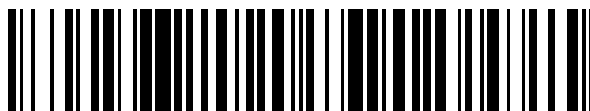


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 361**

51 Int. Cl.:

**C07D 419/02** (2006.01) **G01N 33/537** (2006.01)  
**C09B 23/02** (2006.01) **A61K 49/00** (2006.01)  
**C07D 401/14** (2006.01)  
**C07D 403/06** (2006.01)  
**C07D 403/14** (2006.01)  
**C07D 209/14** (2006.01)  
**C09B 23/01** (2006.01)  
**C09B 23/08** (2006.01)  
**G01N 33/533** (2006.01)  
**G01N 33/58** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2006 PCT/US2006/034260**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2007 WO07028037**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2006 E 06802829 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 1934211**

54 Título: **Marcadores colorantes fluorescentes que contienen sulfonamida N,N-disustituida biocompatible**

30 Prioridad:

**02.09.2005 US 713632 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.06.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**NARAYANAN, NARASIMHACHARI;**  
**GROVES, KEVIN;**  
**PETERSON, JEFFREY, D. y**  
**RAJOPADHYE, MILIND**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 618 361 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

Marcadores colorantes fluorescentes que contienen sulfonamida N,N-disustituida biocompatible

- 5 La presente invención se refiere a marcadores colorantes fluorescentes que contienen sulfonamida N,N-disustituida biocompatible como se define en las reivindicaciones.

La formación de imágenes ópticas es una modalidad de formación de imágenes clínica en evolución que utiliza rayos de luz penetrantes para crear imágenes. La luz en el intervalo rojo y el infrarrojo cercano (IIC) (600-1.200 nm) se utiliza para maximizar la penetración en el tejido y minimizar la absorción de absorbentes biológicos naturales, tales como hemoglobina y agua. (Wyatt, *Phil. Trans. R. Soc. London B* 352:701-706, 1997; Tromberg, *et al.*, *Phil. Trans. R. Soc. London B* 352:661-667, 1997).

Además de ser no invasivo, los métodos de formación de imágenes ópticas ofrecen una serie de ventajas sobre otros métodos de formación de imágenes: generalmente proporcionan alta sensibilidad, no requieren la exposición de los sujetos de ensayo o el personal del laboratorio a la radiación ionizante, pueden permitir el uso simultáneo de múltiples sondas distinguibles (importante en la formación de imágenes moleculares), y ofrecen una alta resolución temporal y espacial (importante en la formación de imágenes a nivel funcional y microscopía *in vivo*, respectivamente).

En la formación de imágenes por fluorescencia, la luz filtrada o un láser con un ancho de banda definido, se utiliza como una fuente de luz de excitación. La luz de excitación viaja a través de los tejidos corporales. Cuando se encuentra una molécula indicadora (es decir, agente de contraste o sonda de imagen), la luz de excitación se absorbe. La molécula indicadora emite entonces una luz que tiene propiedades detectablemente diferentes de la luz de excitación. La luz emitida resultante puede utilizarse para construir una imagen.

La mayoría de las técnicas de formación de imágenes ópticas se han basado en el uso de moléculas fluorescentes orgánicas e inorgánicas como molécula indicadora.

Los marcadores fluorescentes son generalmente conocidos y se utilizan para el marcado por fluorescencia y la detección de diversos materiales biológicos y no biológicos por procedimientos, tales como microscopía de fluorescencia, inmunoensayo de fluorescencia y citometría de flujo. Un método típico para el marcado de dichos materiales con colorantes fluorescentes es la creación de un complejo fluorescente por medio de una unión entre grupos adecuados en la molécula de colorante y grupos compatibles en el material que va a ser marcado. De este modo, los materiales tales como células, tejidos, aminoácidos, proteínas, anticuerpos, fármacos, hormonas, nucleótidos, ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos y similares pueden ser marcados y detectados o cuantificados químicamente, o pueden utilizarse como sondas fluorescentes que se pueden unir específicamente a materiales diana y detectarse por métodos de detección por fluorescencia. Los colorantes fuertemente fluorescentes permiten la detección o localización de los materiales adheridos con gran sensibilidad.

Ciertos fluorocromos como carbocianina o polimetina han demostrado ser útiles como reactivos de marcado para una variedad de aplicaciones biológicas, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5.627.027 de Waggoner (1997); patente de Estados Unidos n.º 5.808.044 de Brush, *et al.* (1998); patente de Estados Unidos n.º 5.877.310 de Reddington, *et al.* (1999); patente de Estados Unidos n.º 6.002.003 de Shen, *et al.* (1999); patente de Estados Unidos n.º 6.004.536 de Leung *et al.* (1999); patente de Estados Unidos n.º 6.008.373 de Waggoner, *et al.* (1999); patente de Estados Unidos n.º 6.043.025 de Minden, *et al.* (2000); patente de Estados Unidos n.º 6.127.134 de Minden, *et al.* (2000); patente de Estados Unidos n.º 6.130.094 de Waggoner, *et al.* (2000); patente de Estados Unidos n.º 6.133.445 de Waggoner, *et al.* (2000); también los documentos WO 97/40104, WO 99/51702, WO 01/21624 y EP 1 065 250 A1; patente de Estados Unidos n.º 6.448.008 de Caputo *et al.* y *Tetrahedron Letters* 41, 9185-88 (2000); todo lo anterior se incorpora por referencia.

Exámenes exhaustivos con respecto a los colorantes de polimetina han sido escritos por L. G. S. Brooker, "The Theory of the Photographic Process" Mees Ed., Macmillan, Nueva York, (1942), pág. 987 y (1966), pág. 198; Frances M. Hamer, en "The Chemistry of Heterocyclic compounds", vol. 18, "The Cyanine Dyes and Related Compounds", Weissberger, Ed, Wiley Interscience, Nueva York, (1964); G. E. Ficken, "The Chemistry of synthetic Dyes", vol. 4, K. Venkataraman Ed., Academic Press, Nueva York, (1971), pág. 211; A. I. Kiprianov, *Usp. Khim.*, 29, 1336, (1960), 35, 361 (1966), 40, 594 (1971); D. W. Heseltine, "The Theory of the Photographic Process", edición 4º supl. James Ed, Macmillan, Nueva York, (1977), capítulo 8, "Sensitising and Desensitising Dyes"; S. Daehne, *Phot. Sci. Eng.*, 12, 219 (1979); D. J. Fry, "Rodd's Chemistry of Carbon Compounds", "Cyanine Dyes and Related Compounds", vol. IVb, capítulo 15, pág. 369 Elsevier, Ámsterdam, (1977); suplemento al vol. IVb, edición 2º supl. (1985), pág. 267; H. Zollinger, "Color Chemistry", VCH, Weinheim (1987), capítulos 3 y 14; D. M. Sturmer "The Chemistry of Heterocyclic Compounds", "Special Topics in Heterocyclic Chemistry", capítulo VIII, "Synthesis and Properties of Cyanine and Related Dyes", Weissberger Ed, Wiley, Nueva York, (1977); "The Kirk-Othmer Encyclopaedia of Chemical Technology", vol. 7, pág. 782, "Cyanine Dyes", Wiley, Nueva York, (1993). Durante muchos años, los colorantes de polimetina han sido muy útiles como sensibilizadores en fotografía, especialmente en las regiones del rojo e infrarrojo cercano del espectro. No obstante, en los últimos años, ha habido un

resurgimiento de nuevos usos de estos colorantes en áreas tecnológicas innovadoras, tales como aplicaciones de láser y electro-ópticas, medios de grabación óptica, médicas, biológicas y de diagnóstico. Estas nuevas aplicaciones de colorantes de polimetina plantean unas elevadas exigencias en el grado de pureza requerida, y la reproducibilidad de los métodos sintéticos y las etapas de purificación es muy importante.

Para que sean útiles como marcador, un fluorocromo tiene que estar provisto de una cadena lateral adecuada que contenga un grupo funcional. El método y el sitio de introducción de una cadena lateral que contiene un grupo funcional en la estructura con el fin de conjugación, o de unión a otra molécula, tal como una biomolécula (BM), representa la etapa innovadora en las invenciones en relación con el uso del fluorocromo como reactivo de marcado. Un enfoque en el diseño de reactivos de marcado con polimetina ha sido unir la ramificación lateral funcionalizada a uno de los restos heterocíclicos ( $Z^1$  o  $Z^2$ ), separados por un enlazador de polimetina (PML), del fluorocromo, de fórmula (1):



Otro enfoque en el diseño de reactivos de marcado con polimetina ha sido unir la ramificación lateral funcionalizada a uno de los restos heterocíclicos (por ejemplo  $Z^2$ ), separados por un enlazador de polimetina (PML), del fluorocromo, de fórmula (1a):



Véanse, por ejemplo: J. S. Lindsey, P. A. Brown, y D. A. Siesel, "Visible Light Harvesting in Covalently-Linked Porphyrin-Cyanine Dyes", *Tetrahedron*, 45, 4845, (1989); R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, y A. S. Waggoner, "Cyanine Dye Labelling Reagents Containing Isothiocyanate Groups", *Cytometry*, 10, 11 (1989); L. A. Ernst, R. K. Gupta, R. B. Mujumdar, y A. S. Waggoner, "Cyanine Dye Labelling Reagents for sulphhydryl Groups", *Cytometry*, 10, 3, (1989); P. L. Southwick P. L., L. A. Ernst, E. W. Tauriello, S. R. Parker, R. B. Mujumdar, S. R. Mujumdar, H. A. Clever, y A. S. Waggoner, "Cyanine Dye Labelling Reagents Carboxymethylindocyanine Succinimidyl Esters", *Cytometry* 11, 418 (1990); R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, Swati R. Mujumdar, C. J. Lexis, y A. S. Waggoner, "Cyanine Dye Labelling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters", *Bioconjugate Chemistry*, 4, 105, (1993); A. J. G. Mank, E. J. Molenaar, H. Lingeman, C. Goojer, U. A. Th. Brinkman, y N. H. Velthorst, "Visible Diode Laser Induced Fluorescence Detection in Liquid Chromatography after Precolumn Derivatisation of Thiols", *Anal. Chem.*, 65, 2197, (1993); H. Yu., J. Chao, D. Patek, S. R. Mujumdar, y A. S. Waggoner, "Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labelling of DNA Probes", *Nucl. Acids Res* 22, 3226, (1994); A. J. G. Mank, H. T. C. van der Laan, H. Lingeman, Cees Goojer, U. A. Th. Brinkman, y N. H. Velthorst, "Visible Diode Laser-Induced Fluorescence Detection in Liquid Chromatography after Precolumn Derivatisation of Amines", *Anal. Chem.*, 67, 1742, (1995); S. R. Mujumdar, R. B. Mujumdar, C. M. Grant, y A. S. Waggoner, "Cyanine Labelling Reagents: sulfobenzoindocyanine succinimidyl esters", *Bioconjugate Chemistry*, 7, 356, (1996). Literatura de patente: P. L. Southwick, y A. S. Waggoner, "Intermediate for and Fluorescent Cyanine Dyes containing Carboxylic Acid Groups", patente de Estados Unidos n.º 4.981.977, 1 de enero de 1991; A. S. Waggoner, L. A. Ernst, y Mujumdar, R. B., "Method for Labelling and Detecting Materials Employing Arylsulfonate Cyanine Dyes", patente de Estados Unidos n.º 5.268.486, 7 de diciembre de 1993; A. S. Waggoner, "Cyanine Dyes as Labelling Reagents for Detection of Biological and Other Materials by Luminescence Methods", patente de Estados Unidos n.º 5.627.027, 6 de mayo de 1996; A. S. Waggoner, y R. B. Mujumdar, "Rigidised Trimethine Cyanine Dyes", documento WO99/311181; G.-Y. Shen, T. S. Dobashi, "Cyanine Dye Activating Group with Improved Coupling Selectivity"; G. M. Little, R. Raghavachari, N. Narayanan; H. L. Osterman, "Fluorescent Cyanine Dyes", patente de Estados Unidos n.º 6.027.709, 22 de febrero de 2000.

La estrategia sintética general necesaria para preparar estos reactivos de marcado es la siguiente. En primer lugar, se prepara un heterociclo de nitrógeno cuaternizado,  $Z^1$ . Entonces, esta base heterocíclica se hace reaccionar con un enlazador de polimetina (PML) que es un reactivo electrófilo, tal como  $\text{PhNH}-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{CH}=\text{NHPH.HCl}$  o  $\text{RO}-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{CH}(\text{OR})_2$ , en el que Ph es un anillo de fenilo y R un grupo metilo o etilo, para obtener hemicianinas, tales como,  $Z^1-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{CH}=\text{NHPH}$  o  $Z^1-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{CH}=\text{NAcPh}$  (en el que Ac es el radical acetilo) o  $Z^1-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{OR}$ . Estos productos intermedios se hacen reaccionar después con un heterociclo de nitrógeno cuaternario diferente,  $Z^2$ . La ramificación lateral funcionalizada se fija o bien al primer ( $Z^1$ ) o al segundo ( $Z^2$ ) heterociclo de nitrógeno cuaternizado. El resultado final es un reactivo de marcado con polimetina no simétrico,  $Z^1\text{-PML-}Z^2$ . Ejemplos de productos intermedios de hemicianina se describen en F. M. Hamer, "Some Unsymmetrical Pentamethincyanine Dyes and their Tetramethine Intermediates", *J. Chem. Soc.*, 32 (1949) y R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, Swati R. Mujumdar, C. J. Lewis, y A. S. Waggoner, "Cyanine Dye Labelling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters", *Bioconjugate Chemistry*, 4, 105, (1993).

Son deseables los fluorocromos de polimetina puesto que son eficientes y fáciles de producir, así como adecuados para la preparación de conjugados con biomoléculas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona compuestos como se define en la reivindicación 1.

En otra realización, la presente invención se dirige a una molécula fluorescente biocompatible que comprende al menos una biomolécula ligada químicamente a un compuesto de la presente invención. Preferentemente, el compuesto tiene unos máximos de absorción y emisión comprendidos entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 90 nm, preferentemente entre aproximadamente 600 y aproximadamente 800 nm.

En otra realización, la presente invención se dirige a una molécula fluorescente biocompatible que comprende al menos una biomolécula ligada químicamente a un compuesto de la presente invención, en la que el compuesto se activa después de la interacción con una diana.

En otra realización, la presente invención se dirige a una molécula fluorescente biocompatible que comprende al menos una biomolécula ligada químicamente a un compuesto de la presente invención, en la que el compuesto tiene una alta afinidad de unión a una diana.

En otra realización, la presente invención se dirige al uso de los compuestos de la reivindicación 1 en la formación de imágenes ópticas *in vivo*, el método comprende:

(a) administrar a un sujeto uno o más compuestos o moléculas fluorescentes biocompatibles de la presente invención;

(b) dar tiempo para que el compuesto o la molécula fluorescente biocompatible se distribuya en el sujeto o se ponga en contacto o interaccione con una diana biológica;

(c) iluminar al sujeto con una luz con una longitud de onda absorbible por el compuesto o la molécula fluorescente biocompatible; y

(d) detectar la señal óptica emitida por el compuesto o la molécula fluorescente biocompatible.

En otra realización, la presente invención se dirige a una molécula fluorescente biocompatible que comprende una biomolécula ligada químicamente a un compuesto de la presente invención, en la que la biomolécula es una célula.

#### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una imagen por fluorescencia de un compuesto de la presente invención en tumores de ratones hembra NU/NU (6-8 semanas de edad) después de 24 horas en un sistema de reflectancia por fluorescencia, sistema (IRF, Kodak 2000MM).

La FIG. 2 es una imagen por fluorescencia de un compuesto de la presente invención en tumores de ratones hembra NU/NU (6-8 semanas de edad) después de 24 horas en un sistema de reflectancia por fluorescencia, sistema de tomografía por fluorescencia de VisEn (TMF).

La FIG. 3 es una imagen por fluorescencia del crecimiento óseo de ratones BALB/c x CF-1 F<sub>1</sub> de cinco días de edad a los que se les inyectó un compuesto de la presente invención después de 24 horas más tarde utilizando un sistema de imagen de reflectancia por fluorescencia (IRF) (Kodak 2000MM).

#### Descripción detallada de la invención

La materia objeto que no está comprendida por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada. Una descripción de las realizaciones preferentes de la invención es de la siguiente manera.

La presente invención se dirige a compuestos (colorantes) altamente fluorescentes, brillantes que absorben y/o emiten entre 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. Debe tenerse en cuenta que los compuestos (fluorocromos) con longitudes de onda de excitación y emisión en otros espectros, tales como el espectro de luz visible y ultravioleta, también estén abarcados por la presente invención.

Las estructuras de los compuestos de la presente invención, se basan en general en derivados de ramificación lateral de sulfonamida N, N-disustituida que confieren alta fluorescencia. Además, en ciertas realizaciones de la presente invención, los compuestos contienen grupos funcionales o reactivos que pueden utilizarse para ligarse químicamente con los grupos complementarios en moléculas diana.

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

El término "compuestos", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a "fluorocromos que contienen polimetina", "fluorocromos", "colorantes fluorescentes", "colorantes de cianina" "colorantes de carbocianina" y "colorantes" de la presente invención. Estos términos se utilizan indistintamente para referirse a los compuestos de la presente invención.

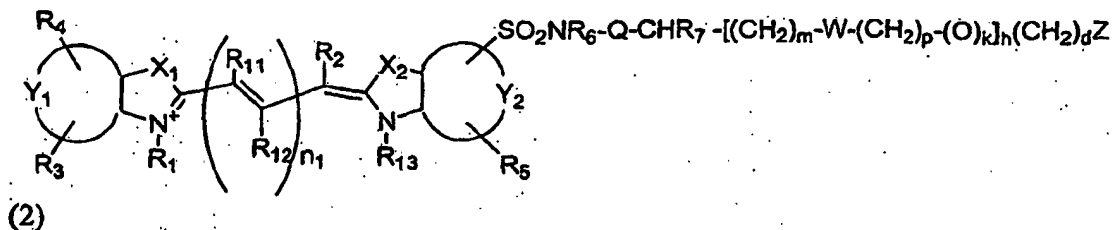
En un aspecto de la divulgación, los compuestos comprenden dos sistemas de anillos heterocíclicos unidos entre sí por un enlazador polimetina (EPM), de acuerdo con la fórmula (1):



en la que  $Z^1$  es un sistema de anillo heterocíclico, tal como un anillo de indolinio,  $Z^2$  es un segundo sistema de anillo heterocíclico, tal como un anillo de indolinio, y EPM es un enlazador polimetina. Los sistemas de anillos  $Z^1$  y  $Z^2$  se sustituyen opcionalmente de forma adicional con una variedad de sustituyentes o se condensan con anillos adicionales que se sustituyen opcionalmente de forma adicional. Los sustituyentes se introducen para potenciar las propiedades ópticas y físicas de los fluorocromos, así como para incorporar una ramificación lateral funcional para ligarse químicamente a las biomoléculas.

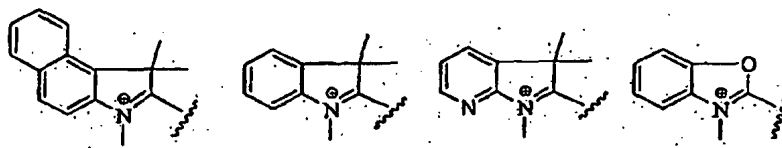
En un aspecto, los compuestos de la presente invención se sustituyen además una o más veces con sulfo o sulfoalquilo. Por "sulfo" se entiende ácido sulfónico, o sal de ácido sulfónico (sulfonato). Del mismo modo, por "carboxilo" se entiende ácido carboxílico, éster de carboxilato o sal de ácido carboxílico. "Fosfato" es un éster de ácido fosfórico, e incluye sales de fosfato. "Fosfonato" significa ácido fosfónico e incluye sales de fosfonato. Del mismo modo, para grupos "carbonilo" se incluyen, por ejemplo, entre otros, haluro de carbonilo, (por ejemplo, cloruro) y carboxamida. Como se utiliza en la presente memoria, a menos que se especifique lo contrario, las porciones alquilo de los sustituyentes, tales como alquilo, alcoxi, arilalquilo, alquilamino, dialquilamino, trialquilamino, o perfluoroalquilo son opcionalmente saturados, insaturados, lineales o ramificados, y todos los sustituyentes alquilo, alcoxi, alquilamino, y dialquilamino son, a su vez, opcionalmente sustituidos además con carboxi, sulfo, amino, o hidroxilo.

En una realización, la presente invención se dirige a compuestos representados por la fórmula (2), como se define en la reivindicación 2 o una sal de los mismos:

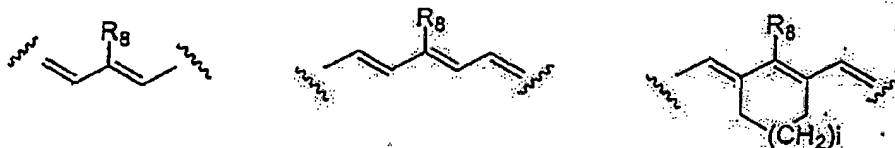


La incorporación de uno o más sustituyentes no hidrógenos en los anillos condensados puede utilizarse para mejorar el espectro de absorción y emisión del colorante resultante.

Se muestran, a continuación, ejemplos seleccionados de la estructura básica de  $Z^1$ . Estas estructuras básicas se sustituyen opcionalmente de forma adicional.



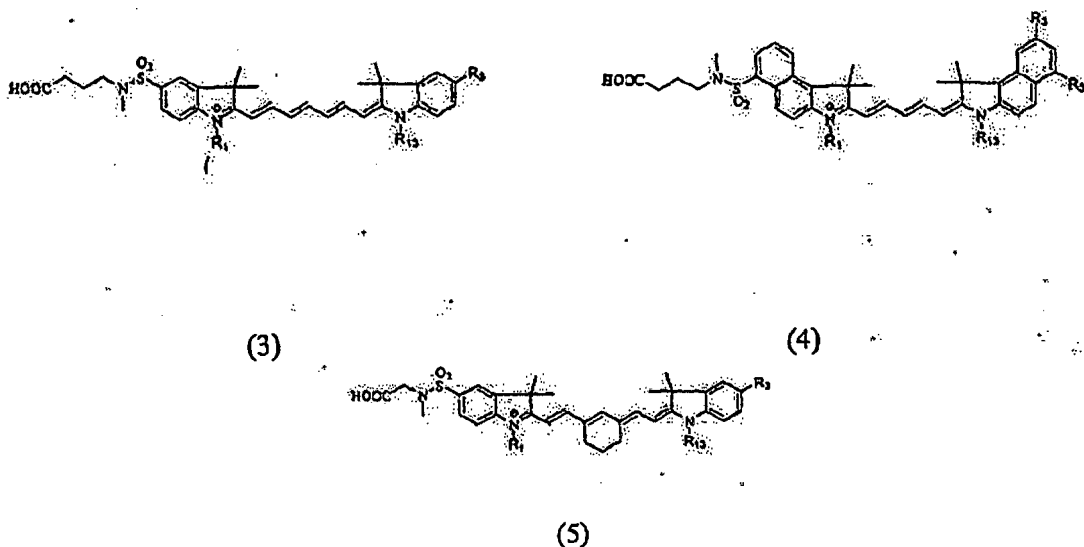
En una realización, el grupo  $-(C(R_{11})=C(R_{12}))_{n1}-C(R_2)=$  se representa por medio de una fórmula estructural seleccionada entre el grupo que consiste en:



en la que  $R^8$  es H o un átomo de halógeno, e  $i = 0$  o  $1$ .

En una realización, el nucleófilo se selecciona entre el grupo que consiste en  $\text{COCl}$ ,  $-\text{CONHNH}_2$ , ésteres de N-hidroxisuccinimido sustituidos y no sustituidos,  $-\text{NCS}$ ,  $-\text{CHO}$ ,  $-\text{COCH}_2$ , grupos fosforamida y maleimida.

En ciertos aspectos, el compuesto de la presente divulgación se representa por una cualquiera de las fórmulas 3-5:



Los ejemplos adecuados de restos de EPM adecuados para los compuestos de la presente divulgación (colorantes de carbocianina) se han descrito previamente en la literatura, incluyendo restos de EPM que incorporan sustituyentes sin hidrógeno, estructuras de anillo, y elementos rigidizadores (patente de Estados Unidos n.º 5.831.098 de Ollmann, Jr (1998); patente de Estados Unidos n.º 6.086.737 de Patonay *et al.* (2000); patente de Estados Unidos n.º 6.048.982 de Waggoner (2000); y patente de Estados Unidos n.º 5.453.505 de Lee *et al.* (1995); patente de Estados Unidos n.º 5.639.874 de Middendorf *et al.* (1997); patente de Estados Unidos n.º 3.864.644 de Lincoln *et al.* (1975); patente de Estados Unidos n.º 4.011.086 de Simson (1977); patente de Estados Unidos n.º 6.747.159 de Caputo (2004)).

En un aspecto de la presente divulgación, un grupo reactivo (o molécula ligada químicamente) puede adherirse a  $Y_2$ , en ciertos compuestos (colorantes de indocianina) de la presente divulgación. Además de un grupo reactivo en  $Y_2$ , los compuestos pueden ser adicionalmente sulfonados al menos cuatro veces (en  $R_3$  y  $R_4$ , y como sulfoalquilo tanto en  $R_1$  como en  $R_{13}$ ). En un aspecto de la presente divulgación, un grupo reactivo (o molécula ligada químicamente) puede adherirse a  $Y_2$ , en ciertos compuestos (colorantes de indocianina) de la presente divulgación. Además de un grupo reactivo en  $Y_2$ , los compuestos pueden ser adicionalmente sulfonados hasta cuatro veces (en  $R_3$  y  $R_4$ , y como sulfoalquilo tanto en  $R_1$  como en  $R_{13}$ ). Esta sulfonación adicional, da lugar a colorantes reactivos y a conjugados de colorante que tienen propiedades novedosas, tales como, por ejemplo, una mejor solubilidad acuosa.

Como se utiliza en la presente memoria, "grupo reactivo" significa un resto en un compuesto de la presente divulgación o que puede añadirse a un compuesto de la presente divulgación que es capaz de reaccionar químicamente con un grupo funcional en un compuesto diferente para formar un enlace covalente, o un resto en un compuesto diferente que es capaz de reaccionar químicamente con un grupo funcional en un compuesto de la presente divulgación para formar un enlace covalente. Normalmente, el grupo reactivo es un electrófilo o nucleófilo que puede formar un enlace covalente a través de la exposición al grupo funcional correspondiente que es un nucleófilo o electrófilo, respectivamente. Alternativamente, el grupo reactivo es un grupo fotoactivable, y se convierte en químicamente reactivo solo después de la iluminación con una luz con una longitud de onda apropiada. Normalmente, la reacción de conjugación entre el compuesto de la presente divulgación y la sustancia a conjugar da lugar a que uno o más átomos del grupo reactivo se incorporen en un nuevo enlace adhiriendo el colorante a la sustancia conjugada.

El resto de EPM procede generalmente del agente de acoplamiento utilizado en la síntesis de los compuestos (colorante) de la presente divulgación. Por ejemplo, N,N'-difenilformamidina y trietilortoformiato producen restos de EPM. También producen colorantes, el clorhidrato de malonaldehído bis(fenilimina), 1,1,3-trimetoxipropano, 1,1,3,3-tetrametoxipropano y monocloruro de glutaconaldehído dianil.

La elección de EPM, que es en efecto la elección de  $n_1$  y  $R_2$ ,  $R_{11}$ ,  $R_{12}$ ,  $R_{13}$  también puede afectar a las propiedades de absorción y fluorescencia del fluorocromo. La longitud del EPM entre  $Z^1$  y  $Z^2$  también afecta a las propiedades de absorción y fluorescencia del fluorocromo. Cuando  $n_1 = 1$ , y el heterociclo de indolio no se condensa con anillos adicionales, los fluorocromos resultantes exhiben normalmente un máximo de absorción cercano a 550 nm. Cuando  $n_1 = 2$ , los fluorocromos exhiben normalmente un máximo de absorción cercano a 650 nm. Cuando  $n_1 = 3$ , los fluorocromos exhiben normalmente un máximo de absorción cercano a 750 nm.

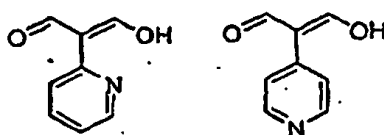
En la invención,  $n_1$  es 1, 2, o 3;  $R_2$ ,  $R_{11}$  y  $R_{12}$  son independientemente H, F, Br, Cl, alquilo  $C_1$ - $C_6$ , alcoxi, ariloxi  $C_1$ - $C_6$ , un heterociclo de nitrógeno, un sulfonato, un ion iminio, o cualquiera de dos sustituyentes adyacentes  $R_{12}$  o  $R_{11}$  o sustituyentes  $R_2$  y  $R_{11}$ , cuando se toman en combinación, forman un anillo de hidrocarburo saturado o insaturado de

4, 5, o 6 miembros que es opcionalmente sustituido una o más veces con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno, o un resto que contiene O o S.

Un aspecto de la invención es un compuesto de fórmula (2), en la que solo un R<sub>12</sub> se selecciona entre un grupo que consiste en un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno funcionalizado (anillo de heteroarilo que contiene nitrógeno sustituido). En la presente realización, el anillo heterocíclico y el anillo de heteroarilo se refiere a un anillo de heteroarilo, como se define en la presente memoria, tal como piridina y funcionalizado se refiere a sustituido.

Otro aspecto de la invención es un compuesto de fórmula (2), en la que solo un R<sub>12</sub> se selecciona entre un grupo que consiste en un anillo de piridina.

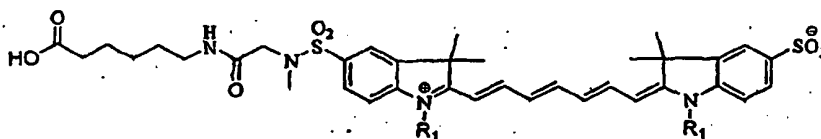
En un aspecto de la invención, el resto EPM se introduce en el colorante utilizando los restos de malonodialdehído mostrados a continuación:



En un aspecto de la invención, el nitrógeno de la piridina, en el EPM, puede cuaternizarse para modificar las propiedades físicas y farmacológicas de los compuestos de la presente invención.

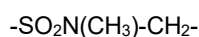
La ramificación lateral funcional puede introducirse en Z<sup>1</sup> o Z<sup>2</sup>. La ramificación lateral funcional se sitúa en cualquier parte del resto descrito por Y<sub>1</sub> o Y<sub>2</sub>.

En un aspecto de la divulgación, la fórmula Z<sup>1</sup>-(EPM)-Z<sup>2</sup> se representa de acuerdo con lo siguiente:

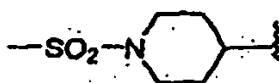


en el que cada R<sub>1</sub> se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub>H; en el que x es un número entero seleccionado entre 0 y 6 y n es un número entero seleccionado entre 2 y 6.

En una realización, el resto -SO<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>-Q-CHR<sub>7</sub>- es de fórmula:



En otra realización, el resto -SO<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>-Q-CHR<sub>7</sub>- es de fórmula:



En un aspecto de la divulgación, Z es un ácido carboxílico, un éster de succinimidilo de un ácido carboxílico, una haloacetamida, una hidrazina, un isotiocianato, un grupo maleimida, una amina alifática, un perfluorobenzamido, un grupo azidoperfluorobenzamido, o un psoraleno. En otro aspecto de la divulgación, Z es un éster de succinimidilo de un ácido carboxílico, una maleimida, una yodoacetamida o un éster de succinimidilo de un ácido carboxílico. En un aspecto adicional de la divulgación, Z es independientemente una funcionalidad de nucleófilo seleccionada entre el grupo que consiste en -NH<sub>2</sub>, -OH, y -SH. Además, Z puede ser una funcionalidad capaz de reaccionar con nucleófilos N, O, S. De acuerdo con la invención, Z se selecciona entre el grupo que consiste en -COCl, -CONHNH<sub>2</sub>, ésteres de N-hidroxisuccinimido sustituidos y no sustituidos, -NCS, -CHO, -COCH<sub>2</sub>I, grupos fosforamida y grupo maleimida.

En un aspecto de la divulgación, Z = CO-OR<sub>15</sub> o Z = CO-R<sub>16</sub> y se encuentra en forma de un éster activado (R<sub>15</sub>) o haluro de carbonilo (R<sub>16</sub> = F, Cl, Br) que es capaz de reaccionar con nucleófilos. El grupo carboxilo CO-OR<sub>15</sub> también se encuentra en una forma seleccionada entre el grupo CO-Obenzotriazolilo, CO-ON-hidroxisuccinimidilo, CO-Otetrafluorofenilo, CO-Opentafluorofenilo, CO-Oimidazolilo, CO-Op-nitrofenilo.

En un aspecto de la divulgación, Z = CO-OR<sub>15</sub> o Z = CO-R<sub>16</sub> y se encuentra en forma de un éster activado (R<sub>15</sub>) o haluro de carbonilo (R<sub>16</sub> = F, Cl, Br) que es capaz de reaccionar con nucleófilos. El grupo carboxilo CO-OR<sub>15</sub> también se encuentra en una forma seleccionada entre el grupo CO-Obenzotriazolilo, CO-ON-succinimidilo, CO-

Otetrafluorofenilo, CO-Opentafluorofenilo, CO-Oimidazolilo, CO-Op-nitrofenilo.

En un aspecto de la divulgación, Z es una azida. En otro aspecto de la divulgación, Z es un alquino.

5 En un aspecto de la divulgación, cuando Z es un éster activado, el compuesto puede ligarse químicamente a enlazadores bifuncionales, tales como aminoetilmaleimida, aminopropilmaleimida, aminopropilazida, aminopropiltiol, mercaptoetilamina, propargilamina 3-aminopropanol, diaminopropano, y diaminobutano para proporcionar grupos funcionales reactivos adicionales en un disolvente adecuado en condiciones neutras o básicas.

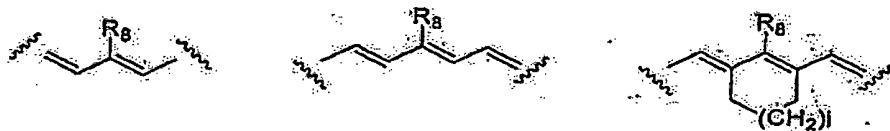
10 En un aspecto de la divulgación, cuando Z es  $\text{NH}_2$ , el compuesto de la invención puede ligarse químicamente a enlazadores bifuncionales, tales como ácido propargílico, succinimidilpiridinditiopropionato, éster de maleimida-PEG-N-hidroxisuccinimida para proporcionar grupos funcionales reactivos adicionales en un disolvente adecuado en condiciones neutras o básicas.

15 En un aspecto de la divulgación, la fórmula  $\text{Z}^1\text{-(EPM)Z}^2$  se representa de acuerdo con lo siguiente, en el que al menos dos de los grupos  $\text{R}_1$ ,  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$ ,  $\text{R}_5$  o  $\text{R}_{13}$  contienen un grupo de ácido sulfónico o sulfonato.

En un aspecto de la divulgación, la fórmula  $\text{Z}^1\text{-(EPM)Z}^2$  se representa de acuerdo con lo siguiente, en el que  $\text{R}_3$ ,  $\text{R}_4$  y  $\text{R}_5$  son todos independientemente un grupo de fórmula  $-\text{SO}_2\text{NR}_6\text{-Q-CHR}_7\text{-}[(\text{CH}_2)_m\text{-W-(CH}_2)_p\text{-(O)}_k]_h\text{-(CH}_2)_d\text{Z}$ .

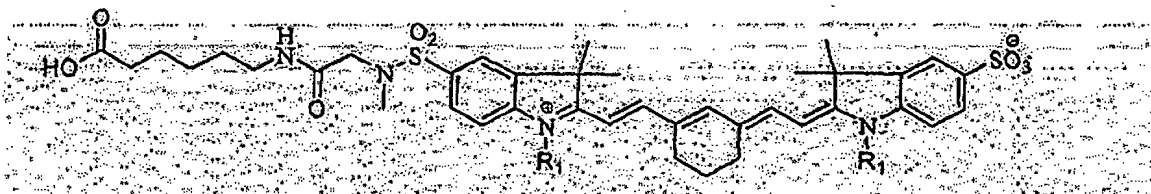
20 En un aspecto de la divulgación, la fórmula  $\text{Z}^1\text{-(EPM)-Z}^2$  se representa de acuerdo con lo siguiente, en el que  $\text{X}_1$  y  $\text{X}_2$  son ambos  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ .

25 En un aspecto de la divulgación, la fórmula  $\text{Z}^1\text{-(EPM)Z}^2$  se representa de acuerdo con lo siguiente, en el que el enlazador polimetina que tiene de 3 a 7 átomos de carbono se selecciona entre el grupo que consiste en:

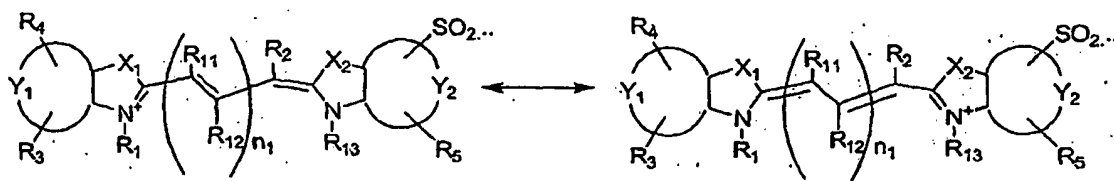


en el que  $\text{R}_8$  es H o un átomo de halógeno, e i = 0 o 1.

30 En un aspecto de la divulgación, la fórmula  $\text{Z}^1\text{-(EPM)Z}^2$  se representa de acuerdo con lo siguiente:



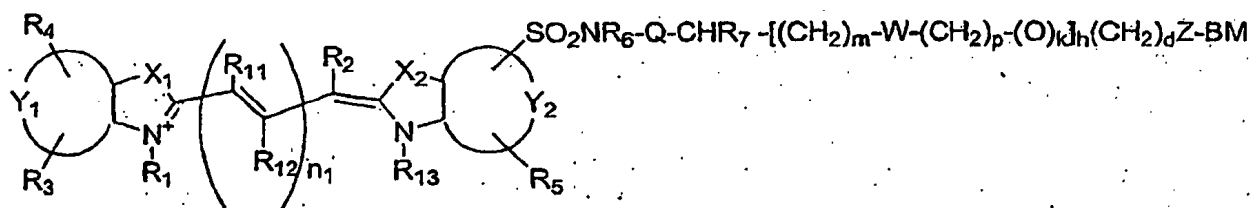
35 Cuando un compuesto de la invención se representa en la presente memoria por medio de una estructura que indica las posiciones de los dobles enlaces en los anillos de un enlazador polimetina, ha de entenderse que la estructura también abarca cualquier estructura de resonancia, como se muestra, por ejemplo, en la siguiente figura:



40 En la presente invención, cuando  $\text{R}_6$  es diferente a hidrógeno, las reacciones de cadena lateral no deseadas, se reducen, previenen o inhiben.

45 En una realización, la presente invención se dirige a compuestos que representan  $\text{Z}^1\text{-(EPM)-Z}^2\text{-BM}$  por la fórmula:





en la que BM es una biomolécula ligada químicamente a Z para formar una molécula biocompatible.

- 5 BM es un resto que cambia o altera o potencia la acumulación, biodistribución, eliminación, orientación selectiva, unión, y/o reconocimiento de los fluorocromos de la estructura general  $Z^1-(EPM)-Z^2$ . Las BM incluyen anticuerpos y fragmentos de las mismas, proteínas, péptidos, aminoácidos, anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, tales como anticuerpos de cadena sencilla), glicoproteínas, ligandos para receptores celulares, polisacáridos, nucleósidos, aptámeros, los propios receptores celulares, sustratos enzimáticos, cofactores enzimáticos, biotina, hormonas, neurohormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, citoquinas, linfoquinas, lectinas, selectinas, toxinas, y carbohidratos. También pueden utilizarse otros enfoques de orientación selectiva y administración que utilizan diferentes biomoléculas, tales como orientación selectiva mediada por folato (Leamon & Low, *Drug Discovery Today*, 6:44-51, 2001), transferrina, vitaminas, carbohidratos y ligandos que se orientan selectivamente a receptores de internalización, incluyendo, el receptor de asialoglicoproteína, somatostatina, factor de crecimiento nervioso, oxitocina, bombesina, calcitonina, arginina vasopresina, angiotensina II, péptido natriurético atrial, insulina, glucagones, prolactina, gonadotropina, varios opioides y activador del plasminógeno de tipo uroquinasa. También se incluyen, secuencias de señal para membrana, para transmembrana y de translocación nuclear, que pueden derivarse de una serie de fuentes, incluyendo, sin limitación, virus y bacterias. La BM también puede ser una molécula, polímero, dendrímero, fármaco, lípido, conjunto lipídico, moléculas de fármacos terapéuticos, micropartícula polimérica, células, o una nanopartícula. En ciertas realizaciones, las BM también pueden incluir fármacos de moléculas pequeñas, moléculas fototerapéuticas y derivados de los mismos.

En ciertas realizaciones de la presente invención, cuando BM está ligada químicamente a un compuesto de la presente invención, se potencia la fluorescencia del compuesto de la presente invención. En ciertas realizaciones, la fluorescencia se potencia en aproximadamente 10 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 50 % o más de aproximadamente 5 %, en comparación con el compuesto no ligado.

En un aspecto de la invención, varias copias de BM se ligan químicamente a Z a través de enlazadores multivalentes o enlazadores que contienen varios grupos funcionales reactivos para formar una molécula fluorescente biocompatible de la estructura  $(Z^1-(EPM)-Z^2)-((L)_w-(BM)_q)_t$ , en la que L es un enlazador o un enlazador multivalente, y  $t=1-6$ ,  $w=1-500$  y  $q=1-500$ .  $(L)_w$  representa copias del mismo enlazador o una combinación de diferentes enlazadores.

Los ejemplos de restos enlazadores apropiados para los compuestos de la presente invención (colorantes de carbocianina) se han descrito previamente en la literatura (solicitud de patente de Estados Unidos 2002/0064794 (2002); patente de Estados Unidos n.º 6.086.737 de Patonay *et al.* (2000); patente de Estados Unidos n.º 6.048.982 de Waggoner (2000); patente de Estados Unidos n.º 6.747.159 de Caputo (2004); patente de Estados Unidos n.º 6.448.008 de Caputo (2002), todas incorporadas por referencia).

En otro aspecto de la invención, más de un compuesto de la presente invención (fluorocromo) de la estructura  $Z^1-(EPM)-Z^2$  puede ligarse químicamente a una única BM para formar una molécula fluorescente biocompatible de la estructura  $[Z^1-(EPM)-Z^2]_k-BM$ , en la que  $k=1-500$ .

En una realización, los compuestos (fluorocromos) y las moléculas fluorescentes biocompatibles de la presente invención tienen unos máximos de absorción y emisión comprendidos entre 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.

En una realización, los compuestos (fluorocromos) y las moléculas fluorescentes biocompatibles de la presente invención se activan después de la interacción con una diana. "Activado después de la interacción con una diana" se entiende como un cambio que altera una propiedad detectable, por ejemplo, una propiedad óptica de los fluorocromos o las moléculas fluorescentes biocompatibles. Esto incluye una modificación, alteración, o unión (covalente o no covalente) que resulta en una diferencia detectable en las propiedades, por ejemplo, las propiedades ópticas de los fluorocromos o las moléculas fluorescentes biocompatibles, por ejemplo, cambios en la amplitud de la señal de fluorescencia (por ejemplo, desatenuación y extinción), cambio en la longitud de onda, vida de fluorescencia, propiedades espectrales, o polaridad. En otra realización, una molécula desactivadora se utiliza para extinguir la señal fluorescente de las moléculas fluorescentes biocompatibles. Mediante la adopción de estos estados activados e inactivados, es posible, por lo tanto, determinar si el fluorocromo o la molécula fluorescente biocompatible se activa o inactiva en un sujeto mediante la identificación de un cambio en la intensidad de la señal.

Además, los fluorocromos y las moléculas fluorescentes biocompatibles pueden diseñarse de manera tal que exhiben escasa señal por no decir una señal nula hasta que sean activados. La activación puede realizarse por escisión enzimática, conversión enzimática, fosforilación o desfosforilación, cambio de conformación debido a la unión, corte y empalme mediado por la enzima, transferencia mediada por la enzima, hibridación de ADN o ARN complementario, unión al analito, tal como la asociación con un analito, tal como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , u otro analito, cambio en la hidrofobicidad del entorno y la modificación química.

En una realización, los compuestos (fluorocromos) y las moléculas fluorescentes biocompatibles de la presente invención tienen una alta afinidad de unión a una diana.

En la presente memoria también se utiliza un compuesto o una molécula fluorescente biocompatible de acuerdo con las reivindicaciones para su uso en un método de formación de imágenes ópticas *in vivo*, el método comprende (a) administrar a un sujeto un compuesto (fluorocromo) o una molécula fluorescente biocompatible de la presente invención; (b) dar tiempo al compuesto (fluorocromo) o a una molécula fluorescente biocompatible para que se distribuya en el sujeto o se ponga en contacto o interaccione con una diana biológica; (c) iluminar al sujeto con una luz con una longitud de onda absorbible por el compuesto (fluorocromo) o molécula fluorescente biocompatible; y (d) detectar la señal óptica emitida por el compuesto (fluorocromo) o la molécula fluorescente biocompatible.

La señal óptica generada por el compuesto (fluorocromos) o la molécula fluorescente biocompatible de la presente invención, si se recoge por métodos tomográficos, de reflectancia, planar, endoscópicos, microscópicos, gafas quirúrgicas, tecnologías de formación de imágenes en vídeo, u otros métodos, tales como microscopía que incluye microscopía intravital y de dos fotones, y si se utiliza cuantitativa o cualitativamente, también se considera que es un aspecto de la divulgación.

Un aspecto de la invención es un compuesto o una molécula fluorescente biocompatible de acuerdo con las reivindicaciones para su uso en un método en el que la presencia, ausencia, distribución, o nivel de la señal óptica emitida por el compuesto (fluorocromo) o la molécula fluorescente biocompatible de la presente invención es indicativo de una patología.

La invención también presenta un compuesto o una molécula fluorescente biocompatible de acuerdo con las reivindicaciones para su uso en un método para detectar una anomalía en un paciente o sujeto, por ejemplo, cualquier anomalía asociada con una enfermedad, tal como cáncer, una enfermedad cardiovascular, SIDA, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad respiratoria, una enfermedad metabólica, una enfermedad ósea o una enfermedad inmunológica. La divulgación también presenta un método para evaluar el efecto de un compuesto o terapia en una diana molecular especificada mediante el uso de compuestos (composiciones) de la presente invención, en la que el sujeto es captado en imágenes antes y después del tratamiento con el compuesto o terapia, y las imágenes correspondientes se comparan.

Un aspecto de la invención es la conjugación a fármacos, ligandos, proteínas, péptidos, macromoléculas, polímeros, nanopartículas u otras BM con múltiples grupos reactivos. Dicha conjugación produce un desplazamiento al azul en la absorbancia del fluorocromo. Esto proporciona un mecanismo para minimizar la fluorescencia de fondo durante la formación de imágenes *in vivo* de sondas fluorescentes activables pero extintas.

En otro aspecto, la divulgación presenta un método de formación de imágenes ópticas *in vivo* o *in vitro* que comprende (a) administrar a una muestra o sujeto un compuesto de la presente divulgación, por ejemplo, sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida biocompatible de la presente divulgación; (b) dar tiempo para que las sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida biocompatible se distribuyan en el sujeto o se pongan en contacto o interactúen con una diana biológica; (c) iluminar al sujeto con una luz con una longitud de onda absorbible por medio de las sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida biocompatible; y (d) detectar la señal óptica emitida por las sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida biocompatible.

Las etapas del método de formación de imágenes de la presente divulgación también pueden repetirse en intervalos predeterminados, permitiendo así la evaluación de la señal emitida de las sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida biocompatible en un sujeto o muestra con el tiempo. La señal emitida puede adaptar la forma de una imagen. El sujeto puede ser un animal vertebrado, por ejemplo, un mamífero, incluyendo un ser humano. El animal también puede ser un no vertebrado (por ejemplo, *C. elegans*, *Drosophila*, u otros organismos modelos de investigación, etc.). La muestra puede incluir células, cultivo celular, secciones tisulares, órganos, secciones de órganos, o muestras de Cytospin.

La divulgación también presenta un método *in vivo* para la detección selectiva y formación de imágenes simultánea de dos o más sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida biocompatible. El método comprende administrar a un sujeto dos o más sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida biocompatible, al mismo tiempo o secuencialmente, cuyas propiedades ópticas son distinguibles. Por lo tanto, el método permite el registro de múltiples acontecimiento o dianas.

La divulgación también presenta un método *in vivo* para la detección selectiva y formación de imágenes de una o más sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida biocompatible, de forma simultánea con una o más sondas de imagen óptica orientadas selectivamente o activables, o en un protocolo dual de formación de imágenes con formación de imágenes de resonancia magnética, tomografía computarizada (TC), rayos X, ultrasonidos o modalidades de formación de imágenes de medicina nuclear y sus respectivos agentes de imagen. El método comprende administrar a un sujeto una o más sondas de imagen, al mismo tiempo o secuencialmente, incluyendo al menos una sonda de imagen que contiene fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida biocompatible, cuyas propiedades son distinguibles de las de las otras. En un aspecto, un protocolo dual de formación de imágenes es la formación de imágenes ópticas y por resonancia magnética utilizando sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida biocompatible secuencial o casi simultáneamente con agentes de imagen de resonancia magnética, (por ejemplo, agentes a base de óxido férrico o agentes a base de gadolinio, tal como gadopentetato). El método, por lo tanto, permite el registro de múltiples acontecimientos o dianas utilizando más de una modalidad de formación de imágenes o agente de imagen.

En otro aspecto, la divulgación presenta un método de formación de imágenes ópticas *in vitro* que comprende poner en contacto la muestra con sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida; dar tiempo para que las sondas se activen o se unan a una diana de interés en la muestra; opcionalmente, retirar las sondas no unidas; iluminar la diana con una luz con una longitud de onda absorbible por medio de las sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida; y detectar la señal óptica emitida por las sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida.

Tras la administración, puede producirse la detección, por ejemplo, por métodos *in vitro*, es decir, citometría de flujo o por métodos de formación de imágenes *in vivo*, es decir, sistemas tomográficos, catéter, planar/de reflectancia o sistemas endoscópicos.

En una realización, el fluorocromo de sulfonamida N,N-disustituida (o sondas de imagen derivadas del mismo) pueden utilizarse para marcar una muestra *ex vivo*. La muestra, por ejemplo, células, puede derivarse directamente de un sujeto o de otra fuente (por ejemplo., de otro sujeto, cultivo celular, etc.). La sonda de imagen que contiene fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida puede mezclarse con las células para que estas sean marcadas eficazmente (de forma covalente o no covalente) y las células marcadas resultantes se inyectan en un sujeto. Esta técnica puede utilizarse para el control del tráfico y la localización de ciertos tipos celulares, incluyendo linfocitos T, células tumorales, células inmunes, células madre, y otros tipos de células. En particular, esta técnica puede utilizarse para controlar las terapias basadas en células. La muestra también se puede derivar a partir de fuentes no mamíferas incluyendo plantas, insectos, virus, bacterias y bacteriófagos.

Otro aspecto de la divulgación presenta sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida que contiene que pueden utilizarse para la formación de imágenes *in vivo* y el marcado de muestras *ex vivo*, incluyendo células, sin uso de dimetilsulfóxido (DMSO) u otros disolventes orgánicos (es decir, tampones fisiológicos o soluciones) que son generalmente tóxicos para los sujetos o muestras biológicos.

Para el marcado de BMs o células, los compuestos (fluorocromos) de la presente invención pueden incubarse con BMs en varias concentraciones durante aproximadamente 5 minutos hasta 24 horas o más a aproximadamente 4 °C-37 °C. Tras la incubación, el fluorocromo libre que no se ha ligado químicamente a la BM puede eliminarse, por ejemplo, por métodos de cromatografía o ultrafiltración que se conocen adecuadamente en la materia. Para las células, después de la incubación, las células pueden centrifugarse para crear un sedimento celular del que se elimina el sobrenadante. Las células pueden volverse a suspender en un medio de cultivo o solución salina fisiológica para lavar el fluorocromo residual, no unido o libre. Esto puede repetirse varias veces. De esta manera, las células pueden marcarse o bien por conjugación directa a moléculas celulares internas o externas o bien por la captación celular no específica en varios compartimentos intracelulares, incluyendo, entre otros, citosol, endosomas, núcleos, aparato de Golgi, y otros orgánulos intracelulares.

Otro aspecto de la invención presenta sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida formuladas en una composición farmacéutica adecuada para la administración a sujetos animales, incluyendo el ser humano. La composición farmacéutica puede incluir las nanopartículas y uno o más estabilizadores en un vehículo fisiológicamente relevante.

Otro aspecto de la invención presenta fluorocromos fluorescentes de sulfonamida N,N-disustituida biocompatible y sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida formuladas en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a sujetos animales, incluyendo seres humanos, y células. La composición farmacéutica puede incluir uno o más estabilizadores en un vehículo fisiológicamente relevante.

Un ejemplo adecuado de estabilizadores para su uso en los métodos de la presente invención incluye carbohidratos de bajo peso molecular, en un aspecto es un polialcohol lineal, tal como sorbitol, y glicerol; o manitol. Otros carbohidratos de bajo peso molecular, tales como inositol, también pueden utilizarse. Los vehículos fisiológicamente relevantes pueden incluir agua, solución salina, y pueden incluir además agentes tales como tampones, y otros agentes tales como conservantes que son compatibles para su uso en formulaciones farmacéuticas.

La divulgación también permite métodos de reconocimiento de secuencias génicas utilizando fluorocromos fluorescentes de sulfonamida N,N-disustituida, moléculas de reconocimiento de ácidos nucleicos marcados, incluyendo ADN, ARN, ácido nucleico modificado, PNA, balizas moleculares, aptámeros, u otras moléculas de unión a ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN de interferencia pequeño o ARNip). Los métodos incluyen el uso de uno o más fluorocromos fluorescentes de sulfonamida N,N-disustituida junto con técnicas tales como hibridación, ligamento, escisión, recombinación, síntesis, secuenciación, detección de mutaciones, reacciones en cadena de la polimerasa en tiempo real, hibridación *in situ*, y uso de micromatrices. Por ejemplo, para la detección de un ácido nucleico monocatenario (es decir, ARNm, ADNc o ADN bicatenario desnaturalizado) en una muestra, a través de los principios de hibridación de ácidos nucleicos, un fluorocromo fluorescente de sulfonamida N,N-disustituida ligado químicamente a un nucleico ácido monocatenario se pone en contacto con una muestra que contiene uno o más ácidos nucleicos monocatenarios y la fluorescencia del fluorocromo fluorescente de sulfonamida N,N-disustituida se detecta, en la que la presencia o el nivel de señal de fluorescencia emitida por el fluorocromo fluorescente de sulfonamida N,N-disustituida indica la presencia o la cantidad de ácido nucleico en la muestra.

La señal óptica generada por los fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida o las sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida, o derivados de los mismos, si se recoge por métodos tomográficos, de reflectancia, planar, endoscópicos, microscópicos, gafas quirúrgicas, o generadores de imágenes, tecnologías de formación de imágenes en vídeo, u otros métodos tales como la microscopía incluyendo microscopía intravital y de dos fotones, y si se utiliza cuantitativa o cualitativamente, también se considera que es un aspecto de la divulgación.

Otro aspecto de la divulgación presenta un kit, que incluye los fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida o sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida, y opcionalmente, instrucciones para utilizar los fluorocromos o las sondas de formación de imágenes para métodos de formación de imágenes *in vivo* o *in vitro*. El kit puede incluir opcionalmente componentes que ayudan en el uso de los fluorocromos o sondas de imagen para los métodos divulgados, tales como tampones y otros agentes de formulación; como alternativa, el kit puede incluir productos sanitarios que ayudan en la administración de las sondas de imagen a los sujetos.

Los fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida o las sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida, y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, por inhalación, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal, o a través de un depósito implantado. La expresión "administración parenteral" incluye la inyección intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraarterial, intraarticular, intrasnovial, intraesternal, intratecal, intraperitoneal, intracisternal, intrahepática, intralesional, intracraneal e intralinfática o técnicas de infusión. Los fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida o el fluorocromo de sulfonamida N,N-disustituida también pueden administrarse a través de catéteres o por medio de una aguja a un tejido.

En una realización, se administra una cantidad eficaz (que es eficaz una cantidad para causar o aumentar la fluorescencia) de los compuestos de la presente invención. En una realización, se administra 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 fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida o las sondas de imagen que contienen fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida preferentes tienen las siguientes propiedades: (1) alto rendimiento cuántico (por ejemplo, rendimiento cuántico superior al 5 % en un medio acuoso), (2) espectro de emisión estrecho (por ejemplo, inferior a 75 nm, más preferentemente inferior a 50 nm), (3) espectros de absorción y emisión espectralmente separados (por ejemplo, separados en más de 20 nm, más preferentemente en más de 50 nm), (3) tienen una alta estabilidad y fotoestabilidad química (por ejemplo, retienen propiedades fluorescentes después de la exposición a la luz), (4) no son tóxicos o son mínimamente tóxicos para las células o sujetos en dosis utilizadas para protocolos de formación de imágenes, (medidos por ejemplo, por DL<sub>50</sub> o estudios de irritación, u otros métodos similares conocidos en la materia) y/o (5) tienen viabilidad comercial y producción creciente para grandes cantidades (por ejemplo, cantidades en gramos y kilogramos).

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 las bases inorgánicas, tales como hidróxidos de metales alcalinotérreos, de amonio o alcalinos, carbonatos, bicarbonatos, y similares, y bases orgánicas tales como alcóxidos, alquilamidas, alquil- y arilaminas, y similares. Dichas bases útiles para preparar las sales de la presente invención incluyen por consiguiente hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio, y similares.

Los compuestos de la presente invención tienen un grupo suficientemente básico, tal como una amina que puede 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-toluensulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-

bromofenil-sulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido acético, y similares. 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, butino-1,4-dioato, hexino-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 utiliza en la presente memoria, significa un hidrocarburo ramificado o cíclico de cadena lineal saturado. Cuando es de cadena lineal o ramificado, un grupo alquilo es generalmente C1-C20, más generalmente C1-C10; cuando es cíclico, un grupo alquilo es generalmente C3-C12, más generalmente C3-C7. 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 contiene generalmente entre 1 y 12 átomos de carbono, más generalmente entre 1 y 6 átomos de carbono, e incluso más generalmente entre 1 y 4 átomos de carbono. Uno o más grupos de metileno en un grupo alifático pueden reemplazarse opcionalmente con O, S, o NH.

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión anillo carbocíclico no aromático o anillo heterocíclico no aromático, utilizada por sí sola o como parte de un resto mayor, se refiere a un anillo que contiene carbono o heteroátomo no aromático que puede estar saturado o contener una o más unidades de insaturación, que tiene tres a catorce átomos incluyendo anillos monocíclicos y policíclicos, en los que el anillo carbocíclico o heterocíclico puede condensarse con uno o más anillos carbocíclicos o heterocíclicos no aromáticos o con uno o más anillos (carbocíclicos o heterocíclicos) aromáticos.

El término "alcoxi", como se utiliza en la presente memoria, se representa por -OR<sup>\*\*</sup>, en el que R<sup>\*\*</sup> es un grupo alquilo, como se ha definido previamente.

El término "carbonilo", como se utiliza en la presente memoria, se representa por -C(=O)R<sup>\*\*</sup>, en el que R<sup>\*\*</sup> es un grupo alquilo, como se ha definido previamente.

La expresión "grupo aromático" incluye anillos aromáticos carbocíclicos y anillos de heteroarilo. La expresión "grupo aromático" se puede utilizar de manera intercambiable con las expresiones "arilo", "anillo de arilo" "anillo aromático", "grupo arilo" y "grupo aromático".

Los grupos de anillo aromático carbocíclico que tienen solo átomos en el anillo de carbono (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 con uno o más anillos aromáticos (aromático carbocíclico o heteroaromático). 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 utiliza en la presente memoria, un grupo en el que un anillo aromático está condensado con uno o más anillos no aromáticos (carbocíclico o heterocíclico), tal como un indanilo, ftalimidilo, naftimidilo, fenantridinilo, o tetrahidronaftilo.

La expresión "heteroarilo", "heteroaromático", "anillo de heteroarilo", "grupo heteroarilo" y "grupo heteroaromático", utilizada por sí sola o como parte de un resto mayor, como en "heteroaralquilo", se refiere a grupos de anillo heteroaromático que tiene de cinco a catorce miembros, incluyendo anillos heteroaromáticos monocíclicos y anillos aromáticos policíclicos en los que un anillo aromático monocíclico está condensado con uno o más 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, 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, benzooxazol, bencimidazolilo, isoquinolinilo e isoindolilo. También incluido dentro del alcance del término "heteroarilo", como se utiliza en la presente, es un grupo en el que un anillo aromático está condensado con uno o más anillos no aromáticos (carbocíclicos o heterocíclicos).

La expresión grupo heterocíclico no aromático, utilizada por sí sola o como parte de un resto mayor, se refiere a grupos de anillo heterocíclico no aromático que tiene de tres a catorce miembros, incluyendo anillos heterocíclicos monocíclicos y anillos policíclicos en los que un anillo monocíclico está condensado con uno o más anillos carbocíclicos o heterocíclicos no aromáticos o anillo aromático (carbocíclico o heterocíclico). Los grupos heterocíclicos tienen uno o más heteroátomos en el anillo, y pueden ser 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 azetidino.

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. También 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 0-3 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 N-sustituido), en el que R" es un sustituyente adecuado para el átomo de nitrógeno en el anillo de un grupo heterocíclico que contiene nitrógeno no aromático, como se define a continuación. Preferentemente, el nitrógeno está no sustituido.

Un grupo arilo sustituido, como se define en la presente memoria, contiene uno o más átomos en el anillo sustituibles, tales como átomos de carbono o nitrógeno en el anillo. Los ejemplos de sustituyentes adecuados en un átomo de carbono en el anillo sustituible de un grupo arilo o alifático incluyen halógeno (por ejemplo, -Br, Cl, I y F), -OH, alquilo C1-C4, haloalquilo C1-C4, -NO<sub>2</sub>, alcoxi C1-C4, haloalcoxi C1-C4, -CN, -NH<sub>2</sub>, alquilamino C1-C4, dialquilamino C1-C4, -C(O)NH<sub>2</sub>, -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)<sub>2</sub>, -NHC(O)O-(alquilo C1-C4), -C(O)OH, -C(O)O-(alquilo C1-C4), -NHC(O)NH<sub>2</sub>, -NHC(O)NH(alquilo C1-C4), -NHC(O)N(alquilo C1-C4)<sub>2</sub>, -NH-C(=NH)NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo C1-C3), -SO<sub>2</sub>N(alquilo C1-C3)<sub>2</sub>, NHSO<sub>2</sub>H, NHSO<sub>2</sub>(alquilo C1-C4) y arilo. Los sustituyentes preferentes 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 en el anillo sustituible de un grupo arilo incluyen alquilo C1-C4, NH<sub>2</sub>, alquilamino C1-C4, dialquilamino C1-C4, -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NH(alquilo C1-C4), -C(O)(alquilo C1-C4), -CO<sub>2</sub> R\*\*, -C(O)C(O)R\*\*, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)OH, -C(O)O-(alquilo C1-C4), -SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, -SO<sub>2</sub>NH(alquilo C1-C3), -SO<sub>2</sub>N(alquilo C1-C3)<sub>2</sub>, NHSO<sub>2</sub>H, NHSO<sub>2</sub>(alquilo C1-C4), -C(=S)NH<sub>2</sub>, -C(=S)NH(alquilo C1-C4), -C(=S)N(alquilo C1-C4)<sub>2</sub>, -C(=NH)-N(H)<sub>2</sub>, -C(=NH)-NH(alquilo C1-C4) y -C(=NH)-N(alquilo C1-C4)<sub>2</sub>.

El grupo alquilo, carbocíclico o heterocíclico, no aromático, alifático, sustituido, como se define en la presente memoria, contiene 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\*\*)<sub>2</sub>, =NNHC(O)R\*\*, -NNHCO<sub>2</sub> (alquilo), =NNHSO<sub>2</sub> (alquilo), =NR\*\*, grupo cicloalquilo espiro o un grupo cicloalquilo condensado. R\*\* en cada ocurrencia, es independientemente -H o alquilo C1-C6. Los sustituyentes preferentes en el grupo alquilo alifático, carbocíclico o heterocíclico, no aromático, son como se define a lo largo de la memoria descriptiva.

#### Ensayo *in vitro* y uso

Los fluorocromos y las moléculas fluorescentes biocompatibles de la presente invención pueden ensayarse *in vitro* por un experto en la materia para evaluar sus características biológicas y de rendimiento. Por ejemplo, diferentes tipos de células cultivadas en un cultivo pueden utilizarse para evaluar sus características biológicas y de rendimiento. La captación, el marcado, la unión, la orientación selectiva o la localización celular de los fluorocromos y las moléculas fluorescentes biocompatibles se puede evaluar utilizando técnicas conocidas en la materia, tales como métodos de espectroscopia, microscopía fluorescente y citometría de flujo. Por ejemplo, los fluorocromos y las moléculas fluorescentes biocompatibles de la presente invención pueden ponerse en contacto con una muestra durante un periodo de tiempo y luego se lavan para eliminar cualquier molécula libre o no unida. La muestra puede verse con un microscopio de fluorescencia equipado con filtros apropiados adaptados a las propiedades ópticas de los fluorocromos y las moléculas fluorescentes biocompatibles de la presente invención. La microscopía de fluorescencia de las células en cultivo es también un medio conveniente para determinar si la captación y la unión se producen en uno o más compartimentos subcelulares. Los tejidos, secciones tisulares y otros tipos de muestras, tales como muestras de Cytospin también se pueden utilizar de manera similar para evaluar las características biológicas y de rendimiento de las moléculas. Otros métodos de detección fluorescente, incluyendo citometría de flujo, inmunoensayos, ensayos de hibridación, y análisis de micromatrices, también se pueden utilizar.

#### Formación de imágenes ópticas

Los principios generales de la fluorescencia, la adquisición de imágenes ópticas, y el procesamiento de las imágenes pueden aplicarse en la práctica de la invención. Para una revisión de las técnicas de formación de imágenes ópticas, véase, por ejemplo, Alfano *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 820:248-270, 1997.

Un sistema de formación de imágenes útil en la práctica de la presente invención incluye normalmente tres componentes básicos: (1) una fuente de luz apropiada para la excitación del fluorocromo y la molécula fluorescente biocompatible, (2) un medio para separar o distinguir las emisiones de luz utilizadas para la excitación, y (3) un sistema de detección para detectar la señal óptica emitida.

En general, el sistema de detección óptica puede visualizarse teniendo en cuenta un componente de recogida óptica/de formación de imágenes y un componente de detección óptica/de grabación de imágenes. Aunque el sistema de detección óptica puede ser un único dispositivo integrado que incorpora ambos componentes, el componente de recogida óptica/de formación de imágenes y el componente de detección de luz/de grabación de imágenes se discutirán por separado.

Un componente de recogida óptica/de formación de imágenes particularmente útil es un endoscopio. Los dispositivos y las técnicas endoscópicas que se han utilizado para la formación de imágenes ópticas *in vivo* de numerosos tejidos y órganos, incluyendo el peritoneo (Gahlen *et al.*, *J. Photochem Photobiol B.* 52:131-135, 1999), cáncer de ovarios (Major *et al.*, *Gynecol. Oncol.* 66:122-132, 1997), colon y recto (Mycek *et al.*, *Gastrointest. Endosc.* 48:390-394, 1998; y Stepp *et al.*, *Endoscopy* 30:379-386, 1998), conductos biliares (Izuishi *et al.*, *Hepatogastroenterology* 46:804-807, 1999), estómago (Abe *et al.*, *Endoscopy* 32:281-286, 2000), vejiga (Kriegmair *et al.*, *Urol. Int.* 63:27-31, 1999; y Riedl *et al.*, *J. Endourol.* 13:755-759, 1999), pulmón (Hirsch *et al.*, *Clin Cancer Res* 7:5-220, 2001), cerebro (Ward, *J. Laser. Appl.* 10:224-228, 1998), esófago, regiones de cabeza y cuello, pueden emplearse en la práctica de la presente invención.

Otros tipos de componentes de recogida óptica útiles en la invención son dispositivos basados en catéteres, incluyendo dispositivos de fibra óptica. Dichos dispositivos son particularmente adecuados para la formación de imágenes intravasculares. Véanse, por ejemplo, Tearney *et al.*, *Science* 276:2037-2039, 1997; y *Circulation* 94:3013, 1996.

Otras tecnologías de formación de imágenes, incluyendo la tecnología de matrices en fase (Boas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 91:4887-4891, 1994; Chance, *Ann. NY Acad. Sci.* 838:29-45, 1998), tomografía óptica (Cheng *et al.*, *Optics Express* 3:118-123, 1998; y Siegel *et al.*, *Optics Express* 4:287-298, 1999), microscopía intravital (Dellian *et al.*, *Br. J. Cancer* 82:1513-1518, 2000; Monsky *et al.*, *Cancer Res.* 59:4129-4135, 1999; y Fukumura *et al.*, *Cell* 94:715-725, 1998), formación de imágenes confocales (Korlach *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 96:8461-8466, 1999; Rajadhyaksha *et al.*, *J. Invest. Dermatol.* 104:946-952, 1995; y González *et al.*, *J. Med.* 30:337-356, 1999) y tomografía molecular de fluorescencia (TMF) (Nziachristos *et al.*, *Nature Medicine* 8:757-760, 2002; patente de Estados Unidos n.º 6.615.063, solicitud PCT n.º WO 03/102558, y PCT US/03/07579) pueden emplearse en la práctica de la presente invención, el sistema de formación de imágenes IVIS® (Xenogen, Alameda, CA), el sistema Maestro (CRI, Woburn, MA), SoftScan® y eXplore Optix™ (Advanced Research Technologies, Montreal, Canadá) pueden emplearse en la práctica de la presente invención.

Un componente de detección óptica/grabación de imágenes adecuado, por ejemplo, sistemas de dispositivo de carga acoplada (DCC) o película fotográfica, puede utilizarse en la invención. La elección de la detección óptica/grabación de imágenes dependerá de factores que incluyen el tipo componente de recogida óptica/grabación de imágenes que se está utilizando. La selección de componentes adecuados, su ensamblaje en un sistema de formación de imágenes ópticas, y el funcionamiento del sistema están dentro de la habilidad ordinaria en la materia.

#### Aplicaciones y métodos de diagnóstico a enfermedades

Los métodos pueden utilizarse para determinar una serie de indicios, incluyendo el seguimiento de la localización de los fluorocromos y las moléculas fluorescentes biocompatibles en el sujeto con el tiempo o la evaluación de los cambios o alteraciones en el metabolismo y/o excreción de las moléculas en el sujeto con el tiempo. Los métodos también pueden utilizarse para seguir una terapia para tales enfermedades por formación de imágenes de acontecimientos moleculares y vías biológicas moduladas por dicha terapia, incluyendo la determinación de la eficacia, el momento óptimo, los niveles de dosificación óptimos (incluso los pacientes individuales o los sujetos de ensayo), y los efectos sinérgicos de las combinaciones de la terapia.

La invención puede utilizarse para ayudar a un médico o a un cirujano a identificar y caracterizar áreas de enfermedad, tales como artritis, cáncer y, específicamente, pólipos en el colon, o la placa vulnerable para distinguir tejido enfermo y normal, como la detección de los márgenes del tumor que son difíciles de detectar utilizando un microscopio de funcionamiento ordinario, por ejemplo, en la cirugía cerebral, ayudará a dictar una intervención terapéutica o quirúrgica, por ejemplo, mediante la determinación de si una lesión es cancerosa y debe ser eliminada o no cancerosa y dejarla tal cual, o en la estadificación quirúrgica de una enfermedad, por ejemplo, estadificación intraoperatoria de los ganglios linfáticos, mapeo de los ganglios linfáticos centinelas, o evaluación del sangrado intraoperatorio.

Los métodos también pueden utilizarse en la detección, caracterización y/o determinación de la localización de una enfermedad, especialmente la enfermedad precoz, la gravedad de una enfermedad o una afección asociada a la enfermedad, la estadificación de una enfermedad, y el seguimiento y la guía de diversas intervenciones terapéuticas, tales como los procedimientos quirúrgicos, y el seguimiento de la terapia con fármacos, incluyendo las terapias basadas en células. Los métodos también pueden utilizarse en el pronóstico de una enfermedad o afección de enfermedad. Ejemplos de tales afecciones de enfermedad o enfermedad incluyen inflamación (por ejemplo, inflamación causada por artritis, por ejemplo, artritis reumatoide), cánceres (por ejemplo, colorrectal, de ovarios, de pulmón, mama, próstata, cervical, piel, cerebral, gastrointestinal, boca, esófago, óseo), enfermedades

cardiovasculares (por ejemplo, aterosclerosis y afecciones inflamatorias de los vasos sanguíneos, isquemia, apoplejía, trombosis), enfermedades dermatológicas (por ejemplo, sarcoma de Kaposi, psoriasis), enfermedades oftálmicas (por ejemplo, degeneración macular, retinopatía diabética), enfermedades infecciosas (por ejemplo, infecciones bacterianas, virales, fúngicas y parasitarias, incluyendo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida), enfermedades inmunológicas (por ejemplo, un trastorno autoinmunitario, linfoma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes mellitus), enfermedades del sistema nervioso central (por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa, tal como enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer), enfermedades hereditarias, enfermedades metabólicas, enfermedades medioambientales (por ejemplo, envenenamiento por plomo, mercurio y radiactivo, cáncer de piel), y enfermedades relacionadas con los huesos (por ejemplo, osteoporosis, tumores óseos primarios y metastásicos, osteoartritis). Por lo tanto, los compuestos o las moléculas fluorescentes biocompatibles para su uso en los métodos de la invención pueden utilizarse, por ejemplo, para determinar la presencia de células tumorales y la localización de las células tumorales, la presencia y la localización de la inflamación, incluyendo la presencia de macrófagos activados, por ejemplo en la aterosclerosis o la artritis, la presencia y la localización de la enfermedad vascular incluyendo áreas con riesgo de oclusión aguda (es decir, placas vulnerables) en las arterias y periféricas, las regiones de expansión de aneurismas, placa inestable en las arterias carótidas, y áreas isquémicas. Los compuestos (composiciones) de la invención también pueden utilizarse en la identificación y evaluación de la apoptosis, necrosis, hipoxia y angiogénesis.

Las modalidades de formación de imágenes ópticas y las técnicas de medición incluyen, formación de imágenes de fluorescencia; endoscopia; endoscopia de fluorescencia; tomografía de coherencia óptica; formación de imágenes de transmitancia; formación de imágenes de transmitancia resuelta con el tiempo; formación de imágenes confocales; microscopía no lineal; formación de imágenes fotoacústicas; formación de imágenes acústica-ópticas; espectroscopía; espectroscopía de reflectancia; formación de imágenes intravitales; formación de imágenes de 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, vida de la fluorescencia, rendimiento cuántico y extinción.

Los compuestos (composiciones) de la presente invención pueden utilizarse en combinación con otras composiciones y métodos de formación de imágenes. Por ejemplo, los compuestos descritos pueden utilizarse en combinación con otras modalidades de formación de imágenes tradicionales, tales como rayos X, tomografía computarizada (TC), tomografía por emisión de positrones (TEP), tomografía computarizada de fotón único (TCFU), y formación de imágenes por resonancia magnética (FIRM). Por ejemplo, los compuestos (composiciones) de la presente invención pueden utilizarse en combinación con la formación de imágenes por TC y RM para obtener información tanto anatómica como biológica de forma simultánea, por ejemplo, por medio del co-registro de una imagen tomográfica con una imagen generada por otra modalidad de formación de imágenes. En particular, la combinación con RM o TC resulta preferente, dada la alta resolución espacial de estas técnicas de formación de imágenes. Los compuestos (composiciones) de la presente invención también pueden utilizarse en combinación con rayos X, TC, TEP, TCFU y MR, agentes de contraste o sondas de imagen con nanopartículas de silicio fluorescentes de la presente divulgación también pueden contener componentes, tales como yodo, átomos de gadolinio e isótopos radiactivos, que pueden ser detectados mediante modalidades de formación de imágenes por TC, TEP, TCFU y RM en combinación con la formación de imágenes ópticas.

#### Kits

Los compuestos (composiciones) descritos en la presente memoria pueden envasarse como un kit, que puede incluir opcionalmente instrucciones para el uso de los fluorocromos o las moléculas fluorescentes biocompatibles en diversas aplicaciones a modo de ejemplo. Los ejemplos incluyen kits que contienen, por ejemplo, los compuestos (composiciones) en forma de polvo o liofilizada, e instrucciones para su uso, incluyendo la reconstitución, información de dosificación, y la información de almacenamiento para aplicaciones *in vivo* y/o *in vitro*. Los kits pueden contener opcionalmente envases de los compuestos (composiciones) en una forma líquida listos para su uso, o que requieren una mezcla mayor con soluciones para la administración. Para aplicaciones *in vivo*, el kit puede contener los compuestos (composiciones) en una dosificación y forma adecuada para una aplicación particular, por ejemplo, un líquido en un vial, cremas tópicas, etc.

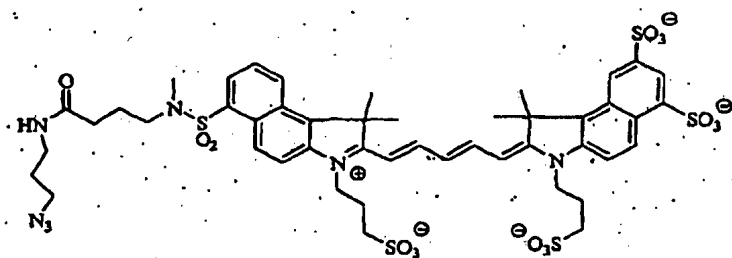
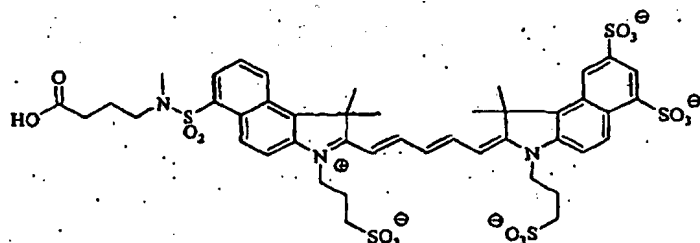
El kit puede incluir componentes opcionales que ayudan en la administración de la dosis unitaria a los sujetos, tales como viales para la reconstitución de formas en polvo, jeringas para inyección, sistemas de administración IV personalizados, inhaladores, etc. Los kits pueden ser suministrados en un envase que está provisto de un sello que es adecuado para una perforación única o múltiple con una aguja hipodérmica (por ejemplo, cierre del sello del tabique plegado) mientras se mantiene la integridad estéril. Dichos envases pueden contener dosis únicas o múltiples para el sujeto. Adicionalmente, el kit de dosis unitaria puede contener componentes personalizados que ayudan en la detección de los compuestos (composiciones) *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo., endoscopios especializados, filtros de luz. Los kits pueden contener también instrucciones para la preparación y administración de los compuestos (composiciones). El kit puede fabricarse como una unidad de dosis única para su uso en un sujeto, múltiples usos para un sujeto particular; o el kit puede contener múltiples dosis adecuadas para la administración a múltiples sujetos ("envase a granel"). Los componentes del kit pueden ser acumulados en cartones, envases de ampollas, botellas y tubos.



A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria poseen el mismo significado que el comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos.

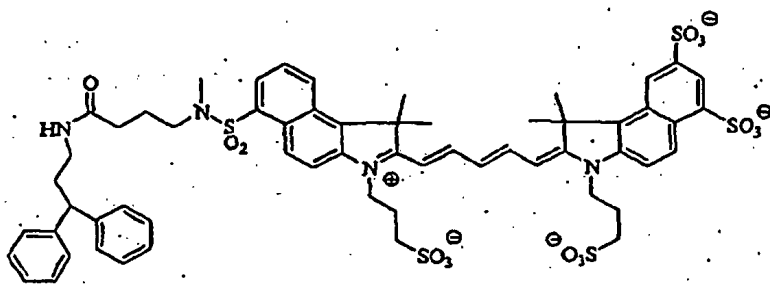
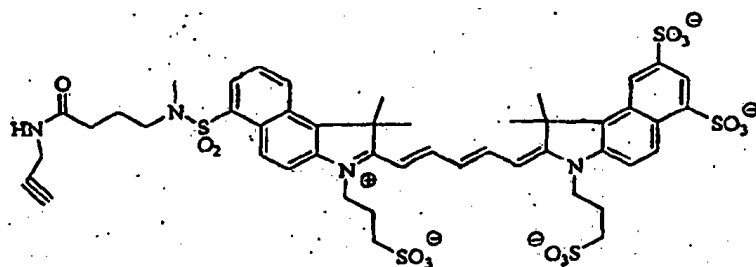
5

En ciertos aspectos de la presente divulgación, los compuestos de la presente invención no son:



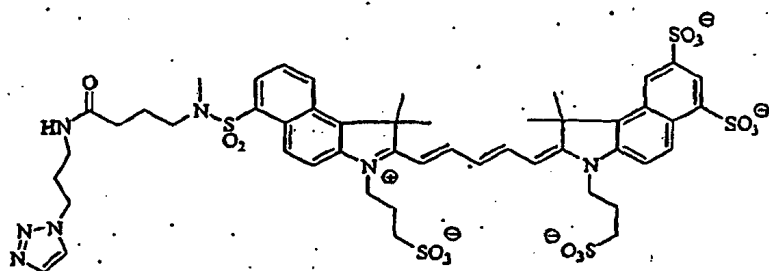
10

o



15

o



20

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos demuestran la síntesis de fluorocromos de sulfonamida N,N-disustituida. Los materiales y métodos representativos que pueden utilizarse en la preparación de los compuestos de la invención se describen adicionalmente a continuación. Se utilizaron todos los productos químicos y disolventes (grado reactivo) como se suministra comercialmente de manera general sin purificación adicional.

Los métodos por HPLC analítica y preparativa utilizados generalmente son:

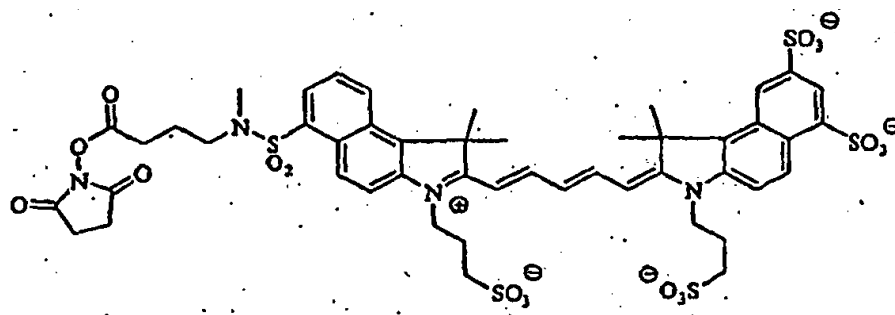
A Columna: Agilent Zorbax 80 Å, Extend C18, 4,6 x 250 mm (5 µm). Fase móvil: acetonitrilo, 25 mM de acetato de trietilamonio.

B Columna: Varian Dynamax, -100 Å, C18, 41,4 x 250 mm. Fase móvil: acetonitrilo, 25 mM de acetato de trietilamonio.

C Columna: Phenomenex Jupiter, 300 Å, C18. Fase móvil: acetonitrilo, 25 mM de acetato de trietilamonio.

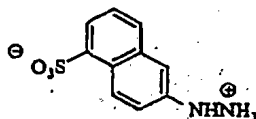
## EJEMPLO 1

## Síntesis del Ejemplo 1



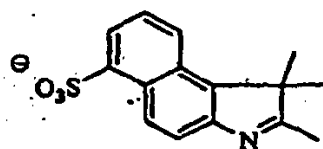
Compuesto A

## Parte A. Preparación de 6-hidrazino-1-naftaleno-sulfonato I



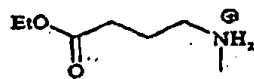
6-amino-1-naftalensulfonato (10 g, 45 mmol) (TCI), hidróxido de sodio (1,8 g, 45 mmol) (Mallinckrodt) y nitrito de sodio (3,7 g, 54 mmol) (Aldrich) se combinaron en 50 ml de agua y se agitaron para obtener una solución transparente de color marrón. La solución se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota durante 15 minutos a 50 ml de ácido clorhídrico concentrado y 30 g de hielo se enfriaron en un baño de hielo/sal a <0 °C. Se disolvió cloruro de estaño (18,7 g, 99 mmol, Aldrich) en 50 ml de ácido clorhídrico 6M, se enfrió a 0 °C y se añadió gota a gota a la mezcla de reacción durante 15 min con agitación. La suspensión resultante se dejó en agitación a 0 °C durante 1 h. El precipitado amarillo se filtró y se lavó con agua destilada, metanol, isopropanol y finalmente éter para proporcionar 9 g de la hidrazina deseada (84 %).

## Parte B. Preparación de 2,3,3-trimetilbenzindol-7-sulfonato II



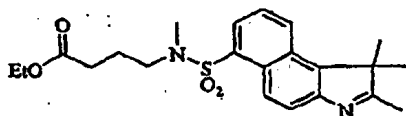
6-hidrazino-1-naftaleno sulfonato (5 g, 21 mmol), metil isopropil cetona (8,1 g, 93 mmol, Aldrich) y acetato de potasio (6 g, 61 mmol) se combinaron en 70 ml de ácido acético glacial en un recipiente a presión de 100 ml con una barra de agitación. El recipiente se selló herméticamente y se calentó a 145 °C durante 22 horas. La lechada se vertió en éter y el precipitado se disolvió en etanol con la ayuda de calor y sometimiento a ultrasonidos y después se filtró. El filtrado se evaporó para dar el compuesto del título como un sólido higroscópico amarillo.

## Parte C. Preparación de clorhidrato de etil-4-(metilamino)butirato III



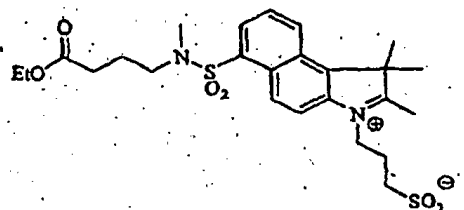
Clorhidrato del ácido 4-(metilamino)butírico (7,5 g, 49 mmol, Aldrich) se disolvió en 75 ml de etanol absoluto y se añadieron 4 ml de HCl 2,0 M en éter (Aldrich). La solución, que se volvió transparente tras el calentamiento a 70 °C, se sometió a reflujo durante 20 horas. El disolvente se eliminó al vacío dando como resultado una sal de clorhidrato blanca, sólida con rendimiento cuantitativo. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1,20 (t, J=7,2 Hz, 3H), 2,13 (m, 2H), 2,47 (t, J=7,2 Hz, 2H), 2,67 (t, J=5,7 Hz, 3H), 3,00 (ancho m, 2H), 4,07 (q, J=7,2 Hz, 2H), 9,50 (ancho s, 2H).

## Parte D. Preparación de 2,3,3-trimetilbenzindol-6-[N-metil-N-(etil-4-butirato)]sulfonamida IV



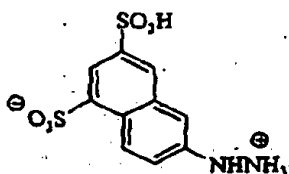
Se colocó sal de potasio del ácido 2,3,3-trimetilbenzindol-6-sulfónico (3 g, 9,2 mmol) en 50 ml de acetonitrilo seco. Se añadió gradualmente pentacloruro de fósforo (4 g, 19 mmol, Aldrich), y la mezcla se sometió a reflujo durante 1 hora dando como resultado una solución de color rojo con un sólido blanquecino. La solución de color rojo se filtró y el disolvente se redujo a 10 ml por evaporación a presión reducida. La solución se vertió en 200 ml de éter y el precipitado sólido de color rojo se recogió por filtración. El sólido se volvió a disolver en acetonitrilo y clorhidrato de etil-4-(metilamino)butirato (2 g, 11 mmol) seguido de trietilamina (1,1 g, 11 mmol). La solución se filtró, se evaporó a sequedad y se purificó por cromatografía en columna rápida en gel de sílice 60 eluyéndose con diclorometano que contiene trietilamina al 0,5 %.

## Parte E. Preparación de 2,3,3-trimetil-1-(sulfonatopropil)-benzindolinio-6-[N-metil-N-(etil-4-butirato)]sulfonamida V



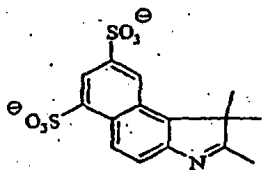
Se disolvieron 2,3,3-trimetil-6-[N-metil-N-(etil-4-butirato)]sulfonamida (250 mg, 0,6 mmol) y 1,3-propanosulfona (140 mg, 1,15 mmol, Aldrich) en 2 ml de *o*-diclorobenceno. La solución se calentó en un tubo sellado a 120 °C durante 16 horas. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente, y después se añadieron 40 ml de éter. El sólido de color púrpura se filtró y se enjuagó con tres porciones de 25 ml de éter y se secó al vacío. Se obtuvieron 260 mg de un polvo higroscópico de color púrpura oscuro (80 %). MALDI-TOF-MS *m/e* 539,19 [M]<sup>+</sup> calculado para C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup>, encontrado 539,19.

## Parte F. Preparación de 6-hidrazino-1,3-naftaleno-disulfonato VI



Se disolvió sal de 6-amino-1,3-naftaleno disulfonato de disodio (10 g, 29 mmol) (TCI) en 30 ml de agua y se añadió a 50 ml de agua y a 15 ml de ácido clorhídrico concentrado. La lechada se enfrió a <0 °C en un baño de hielo/acetona y se añadió nitrito de sodio (2,2 g, 32 mmol, Aldrich) en 40 ml de agua fría gota a gota durante 10 minutos. Cloruro de estaño (11 g, 58 mmol) (Aldrich) se disolvió en 30 ml de agua y 6 ml de ácido clorhídrico concentrado, se enfrió a 0 °C y se añadió a la mezcla de reacción durante 10 minutos. La solución resultante se agitó y se dejó calentar a temperatura ambiente durante 3 horas dando como resultado una solución transparente de color marrón. La solución se redujo en volumen por evaporación rotatoria y el producto se precipitó por la adición de isopropanol. El producto se filtró, se lavó con isopropanol y se secó al vacío.

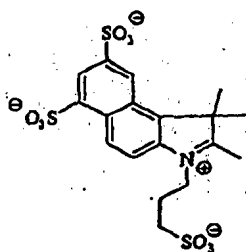
## Parte G. Preparación de 2,3,3-trimetilbenzindol-5,7-disulfonato VII



- 5 6-hidrazino-1,1,3-naftaleno-disulfonato (10 g, 25 mmol), isopropil metil cetona (12 g, 140 mmol, Aldrich) y acetato de potasio (6 g, 61 mmol) se combinaron en 75 ml de ácido acético glacial en un recipiente a presión de 100 ml con una barra de agitación. El recipiente se selló y se calentó a 145 °C durante 22 horas. La solución se enfrió y el ácido acético se eliminó por evaporación rotatoria. El residuo se disolvió en metanol y se filtró. El producto se precipitó a partir del filtrado de metanol con isopropanol y se filtró, se lavó con isopropanol y éter y se secó al vacío.

10

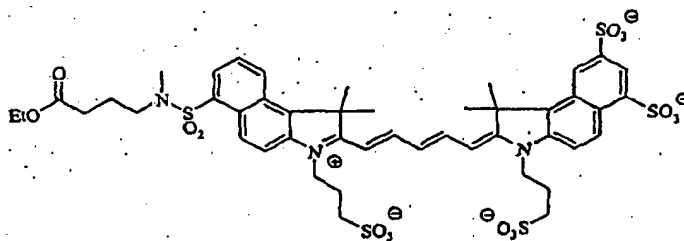
## Parte H. Preparación de 2,3,3-trimetil-1-(3-sulfonatopropil)benzindolinio-5,7-disulfonato VIII



- 15 2,3,3-trimetilbenzindol-6,8-disulfonato (2,2 g, 5 mmol) se disolvió en 50 ml de DMF seca resultante en una solución de color naranja transparente. Se añadió 1,3-propanosultona (2,8 g, 23 mmol, Aldrich) y la solución se calentó a 145 °C en un tubo sellado durante 15 horas, volviéndose de color púrpura oscuro. La solución se enfrió y se vertió en 150 ml de 2-propanol. La mezcla se centrifugó y la solución sobrenadante se decantó. El producto sólido se lavó en un filtro con tres porciones de 50 ml de propanol seguido de 50 ml de éter y se secó al vacío, dando como resultado
- 20 2,5 g de un sólido de color púrpura oscuro (90 %). MALDI-TOF-MS m/e 492,05 [M]<sup>+</sup> calculado para C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>9</sub>S<sub>3</sub><sup>+</sup>, encontrado 492,05.

20

## Parte I. Preparación del compuesto IX



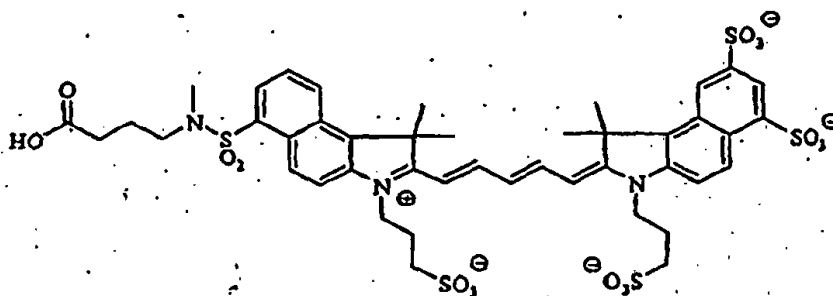
25

30

35

Benzindolinio trisulfonato VIII (250 mg, 0,44 mmol) se disolvió en 5 ml de ácido acético glacial y 2 ml de anhídrido acético. Se añadió clorhidrato de malonaldehído dianilina (112 mg, 0,43 mmol) (TCI) y la solución se calentó a 120 °C en un tubo sellado durante 2 h. La solución se enfrió y se añadieron 25 ml de acetato de etilo para precipitar el producto. La mezcla se centrifugó y el acetato de etilo se decantó y el sólido se lavó con 25 ml de acetato de etilo. El sólido se disolvió en 6 ml de ácido acético glacial y en 2 ml de anhídrido acético. Se añadió benzindolinio de sulfonamida V (235 mg, 0,44 mmol) junto con 300 mg de acetato de potasio y la solución se calentó a 125 °C en un tubo sellado durante 18 horas. La solución se enfrió, y se añadieron 25 ml de acetato de etilo para precipitar el producto. La mezcla se centrifugó y el acetato de etilo se decantó y el sólido se lavó con 25 ml de acetato de etilo seguido de 25 ml de acetonitrilo. El producto se purificó por HPLC proporcionando 67 mg de colorante de éster etílico puro (13 %). MALDI-TOF-MS m/e 1.066,23 [M]<sup>+</sup> calculado para C<sub>46</sub>H<sub>56</sub>N<sub>3</sub>O<sub>16</sub>S<sub>5</sub><sup>+</sup>, encontrado 1.066,18. λ<sub>máx</sub> (H<sub>2</sub>O)=673 nm.

## Parte J. Preparación del compuesto X



- 5 El compuesto IX (65 mg, 0,048 mmol) se disolvió en 5 ml de NaOH 0,4 M y se agitó a 20 °C durante 1 hora dando como resultado una conversión cuantitativa a ácido libre por HPLC. La solución se acidificó a pH~3 con HCl 1 M, se desaló y se liofilizó para dar el producto deseado X. MALDI-TOF-MS m/e 1.038,20 [M]<sup>+</sup> calculado para C<sub>44</sub>H<sub>52</sub>N<sub>3</sub>O<sub>16</sub>S<sub>5</sub><sup>+</sup>, encontrado 1.038,21. λ<sub>máx</sub> (H<sub>2</sub>O)=673 nm.

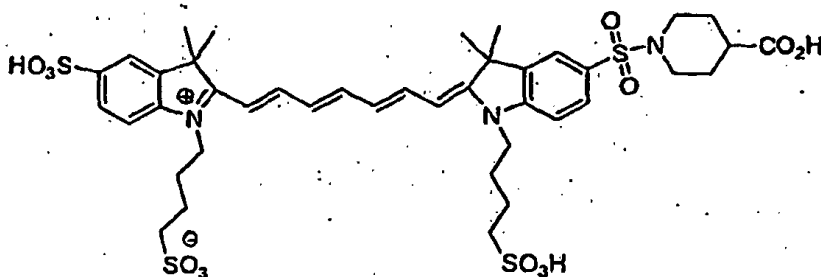
## 10 Parte K. Preparación del Ejemplo 1

- El compuesto X (21 mg, 0,019 mmol) se disolvió en 1,5 ml de DMF seca. Se añadió carbonato de disuccinimidilo (37 mg, 0,14 mmol) (Aldrich) junto con 4-dimetilaminopiridina (2,5 mg, 0,02 mmol) (Aldrich). La solución se calentó con agitación a 60-65 °C durante 1 hora. El éster activo se precipitó con 20 ml de acetato de etilo y se separó por centrifugación. El sólido azul oscuro se lavó con cuatro porciones de 20 ml de acetato de etilo y se secó al vacío para dar el compuesto del título (compuesto A). MALDI-TOF-MS m/e 1.135,21 [M]<sup>+</sup> calculado para C<sub>48</sub>H<sub>55</sub>N<sub>4</sub>O<sub>18</sub>S<sub>5</sub><sup>+</sup>, encontrado 1.135,19. λ<sub>máx</sub> (H<sub>2</sub>O)=673 nm.

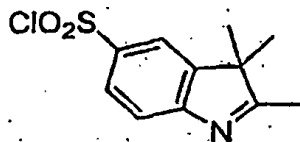
## EJEMPLO 2

20

## Síntesis del Ejemplo 2

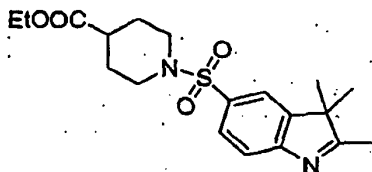


## 25 Parte A. Preparación de cloruro de 2,3,3-trimetil indolinina 5-sulfonil (XI)



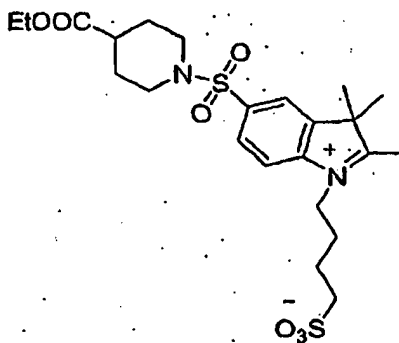
- 30 Se añadió sal de 5-sulfo-2,3,3-trimetil indolinina K comercialmente disponible (5,45 g, 19,6 mmol) a una mezcla de pentacloruro de fósforo (PCl<sub>5</sub>, 6,12 g, 29,42 mmol, 1,5 equivalente), y POCl<sub>3</sub> (3 ml) en un matraz de fondo redondo equipado con un condensador de aire en atmósfera de nitrógeno, y se agitó vigorosamente durante 45 min a 120 °C. El contenido se enfrió a temperatura ambiente, se añadió diclorometano y se precipitó el cloruro de sulfonilo con hexano al 25 % en éter, y se filtró en atmósfera de nitrógeno. Se repitió por segunda vez y se lavó con acetato de etilo al 10 % en hexano. El material sólido transferido a RBF y secado al vacío durante 30 min y el polvo resultante
- 35 (XI) se utilizaron inmediatamente para una reacción adicional (3,2 g, 53 % de rendimiento).

## Parte B. Preparación del compuesto XII



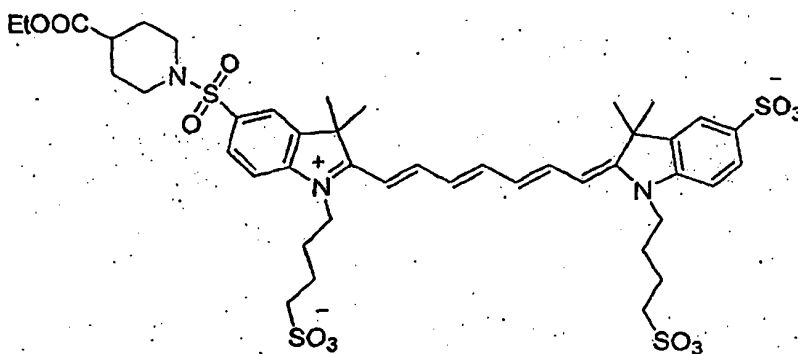
- 5 Se disolvieron 2,22 g de cloruro de sulfonilo XI en 25 ml de acetonitrilo y se enfriaron a 0 °C. 1,35 g de isonipecotato de etilo (8,6 mmol) se disolvieron en 5 ml de acetonitrilo y se añadieron 3 ml de trietilamina en gotas durante 2 min. La solución de color marrón oscuro se volvió en primer lugar amarilla y luego naranja. Después de transcurrir 30 minutos con agitación a 0 °C, la mezcla de reacción se dejó que se calentara hasta temperatura ambiente. La compleción de la reacción se observó por CCF (gel de sílice, acetonitrilo al 5 % en diclorometano). Los disolventes se eliminaron por rotavapor. El material crudo concentrado se cromatografió sobre gel de sílice y se purificó utilizando una mezcla de cloruro de acetonitrilo-metileno, (10 % a 50 % de gradiente). Se obtuvo un rendimiento de 1,2 g de material sólido seco amarillo (XII) al 43 %. IR (1.728 cm<sup>-1</sup> para éster).

## Parte C. Preparación del compuesto XIII



- La sulfonamida XII, 1,2 g (PM 395,2, 3,06 mmol) de antes se hizo reaccionar con 2 ml de 1,4-butano sultona (20 mmol) en 20 ml de 1,2-diclorobenceno y se calentó a 125 °C durante una noche (16 h). La precipitación de la solución viscosa con éter, y los lavados con hexano con acetato de etilo al 10 % proporcionó 300 mg de sal cuaternaria deseada XIII como un polvo de color marrón oscuro (rendimiento del 20 %).

## Parte D. Preparación del compuesto XIV



- 0,1 g de 2,3,3-trimetil-1-(3-sulfonatobutil)-indolinio-5-sulfonato (0,25 mmol) se calentaron con 0,072 g de monohidrocloreto de N-[5-(fenilamino)-2,4-pentadienilideno]anilina (PM 284,8, 0,25 mmol) en 10 ml de anhídrido acético a 110 °C durante una hora. El contenido se enfrió a 0 °C con agitación. 0,133 g (0,25 mmol) de la sal cuaternaria XIII se añadieron seguido por una adición de 0,082 g de acetato de sodio (1 mmol, 4 eq.). Después de agitar durante 10 min a 0 °C, el matraz se calentó hasta temperatura ambiente durante 15 min y se calentó luego gradualmente a 65 °C durante 30 min. Se continuó el calentamiento a 65 °C durante 7 horas. El progreso de la reacción se controló por HPLC, que mostró la presencia de los tres productos colorantes esperados, y el colorante asimétrico deseado en una cantidad bastante grande (aproximadamente 55 %). La mezcla de reacción se mezcló con éter que precipitó el colorante junto con el acetato de sodio. El residuo se recogió por filtración en un embudo sinterizado (tamaño de poro medio), se lavó bien con éter, se secó y se disolvió en agua, que se purificó en una columna preparativa de HPLC RPC18. Se recogieron todas las fracciones correspondientes a los tres colorantes, el disolvente se evaporó en concentradores centrífugos tipo Speed Vac y se secó. Cada fracción se identificó por

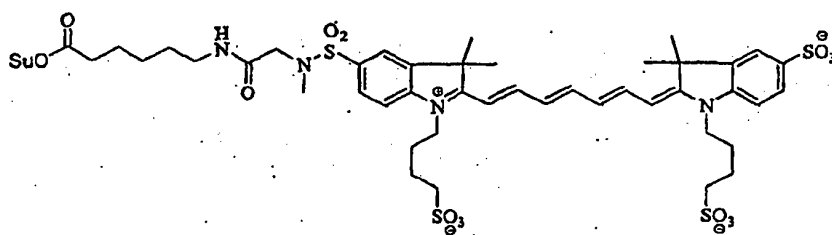
MALDI. MALDI-TOF-MS m/e 952,18 [M+1]<sup>+</sup> calculado para C<sub>43</sub>H<sub>57</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S<sub>4</sub><sup>+</sup>, encontrado 952,26 λ<sub>máx</sub> (H<sub>2</sub>O) = 758 nm. El colorante asimétrico deseado, XIV se obtuvo con un rendimiento del 42 %, 0,1 g.

#### Parte E. Preparación del Ejemplo 2

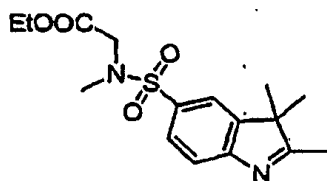
Se disolvieron 0,05 g del compuesto XIV (éster etílico) en 1 ml de agua en un vial de vidrio de 20 ml y se enfriaron a 0 °C con agitación. 100 ul de solución de hidróxido sódico 2M se añadieron en gotas y se continuó la agitación durante 1 hora a 0 °C. HPLC mostró una hidrólisis completa del éster etílico a ácido carboxílico. La solución acuosa se neutralizó con ácido clorhídrico 5 M (100 ul) y después se secó en concentradores centrífugos tipo Speed Vac. El compuesto resultante se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional para la activación, que se llevó a cabo utilizando carbonato de disuccinimido y DMAP en DMF a 65 °C durante 30 min. λ<sub>máx</sub> (H<sub>2</sub>O) = 748 nm.

#### EJEMPLO 3

#### Síntesis del Ejemplo 3

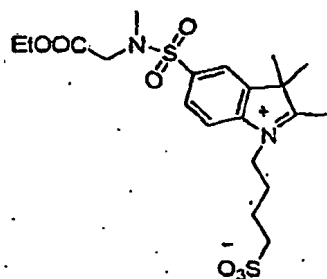


#### Parte A. Preparación del compuesto XV



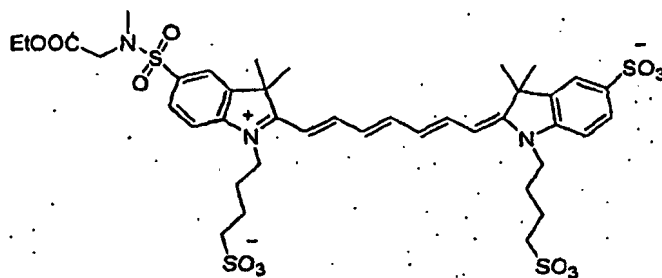
3,0 g de cloruro de 2,3,3-trimetil indolinina 5-sulfonilo (9,65 mmol), como se ha obtenido previamente, se disolvieron en 25 ml de acetonitrilo seco y se enfriaron a 0 °C. 1,86 g de etil (N-metil) glicinato (12,11 mmol), disueltos en 5 ml de acetonitrilo y 3 ml de trietilamina se añadieron en gotas durante 2 min. La solución de color marrón oscuro se volvió en primer lugar amarilla y luego naranja. Después de 3 horas de agitación a 0 °C, se dejó que la mezcla de reacción se calentara hasta la temperatura ambiente. La compleción de la reacción se reveló por CCF (gel de sílice, acetonitrilo al 19 % en diclorometano y trietilamina al 1 %). Los disolventes se eliminaron por rotavapor. El material crudo concentrado se cromatografió sobre gel de sílice y se eluyó utilizando una mezcla de cloruro de acetonitrilo-metileno, (10 % a 50 % de gradiente). Se obtuvo un rendimiento de 1,7 g de material de color amarillo, al 50 %. IR (1.732 cm<sup>-1</sup> para éster).

#### Parte B. Preparación del compuesto XVI



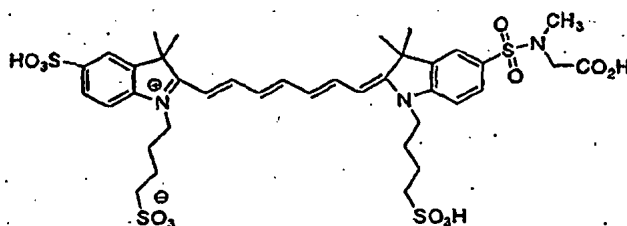
La sulfonamida XV, 1,7 g (5 mmol) de antes se hizo reaccionar con 2 ml de 1,4-butano sultona (20 mmol) en 20 ml de 1,2-diclorobenceno y se calentó a 125 °C durante una noche (16 h). La precipitación de la solución viscosa con éter, y los lavados con una mezcla de hexano y acetona proporcionó 1,5 g de sal cuaternaria deseada como un polvo de color marrón oscuro (rendimiento del 63 %).

## Parte C. Preparación del compuesto XVII



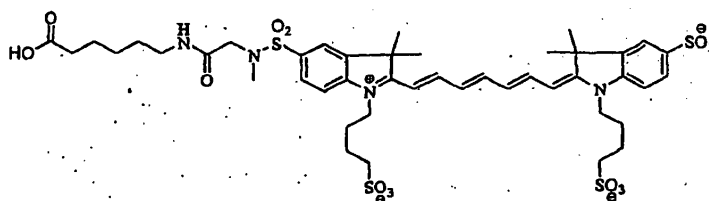
- 5 0,22 g del compuesto XVI (0,55 mmol) se calentaron con 0,157 g de monohidrócloruro de N-[5-(fenilamino)-2,4-pentadienilideno] anilina (0,55 mmol) en 10 ml de anhídrido acético a 110 °C durante hora y media. El contenido se enfrió a 0 °C con agitación y 0,261 g (0,55 mmol) de la sal de potasio cuaternario, 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetilindolenina-5-sulfonato se añadieron seguido de la adición de 0,1 g de acetato de sodio (1,22 mmol, 2,2 eq.)
- 10 Después de agitar durante 20 min a 0 °C, el matraz se calentó hasta temperatura ambiente durante 15 min y después se calentó gradualmente a 70 °C durante 45 min. El calentamiento continuó a 70 °C durante 4 horas. El progreso de la reacción se siguió por HPLC, que mostró los tres productos colorantes esperados con el colorante asimétrico deseado en una cantidad bastante grande (aproximadamente 50 %). La mezcla de reacción se mezcló con éter que precipitó el colorante junto con acetato de sodio. El residuo se recogió por filtración en un embudo sinterizado (tamaño de poro medio), se lavó bien con éter, y los disolventes orgánicos se secaron. El colorante crudo
- 15 se disolvió en agua, se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y después se purificó en una columna preparativa de HPLC RPC18, el disolvente se evaporó en concentradores centrífugos de tipo Speed Vac y se secó para dar XVII (43 %). MALDI-TOF-MS m/e 912,12 [M+1]<sup>+</sup> calculado para C<sub>40</sub>H<sub>53</sub>N<sub>3</sub>O<sub>13</sub>S<sub>4</sub><sup>+</sup>, encontrado 912,22.

## Parte D. Preparación del compuesto XVIII



- 25 0,22 g de compuesto XVII se disolvieron en 10 ml de agua en un matraz de fondo redondo y se enfriaron a 0 °C con agitación. Se añadieron 0,5 ml de solución de hidróxido de sodio 2 M en gotas y la agitación continuó durante 1 h a 0 °C. HPLC mostró una completión >98 % de la hidrólisis del éster etílico al ácido carboxílico. La solución acuosa se neutralizó con ácido clorhídrico 5 M (0,25 ml) y después se secó concentradores centrífugos de tipo en Speed Vac. El compuesto resultante se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional para la activación. La identidad se confirmó por análisis de espectrometría de masas, (rendimiento 0,19 g, 90 %)

## Parte E. Preparación del compuesto XIX



- 35 Se hizo reaccionar 150 mg de XVIII (0,160 mmol) con 206 mg de DCC (1 mmol, y 138 mg de N-hidroxisuccinimida (1,2 mmol)) en 1 ml de DMF seca a temperatura ambiente durante 16 horas. El precipitado de dicitohexilurea se centrifugó y se recogió el producto intermedio en DMF. MALDI-TOF-MS m/e 1.025,10 [M]<sup>+</sup> calculado para C<sub>42</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>15</sub>S<sub>4</sub><sup>+</sup>, encontrado 1.025,27.

- 40 Después, el producto intermedio se añadió a una solución acuosa de ácido 6-aminocaproico (210 mg, 1,6 mmol, en 2 ml de agua) enfriada a 0 °C con agitación. El progreso de la conjugación se controló por HPLC en FI. La solución de DMF acuosa se concentró por rotavapor y después se purificó por HPLC preparatoria para dar el compuesto XIX.



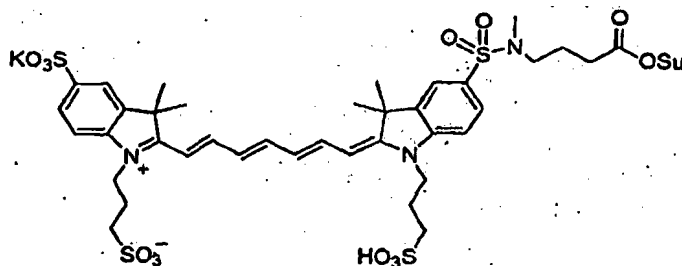
El producto purificado se caracterizó por análisis de espectrometría de masas. (Rendimiento de 110 mg, 69 %).

#### Parte F. Preparación del Ejemplo 3

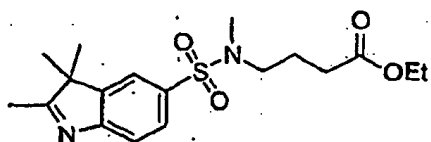
- 5 El compuesto XIX se activó por calentamiento de una solución del colorante en DMF seca con DSC y DMAP a 65 °C durante 90 min para dar el compuesto del título.

#### EJEMPLO 4

#### 10 Síntesis del Ejemplo 4

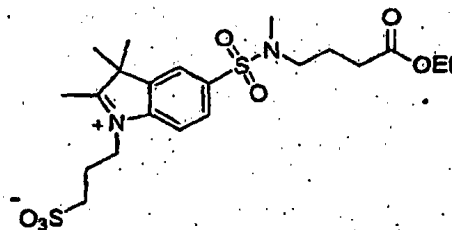


#### 15 Parte A. Preparación de 5-(SO<sub>2</sub>-NMe-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (XX)



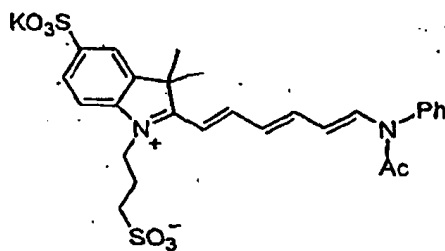
- En un flujo de nitrógeno seco, se añadieron 1,2 g de cloruro de sulfonilo XI (4,0 mmol) a un fondo redondo de 100 ml seco seguido de 25 ml de acetonitrilo seco, y la solución se enfrió en un baño de hielo. La sal de hidrocloreto de éster etílico del ácido N-metilo butírico (1,5 g, 8,1 mmol) se disolvió en 25 ml de acetonitrilo seco y se convirtió en la base libre correspondiente con la adición de 1,2 ml de trietilamina (8,9 mmol). La solución se enfrió y, una vez que las sales cuaternarias se establecieron, se decantó en un embudo de adición de presión ecualizada. La amina se añadió gota a gota a 0 °C con agitación vigorosa durante el transcurso de 30 minutos. Una vez completada la adición, se eliminó el baño de hielo y la reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante una hora. El disolvente se eliminó por evaporación rotatoria a presión reducida, y se purificó por cromatografía en columna. Una columna de sílice se preparó con trietilamina al 1 % y acetonitrilo al 20 % en diclorometano y se cambió gradualmente a acetonitrilo al 30 %. Se obtuvieron 660 mg de la sulfonamida XX (1,7 mmol, 42 %) como un aceite naranja después de la evaporación del eluyente. La sulfonamida se secó posteriormente durante la noche en un desecador de vacío con hidróxido de potasio abierto para asegurar que la indolenina mantuviese su forma de base libre. MALDI-TOF m/z (intensidad): 367,0837 (100 %).

#### Parte B. Preparación de 1-(γ-sulfonatopropil)-5-(SO<sub>2</sub>-NMe-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (XXI)



- La sulfonamida XX (660 mg, 1,8 nmol) se disolvió en 5 ml de 1,2-diclorobenceno y se transfirió a un tubo de presión de 100 ml. Después de la adición de 157 µl de 1,3-propano sulfona (1,82 mmol), el recipiente de reacción se purgó con nitrógeno seco, se selló y se colocó en un baño de aceite de 130 °C. El calentamiento se detuvo después de 8 horas. Los sólidos de color púrpura oleosos se sometieron a ultrasonidos con 5 ml de acetona seguida por 75 ml de éter dietílico hasta que los sólidos se establecieron como un polvo fino. Los sólidos de color púrpura se filtraron y se secaron a presión reducida para dar XXI. MALDI-TOF m/z (intensidad): 489,1463 (100 %).

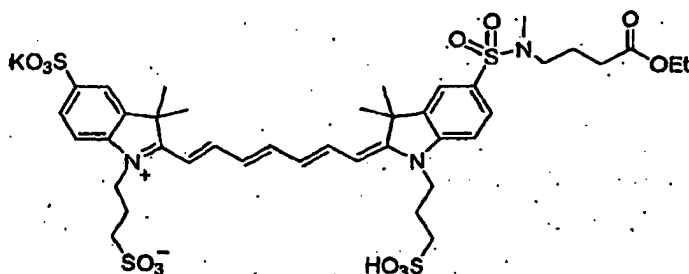
## Parte C. Preparación del compuesto XXII



- 5 Un tubo de presión de 100 ml se cargó con 520 mg de indolenina cuaternizada (1,3 mmol) y 370 mg de monohidrocloreto de N-[5-(fenilamino)-2,4-pentadienilideno]anilina (1,3 mmol). Los reactivos se disolvieron tras la adición de 3 ml de ácido acético y 3 ml de anhídrido acético con agitación. El tubo se purgó con nitrógeno seco, se selló y se calentó durante 3 horas a 110 °C. Después de enfriarse a temperatura ambiente, el producto se precipitó con la adición de 50 ml de éter dietílico produciendo 740 mg.

10

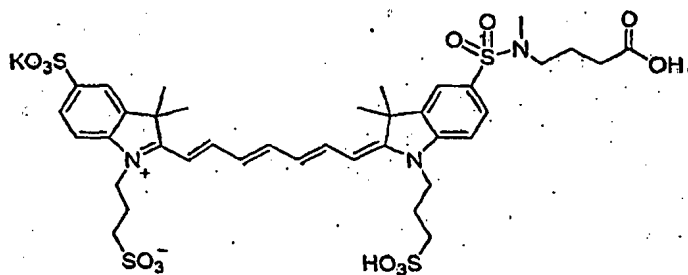
## Parte D. Preparación del éster etílico (XXIII)



- 15 Un matraz de fondo redondo de 2 cuellos de 100 ml se cargó con 3 ml de ácido acético y 3 ml de anhídrido acético, seguido de 500 mg de XXI (1,0 mmol). La temperatura se mantuvo a 75 °C y 560 mg de XII (1,0 mmol) se añadieron en cuatro porciones iguales durante dos horas. Después de la primera adición, se añadieron 200 mg de acetato de sodio (2,4 mmol). Después de seis horas, el colorante se precipitó en éter dietílico, se filtró, y se secó a presión reducida. HPLC se utilizó para aislar el producto deseado.

20

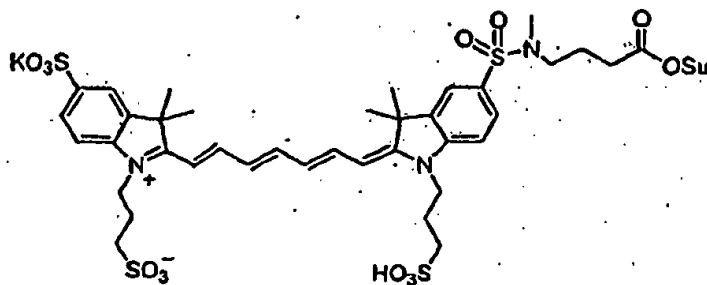
## Parte E. Preparación del compuesto XXIV



- 25 El volumen de una solución acuosa de XXIII (125 μmol) se llevó a 25 ml con agua y se enfrió en un baño de hielo. Después de enfriar, 6,2 de solución de hidróxido de sodio acuoso 1N ml se añadieron con agitación vigorosa. El baño de hielo se eliminó y la reacción continuó durante una hora a temperatura ambiente antes de ser almacenada a 4 °C durante la noche. La reacción se neutralizó a pH 7,0 con ácido clorhídrico 1N a 0 °C. El disolvente se redujo y la reacción se desaló en una columna C18. El producto relativamente puro se volvió a purificar por HPLC preparativa. Después de eliminar el eluyente, el producto XXIV se disolvió en acetonitrilo seco, se precipitó en éter dietílico, se filtró, y se secó al vacío para proporcionar 179 mg de sólidos de color azul. MALDI-TOF m/z (intensidad): 884,2034 (100 %).

30

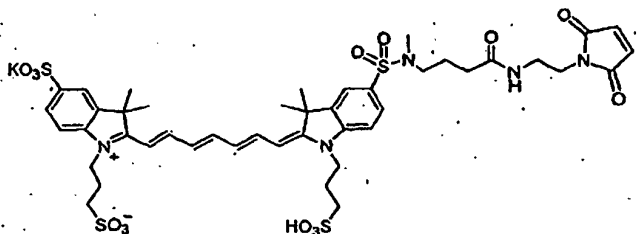
## Parte F. Preparación del Ejemplo 4



- 5 El ácido carboxílico XXIV (10,7 mg, 12,2  $\mu\text{mol}$ ) se disolvió en 1 ml de dimetilformamida seca, seguido de 4,6 mg de disuccinimidilcarbonato (18  $\mu\text{mol}$ ) y 2,2 mg de dimetilaminopiridina (18  $\mu\text{mol}$ ). La reacción se calentó a 60 °C durante cuarenta minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, el éster activado se precipitó en éter dietílico y se recuperó en un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ .

## 10 EJEMPLO 5

## Síntesis del Ejemplo 5



- 15 1,4 mg de sal de maleimida N-etilamina trifluoroacetato (7,2  $\mu\text{mol}$ ) y 3,8  $\mu\text{l}$  de diisopropiletilamina (22  $\mu\text{mol}$ ) se añadieron secuencialmente a 1 ml de dimetilformamida seca. Esta solución se añadió directamente a un vial que contenía 1,0 mg de éster de succinimida seca (1,0  $\mu\text{mol}$ ). El vial se selló y se giró en la oscuridad a temperatura ambiente durante la noche. Método A HPLC: 8,235 min (750 nm). El compuesto deseado se aisló utilizando HPLC preparativa. MALDI-TOF m/z (intensidad): 1.006,3552 (55 %).

## EJEMPLO 6

## Marcado celular

- 25 Los esplenocitos de ratón se preparan como una suspensión de células individuales, y la subpoblación de linfocitos T en la preparación de esplenocitos se enriquece mediante el pase sobre una columna que elimina los linfocitos B y los macrófagos (kit R & D, columnas con un enriquecimiento en linfocitos T de ratón, MTCC500). Los linfocitos T se centrifugan para generar un sedimento celular de  $10^7$  células. Se elimina el sobrenadante del sedimento celular, y se añade una solución de 10 mg/ml de compuesto A en 100  $\mu\text{l}$ . Las células se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos, seguido de 2 rondas de centrifugación y resuspensión en tampón fisiológico para enjuagar el compuesto A no unido. Las células se evalúan por microscopía de fluorescencia.

## EJEMPLO 7

Marcado celular y formación de imágenes *in vivo*

- 35 Las células 4T1 de adenocarcinoma de mama de ratón se centrifugan para generar un sedimento celular de  $10^7$  células. Se elimina el sobrenadante del sedimento celular, y se añade una solución de 10 mg/ml de compuesto A en 100  $\mu\text{l}$ . Las células se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos, seguido de 2 rondas de centrifugación y resuspensión en tampón fisiológico para enjuagar el compuesto A no unido. Las células se evalúan por microscopía de fluorescencia. Las células se inyectan por vía intravenosa en ratones a  $5 \times 10^5$  células por ratón, y los ratones vivos son captados en imágenes por tomografía molecular fluorescente inmediatamente después de la inyección y 24 horas después de la inyección. A medida que las células 4T1 se metastatizan principalmente a los pulmones, se cuantifica la fluorescencia en el pulmón.

## EJEMPLO 8

Una solución de compuesto A se ligó químicamente a un péptido que contiene Arg-Gly-Asp en condiciones básicas para producir una molécula fluorescente biocompatible para formación de imágenes ópticas *in vivo*. La estirpe celular tumoral HT-29 (carcinoma de colon humano/HTB-38) se obtuvo de CCAT (Manassas, VA). Las células HT-29 se cultivaron en McCoy suplementado con SFB al 10 % a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene CO<sub>2</sub> al 5 %. Las células en crecimiento exponencial se tripsinizaron y se volvieron a suspender en una solución salina equilibrada de Hank en una concentración de  $3 \times 10^7$  células/ml. A los ratones NU/NU hembras de 6-8 semanas de edad (Charles River Laboratory, Wilmington, MA) se les inyectó subcutáneamente  $3 \times 10^6$  células HT-29 bilateralmente en las primeras almohadillas adiposas mamarias. Una semana más tarde, cuando los tumores eran de aproximadamente 30 mm<sup>3</sup>, a los ratones se les inyectó por vía intravenosa la molécula fluorescente, (en 150 µl de 1 x TFS) y se captaron en imágenes después de 24 horas en un sistema de reflectancia por fluorescencia (IRF, Kodak 2000 mm) y sistema de tomografía de fluorescencia (TMF) de VisEn.

## EJEMPLO 9

Una solución del compuesto A se ligó químicamente a un bisfosfonato que contenía una biomolécula en condiciones básicas para proporcionar una molécula fluorescente biocompatible para formación de imágenes ópticas *in vivo*. A los ratones BALB/c x CF-1 F<sub>1</sub> de cinco días de edad se les inyectó por vía subcutánea la molécula fluorescente (en 15 µl 1 x TFS) y se captaron en imágenes 24 horas más tarde utilizando un sistema de imagen de reflectancia por fluorescencia (IRF) (Kodak 2000MM). Las áreas de crecimiento óseo podían ser vistas claramente.

## EJEMPLO 10

10 mg de éster de NHS del compuesto X de la presente invención se disuelven en 100 µl de DMF seca, a la que se añade una solución de 3-azidopropilamina (5 mg) en 20 µl de DMSO seca, y la mezcla se giró a temperatura ambiente durante una hora. 1 ml de éter se añade a la mezcla de reacción, y se centrifuga durante 10 minutos. La solución sobrenadante se desecha, y el residuo se seca en concentradores centrífugos de tipo Speed Vac durante 5 minutos, se vuelve a disolver en agua y se purifica en una columna semiprep. RPC18. La fracción correspondiente al producto se recoge y se seca en concentradores centrífugos de tipo Speed Vac.

## EJEMPLO 11

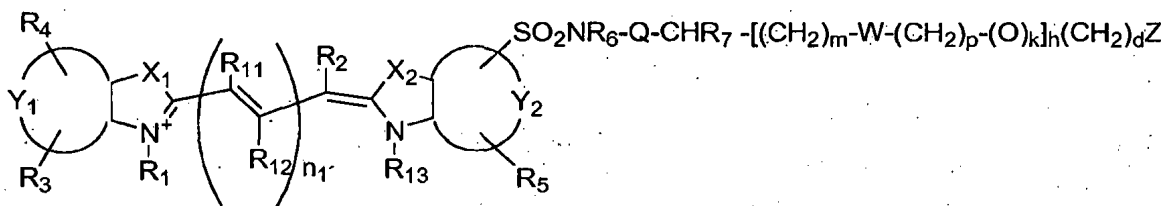
10 mg de éster de NHS del compuesto X de la presente invención se disuelven en 100 µl de DMF seca, a la que se añade una solución de 3-propargilamina (5 mg) en 10 µl de DMSO seca, y la mezcla se giró a temperatura ambiente durante una hora. 1 ml de éter se añade a la mezcla de reacción, y se centrifuga durante 10 minutos. La solución sobrenadante se desecha, y el residuo se seca en concentradores centrífugos de tipo Speed Vac durante 5 minutos, se vuelve a disolver en agua y se purifica en una columna semi-prep. RPC18. La fracción correspondiente al producto se recoge y se seca en concentradores centrífugos de tipo Speed Vac.

## EJEMPLO 12

17 mg de éster de NHS del compuesto X de la presente invención se disuelven en 250 µl de DMF seca, a la que se añade una solución de hidrócloruro de 2-(2-aminometil-ditio)piridina (11 mg) en 10 µl de DMSO seca y 4 µl de trietilamina, y la mezcla se giró a temperatura ambiente durante una noche. 1 ml de acetato de etilo se añade a la mezcla de reacción, y se centrifuga durante 10 minutos. La solución sobrenadante se desecha, y el residuo se seca en concentradores centrífugos de tipo Speed Vac durante 5 minutos, se vuelve a disolver en agua y se purifica en una columna semi-prep. RPC18. La fracción correspondiente al producto se recoge y se seca en concentradores centrífugos de tipo Speed Vac.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural:



o una sal del mismo, en la que:

X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en C(CH<sub>2</sub>K<sub>1</sub>)(CH<sub>2</sub>K<sub>2</sub>), O, S y Se;

K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H o un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, un grupo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> y un grupo alifático C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> sustituido con -OR\*, N(R\*)<sub>2</sub> o -SR\*; o K<sub>1</sub> y K<sub>2</sub> juntos forman parte de un anillo heterocíclico o carbocíclico sustituido o no sustituido;

cada uno de Y<sub>1</sub> e Y<sub>2</sub> es independientemente un anillo condensado con benzo, un anillo condensado con nafta o un anillo condensado con pirido;

n<sub>1</sub> es 1, 2 o 3;

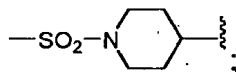
R<sub>2</sub>, R<sub>11</sub> y R<sub>12</sub> son independientemente H, F, Br, Cl, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, ariloxi, un anillo heterocíclico que contiene nitrógeno, un anillo heteroaromático que contiene nitrógeno, un sulfonato, un ion iminio o cualquiera de dos sustituyentes adyacentes R<sub>12</sub> y R<sub>11</sub> o sustituyentes R<sub>2</sub> y R<sub>1</sub>, cuando se toman en combinación, forman un anillo carbocíclico sustituido o no sustituido de 4, 5 o 6 miembros, un anillo carbocíclico no aromático sustituido o no sustituido o un anillo arilo carbocíclico sustituido o no sustituido, en el que cada uno de los anillos carbocíclicos está independientemente de forma opcional sustituido una o más veces con alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halógeno o OR\* o Sir\*;

R<sub>1</sub> y R<sub>13</sub> son (CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>CH<sub>3</sub>, cuando x es un número entero seleccionado entre 0 y 6; o R<sub>1</sub> y R<sub>13</sub> son independientemente (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup> o (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>SO<sub>3</sub>H cuando n es un número entero seleccionado entre 2 y 6;

R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en H, carboxilato, ácido carboxílico, éster carboxílico, amina, amida, sulfonamida, hidroxilo, alcoxilo, un resto ácido sulfónico y un resto sulfonato;

en el que al menos dos de los grupos R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> o R<sub>13</sub> contienen un grupo ácido sulfónico o sulfonato;

en el que el resto -SO<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>-Q-CHR<sub>7</sub>- es: (a) -SO<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>- o (b) es de fórmula:



y

W está ausente o se selecciona entre el grupo que consiste en -SO<sub>2</sub>NR<sub>6</sub>-Q-CHR<sub>7</sub>-, -O-, -COO- y -CONH-;

h = 0-10; k = 0 o 1; d = 0-6; m = 0-6; y p = 0-6;

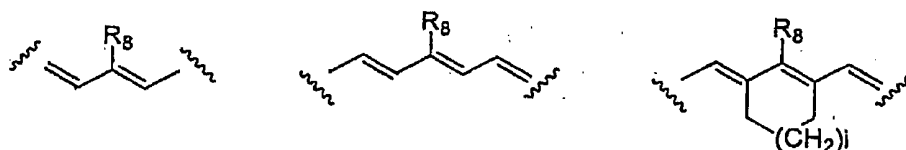
Z se selecciona entre el grupo que consiste en -COCl, -CONHNH<sub>2</sub>, ésteres de N-hidroxisuccinimido sustituidos y no sustituidos, ésteres de nitro- o fluoro-fenol, -NCS, -CHO, -COCH<sub>2</sub>I, grupos fosforamida y maleimida; y

cada R\* es independientemente -H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que Z se selecciona entre el grupo que consiste en -COCl, -CONHNH<sub>2</sub>, ésteres de N-hidroxisuccinimido sustituidos y no sustituidos, -NCS, -CHO, -COCH<sub>2</sub>I, grupos fosforamida y maleimida.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son ambos -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el grupo -((C(R<sub>11</sub>)=C(R<sub>12</sub>))<sub>n1</sub>-C(R<sub>2</sub>)= está representado por una fórmula estructural seleccionada entre el grupo que consiste en:

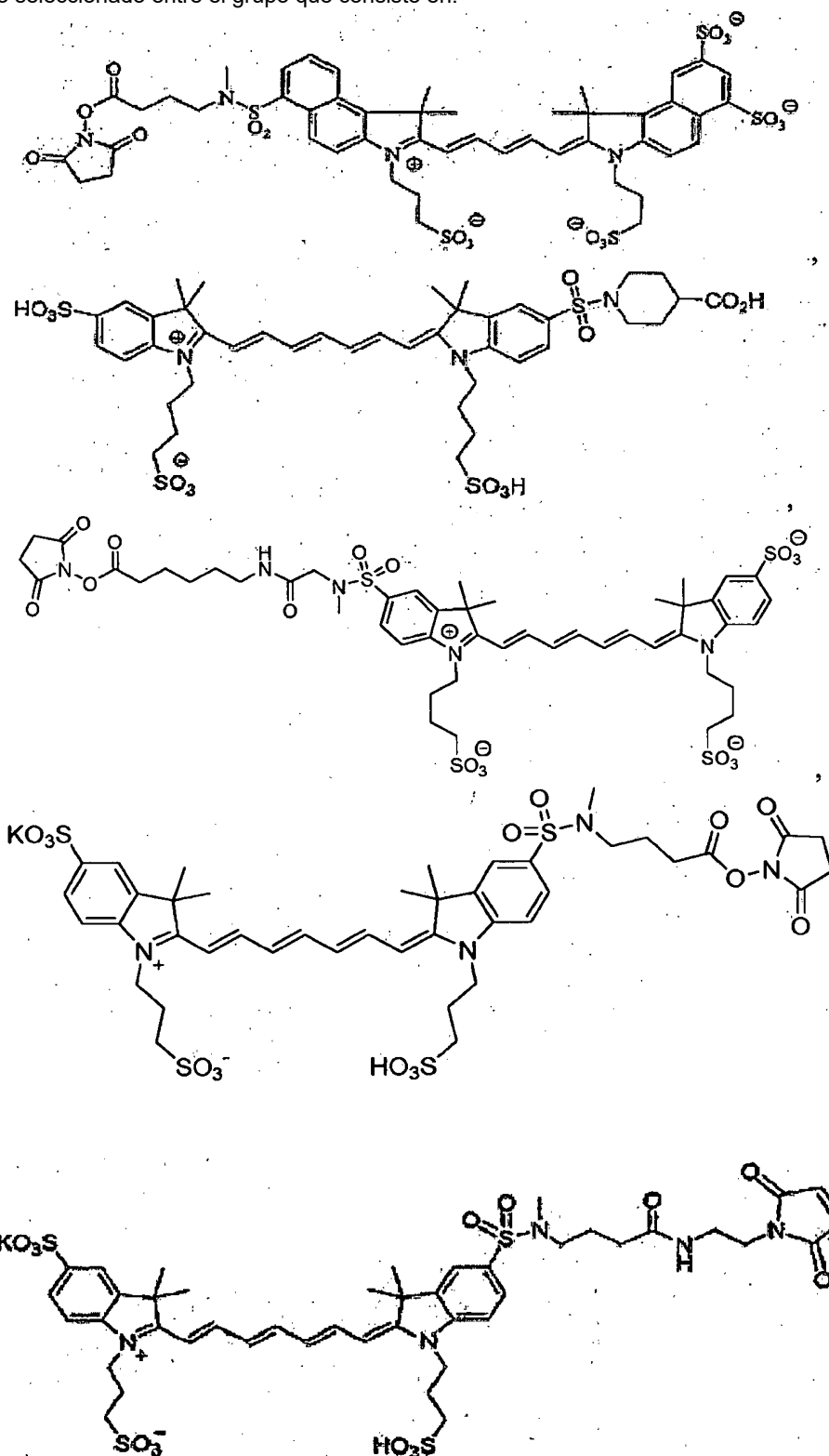


en la que R<sub>8</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en H o Cl, Br o F e i es 0 o 1.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que W está ausente.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que h = 0, k = 0, d = 0, m = 0 y p = 0.

7. Un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en:



8. Una molécula fluorescente biocompatible que comprende una o más biomoléculas químicamente ligadas a un compuesto de la reivindicación 1; en el que, opcionalmente:

- (a) el compuesto tiene unos máximos de absorción y emisión comprendidos entre aproximadamente 400 nm y aproximadamente 900 nm; o
- (b) el compuesto tiene unos máximos de absorción y emisión comprendidos entre aproximadamente 600 nm y

aproximadamente 800 nm; o

(c) el compuesto se activa después de la interacción con una diana; o

(d) el compuesto tiene una alta afinidad de unión a una diana; o

(e) la biomolécula es una célula.

5

9. Una composición que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una molécula fluorescente biocompatible según la reivindicación 8 y un vehículo fisiológicamente relevante.

10

10. El uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una molécula fluorescente biocompatible según la reivindicación 8 en un método de formación de imágenes ópticas *in vivo*, comprendiendo el método:

15

a) administrar a un sujeto uno o más compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una molécula fluorescente biocompatible según la reivindicación 8;

(b) dar tiempo para que el compuesto o la molécula fluorescente biocompatible se distribuya en el sujeto o se ponga en contacto o interaccione con una diana biológica;

(c) iluminar el sujeto con una luz con una longitud de onda absorbible por el compuesto o la molécula fluorescente biocompatible; y

(d) detectar la señal óptica emitida por el compuesto o la molécula fluorescente biocompatible.

20

11. El uso de la reivindicación 10, en el que:

25

(i) la señal emitida por el compuesto se utiliza para construir una imagen; o

(ii) las etapas (a)-(d) se repiten a intervalos predeterminados permitiendo de este modo la evaluación de las señales emitidas de la molécula fluorescente biocompatible en el sujeto con el tiempo; o

(iii) el sujeto es un animal o un ser humano; o

(iv) en la etapa (a) se administran a un sujeto dos o más compuestos cuyas propiedades de señal son distinguibles.

30

12. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una molécula fluorescente biocompatible según la reivindicación 8, para su uso en un método de formación de imágenes ópticas *in vivo*, comprendiendo el método:

35

a) administrar a un sujeto uno o más compuestos según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o una molécula fluorescente biocompatible según la reivindicación 8;

(b) dar tiempo para que el compuesto o la molécula fluorescente biocompatible se distribuya en el sujeto o se ponga en contacto o interaccione con una diana biológica;

(c) iluminar el sujeto con una luz con una longitud de onda absorbible por el compuesto o la molécula fluorescente biocompatible; y

40

(d) detectar la señal óptica emitida por el compuesto o la molécula fluorescente biocompatible;

en el que (i) las etapas de iluminación y de detección se realizan utilizando un endoscopio, un catéter, un sistema tomográfico, un sistema de formación de imágenes ópticas portátil, gafas quirúrgicas o un microscopio intraoperatorio o

45

en el que (ii) la presencia, ausencia o nivel de señal emitida por la molécula fluorescente es indicativo de una patología.

50

13. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una molécula fluorescente biocompatible según la reivindicación 8, para su uso en un método según la reivindicación 12(ii), en el que el método se utiliza para detectar y controlar una enfermedad, opcionalmente una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste en cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades inmunológicas, enfermedades autoinmunes, enfermedades respiratorias, enfermedades metabólicas, enfermedades hereditarias, enfermedades infecciosas, enfermedades óseas y enfermedades medioambientales; en cuyo caso, opcionalmente, antes de la etapa (a), el compuesto se mezcla con células para que estas sean marcadas y las células marcadas resultantes se administran al sujeto en la etapa (a);

55

y, opcionalmente,

la señal emitida por el compuesto se utiliza para controlar el tráfico y la localización de células o la evaluación de una terapia celular.

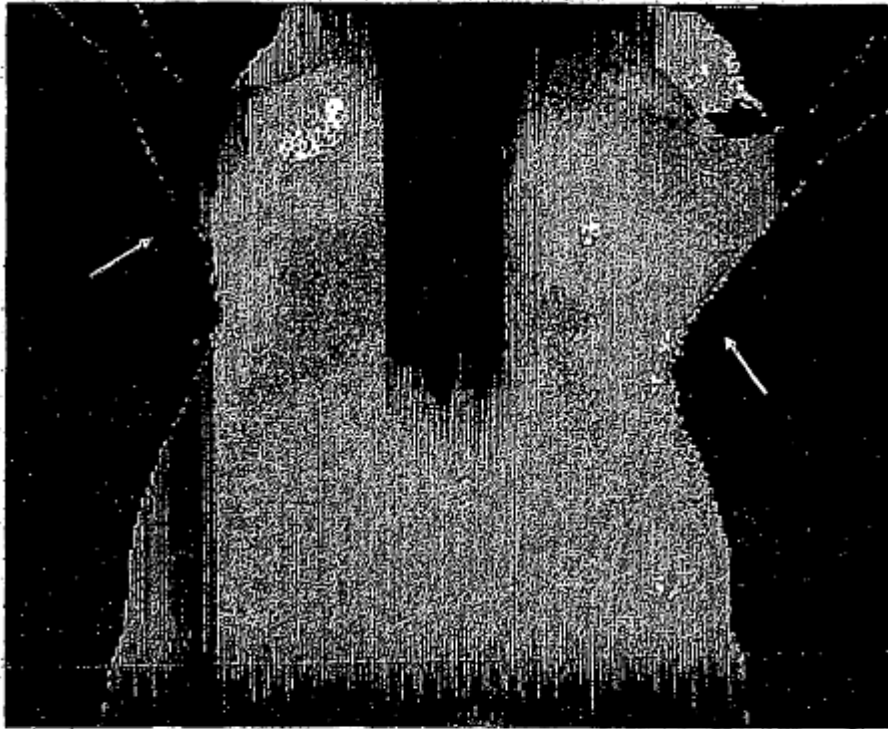
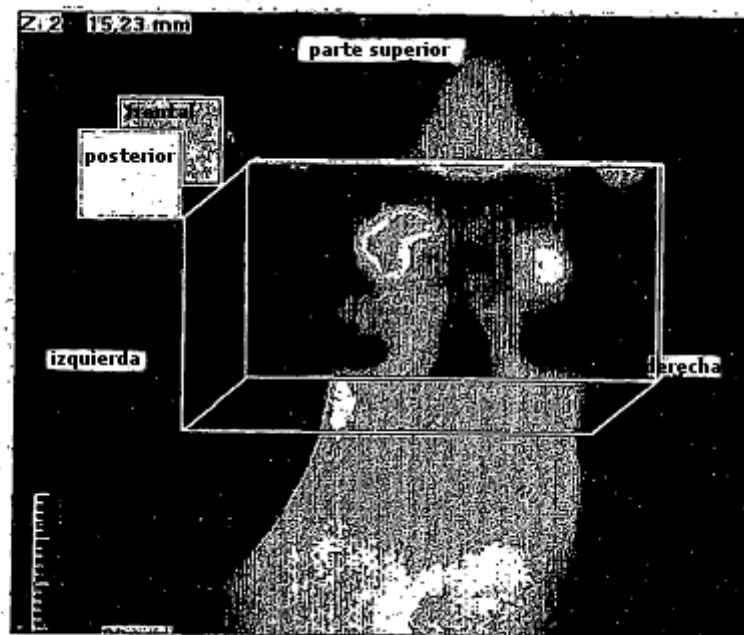


FIG. 1





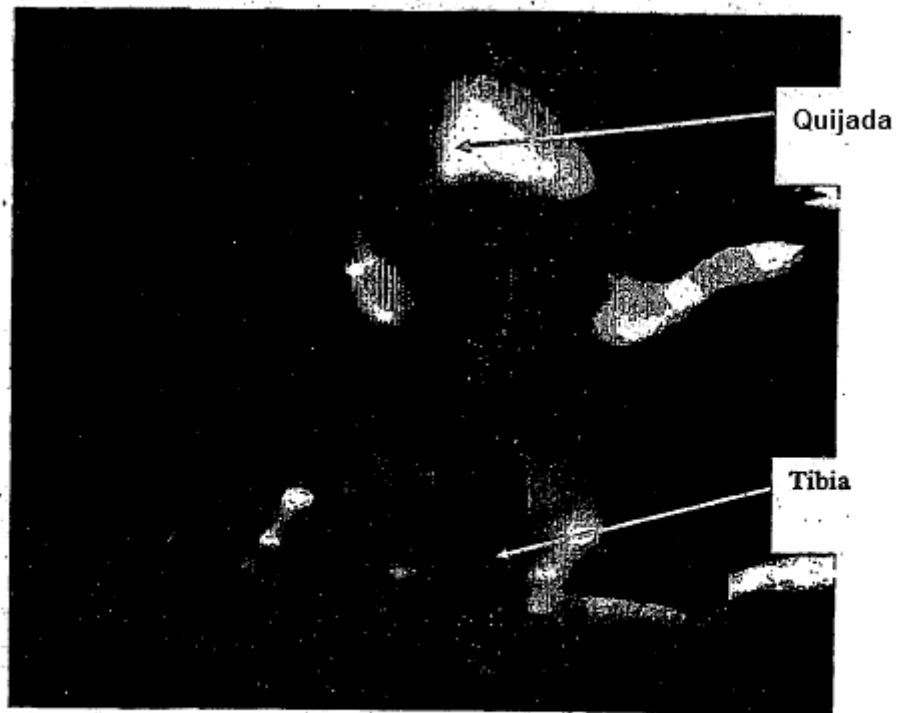


FIG 3