

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 738**

51 Int. Cl.:

C07D 419/02 (2006.01)
C09B 23/01 (2006.01)
C09B 23/02 (2006.01)
C09B 23/08 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2006 PCT/US2006/034604**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2007 WO07028163**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2006 E 06802988 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 1937676**

54 Título: **Agentes de formación de imágenes fluorescentes biocompatibles**

30 Prioridad:

02.09.2005 US 714075 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.05.2017

73 Titular/es:

**VISEN MEDICAL, INC. (100.0%)
940 Winter Street
Waltham MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**RAJOPADHYE, MILIND y
GROVES, KEVIN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 612 738 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

Agentes de formación de imágenes fluorescentes biocompatibles

5 Antecedentes de la invención

10 Las longitudes de onda del infrarrojo cercano (aprox. 600-1.000 nm) se han usado en la formación de imágenes ópticas de los tejidos internos, porque la radiación del infrarrojo cercano presenta una penetración en el tejido de hasta 15 centímetros. Véase, por ejemplo, Wyatt, 1997, "Cerebral oxygenation and haemodynamics in the fetus and newborn infant", *Phil. Trans. R. Soc. Londres B* 352:701-706; y Tromberg *et al.*, 1997, "Non-invasive measurements of breast tissue optical properties using frequency-domain photo migration," *Phil. Trans. R. Soc. Londres B* 352:661-667.

15 Las ventajas de la formación de imágenes en el infrarrojo cercano con respecto a otras técnicas clínicas de formación de imágenes usadas en la actualidad son las siguientes: posibilidad de usar de manera simultánea múltiples sondas distinguibles (importante en la formación de imágenes moleculares); alta resolución temporal (importante en la formación de imágenes funcionales); alta resolución espacial (importante en la microscopía *in vivo*); y seguridad (radiación no ionizante).

20 En la formación de imágenes de fluorescencia en el infrarrojo cercano, se usa la luz filtrada o un láser con un ancho de banda definido como fuente de luz de excitación. La luz de excitación viaja a través de los tejidos corporales. Cuando se encuentra con una molécula fluorescente en el infrarrojo cercano ("agente de contraste" o "sonda"), la luz de excitación se absorbe. Entonces, el fluoróforo emite luz que tiene diferentes propiedades de forma detectable (es decir, propiedades espectrales de la sonda (longitud de onda un poco más larga), por ejemplo, fluorescencia) con respecto a la luz de excitación.

25 Se considera que los documentos EP1065250 y WO 00/16810 representan la técnica anterior más cercana, y cada uno de ellos desvela compuestos fluorescentes que incluyen fluoróforos. El documento EP1065250 desvela compuestos fluorescentes para su uso en diodos de emisión de luz. El documento WO 00/16801 desvela compuestos para su uso como un agente de contraste fluorescente en el infrarrojo cercano.

Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona un compuesto fluoróforo según lo reivindicado en la reivindicación 1.

Las reivindicaciones dependientes exponen las características de ciertas realizaciones preferidas de la invención.

40 La invención se basa en el diseño de compuestos que son capaces de ser absorbidos por, retenidos por o unidos a una molécula biocompatible para formar una construcción de formación de imágenes *in vivo*. Los compuestos de la invención se basan en un fluoróforo de fórmula T-F, en la que T es una fracción orgánica que contiene fracciones aromáticas, incluyendo fracciones de fenilo y fracciones heterocíclicas; y F es un fluorocromo de carbocianina. La invención también se basa en las aplicaciones de estos fluoróforos para aplicaciones de formación de imágenes *in vivo*.

45 En otra realización, la presente invención es un método de formación de imágenes ópticas *in vivo*, comprendiendo el método:

- 50 (a) administrar a un sujeto un compuesto de la presente invención;
 (b) dejar al compuesto tiempo para unirse a una molécula biocompatible y formar un agente de formación de imágenes *in vivo*;
 (c) iluminar el sujeto con luz de una longitud de onda absorbible por el fluoróforo; y
 (e) detectar la señal óptica emitida por el fluoróforo.

55 Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 es una imagen de fluorescencia de un compuesto de la presente invención en tumores de un ratón NU/NU hembra (6-8 semanas de vida) tras 24 horas en un sistema de reflectancia de la fluorescencia (FRI, Kodak 2000MM).

60 Descripción detallada de la invención

A continuación, se presenta una descripción de las realizaciones preferidas de la invención.

65 La invención se basa en el diseño de compuestos (fluoróforos) que son capaces de ser absorbidos por, retenidos por o unidos a una molécula biocompatible para formar una construcción de formación de imágenes *in vivo*.

El término "compuestos", como se usa en el presente documento, se refiere a "fluorocromos de polimetina", "fluorocromos", "colorantes fluorescentes", "colorantes de cianina", "colorantes de carbocianina" y "colorantes" de la presente invención. Estos términos se usan indistintamente para referirse a los compuestos de la presente invención.

5 En un aspecto de la invención, el compuesto (fluoróforo) de la presente invención comprende una fracción de dirección a una biomolécula que permite que el fluoróforo se una químicamente a la biomolécula (molécula biocompatible) (B). En una realización, T es una fracción de dirección a una biomolécula. Como se usan en el presente documento, el término "biomolécula" y la expresión "molécula biocompatible" se pueden usar indistintamente para representar (B).

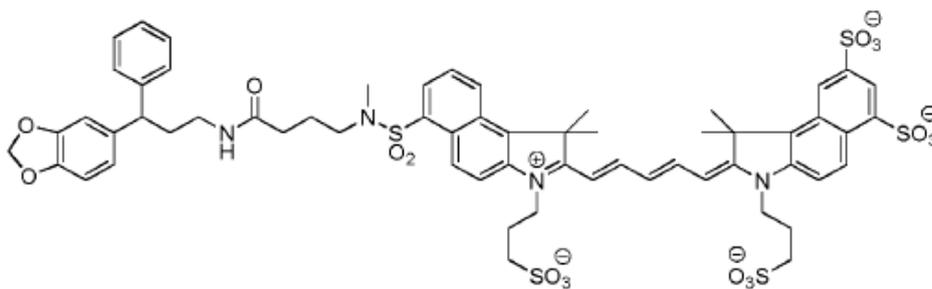
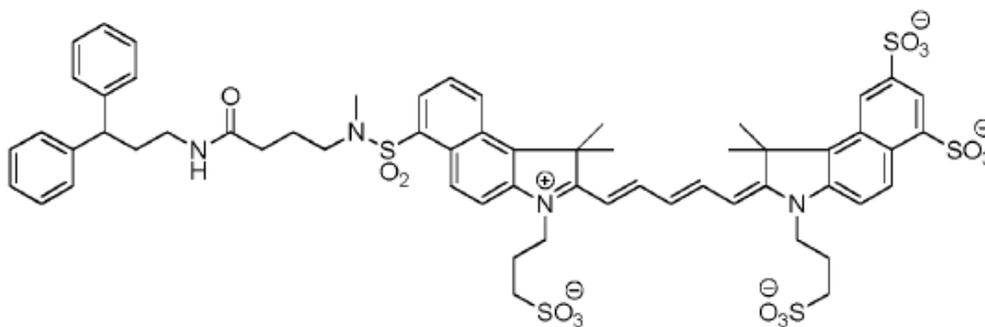
10 En ciertas realizaciones, una fracción de dirección a una biomolécula es una fracción que se unirá químicamente por sí misma, o hará que el compuesto (fluoróforo) se una químicamente, o hará que la combinación de la fracción de dirección a una biomolécula y el compuesto (fluoróforo) se una químicamente a una biomolécula.

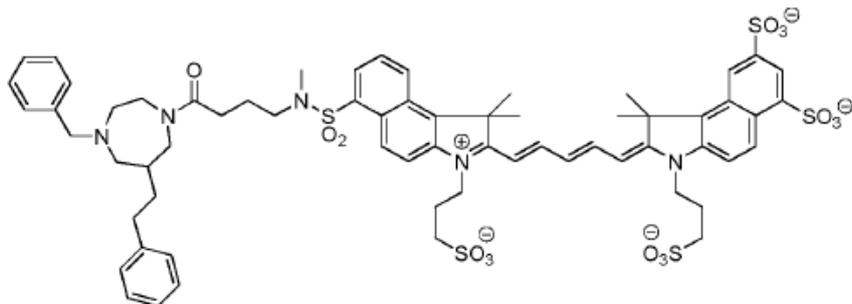
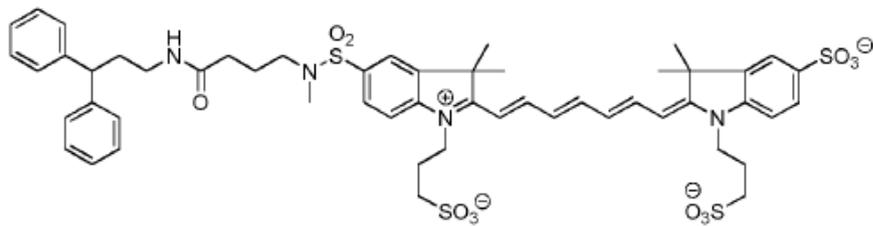
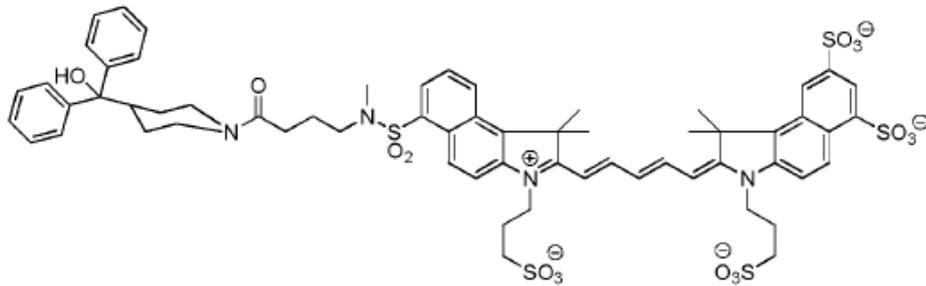
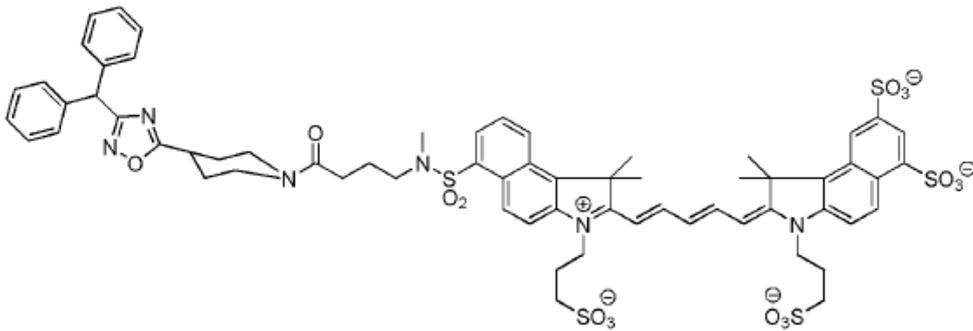
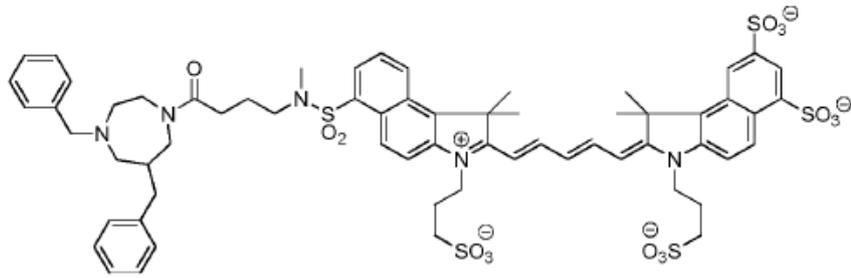
15 En otro aspecto de la invención, la intensidad de la fluorescencia del fluoróforo se potencia cuando se enlaza químicamente a una biomolécula (molécula biocompatible) (B). En ciertas realizaciones de la presente invención, cuando B se enlaza químicamente a un compuesto de la presente invención, la fluorescencia (intensidad de la fluorescencia) del compuesto de la presente invención se potencia. En ciertas realizaciones, la fluorescencia se potencia en aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 50 % o más del aproximadamente 50 %, en comparación con el compuesto no enlazado.

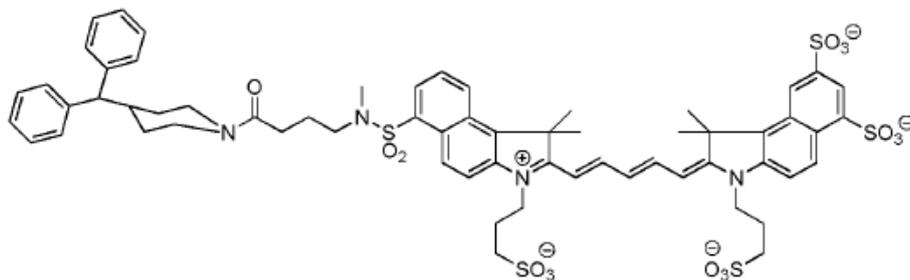
20 "Enlazado químicamente" significa conectado por una fuerza de atracción entre átomos lo suficientemente fuerte como para permitir que el agregado combinado funcione como una unidad. Esto incluye, pero sin limitación, enlaces químicos tales como enlaces covalentes, enlaces no covalentes tales como enlaces iónicos, enlaces metálicos y enlaces de puentes, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals. Esto también incluye la reticulación o el enjaulamiento.

25 En un aspecto, la invención se dirige a los siguientes compuestos:

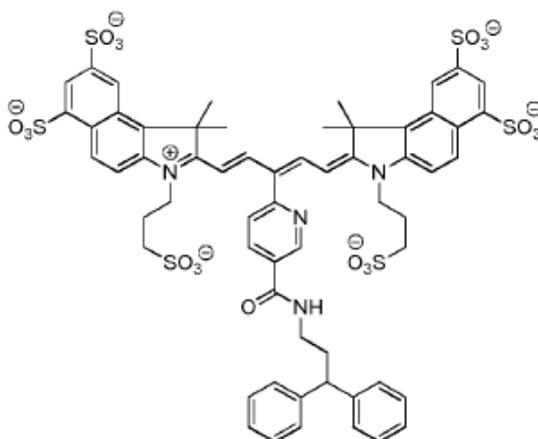
30







y



5 y a sales de los mismos.

Un "fluoróforo" incluye, pero sin limitación, un fluorocromo, un fluoróforo no fluorocromo, un desactivador de la fluorescencia, un fluoróforo de absorción, un fluoróforo, cualquier colorante orgánico o inorgánico, un quelato de metal o cualquier sustrato enzimático fluorescente, incluyendo sustratos enzimáticos activables por proteasas.

10 Una "molécula biocompatible" o una "biomolécula" es una molécula que es compatible con un entorno biológico y a la que se pueden unir una o más moléculas de fluoróforo (enlazarse químicamente). Las biomoléculas endógenas incluyen, pero sin limitación, albúmina, transferrina, proteínas de unión a ácidos grasos, globulinas, glóbulos rojos, linfocitos, células mare u otras células, anticuerpos y lipoproteínas.

15 "Unido" pretende significar conectado por cualquier fuerza de atracción entre átomos lo suficientemente fuerte como para permitir que el agregado combinado funcione como una unidad. Esto incluye, pero sin limitación, enlaces covalentes, enlaces no covalentes tales como enlaces iónicos, enlaces metálicos y enlaces de puentes, e interacciones hidrófobas e interacciones de van der Waals.

20 En ciertas realizaciones, la presente invención se dirige a compuestos (fluoróforos) con longitudes de onda de excitación y emisión en el espectro del rojo e infrarrojo cercano en el intervalo de 550 a 1.300 o de 400 a 1.300 nm o de aproximadamente 440 y aproximadamente 1.100 nm, entre aproximadamente 550 y aproximadamente 800 nm, entre aproximadamente 500 y aproximadamente 900 nm o entre aproximadamente 600 y aproximadamente 900 nm, y conjugados de los mismos. El uso de esta parte del espectro electromagnético aumenta al máximo la penetración en el tejido y reduce al mínimo la absorción por absorbentes fisiológicamente abundantes tales como la hemoglobina (< 650 nm) y el agua (> 1.200 nm). Se apreciará que los fluorocromos con longitudes de onda de excitación y emisión en otros espectros, tales como el espectro de luz visible y ultravioleta, también se pueden emplear en los compuestos (las composiciones) y los métodos de la presente invención.

30 En cierta realización, los compuestos (fluoróforos del infrarrojo cercano) de la presente invención que son adecuados para su uso *in vivo*, en general, presentan una o más de las siguientes características: (1) características espectrales limitadas; (2) alta sensibilidad (rendimiento cuántico); (3) biocompatibilidad; y (4) espectros de absorción y excitación desacoplados.

35 Se apreciará que el uso de fluoróforos con longitudes de onda de excitación y emisión en otros espectros tales como el espectro de la luz visible y ultravioleta, también se puede emplear en los compuestos (las composiciones) y los métodos de la presente divulgación.

Hay diversos fluoróforos del infrarrojo cercano disponibles en el mercado y que se pueden usar en los compuestos (sondas o fluoróforos, es decir, compuestos de fórmula (1): T-F, en la que F es el fluoróforo disponible en el mercado) de la presente divulgación. Los fluoróforos ilustrativos incluyen los siguientes: Cy5.5, Cy5 y Cy7 (Amersham, Arlington Hts., Ill.); IRD41 e IRD700 (LI-COR, Lincoln, Nebr.); NIR-1 y 1C5-OSu, (Dejindo, Kumamoto, Japón); Alexflour 660, Alexflour 680 (Molecular Probes, Eugene, Oreg.), LaJolla Blue (Diatron, Miami, Fla.); FAR-Blue, FAR-Green One y FAR-Green Two (Innosense, Giacosa, Italia), ADS 790-NS y ADS 821-NS (American Dye Source, Montreal, Canadá), verde de indocianina (ICG) y sus análogos (Licha, *et al.*, 1996, SPIE 2927:192-198; Ito *et al.*, patente de EE.UU. n.º 5.968.479); indocianinas descritas en la patente de EE.UU. n.º 6.448.008 (Caputo, 2002), indotricarbocianina (ITC; documento WO 98/47538) y compuestos de lantánidos quelatados. Los metales lantánidos fluorescentes incluyen europio y terbio. Las propiedades de fluorescencia de los lantánidos se describen en Lackowicz, 1999, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", 2.sup.nd Ed., Kluwar Academic, Nueva York.

Es bien conocido en la técnica que ciertas biomoléculas tales como la albúmina y la transferrina se acumulan en los tumores sólidos y se pueden usar como vehículos para la administración de agentes de formación de imágenes y agentes terapéuticos a tumores y sitios de inflamación (Becker *et al.* (2000) *Photochem. Photobiol.* 72:234-241; Kremer *et al.* (2000); 22:481-489; Schilling *et al.* (1992) 19:685-695; *Nucl. Med. Biol.* (2001) 28:895-902; Brasseur *et al.* (1999) *Photochem. Photobiol.* 69:345-352; Gatter *et al.* (1983) *J. Clin. Path.* 36:539-545; Hamlin y Newman (1994) 26:45-56; Rennen *et al.* (2001) 28:401-408). Esto se debe, en parte, a la alta densidad y al aumento de la permeabilidad de la vasculatura dentro de muchos tumores y sitios de inflamación. (Matsumura y Maeda (1986) *Cancer Res.* 46:6387-6392). Por lo tanto, en muchas afecciones patológicas tales como tumores, inflamación y placas arterioscleróticas, en las que los capilares son "filtrantes", hay altas concentraciones locales de albúmina.

En virtud de dicha acumulación, los fluoróforos de la presente invención se pueden usar para formar imágenes de los tejidos tumorales y los sitios de inflamación. Por lo tanto, los métodos de la invención se pueden usar, por ejemplo, para determinar la presencia de células tumorales y la ubicación de las células tumorales, la presencia y la ubicación de la inflamación, la presencia y la ubicación de la enfermedad vascular incluyendo las zonas con riesgo de oclusión aguda (placas vulnerables) de las arterias coronarias y periféricas, y las regiones de aneurismas en expansión. Como alternativa, dicha acumulación también se puede aprovechar para administrar fluoróforos específicos que sean sustratos enzimáticos, para indagar en las enzimas relativamente más específicas de las enfermedades.

En una realización, la invención presenta una construcción de formación de imágenes que comprende un fluoróforo que se ha diseñado para unirse a una molécula biocompatible endógena. El fluoróforo se administra al sujeto, y se produce la unión del fluoróforo a la molécula biocompatible *in situ in vivo*. Como resultado de la unión a la molécula biocompatible, el fluoróforo tiene una intensidad de señal más brillante en comparación con el fluoróforo no unido y también adopta algunas de las propiedades biológicas de la fracción endógena de unión al fluoróforo, incluyendo la semivida.

En otra realización, la molécula biocompatible es albúmina. En otra realización, el fluoróforo se puede unir previamente a la molécula biocompatible *ex vivo*. Por ejemplo, el fluoróforo se puede mezclar con albúmina estéril o una solución de sustitución de plasma, e inyectarse la mezcla resultante en el sujeto. Como alternativa, se puede extraer sangre del sujeto, y se puede mezclar el fluoróforo con la sangre del sujeto y volverse a inyectar la mezcla resultante en el sujeto.

Aunque la invención incluye nuevos fluoróforos, los principios generales de la fluorescencia, la adquisición de imágenes ópticas y el procesamiento de imágenes se pueden aplicar en la práctica de la invención. Para una revisión de las técnicas de formación de imágenes ópticas, véase, por ejemplo, Alfano *et al.*, 1997, "Advances in Optical Imaging of Biomedical Media", Ann. NY Acad. Sci., 820:248-270.

Un sistema de formación de imágenes útil en la práctica de la presente invención normalmente incluye tres componentes básicos: (1) una fuente de luz adecuada para la excitación del fluoróforo; (2) un medio de separación o distinción de las emisiones de la luz usada para la excitación del fluoróforo; y (3) una detección sistema.

La fuente de luz proporciona luz del infrarrojo cercano monocromática (o esencialmente monocromática). La fuente de luz puede ser una luz blanca filtrada adecuadamente, es decir, la luz de paso de banda de una fuente de banda ancha. Por ejemplo, la luz de una lámpara halógena de 150 vatios se puede pasar a través de un filtro de paso de banda adecuado disponible en el mercado de Omega Optical (Brattleboro, Vt.). En algunas realizaciones, la fuente de luz es un láser. Véase, por ejemplo, Boas *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91:4887-4891; Ntziachristos *et al.*, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 97:2767-2772; Alexander, 1991, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 9:416-418. En diversas fuentes bien conocidas, se puede encontrar información sobre los láseres del infrarrojo cercano para la formación de imágenes.

Se puede usar un filtro de paso alto o de paso de banda (700 nm) para separar las emisiones ópticas de la luz de excitación. Un filtro de paso alto o de paso de banda adecuado se encuentra disponible en el mercado en Omega Optical.

En general, se puede observar que el sistema de detección de luz incluye un componente de captación de luz/formación de imágenes y un componente de detección de luz/registro de imágenes. Aunque el sistema de detección de luz puede ser un único dispositivo integrado que tenga incorporados ambos componentes, el componente de captación de luz/formación de imágenes y el componente de detección de luz/registro de imágenes se describirán por separado.

Un componente de captación de luz/formación de imágenes particularmente útil es un endoscopio. En la práctica de la invención, se pueden usar los dispositivos endoscópicos y las técnicas endoscópicas que se han usado para la formación de imágenes ópticas *in vivo* de numerosos tejidos y órganos, incluyendo el peritoneo (Gahlen *et al.*, 1999, *J. Photochem. Photobiol.* B 52:131-135), el cáncer de ovario (Major *et al.*, 1997, *Gynecol. Oncol.* 66:122-132), el colon (Mycek *et al.*, 1998, *Gastrointest. Endosc.* 48:390-394; Stepp *et al.*, 1998, "Endoscopy" 30:379-386), conductos biliares (Izuishi *et al.*, 1999, "Hepatogastroenterology" 46:804-807), estómago (Abe *et al.*, 2000, "Endoscopy" 32:281-286), vejiga (Kriegmair *et al.*, 1999, *Urol. Int.* 63:27-31; Riedl *et al.*, 1999, *J. Endourol.* 13:755-759) y cerebro (Ward, 1998, *J. Laser Appl.* 10:224-228).

Otros tipos de componentes de captación de luz útiles en la invención son dispositivos basados en catéteres, incluyendo los dispositivos de fibra óptica. Dichos dispositivos son particularmente adecuados para la formación de imágenes intravasculares. Véase, por ejemplo, Tearney *et al.*, 1997, *Science* 276:2037-2039; *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94:4256-4261.

En la práctica de la invención, se pueden emplear otras tecnologías de formación de imágenes más, incluyendo la tecnología de antenas en fase (Boas *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91:4887-4891; Chance, 1998, *Ann. NY Acad. Sci.* 38:29-45), la tomografía óptica difusa (Cheng *et al.*, 1998, *Optics Express* 3:118-123; Siegel *et al.*, 1999, *Optics Express* 4:287-298), la microscopía intravital (Dellian *et al.*, 2000, *Br. J. Cancer* 82:1513-1518; Monsky *et al.*, 1999, *Cancer Res.* 59:4129-4135; Fukumura *et al.*, 1998, *Cell* 94:715-725) y la formación de imágenes confocales (Korlach *et al.*, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96:8461-8466; Rajadhyaksha *et al.*, 1995, *J. Invest. Dermatol.* 104:946-952; Gonzalez *et al.*, 1999, *J. Med.* 30:337-356), la tomografía molecular de fluorescencia (Ntziachristos V., *Nature Medicine* 8(7), 757-760 (2002). Monet, X., *Cancer Research* 65(14), 6330-6336 (2005), el sistema de formación de imágenes IVIS®, el SoftScan® y el sistema eXplore Optix™.

En la invención, se puede usar cualquier componente de detección de luz/formación de imágenes adecuado, por ejemplo, sistemas de dispositivo acoplado a carga (CCD) o película fotográfica. La elección de la detección de luz/registro de imágenes dependerá de factores que incluyen el tipo de componente de captación de luz/formación de imágenes que se esté usando. La selección de los componentes adecuados, el montaje de los mismos en un sistema de formación de imágenes en el infrarrojo cercano y el funcionamiento del sistema pertenece al alcance de la técnica.

Los compuestos (fluoróforos) de la presente invención y las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por vía oral, parenteral, por inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. La expresión "administración parenteral" incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial, intraarticular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intraperitoneal, intracisternal, intrahepática, intralesional, inyección intracraneal e intralinfática o técnicas de infusión. Los fluoróforos de la presente invención también se pueden administrar a través de catéteres o por medio de una aguja a un tejido.

En una realización, se administra una cantidad eficaz (que es una cantidad eficaz para causar o aumentar la fluorescencia) de los compuestos de la presente invención. En una realización, se administran entre aproximadamente 1 ng/kg y aproximadamente 100 mg/kg, entre aproximadamente 100 ng/kg y 10 mg/kg, entre aproximadamente 1 µg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, entre aproximadamente 10 µg/kg y aproximadamente 2 mg/kg, entre aproximadamente 50 µg/kg y aproximadamente 1 mg/kg del compuesto de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención pueden tener uno o más protones suficientemente ácidos que pueden reaccionar con una base orgánica o inorgánica adecuada para formar una sal de adición de base. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de bases inorgánicas, tales como hidróxidos de amonio, o de metales alcalinos o alcalinotérreos, carbonatos, bicarbonatos y similares, y bases orgánicas tales como alcóxidos, alquilamidas, alquilaminas y arilaminas, y similares. Dichas bases útiles para preparar las sales de la presente invención incluyen, por tanto, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio y similares.

Los compuestos de la presente invención que tienen un grupo suficientemente básico, tal como una amina, pueden reaccionar con un ácido orgánico o inorgánico para formar una sal de adición de ácido. Los ácidos empleados comúnmente para formar sales de adición de ácido a partir de compuestos con grupos básicos son ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido *p*-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido *p*-bromofenil-sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético, y similares. Los ejemplos de dichas sales incluyen las sales de sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato,

decanoato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butin-1, 4-dioato, hexin-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, gamma-hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftaleno-1-sulfonato, naftaleno-2-sulfonato, mandelato y similares.

El término "alquilo", como se usa en el presente documento, significa un hidrocarburo saturado de cadena lineal, ramificado o cíclico. Cuando es de cadena lineal o ramificado, un grupo alquilo es normalmente C1-C20, más normalmente C1-C10; cuando es cíclico, un grupo alquilo es normalmente C3-C12, más normalmente C3-C7. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo y 1,1-dimetilhexilo.

Un "grupo alifático" es no aromático, y puede contener opcionalmente una o más unidades de insaturación, por ejemplo, dobles y/o triples enlaces. Un grupo alifático puede ser de cadena lineal o ramificado, y normalmente contiene entre 1 y 12 átomos de carbono, más normalmente entre 1 y 6 átomos de carbono, e incluso más normalmente entre 1 y 4 átomos de carbono. Opcionalmente, se pueden reemplazar uno o más grupos metileno de un grupo alifático por O, S o NH.

Como se usa en el presente documento, el anillo carbocíclico no aromático o el anillo heterocíclico no aromático cuando se usa solo o como parte de una fracción mayor se refiere a un anillo no aromático que contiene carbonos o heteroátomos que puede estar saturado o contener una o más unidades de insaturación, que tiene de tres a catorce átomos incluyendo anillos monocíclicos y policíclicos, pudiendo estar el anillo carbocíclico o heterocíclico condensado a uno o más anillos carbocíclicos o heterocíclicos no aromáticos, o a uno o más anillos (carbocíclicos o heterocíclicos) aromáticos.

El término "alcoxi", como se usa en el presente documento, está representado por -OR**, en el que R** es un grupo alquilo como se ha definido anteriormente.

El término "carbonilo", como se usa en el presente documento, está representado por -C(=O)R **, en el que R** es un grupo alquilo como se ha definido anteriormente.

La expresión "grupo aromático" incluye anillos aromáticos carbocíclicos y anillos de heteroarilo. La expresión "grupo aromático" se puede usar indistintamente con los términos "arilo", "anillo arilo", "anillo aromático", "grupo arilo" y "grupo aromático".

Los grupos de anillo aromático carbocíclico solo tienen átomos de carbono de anillo (normalmente, de seis a catorce) e incluyen anillos aromáticos monocíclicos tales como fenilo y sistemas de anillos aromáticos policíclicos condensados en los que un anillo aromático carbocíclico está condensado a uno o más anillos aromáticos (carbocíclicos aromáticos o heteroaromáticos). Los ejemplos incluyen 1-naftilo, 2-naftilo, 1-antracilo y 2-antracilo. También se incluye dentro del alcance de la expresión "anillo aromático carbocíclico", como se usa en el presente documento, un grupo en el que un anillo aromático está condensado a uno o más anillos no aromáticos (carbocíclicos o heterocíclicos), tales como en un indanilo, ftalimidilo, naftimidilo, fenantridinilo o tetrahidronaftilo.

El término "heteroarilo", "heteroaromático", "anillo heteroarilo", "grupo heteroarilo" y "grupo heteroaromático", usado solo o como parte de una fracción mayor como en "heteroaralquilo", se refiere a grupos de anillos heteroaromáticos que tienen de cinco a catorce miembros, incluyendo anillos heteroaromáticos monocíclicos y anillos aromáticos policíclicos en los que un anillo aromático monocíclico está condensado a uno o más otros anillos aromáticos (carbocíclicos o heterocíclicos). Los grupos heteroarilo tienen uno o más heteroátomos en el anillo. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen 2-furanilo, 3-furanilo, *N*-imidazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 5-imidazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, oxadiazolilo, oxadiazolilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo, *N*-pirazolilo, 3-pirazolilo, 4-pirazolilo, 5-pirazolilo, *N*-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, triazolilo, tetrazolilo, 2-tienilo, 3-tienilo, carbazolilo, benzotienilo, benzofuranilo, indolilo, quinolinilo, benzotiazol, benzoxazol, bencimidazolilo, isoquinolinilo e isoindolilo. También se incluye dentro del alcance del término "heteroarilo", como se usa en el presente documento, un grupo en el que un anillo aromático está condensado a uno o más anillos no aromáticos (carbocíclicos o heterocíclicos).

La expresión "grupo heterocíclico no aromático" usado solo o como parte de una fracción mayor se refiere a grupos de anillo heterocíclico no aromático que tiene de tres a catorce miembros, incluyendo los anillos heterocíclicos monocíclicos y los anillos policíclicos, en los que un anillo monocíclico está condensado con uno o más otros anillos carbocíclicos o heterocíclicos no aromáticos, o anillos aromáticos (carbocíclicos o heterocíclicos). Los grupos heterocíclicos tienen uno o más heteroátomos en el anillo, y pueden estar saturados o contener una o más unidades de insaturación. Los ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen piperidinilo, piperizinilo, pirrolidinilo, pirazolidinilo, imidazolidinilo, tetrahidroquinolinilo, inodolinilo, isoindolinilo, tetrahidrofuranilo, oxazolidinilo, tiazolidinilo, dioxolanilo, ditiolanilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, azepanilo y azetidínilo.

El término "heteroátomo" significa nitrógeno, oxígeno o azufre, e incluye cualquier forma oxidada de nitrógeno y azufre, y la forma cuaternizada de cualquier nitrógeno básico. Además, el término "nitrógeno" incluye un nitrógeno sustituible de un grupo heteroarilo o heterocíclico no aromático. Como ejemplo, en un anillo saturado o parcialmente insaturado que tiene de 0 a 3 heteroátomos seleccionados entre oxígeno, azufre o nitrógeno, el nitrógeno puede ser N (como en 3,4-dihidro-2H-pirrolilo), NH (como en pirrolidinilo) o NR" (como en pirrolidinilo sustituido en N), en el que R" es un sustituyente adecuado para el átomo de nitrógeno en el anillo de un grupo heterocíclico no aromático que contiene nitrógeno, tal como se define a continuación. Preferentemente, el nitrógeno no está sustituido.

Un grupo arilo sustituido como se define en el presente documento contiene uno o más átomos del anillo sustituibles, tales como átomos de carbono o de nitrógeno del anillo. Los ejemplos de sustituyentes adecuados en un átomo de carbono del anillo sustituible de un grupo arilo o alifático incluyen halógeno (por ejemplo, -Br, Cl, I y F), -OH, alquilo C₁-C₄, haloalquilo C₁-C₄, -NO₂, alcoxi C₁-C₄, haloalcoxi C₁-C₄, -CN, -NH₂, alquilamino C₁-C₄, dialquilamino C₁-C₄, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₄), -C(O)(alquilo C₁-C₄), -OC(O)(alquilo C₁-C₄), -OC(O)(arilo), -OC(O)(arilo sustituido), -OC(O)(aralquilo), -OC(O)(aralquilo sustituido), -NHC(O)H, -NHC(O)(alquilo C₁-C₄), -C(O)N(alquilo C₁-C₄)₂, -NHC(O)O(alquilo C₁-C₄), -C(O)OH, -C(O)O(alquilo C₁-C₄), -NHC(O)NH₂, -NHC(O)NH(alquilo C₁-C₄), -NHC(O)N(alquilo C₁-C₄)₂, -NH-C(=NH)NH₂, -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo C₁-C₃), -SO₂N(alquilo C₁-C₃)₂, NHSO₂H, NHSO₂(alquilo C₁-C₄) y arilo. Los sustituyentes preferidos en los grupos arilo son como se definen a lo largo de la memoria descriptiva.

Los ejemplos de sustituyentes adecuados en un átomo de nitrógeno del anillo sustituible de un grupo arilo incluyen alquilo C₁-C₄, NH₂, alquilamino C₁-C₄, dialquilamino C₁-C₄, -C(O)NH₂, -C(O)NH(alquilo C₁-C₄), -C(O)(alquilo C₁-C₄), -CO₂R**, -C(O)C(O)R**, -C(O)CH₃, -C(O)OH, -C(O)O(alquilo C₁-C₄), -SO₂NH₂, -SO₂NH(alquilo C₁-C₃), -SO₂N(alquilo C₁-C₃)₂, NHSO₂H, NHSO₂(alquilo C₁-C₄), -C(=S)NH₂, -C(=S)NH(alquilo C₁-C₄), -C(=S)N(alquilo C₁-C₄)₂, -C(=NH)-N(H)₂, -C(=NH)-NH(alquilo C₁-C₄) y -C(=NH)-N(alquilo C₁-C₄)₂.

Los grupos alquilo, heterocíclicos o carbocíclicos no aromáticos, alifáticos, como se definen en el presente documento contienen uno o más sustituyentes. Los ejemplos de sustituyentes adecuados para un grupo alquilo incluyen los enumerados anteriormente para un carbono sustituible de un arilo y alifático, y los siguientes: =O, =S, =NNHR**, =NN(R**)2, =NNHC(O)R**, =NNHCO₂(alquilo), =NNHSO₂(alquilo), =NR**, grupo cicloalquilo espiral o grupo cicloalquilo condensado. R**, en cada aparición, es independientemente alquilo -H o alquilo C₁-C₆. Los sustituyentes preferidos en los grupos alquilo, heterocíclicos o carbocíclicos no aromáticos, alifáticos, son como se definen a lo largo de la memoria descriptiva.

Aplicaciones y métodos de diagnóstico y enfermedades

Los métodos de la invención se pueden usar para determinar una serie de indicaciones, incluyendo el seguimiento de la ubicación de los fluoróforos y los agentes formadores de imágenes resultantes en el sujeto a lo largo del tiempo, o la evaluación de los cambios o de las alteraciones en el metabolismo y/o la excreción de las moléculas en el sujeto a lo largo del tiempo. Los métodos también se pueden usar para seguir la terapia de dichas enfermedades mediante formación de imágenes moleculares y vías biológicas moduladas por dicha terapia, incluyendo, pero sin limitación, la determinación de la eficacia, el momento óptimo, los niveles de dosificación óptimos (incluso para pacientes o sujetos de ensayo individuales) y los efectos sinérgicos de las combinaciones de la terapia.

La invención se puede usar para ayudar a un médico o cirujano a identificar y caracterizar zonas de enfermedad tales como artritis, cáncer y, específicamente, pólipos en el colon o placa vulnerable, para distinguir el tejido enfermo del tejido normal, tal como la detección de los márgenes del tumor que son difíciles de detectar usando un microscopio de funcionamiento ordinario, por ejemplo, en la cirugía del cerebro, para ayudar a dictar una intervención terapéutica o quirúrgica, por ejemplo, mediante la determinación de si una lesión es cancerosa y se debe extirpar o no es cancerosa y se ha de dejar, o en la determinación de la fase o evaluación quirúrgicamente de una enfermedad, por ejemplo, la determinación intraoperatoria de la fase del ganglio linfático, la cartografía del ganglio linfático centinela o la evaluación del sangrado intraoperatorio.

Los métodos de la invención también se pueden usar en la detección, caracterización y/o determinación de la ubicación de una enfermedad, especialmente, una enfermedad temprana, de la gravedad de una enfermedad o de una afección asociada a la enfermedad, la determinación de la fase de una enfermedad, y el seguimiento y la dirección de diversas intervenciones terapéuticas, tales como procedimientos quirúrgicos, y el seguimiento de la terapia con medicamentos, incluyendo las terapias basadas en células. Los métodos de la invención también pueden usarse en el pronóstico de una enfermedad o de una afección patológica. Los ejemplos de dicha enfermedad o de dichas afecciones patológicas incluyen inflamación (por ejemplo, la inflamación causada por la artritis, por ejemplo, artritis reumatoide), cáncer (por ejemplo, cáncer colorrectal, de ovario, de pulmón, de mama, de próstata, cervical, de piel, cerebral, gastrointestinal, de boca, de esófago, óseo), enfermedad cardiovascular (por ejemplo, aterosclerosis y afecciones inflamatorias de los vasos sanguíneos, isquemia, apoplejía, trombosis), enfermedades dermatológicas (por ejemplo, sarcoma de Kaposi, soriasis), enfermedades oftálmicas (por ejemplo, degeneración macular, retinopatía diabética), enfermedades infecciosas (por ejemplo, infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias, incluyendo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida), enfermedad inmunológica (por ejemplo, un trastorno autoinmune, linfoma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes mellitus),

enfermedad del sistema nervioso central (por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa tal como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer), enfermedades hereditarias, enfermedades metabólicas, enfermedades ambientales (por ejemplo, envenenamiento con plomo, con mercurio y radiactivo, cáncer de piel), y enfermedades relacionadas con los huesos (por ejemplo, osteoporosis, tumores óseos primarios y metastásicos, artrosis). Por lo tanto, los métodos de la invención se pueden usar, por ejemplo, para determinar la presencia de células tumorales y la ubicación de las células tumorales, la presencia y la ubicación de la inflamación, incluyendo la presencia de macrófagos activados, por ejemplo, en la aterosclerosis o la artritis, la presencia y la ubicación de la enfermedad vascular incluyendo las zonas con riesgo de oclusión aguda (es decir, placas vulnerables) en las arterias coronarias y periféricas, las regiones de aneurismas en expansión, la placa inestable en las arterias carótidas y las zonas isquémicas. Los métodos y los compuestos (las composiciones) de la invención también se pueden usar en la identificación y la evaluación de la apoptosis, necrosis, hipoxia y angiogénesis.

Las modalidades de formación de imágenes ópticas y de técnicas de medición incluyen, pero sin limitación, la formación de imágenes de fluorescencia; endoscopia; endoscopia de fluorescencia; tomografía de coherencia óptica; formación de imágenes de transmitancia; formación de imágenes de transmitancia resuelta en el tiempo; formación de imágenes confocal; microscopía no lineal; formación de imágenes fotoacústica; formación de imágenes acústica-óptica; espectroscopia; espectroscopia de reflectancia; formación de imágenes intravital; formación de imágenes dos fotones; interferometría; interferometría de coherencia; tomografía óptica difusa y tomografía molecular de fluorescencia, y la medición de la dispersión de la luz, absorción, polarización, luminiscencia, duración de la fluorescencia, rendimiento cuántico y desactivación.

Los compuestos (las composiciones) y los métodos de la presente invención se pueden usar en combinación con otras composiciones y métodos de formación de imágenes. Por ejemplo, los métodos de la presente invención se pueden usar en combinación con otras modalidades de formación de imágenes tradicionales tales como rayos X, tomografía computarizada (CT), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de fotón único (SPECT) y formación de imágenes por resonancia magnética (MRI). Por ejemplo, los compuestos (las composiciones) y los métodos de la presente invención se pueden usar en combinación con la formación de imágenes de TC y RM para obtener información tanto anatómica como biológica de forma simultánea, por ejemplo, mediante el registro conjunto de una imagen de tomografía con una imagen generada por otra modalidad de formación de imágenes. En particular, se prefiere la combinación con MRI o CT, dada la alta resolución espacial de estas técnicas de formación de imágenes. Los compuestos (las composiciones) y los métodos de la presente invención también se pueden usar en combinación con rayos X, CT, PET, SPECT y MR. Los agentes de contraste o compuestos (composiciones) de la presente invención también pueden contener componentes, tales como el yodo, átomos de gadolinio e isótopos radiactivos, que se pueden detectar usando las modalidades de formación de imágenes de CT, PET, SPECT y MR en combinación con las modalidades de formación de imágenes ópticas.

La invención también presenta métodos de formación de imágenes ópticas *in vivo*. En una realización, el método incluye las etapas de: (a) administrar a un sujeto un fluoróforo; (b) dar tiempo al fluoróforo para unirse a la molécula biocompatible *in vivo* y alcanzar el tejido diana; (c) iluminar el tejido diana con luz de una longitud de onda absorbible por el fluoróforo; y (e) detectar la señal óptica emitida por el fluoróforo.

La invención también presenta métodos de formación de imágenes ópticas *in vivo*. En una realización, el método incluye las etapas de: (a) administrar a un sujeto un fluoróforo previamente mezclado con la molécula biocompatible; (b) dejar al fluoróforo y al agente de formación de imágenes resultante tiempo para alcanzar el tejido diana; (c) iluminar el tejido diana con luz de una longitud de onda absorbible por el fluoróforo; y (e) detectar la señal óptica emitida por el fluoróforo.

Estas etapas también se pueden repetir a intervalos predeterminados, permitiendo así la evaluación de la señal emitida de los fluoróforos en un sujeto con el tiempo. La señal emitida puede adoptar la forma de una imagen. El sujeto puede ser un mamífero, incluyendo un ser humano, así como otros modelos animales experimentales tales como *Xenopus*, pez cebra y *C. elegans*.

La divulgación también presenta un método *in vivo* de detección y formación de imágenes de manera selectiva de dos o más fluoróforos simultáneamente. El método incluye administrar a un sujeto dos o más fluoróforos, cuyas propiedades ópticas son distinguibles entre sí. El método, por lo tanto, permite el registro de múltiples hechos o dianas.

Kits

Los compuestos (las composiciones) descritos en el presente documento se pueden envasar como un kit, que puede incluir opcionalmente instrucciones para el uso de los fluorocromos o moléculas fluorescentes biocompatibles en diversas aplicaciones ilustrativas. Los ejemplos no limitantes incluyen kits que contienen, por ejemplo, los compuestos (las composiciones) en forma de polvo o liofilizada, e instrucciones de uso, incluyendo la reconstitución, la información de dosificación y la información de almacenamiento para aplicaciones *in vivo* y/o *in vitro*. Los kits pueden contener opcionalmente recipientes de los compuestos (composiciones) en una forma líquida listos para su uso, o que requieren la mezcla posterior con soluciones para su administración. Para las aplicaciones *in vivo*, el kit

puede contener los compuestos (las composiciones) en una dosis y forma adecuadas para una aplicación particular, por ejemplo, un líquido en un vial, una crema tópica, etc.

5 El kit puede incluir componentes opcionales que ayuden en la administración de la dosis unitaria a los sujetos, tales como viales para la reconstitución de formas en polvo, jeringas para inyección, sistemas de administración intravenosa personalizados, inhaladores, etc. Los kits se pueden suministrar bien en un recipiente que esté provisto de un precinto que sea adecuado para una o varias perforaciones con una aguja hipodérmica (por ejemplo, un cierre hermético de membrana a presión), manteniendo la integridad estéril. Dichos recipientes pueden contener una o varias dosis para el sujeto. Además, el kit de dosis unitaria puede contener componentes personalizados que
10 ayuden en la detección de los compuestos (composiciones) *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, endoscopios especializados, filtros de luz. Los kits también pueden contener instrucciones para la preparación y la administración de los compuestos (composiciones). El kit se puede fabricar como una dosis unitaria de un solo uso para un sujeto, de múltiples usos para un sujeto en particular; o el kit puede contener múltiples dosis adecuadas para la administración a múltiples sujetos ("envasado a granel"). Los componentes del kit se pueden presentar en cajas de
15 cartón, paquetes de blíster, frascos, tubos, y similares.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos.
20

Ejemplos

Los siguientes ejemplos demuestran la síntesis de dichos fluoróforos del infrarrojo cercano. Además, a continuación, se describen los materiales y métodos representativos que pueden usarse en la preparación de los compuestos de
25 la invención. Todos los productos químicos y disolventes (grado reactivo) se usaron como se adquirieron en el mercado sin purificación adicional. La dimetilformamida (DMF), el acetonitrilo, el acetato de trietilamonio y la trietilamina se adquirieron en el mercado. La difenilpropilamina (DPPA) se obtuvo de Aldrich. El resto de productos intermedios se encuentra disponible en Matrix Scientific. Los métodos de HPLC analítica y preparativa utilizados en general son:
30

Columna A: Agilent Zorbax 80 Å, Extend C18, 4,6 x 250 mm (5 µm).

Fase móvil: Acetonitrilo y acetato de trietilamonio 25 mM.

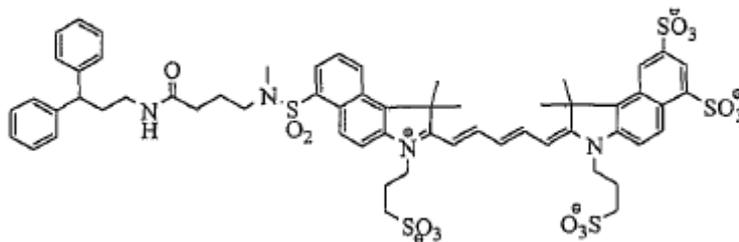
Columna B: Varian Dynamax, 100 Å, C18, 41,4 x 250 mm.

Fase móvil: acetonitrilo y acetato de trietilamonio 25 mM.

35 Columna C: Phenomenex Jupiter, 30 Å, C18.

Fase móvil: acetonitrilo y acetato de trietilamonio 25 mM.

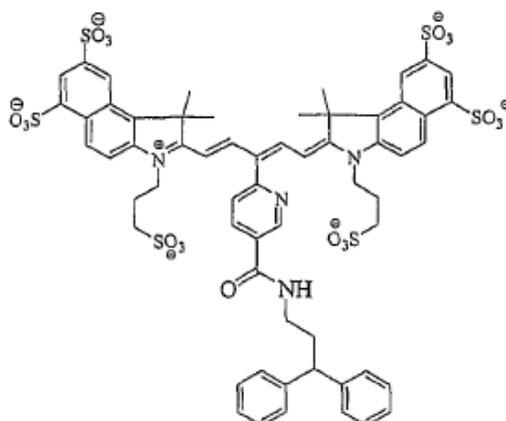
EJEMPLO 1



Síntesis del Ejemplo 1

Se combinaron el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo de la molécula de cianina apropiada (1,1 mg, 1 µmol) y 3,3-difenilpropilamina (1,1 mg, 5 µmol, Aldrich) en 115 µl de DMF anhidra, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora. Se purificó el producto mediante RP-HPLC (acetato de trietilamonio 25 mM, pH 7 con un gradiente de acetonitrilo del 20 % al 85 % durante 20 minutos) y se aisló como un sólido liofilizado. ESI-MS m/e 1.231,32065
45 $[M]^+$ calculado para $C_{59}H_{67}N_4O_{15}S_5^+$, encontrado 1.231,3207.

EJEMPLO 2

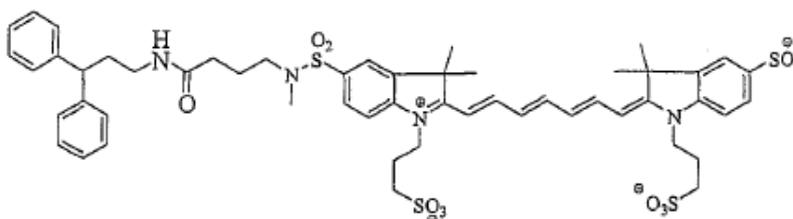


Síntesis del Ejemplo 2

- 5 Se combinaron el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo de la molécula de cianina apropiada (1,1 mg, 1 μ mol) y 3,3-difenilpropilamina (1,1 mg, 5 μ mol, Aldrich) en 200 μ l de DMF anhidra, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora. Se purificó el producto mediante RP-HPLC (acetato de trietilamonio 25 mM, pH 7 con un gradiente de acetonitrilo del 20 % al 85 % durante 20 minutos) y se aisló como un sólido liofilizado. MALDI TOF: calc = 1.077,3; encontrado = 1.077,9.

10

EJEMPLO 3

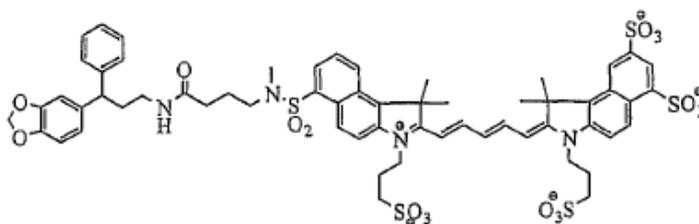


Síntesis del Ejemplo 3

- 15 Se combinaron el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo de la molécula de cianina apropiada (1,0 mg, 1 μ mol) y 3,3-difenilpropilamina (1,1 mg, 5 μ mol, Aldrich) en 200 μ l de DMF anhidra, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora. Se purificó el producto mediante RP-HPLC (acetato de trietilamonio 25 mM, pH 7 con un gradiente de acetonitrilo del 20 % al 85 % durante 20 minutos) y se aisló como un sólido liofilizado. MS m/e: calc = 1.333,2; encontrado = 1.332,9.

20

EJEMPLO 4

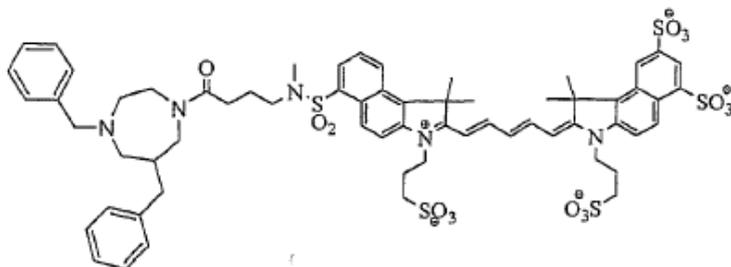


Síntesis del Ejemplo 4

- 25 Se combinaron el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo de la molécula de cianina apropiada (1 μ mol) y 3-benzo[1,3]-dioxol-5-il-3-fenil-propilamina (5 μ mol, Aldrich) en 100 μ l de DMF anhidra, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora. Se purificó el producto mediante RP-HPLC (acetato de trietilamonio 25 mM, pH 7 con un gradiente de acetonitrilo del 20 % al 85 % durante 20 minutos) y se aisló como un sólido liofilizado.

30

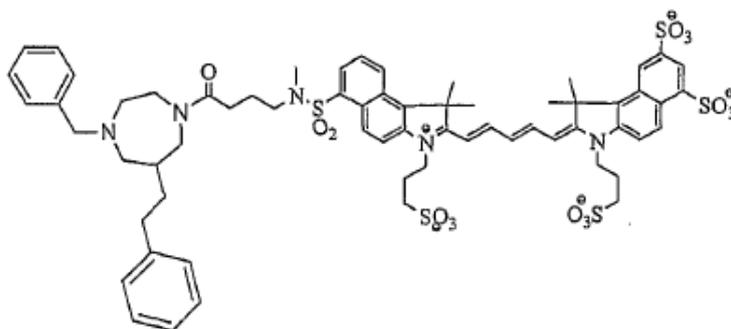
EJEMPLO 5



Síntesis del Ejemplo 5

- 5 Se combinaron el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo de la molécula de cianina apropiada (1 μ mol) y 1,6-dibencil-1,4-diazepano (5 μ mol, Aldrich) en 100 μ l de DMF anhidra, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora. Se purificó el producto mediante RP-HPLC (acetato de trietilamonio 25 mM, pH 7 con un gradiente de acetonitrilo del 20 % al 85 % durante 20 minutos) y se aisló como un sólido liofilizado.

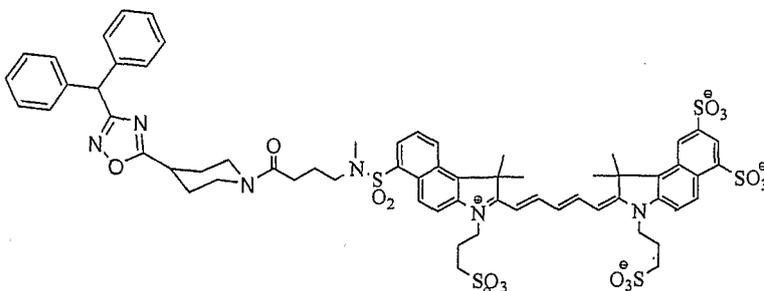
10 EJEMPLO 6



Síntesis del Ejemplo 6

- 15 Se combinaron el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo de la molécula de cianina apropiada (1 μ mol) y 1-bencil-6-fenil-1,4-diazepano (5 μ mol, Aldrich) en 100 μ l de DMF anhidra, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora. Se purificó el producto mediante RP-HPLC (acetato de trietilamonio 25 mM, pH 7 con un gradiente de acetonitrilo del 20 % al 85 % durante 20 minutos) y se aisló como un sólido liofilizado.

EJEMPLO 7

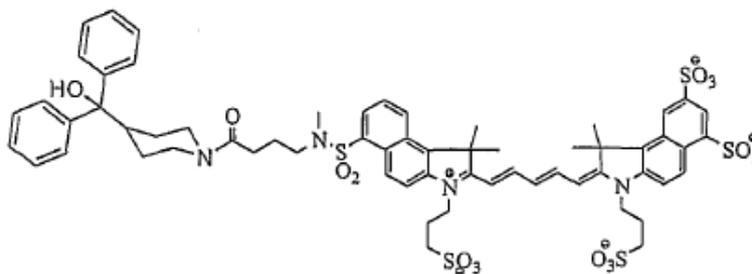


20

Síntesis del Ejemplo 7

- 25 Se combinaron el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo de la molécula de cianina apropiada (1 μ mol) y 4-[3-difenilmetil]-[1,2,4-oxadiazol-5-il]-piperidina (5 μ mol, Aldrich) en 100 μ l de DMF anhidra, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora. Se purificó el producto mediante RP-HPLC (acetato de trietilamonio 25 mM, pH 7 con un gradiente de acetonitrilo del 20 % al 85 % durante 20 minutos) y se aisló como un sólido liofilizado.

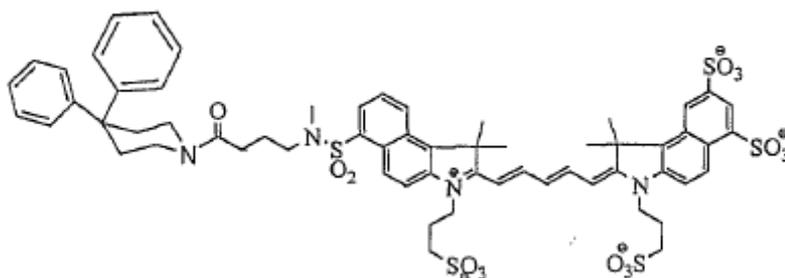
EJEMPLO 8



Síntesis del Ejemplo 8

- 5 Se combinaron el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo de la molécula de cianina apropiada (1 μ mol), clorhidrato de difenil-piperidin-4-il-metanol (5 μ mol, Aldrich) y trietilamina (15 μ mol) en 100 μ l de DMF anhidra, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora. Se purificó el producto mediante RP-HPLC (acetato de trietilamonio 25 mM, pH 7 con un gradiente de acetonitrilo del 20 % al 85 % durante 20 minutos) y se aisló como un sólido liofilizado.

10 EJEMPLO 9



Síntesis del Ejemplo 9

- 15 Se combinaron el éster de *N*-hidroxisuccinimidilo de la molécula de cianina apropiada (1 μ mol), clorhidrato de 4,4-difenil-piperidina (5 μ mol, Aldrich) y trietilamina (15 μ mol) en 100 μ l de DMF anhidra, y se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora. Se purificó el producto mediante RP-HPLC (acetato de trietilamonio 25 mM, pH 7 con un gradiente de acetonitrilo del 20 % al 85 % durante 20 minutos) y se aisló como un sólido liofilizado.

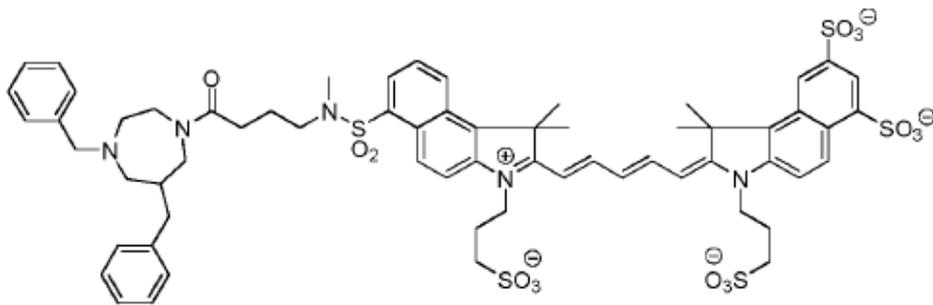
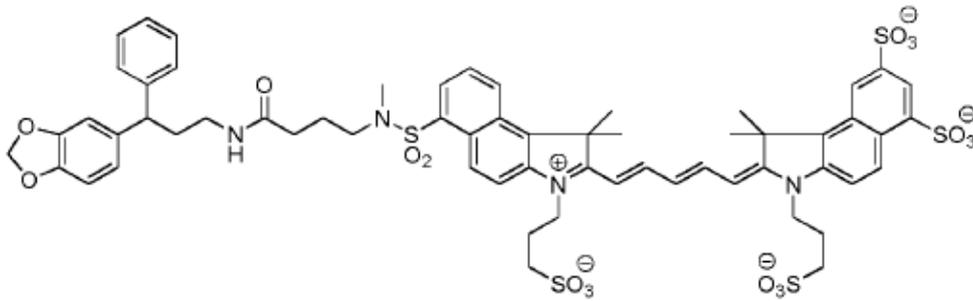
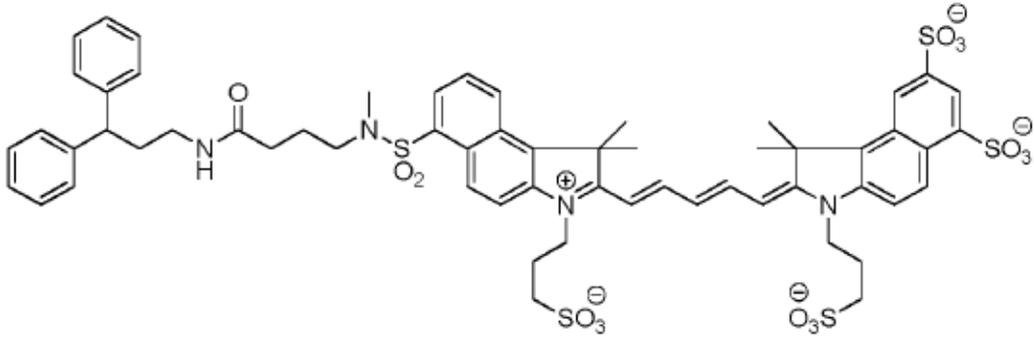
20 EJEMPLO 10

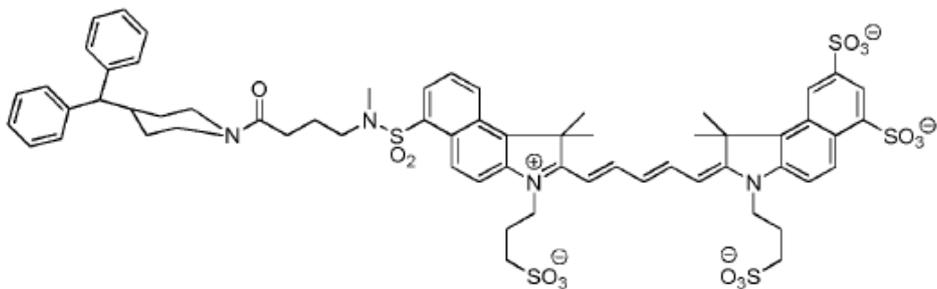
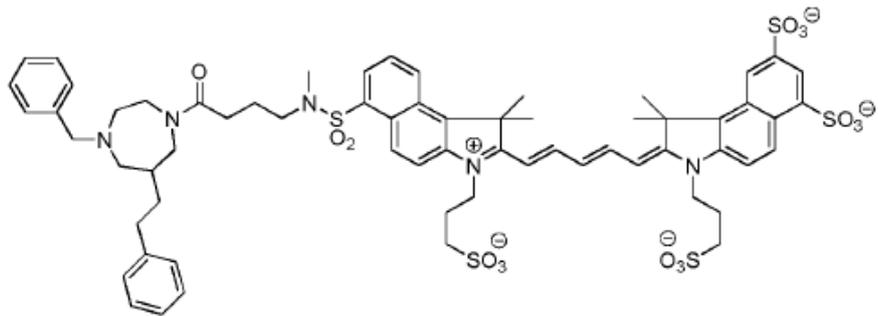
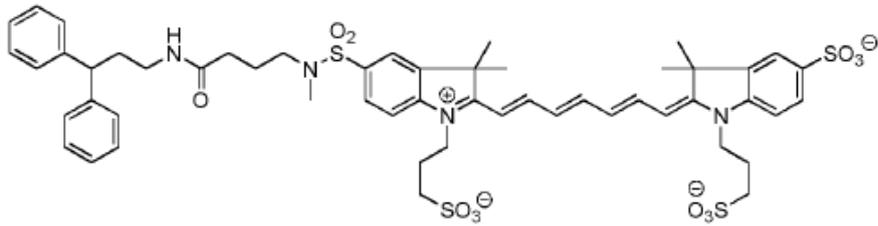
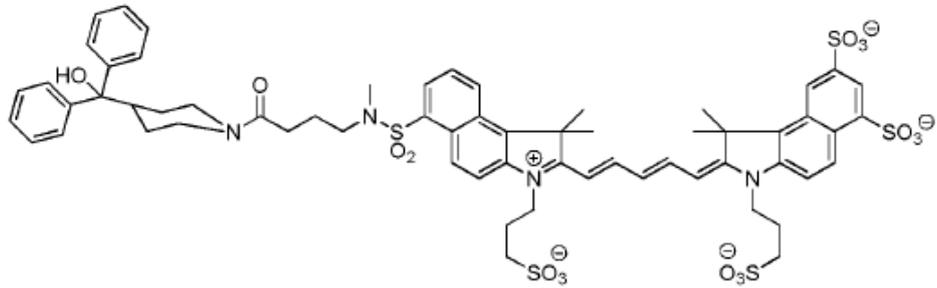
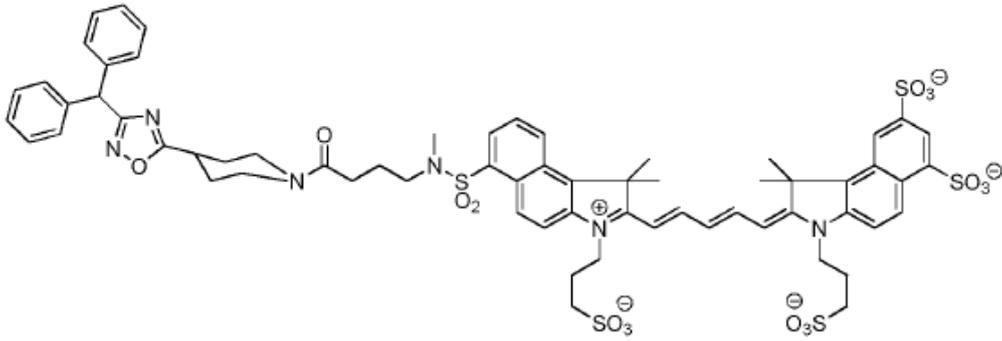
- 20 Se obtuvo la línea celular tumoral HT-29 (carcinoma de colon humano/HTB-38) de la ATCC (Manassas, VA). Se cultivaron células HT-29 en McCoy suplementado con FAS al 10 % a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5 %. Se trataron con tripsina las células en crecimiento exponencial y se volvieron a suspender en solución salina equilibrada de Hank a una concentración de 3 x 10⁷ células/ml. Varios ratones nu/nu hembra de 6-8 semanas de vida (Charles River Laboratory, Wilmington, MA) recibieron mediante inyección por vía subcutánea 3 x 10⁶ células HT-29 bilateralmente en los primeros depósitos de grasa mamaria. Una semana más tarde, cuando los tumores eran de aproximadamente 30 mm³, los ratones recibieron mediante inyección por vía intravenosa la molécula descrita en el Ejemplo 1 (en 150 μ l de 1 x PBS) y, tras 24 horas, se obtuvieron imágenes en un sistema de reflectancia de fluorescencia (FRI, Kodak 2000MM).

30

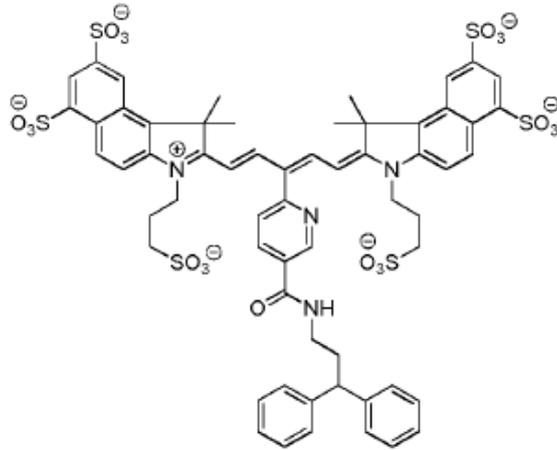
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto fluoróforo seleccionado del grupo que consiste en:



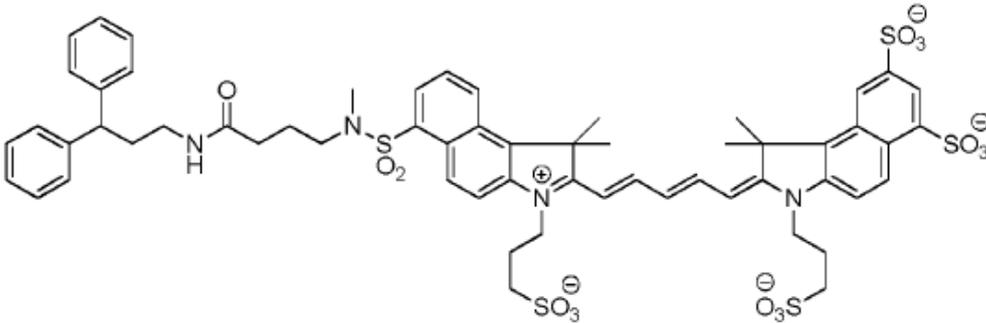


y



o una de sus sales.

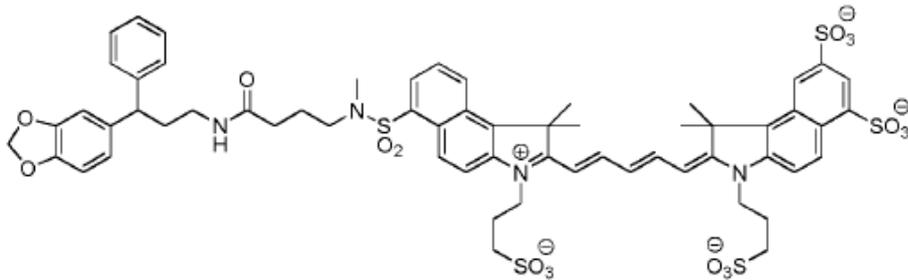
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es



5

o una de sus sales.

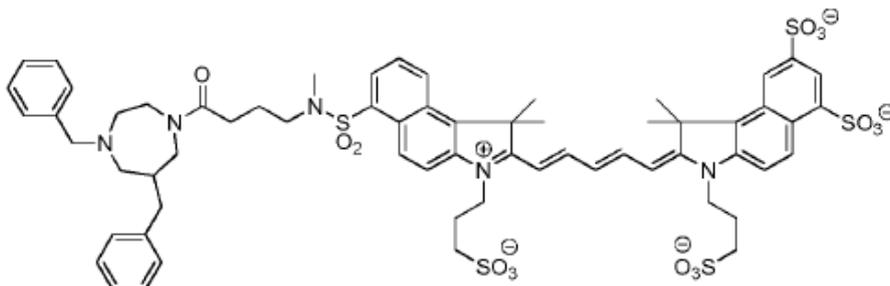
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es



10

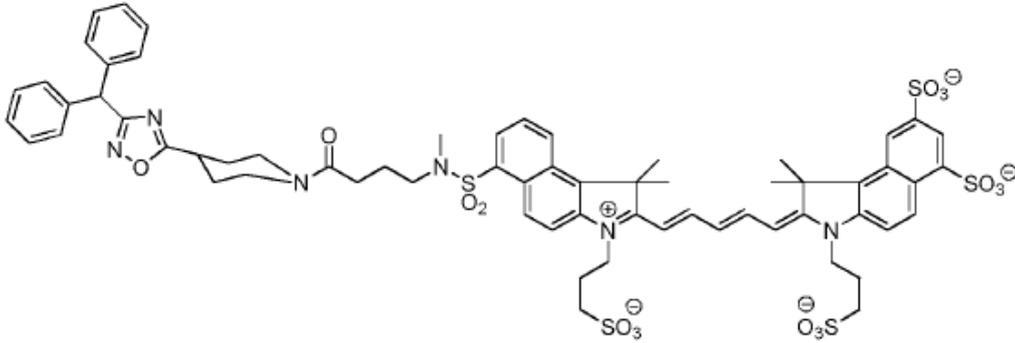
o una de sus sales.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es



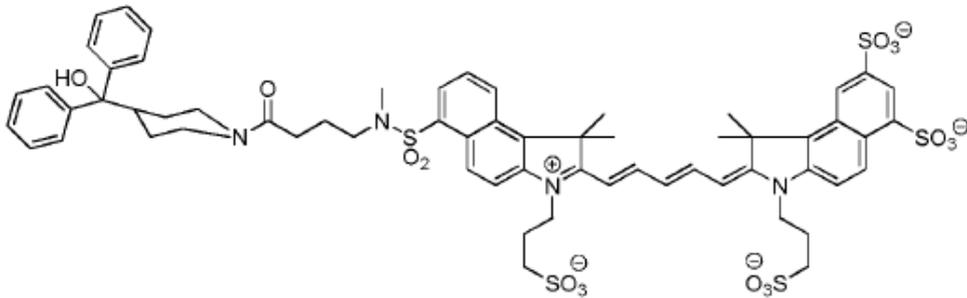
o una de sus sales.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es



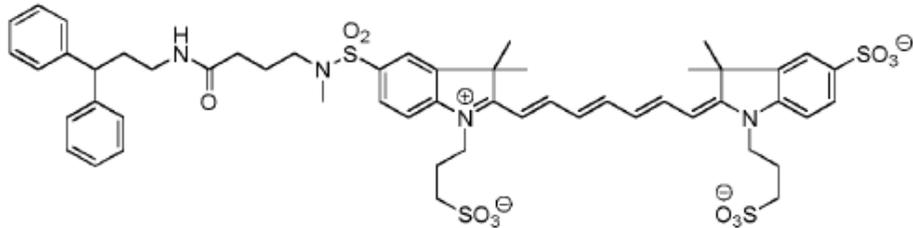
o una de sus sales.

5 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es



o una de sus sales.

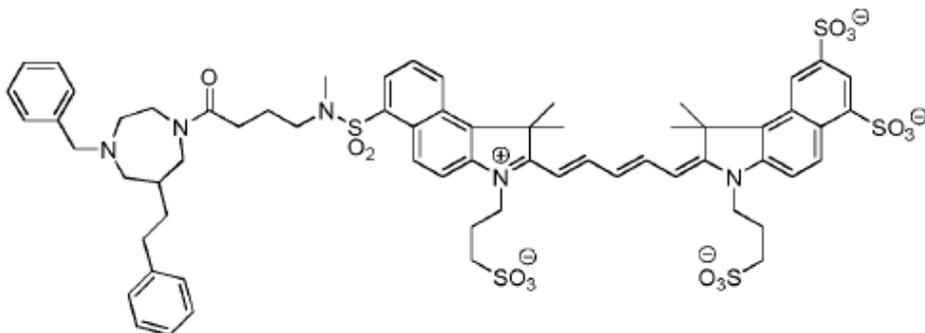
7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es



10

o una de sus sales

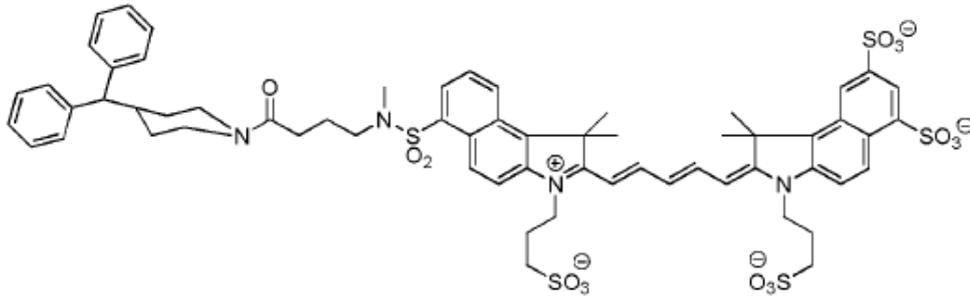
8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es



15

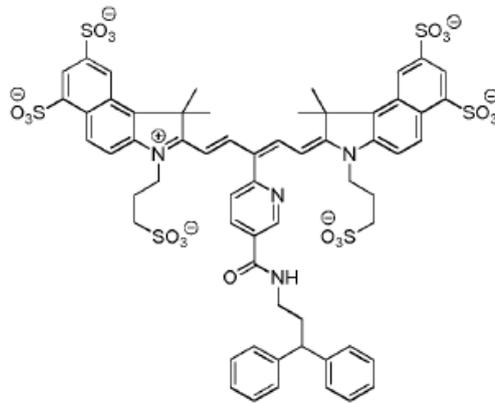
o una de sus sales.

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es



o una de sus sales.

10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto es



5

o una de sus sales.

11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en un método de diagnóstico.

10

12. Un método de formación de imágenes ópticas *in vivo*, comprendiendo el método:

15

- (a) administrar a un sujeto un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11;
- (b) dejar tiempo al compuesto para que se una a una molécula biocompatible y forme un agente de formación de imágenes *in vivo*;
- (c) iluminar el sujeto con luz de una longitud de onda absorbible por el fluoróforo; y
- (d) detectar la señal óptica emitida por el fluoróforo.



FIG 1.