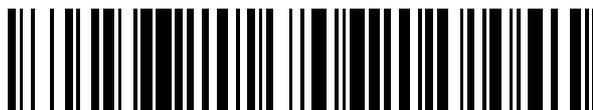


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 852**

51 Int. Cl.:

C09B 23/08 (2006.01)

C09B 23/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.02.2008 PCT/US2008/053399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.08.2008 WO08100817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2008 E 08729371 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2118206**

54 Título: **Colorantes con policiclo y uso de los mismos**

30 Prioridad:

09.02.2007 US 889066 P

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

01.06.2018

73 Titular/es:

VISEN MEDICAL, INC. (100.0%)

**940 Winter Street
Waltham MA 02451, US**

72 Inventor/es:

NARAYANAN, NARA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 670 852 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

Colorantes con policiclo y uso de los mismos

Antecedentes

5 Los métodos de formación de imágenes ópticas ofrecen una serie de ventajas sobre otros métodos de formación de imágenes. Una formación de imágenes de este tipo normalmente utiliza luz en el intervalo de rojo y cercano al infrarrojo (NIR) (600-1200 nm) para maximizar la penetración en el tejido y minimizar la absorción desde absorbedores biológicos naturales, tales como la hemoglobina y el agua. La formación de imágenes ópticas puede proporcionar una sensibilidad elevada, no requiere una exposición de los sujetos del análisis o del personal de laboratorio a una radiación ionizante, puede permitir un uso simultáneo de múltiples sondas distinguibles (lo que puede ser importante en la formación de imágenes moleculares) y ofrece una resolución temporal y espacial elevadas, lo que es importante en la obtención de imágenes funcionales y la microscopía *in vivo*, respectivamente.

10 En la formación de imágenes con 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 atraviesa los tejidos corporales y cuando la luz de excitación se encuentra con una molécula informadora (por ejemplo, un agente de contraste o una sonda de formación de imágenes), la luz es absorbida. La molécula informadora emite entonces luz que tiene propiedades detectables diferentes de la luz de excitación. La luz emitida resultante se puede utilizar para construir una imagen. La mayoría de las técnicas de formación de imágenes ópticas se ha basado en el uso de colorantes fluorescentes orgánicos e inorgánicos como molécula informadora.

15 Los colorantes fluorescentes son generalmente conocidos y se utilizan para marcar con fluorescencia y detectar diversos materiales biológicos y no biológicos por procedimientos tales como la microscopía de fluorescencia, inmunoensayo con fluorescencia y citometría de flujo. Un método típico para marcar tales materiales con colorantes fluorescentes es crear un complejo fluorescente por medio de una unión entre grupos adecuados en la molécula de colorante y grupos compatibles en el material que se va a marcar. De esta manera, materiales tales como células, tejidos, aminoácidos, proteínas, anticuerpos, fármacos, hormonas, nucleótidos, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos, y similares se pueden marcar, detectar o cuantificar de forma química o se pueden utilizar como sondas fluorescentes que se pueden unir específicamente a materiales diana y detectar por métodos de detección de fluorescencia. Los colorantes intensamente fluorescentes permiten una detección o localización de los materiales fijados con una gran sensibilidad.

20 Durante muchos años, los colorantes de polimetina han sido útiles como sensibilizadores en fotografía, especialmente en las regiones del espectro rojo y cercano al infrarrojo. Sin embargo, en los últimos años, estos colorantes se han utilizado en una variedad de diferentes áreas tecnológicas innovadoras, tales como aplicaciones láser y electro-ópticas, medios de grabación óptica y aplicaciones de diagnóstico médico. Tales aplicaciones imponen altas exigencias a los colorantes, por ejemplo, en el grado de pureza requerida y la reproducibilidad de los métodos sintéticos. Los colorantes de polimetina son útiles como agentes para marcar en aplicaciones biológicas, especialmente cuando tales colorantes incluyen grupos funcionales que son capaces de formar un enlace covalente estable con una molécula biológica de interés, de modo que el conjugado resultante actuará como un analito o una sonda biológica fluorescente eficaz.

25 El documento de EE.UU. 2006/280688 A1 se refiere a la formación de imágenes ópticas fluorescentes.

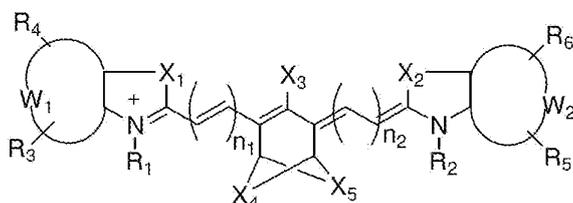
30 El documento de EE.UU. 2004/260072 A1 se refiere a colorantes de cianina hidrófilos que reaccionan con tiol y conjugados de los mismos con biomoléculas para el diagnóstico con fluorescencia.

No obstante, existe una necesidad permanente de nuevos colorantes que se puedan utilizar en diversas aplicaciones médicas, diagnósticas y biológicas.

Compendio de la invención

35 La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que es posible producir compuestos con fluorocromo que contienen un puente de polimetina, que se puede utilizar en una variedad de aplicaciones de formación de imágenes *in vitro* e *in vivo*. La presente invención proporciona compuestos y métodos de acuerdo con las reivindicaciones.

Los compuestos con fluorocromo de la invención tienen la fórmula



y sales de los mismos, en donde R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 , W_1 , W_2 , n_1 y n_2 se describen con más detalle a continuación.

5 Se describe un método de formación de imágenes ópticas *in vivo*. El método comprende las etapas de (a) administrar a un sujeto, tal como un animal o un ser humano, un compuesto con fluorocromo de la invención, (b) permitir que el compuesto con fluorocromo se distribuya dentro del sujeto o se ponga en contacto o interaccione con una diana biológica, (c) exponer el sujeto a radiación electromagnética, por ejemplo, luz, de una longitud de onda absorbible por el compuesto con fluorocromo y (d) detectar una señal óptica emitida por el compuesto con fluorocromo, por ejemplo, con un endoscopio, un catéter, un sistema de tomografía, un sistema plano o de reflectancia, un sistema de formación de imágenes ópticas portátil o sistemas intraoperativos y un microscopio. La señal emitida por el compuesto se puede utilizar para formar una imagen, por ejemplo, una imagen tomográfica, de una región o una estructura que se va a visualizar. Se entiende que el compuesto con fluorocromo puede comprender un colorante de fluorocromo ligado químicamente a una biomolécula.

10 Las etapas anteriores se pueden repetir a intervalos predeterminados permitiendo de este modo la evaluación de las señales emitidas del compuesto fluorescente en el sujeto con el paso del tiempo. En ciertas realizaciones, dos o más compuestos cuyas propiedades como señal son distinguibles, se pueden administrar al sujeto y sus propiedades de emisión se pueden utilizar para visualizar dos o más características en el sujeto.

15 Los métodos descritos se pueden utilizar para detectar y/o supervisar una enfermedad, por ejemplo, enfermedad ósea, cáncer, enfermedad cardiovascular, enfermedad dermatológica, enfermedad ambiental, enfermedad inmunológica, enfermedad infecciosa, inflamación, enfermedad hereditaria, enfermedad metabólica, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad oftálmica y enfermedad respiratoria.

20 En ciertas realizaciones, las células se marcan con un compuesto con fluorocromo descrito en el presente documento y las células marcadas resultantes se administran al sujeto. La señal emitida por el compuesto con fluorocromo se puede emplear para supervisar el transporte y la localización de las células o para evaluar la eficacia de una terapia celular.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un método de formación de imágenes ópticas *in vitro*. El método comprende las etapas de (a) poner en contacto una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, con el compuesto con fluorocromo de la invención, (b) permitir que el compuesto con fluorocromo se active mediante una diana biológica o se una a la misma; (c) opcionalmente, eliminar el compuesto con fluorocromo no unido; (d) exponer la muestra a una radiación electromagnética, por ejemplo, luz, con una longitud de onda absorbible por el compuesto con fluorocromo; y (e) detectar la señal emitida desde el compuesto con fluorocromo para determinar de este modo si el compuesto con fluorocromo ha sido activado por la diana biológica o se ha unido a la misma.

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención proporciona una familia de compuestos con fluorocromo (colorantes) que absorben y/o emiten luz que tiene una longitud de onda en el intervalo desde aproximadamente 500 nm a aproximadamente 1100 nm, más preferiblemente en el intervalo desde aproximadamente 600 nm a aproximadamente 900 nm. En ciertas realizaciones, los colorantes absorben y/o emiten luz que tiene una longitud de onda en el intervalo desde aproximadamente 600 nm a aproximadamente 850 nm, desde aproximadamente 650 nm a aproximadamente 900 nm o desde aproximadamente 650 nm a aproximadamente 850 nm. Los compuestos con fluorocromo son particularmente útiles en una variedad de aplicaciones de formación de imágenes *in vitro* e *in vivo*.

40 I. Definiciones

Las definiciones recogidas en el presente documento se deben leer a la luz del resto de la descripción y entender como lo hace una persona con experiencia en la técnica. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención.

45 "Ligado químicamente" significa conectado por una fuerza atrayente entre los átomos que es lo suficientemente fuerte para permitir que el agregado combinado actúe como una unidad. Esto incluye, pero no se limita a, enlaces químicos, tales como enlaces covalentes, enlaces no covalentes, tales como enlaces iónicos, enlaces metálicos y enlaces por puentes, interacciones hidrófobas, puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals. Esto también incluye la reticulación o la captación.

50 El término "alquilo" está reconocido en la técnica e incluye grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alíclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En ciertas realizaciones, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene aproximadamente 30 o menos átomos de carbono en su cadena principal (por ejemplo, C_1 - C_{30} para una cadena lineal, C_3 - C_{30} para una cadena ramificada) y, alternativamente, aproximadamente 20 o menos. Del mismo modo, los cicloalquilos tienen desde aproximadamente 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono en su estructura del anillo y, alternativamente, aproximadamente 5, 6 o 7 carbonos en la estructura del anillo. El término "alquilo" también incluye alquilos sustituidos con halógeno.

Además, el término "alquilo" incluye "alquilos sustituidos", lo que se refiere a restos alquilo que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o varios carbonos de la cadena principal del hidrocarburo. Tales sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, un hidroxilo, un carbonilo (tal como un carboxilo, un alcoxicarbonilo, un formilo o un acilo), un tiocarbonilo (tal como un tioéster, un tioacetato o un tioformiato), un alcoxilo, un fosforilo, un fosfonato, un fosfinato, un amino, un amido, una amidina, una imina, un ciano, un nitro, un azido, un sulfhidrilo, un alquiltio, un sulfato, un sulfonato, un sulfamoilo, un sulfonamido, un sulfonilo, un heterociclilo, un aralquilo o un resto aromático o heteroaromático. Los expertos en la técnica entenderán que los restos sustituidos en la cadena de hidrocarburo pueden estar ellos mismos sustituidos, si es adecuado. Por ejemplo, los sustituyentes de un alquilo sustituido pueden incluir formas sustituidas y no sustituidas de amino, azido, imino, amido, fosforilo (incluyendo fosfonato y fosfinato), sulfonilo (incluyendo sulfato, sulfonamido, sulfamoilo y sulfonato) y grupos sililo, así como éteres, alquiltios, carbonilos (incluyendo cetonas, aldehídos, carboxilatos y ésteres), -CN y similares. Los alquilos sustituidos a modo de ejemplo se describen a continuación. Los cicloalquilos pueden estar sustituidos adicionalmente con alquilos, alquénilos, alcoxis, alquiltios, aminoalquilos, alquilos sustituidos con carbonilo, -CN y similares.

Los términos "aralquilo" y "alquilarilo" están reconocidos en la técnica y se refieren a un grupo alquilo sustituido con un grupo arilo (por ejemplo, un grupo aromático o heteroaromático).

Los términos "alquénilo" y "alquínilo" están reconocidos en la técnica y se refieren a grupos alifáticos insaturados, análogos en la longitud y la posible sustitución con los alquilos descritos anteriormente, pero que contienen al menos un enlace doble o triple, respectivamente.

El término "heteroátomo" está reconocido en la técnica y se refiere a un átomo de cualquier elemento distinto de carbono o hidrógeno. Los heteroátomos ilustrativos incluyen boro, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre y selenio.

El término "arilo" está reconocido en la técnica y se refiere a grupos aromáticos de un solo anillo de 5, 6 y 7 miembros que pueden incluir desde cero a cuatro heteroátomos, por ejemplo, benceno, pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, triazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares. Aquellos grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura del anillo también se pueden denominar "heteroarilo" o "heteroaromáticos". El anillo aromático puede estar sustituido en una o varias posiciones del anillo con sustituyentes tales como los que se han descrito anteriormente, por ejemplo, halógeno, azida, alquilo, aralquilo, alquénilo, alquínilo, cicloalquilo, hidroxilo, alcoxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, sulfonamido, cetona, aldehído, éster, heterociclilo, restos aromáticos o heteroaromáticos, -CF₃, -CN o similares. El término "arilo" también incluye sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes (los anillos son "anillos condensados") en donde al menos uno de los anillos es aromático, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquénilos, cicloalquínilos, arilos y/o heterociclilos.

El término y expresiones "heterociclilo", "grupo heterocíclico" o "resto heterocíclico" están reconocidos en la técnica y se refieren a estructuras de anillo que tienen desde 3 a aproximadamente 10 miembros, alternativamente anillos que tienen desde 3 a aproximadamente 7 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen de uno a cuatro heteroátomos. Los heterociclos también pueden ser policiclos. Los grupos heterociclilo incluyen, por ejemplo, tiofeno, tiantreno, furano, pirano, isobenzofurano, cromeno, xanteno, fenoxanteno, pirrol, imidazol, pirazol, isotiazol, isoxazol, piridina, pirazina, pirimidina, piridazina, indolizina, isoindol, indol, indazol, purina, quinolizina, isoquinolina, quinolina, ftalazina, naftiridina, quinoxalina, quinazolina, cinolina, pteridina, carbazol, carbolina, fenantridina, acridina, pirimidina, fenantrolina, fenazina, fenarsazina, fenotiazina, furazán, fenoxazina, pirrolidina, oxolano, tiolano, oxazol, piperidina, piperazina, morfolina, lactonas, lactamas tales como azetidionas y pirrolidinonas, sultamas, sultonas y similares. El anillo heterocíclico puede estar sustituido en una o varias posiciones con sustituyentes tales como los descritos anteriormente, como por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alquénilo, alquínilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclilo, un resto aromático o heteroaromático, -CF₃, -CN o similares.

El término y expresiones "policiclilo", "grupo policíclico" o "resto policíclico" están reconocidos en la técnica y se refieren a dos o más anillos (por ejemplo, cicloalquilos, cicloalquénilos, cicloalquínilos, arilos y/o heterociclilos) en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos adyacentes, por ejemplo, los anillos son "anillos condensados". Los anillos que están unidos a través de átomos no adyacentes se denominan anillos "puenteados". Cada uno de los anillos del policiclo puede estar sustituido con sustituyentes tales como los descritos anteriormente, como por ejemplo, halógeno, alquilo, aralquilo, alquénilo, alquínilo, cicloalquilo, hidroxilo, amino, nitro, sulfhidrilo, imino, amido, fosfonato, fosfinato, carbonilo, carboxilo, sililo, éter, alquiltio, sulfonilo, cetona, aldehído, éster, un heterociclilo, un resto aromático o heteroaromático, -CF₃, -CN o similares.

El término "nitro" está reconocido en la técnica y se refiere a -NO₂; el término "halógeno" está reconocido en la técnica y se refiere a -F, -Cl, -Br o -I; el término "sulfhidrilo" está reconocido en la técnica y se refiere a -SH; el término "hidroxilo" significa -OH; y el término "sulfonilo" está reconocido en la técnica y se refiere a -SO₂-. "Haluro" designa el anión correspondiente de los halógenos y "seudohaluro" tiene la definición expuesta en "Advanced Inorganic Chemistry" de Cotton y Wilkinson.

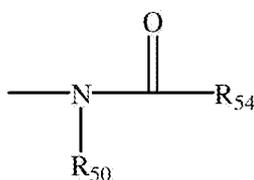
Los términos "amina" y "amino" están reconocidos en la técnica y se refieren tanto a aminas no sustituidas como

sustituidas, por ejemplo, un resto que puede estar representado por las fórmulas generales:



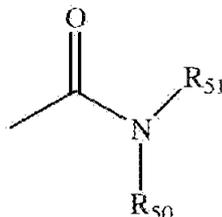
5 en las que R_{50} , R_{51} , R_{52} y R_{53} representan cada uno independientemente un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo, $-(CH_2)_m-R_{61}$ o R_{50} y R_{51} , tomados junto con el átomo de N al que están fijados, completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura del anillo; R_{61} representa un arilo, un cicloalquilo, un cicloalquenilo, un heterociclo o un policiclo; y m es cero o un número entero en el intervalo de 1 a 8. En ciertas realizaciones, solo uno entre R_{50} o R_{51} puede ser un carbonilo, por ejemplo, R_{50} , R_{51} y el nitrógeno no forman juntos una imida. En otras realizaciones, R_{50} y R_{51} (y opcionalmente R_{52}) cada uno independientemente representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo o $-(CH_2)_m-R_{61}$. Por lo tanto, el término "alquilamina" incluye un grupo amina, como se ha definido anteriormente, que tiene un alquilo sustituido o no sustituido fijado al mismo, es decir, al menos uno entre R_{50} y R_{51} es un grupo alquilo.

10 El término "acilamino" está reconocido en la técnica y se refiere a un resto que se puede representar por la fórmula general:



15 en la que R_{50} es como se ha definido anteriormente y R_{54} representa un hidrógeno, un alquilo, un alquenilo o $-(CH_2)_m-R_{61}$, en donde m y R_{61} son como se han definido anteriormente.

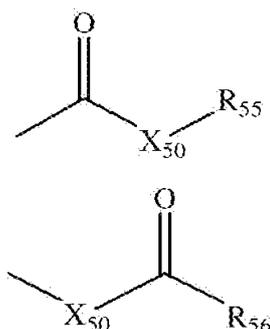
El término "amido" está reconocido en la técnica como un carbonilo sustituido con amina e incluye un resto que puede estar representado por la fórmula general:



20 en la que R_{50} y R_{51} son como se han definido anteriormente. Ciertas realizaciones de la amida en la presente invención no incluirán imidas que puedan ser inestables.

El término "alquiltio" se refiere a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, que tiene un radical de azufre fijado al mismo. En ciertas realizaciones, el resto "alquiltio" está representado por uno entre $-S$ -alquilo, $-S$ -alquenilo, $-S$ -alquinilo y $-S-(CH_2)_m-R_{61}$, en donde m y R_{61} se han definido anteriormente. Los grupos alquiltio representativos incluyen metiltio, etiltio y similares.

25 El término "carbonilo" está reconocido en la técnica e incluye restos tales como los que pueden estar representados por las fórmulas generales:

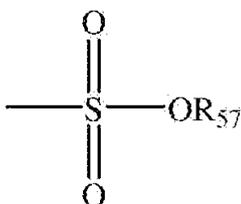


en las que X_{50} es un enlace o representa un oxígeno o un azufre, y R_{55} y R_{56} representan un hidrógeno, un alquilo,

un alqueno, $-(CH_2)_m-R_{61}$ o una sal farmacéuticamente aceptable, R_{56} representa un hidrógeno, un alquilo, un alqueno o $-(CH_2)_m-R_{61}$, en donde m y R_{61} se han definido anteriormente. Cuando X_{50} es un oxígeno y R_{55} o R_{56} no es hidrógeno, la fórmula representa un "éster". Cuando X_{50} es un oxígeno y R_{55} es como se ha definido anteriormente, el resto se denomina en este documento un grupo carboxilo y, particularmente, cuando R_{55} es un hidrógeno, la fórmula representa un "ácido carboxílico". Cuando X_{50} es un oxígeno y R_{56} es hidrógeno, la fórmula representa un "formiato". En general, cuando el átomo de oxígeno de la fórmula anterior está reemplazado por azufre, la fórmula representa un grupo "tiolcarbonilo". Cuando X_{50} es un azufre y R_{55} o R_{56} no es hidrógeno, la fórmula representa un "tioléster." Cuando X_{50} es un azufre y R_{55} es hidrógeno, la fórmula representa un "ácido tiolcarboxílico". Cuando X_{50} es un azufre y R_{56} es hidrógeno, la fórmula representa un "tiolformiato". Por otra parte, cuando X_{50} es un enlace y R_{55} no es hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo "cetona". Cuando X_{50} es un enlace y R_{55} es hidrógeno, la fórmula anterior representa un grupo "aldehído".

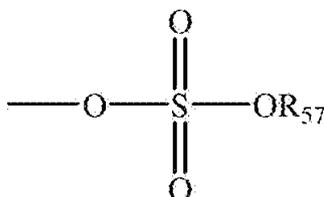
Los términos "alcoxilo" o "alcoxi" están reconocidos en la técnica y se refieren a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, el cual tiene un oxígeno fijado. Los grupos alcoxilo representativos incluyen metoxi, etoxi, propiloxi, *tert*-butoxi y similares. Un "éter" es dos hidrocarburos unidos covalentemente por un oxígeno. Por consiguiente, el sustituyente de un alquilo que convierte al alquilo en un éter o que se asemeja a un alcoxilo, se puede representar por uno entre $-O$ -alquilo, $-O$ -alqueno, $-O$ -alquino, $-O-(CH_2)_m-R_{61}$, en donde m y R_{61} se han descrito anteriormente.

El término "sulfonato" está reconocido en la técnica y se refiere a un resto que se puede representar por la fórmula general:



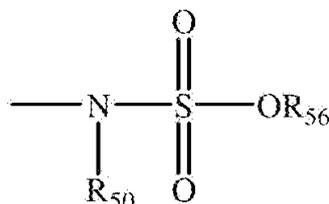
en la que R_{57} es una pareja de electrones, hidrógeno, alquilo, cicloalquilo o arilo.

El término "sulfato" está reconocido en la técnica e incluye un resto que se puede representar por la fórmula general:



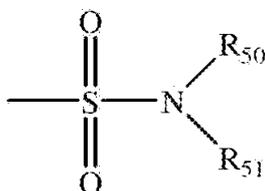
en la que R_{57} es como se ha definido anteriormente.

El término "sulfonamido" está reconocido en la técnica e incluye un resto que se puede representar por la fórmula general:



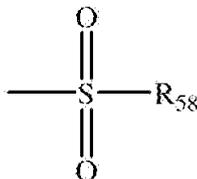
en la que R_{50} y R_{56} son como se han definido anteriormente.

El término "sulfamoilo" está reconocido en la técnica y se refiere a un resto que se puede representar por la fórmula general:



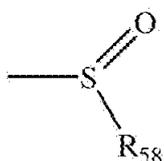
en la que R₅₀ y R₅₁ son como se han definido anteriormente.

El término "sulfonilo" está reconocido en la técnica y se refiere a un resto que se puede representar por la fórmula general:



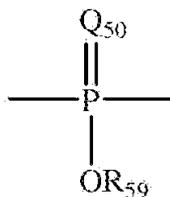
- 5 en la que R₅₈ es uno de los siguientes: hidrógeno, alquilo, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, heterociclilo, arilo o heteroarilo.

El término "sulfóxido" está reconocido en la técnica y se refiere a un resto que se puede representar por la fórmula general:

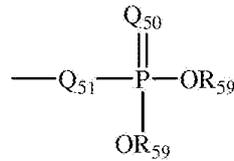
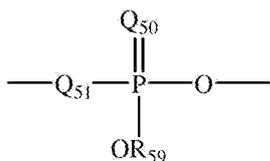


- 10 en la que R₅₈ se ha definido anteriormente.

El término "fosforilo" está reconocido en la técnica y en general se puede representar por la fórmula:

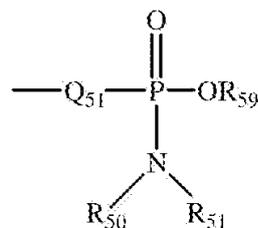
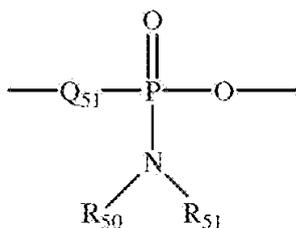


en la que Q₅₀ representa S u O, y R₅₉ representa hidrógeno, un alquilo inferior o un arilo. Cuando se usa para sustituir, por ejemplo, un alquilo, el grupo fosforilo del fosforilalquilo se puede representar por las fórmulas generales:



- 15 en las que Q₅₀ y R₅₉, cada una independientemente, se han definido anteriormente y Q₅₁ representa O, S o N. Cuando Q₅₀ es S, el resto fosforilo es un "fosforotioato".

El término "fosforamidita" está reconocido en la técnica y se puede representar por las fórmulas generales:



- 20 en las que Q₅₁, R₅₀, R₅₁ y R₅₉ son como se han definido anteriormente.

El término "fosfonamidita" está reconocido en la técnica y se puede representar por las fórmulas generales:



en las que Q₅₁, R₅₀, R₅₁ y R₅₉ son como se han definido anteriormente y R₆₀ representa un alquilo inferior o un arilo.

5 Las sustituciones análogas se pueden realizar sobre grupos alquenilo y alquinilo para producir, por ejemplo, aminoalquenilos, aminoalquinilos, amidoalquenilos, amidoalquinilos, iminoalquenilos, iminoalquinilos, tioalquenilos, tioalquinilos, alquenilos o alquinilos sustituidos con carbonilo.

La definición de cada expresión, por ejemplo, alquilo, m, n y similares, cuando se produce más de una vez en cualquier estructura, se entiende que es independiente de su definición en otro lugar en la misma estructura.

10 Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que tal sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y del sustituyente y que la sustitución da como resultado un compuesto estable, por ejemplo, que no sufre espontáneamente una transformación, tal como mediante una reordenación, ciclación, eliminación u otra reacción.

15 El término "sustituido" también se contempla que incluye todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes permisibles incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes ilustrativos incluyen, por ejemplo, los descritos anteriormente en el presente documento. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o varios y el mismo o diferentes para compuestos orgánicos apropiados. Para los fines de esta invención, los heteroátomos tales como el nitrógeno, pueden tener sustituyentes de hidrógeno y/o cualquier sustituyente permisible de compuestos orgánicos descritos en este documento, que satisfagan las valencias de los heteroátomos. Esta invención no pretende estar limitada de ninguna manera por los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos.

La expresión "puente de polimetina" se refiere a una cadena de metileno con doble enlace conjugado que comprende un número impar de carbonos. Un puente de este tipo puede incluir una estructura de anillo como parte de la cadena de metileno con doble enlace conjugado.

25 La expresión "vehículo fisiológicamente aceptable" se refiere a un vehículo en el que uno o varios de los compuestos de la invención se dispersan, se disuelven, se suspenden, se mezclan por adición y son fisiológicamente tolerables, es decir, se pueden administrar al cuerpo del sujeto enfermo o sobre el mismo, sin una incomodidad indebida o irritación o toxicidad.

30 A lo largo de toda la descripción, en la que se describen composiciones que tienen, incluyen o comprenden componentes específicos, se contempla que las composiciones también consisten esencialmente en, o consisten en, los componentes citados. Del mismo modo, cuando se describen los procedimientos que tienen, incluyen o comprenden etapas específicas del procedimiento, los procedimientos también consisten esencialmente en, o consisten en, las etapas de procesamiento citadas. Además, se debe entender que el orden de las etapas o el orden para realizar ciertas acciones son irrelevantes siempre que la invención siga siendo funcional. Además, se pueden realizar simultáneamente dos o más etapas o acciones.

II. Compuestos con fluorocromo de la invención

35 Los compuestos tienen unas longitudes de onda de absorción y emisión en el intervalo desde aproximadamente 500 nm a aproximadamente 1100 nm, preferiblemente en el intervalo desde aproximadamente 600 nm a aproximadamente 900 nm. En ciertas realizaciones, los colorantes absorben y/o emiten luz que tiene una longitud de onda en el intervalo desde aproximadamente 600 nm a aproximadamente 850 nm, desde aproximadamente 650 nm a aproximadamente 900 nm o desde aproximadamente 650 nm a aproximadamente 850 nm.

45 Las biomoléculas contempladas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, proteínas (por ejemplo, enzimas, hormonas, anticuerpos y fragmentos de los mismos que se unen a antígeno y anticuerpos de cadena sencilla), péptidos, aminoácidos, glicoproteínas, ligandos para receptores celulares, polisacáridos, carbohidratos, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), nucleósidos, nucleótidos, aptámeros, ácidos nucleicos con peptidilo, receptores celulares, sustratos de enzimas, cofactores de enzimas, biotina, hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, citocinas, linfoquinas, lectinas, selectinas, lípidos, conjuntos lipídicos (por ejemplo, micelas o vesículas) y toxinas. Se pueden usar otras biomoléculas, tales como las implicadas en la orientación hacia una diana

y la entrega, tal como la orientación mediada con folato (Leamon & Low, *Drug Discovery Today*, 6:44-51, 2001), transferrina, vitaminas, hidratos de carbono y ligandos que se dirigen a receptores de internalización, incluyendo, pero no limitados a, receptor de asialoglicoproteína, somatostatina, factor de crecimiento nervioso, oxitocina, bombesina, calcitonina, arginina vasopresina, angiotensina II, péptido natriurético auricular, insulina, glucagón, prolactina, gonadotropina, diversos opioides y activador del plasminógeno de tipo urocinasa. También se contemplan secuencias de señales de translocación membranal, transmembranal y nuclear, que se pueden obtener a partir de una variedad de fuentes que incluyen, sin limitación, virus y bacterias. Las biomoléculas pueden incluir también moléculas orgánicas, polímeros, dendrímeros, células (por ejemplo, células de mamífero, células de no mamífero, células vegetales, células de insecto, células embrionarias), bacterias, bacteriófagos, virus, organismos, partículas, micropartículas o nanopartículas. Las biomoléculas también pueden incluir moléculas de fármacos terapéuticos, incluyendo pero no limitadas a moléculas para fototerapia o radioterapia.

Los compuestos con fluorocromo de la presente invención se pueden utilizar para crear uno o varios de los siguientes tipos de agentes o sondas de formación de imágenes: una sonda molecular, una sonda activable, una sonda activable con enzima, una sonda de formación de imágenes a base de punto cuántico, una sonda de formación de imágenes a base de nanopartículas, una sonda dirigida a una biomolécula, una baliza molecular de longitud de onda cambiante, una sonda multicolor, una sonda con alta afinidad de unión a una diana, una sonda de formación de imágenes no específica, una sonda basada en células, un agente de modalidad dual, un agente de modalidad dual óptico/CT (por ejemplo, un agente óptico ligado de forma física o química a un agente de CT), un agente de modalidad dual óptico/MR (por ejemplo, un agente óptico ligado de forma física o química a un agente de MR), un agente de modalidad dual óptico/nuclear (por ejemplo, un agente óptico ligado de forma física o química o con un átomo radiactivo) y/o cualquier combinación de los mismos.

Los compuestos de la invención que incluyen una biomolécula ligada químicamente pueden tener una fluorescencia incrementada en comparación con el compuesto que no está ligado químicamente a una biomolécula. En ciertas realizaciones, la fluorescencia se incrementa en aproximadamente un 10%, aproximadamente un 25% o aproximadamente un 50%, en comparación con el compuesto no ligado. Las biomoléculas ligadas químicamente a los compuestos de la invención pueden alterar o mejorar la acumulación, la biodistribución, la eliminación, la orientación, la unión y/o el reconocimiento de las moléculas *in vivo* y/o *in vitro*.

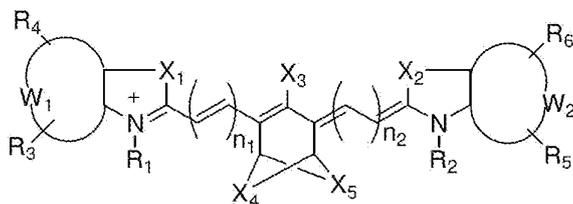
Los ejemplos de restos enlazadores apropiados para compuestos de la presente invención se han descrito previamente en la bibliografía (véanse, los documentos de solicitud de Patente de EE.UU. 2002/0064794 (2002); Patente de EE.UU. n° 6.086.737; Patente de EE.UU. n° 6.048.982; Patente de EE.UU. n° 6.747.159; y Patente de EE.UU. n° 6.448.008).

Se entiende que más de un compuesto con fluorocromo de la presente invención puede estar ligado químicamente a una única biomolécula.

Las sales de los compuestos descritos también se contemplan e incluyen tanto sales de adición de base como de ácido. Los compuestos de la presente invención pueden tener uno o varios 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 obtenidas a partir de bases inorgánicas, tales como hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos de amonio o de metales alcalinos o alcalinotérreos, y similares, y bases orgánicas tales como alcóxidos, alquil amidas, alquil aminas y aril aminas y similares. Tales bases que son útiles para preparar las sales de esta invención, incluyen por tanto hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, carbonato de potasio y similares.

Los compuestos de la presente invención que tienen un grupo suficientemente básico, tal como una amina, pueden reaccionar con un ácido orgánico o inorgánico para formar una sal de adición de ácido. Los ácidos comúnmente empleados 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 tales sales incluyen las sales sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, monohidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, metafosfato, pirofosfato, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, propionato, decanoato, caprilato, acrilato, formiato, isobutirato, caproato, heptanoato, propiolato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, maleato, butin-1,4-dioato, hexin-1,6-dioato, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, dinitrobenzoato, hidroxibenzoato, metoxibenzoato, ftalato, sulfonato, xilenosulfonato, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, citrato, lactato, gamma-hidroxibutirato, glicolato, tartrato, metanosulfonato, propanosulfonato, naftalen-1-sulfonato, naftalen-2-sulfonato, mandelato y similares.

La invención se puede representar por:



o una sal del mismo, en donde:

- 5 X₁ y X₂ cada uno independientemente, se seleccionan a partir del grupo que consiste en C(CH₂K₁)(CH₂K₂), O, S y Se;
- K₁ y K₂ cada uno independientemente, se seleccionan a partir del grupo que consiste en H y alquilo C₁-C₂₀: en donde K₁ y K₂ juntos pueden formar parte opcionalmente de un anillo cíclico;
- R₁ y R₂ cada uno independientemente, se seleccionan a partir del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₂₀, alquilarilo y -R₉T₁;
- 10 R₉ se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₂₀, arilo, alquilarilo y -(CH₂-O-CH₂)_yCH₂;
- T₁ es un resto enlazador capaz de formar un enlace covalente con una biomolécula;
- y es un número entero seleccionado a partir de 1 a 100;
- X₃ se selecciona a partir del grupo que consiste en H, halógeno, -T₂R₁₀, -T₂R₉T₁ y -R₉T₁;
- 15 T₂ se selecciona a partir del grupo que consiste en S, O y NR';
- R₁₀ se selecciona a partir del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₂₀, arilo, arilalquilo;
- X₄ y X₅ cada uno independientemente, se seleccionan a partir del grupo (CK₁K₂)_i y NR';
- i es un número entero seleccionado a partir de 1 a 7;
- R' se selecciona a partir del grupo que consiste en H y alquilo;
- 20 W₁ y W₂ representan cada uno representa átomos no metálicos como parte de un resto arilo;
- n₁ y n₂ cada uno independientemente, se seleccionan a partir de 0 a 4;
- R₃, R₄, R₅ y R₆ cada uno independientemente, se seleccionan a partir del grupo que consiste en H, halógeno, carboxilato, ácido carboxílico, éster carboxílico, amina, amida, sulfonamida, hidroxilo, O-alquilo, S-alquilo, alquilo, ácido sulfónico, sulfonato, un fosforilo, SO₂NR₇-Q-CHR₈-[(CH₂)_m- Y-(CH₂)_p-(O)_k]_h(CH₂)_d T₁ y -R₉T₁;
- 25 R₇ se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en alquilo C₁-C₂₀, arilo; alquilarilo;
- R₈ se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₂₀, arilo y alquilarilo;
- R₇ y R₈, cuando se toman en combinación, forman opcionalmente un anillo de 4, 5, 6 o 7 miembros, opcionalmente sustituido, saturado o insaturado;
- 30 Q se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en un enlace, carbonilo, alquilo C₁-C₆ y cicloalquilo C₁-C₆;
- Y se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en un enlace, -SO₂NR₇-Q-CHR₈-, -O-, -COO- y -CONR'-;
- h es un número entero seleccionado a partir de 0 a 70;
- k es 0 o 1;
- 35 d es un número entero de 0 a 12;
- m es un número entero de 0 a 12; y
- p es un número entero de 0 a 12.

En ciertas realizaciones, X_3 se puede seleccionar a partir del grupo que consiste en: $O-(CH_2)_j-T_1$, $S-(CH_2)_j-T_1$, $O-Ph-(CH_2)_j-T_1$, $S-Ph-(CH_2)_j-T_1$, en donde j es un número entero de 0 a 6 y Ph es fenilo.

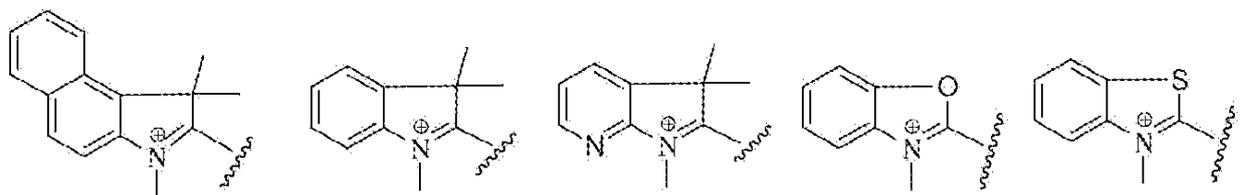
La invención tiene T_1 seleccionado a partir del grupo que consiste en $-NH_2$, $-OH$, $-SH$, $-SO_3H$, carboxilo, $-COCl$, $-(CO)O(CO)R_{13}$, $-CONHN_2$, ésteres de N-hidroxisuccinimido sustituidos y no sustituidos, ésteres de N-hidroxisulfosuccinimido sustituidos y no sustituidos, ésteres de nitro-fenol o fluoro-fenol, azida, $-NCS$, $-CHO$, $-COCH_2I$, ftalamido y maleimida, en donde R_{13} se selecciona a partir del grupo que consiste en H, alquilo y arilo.

En otras realizaciones, X_4 es $-CH_2-CH_2-$ y X_5 se selecciona a partir del grupo que consiste en $-CH_2$, $-NCH_3$ y $-C(CH_3)_2$.

En otras realizaciones, n_1 y n_2 son 1.

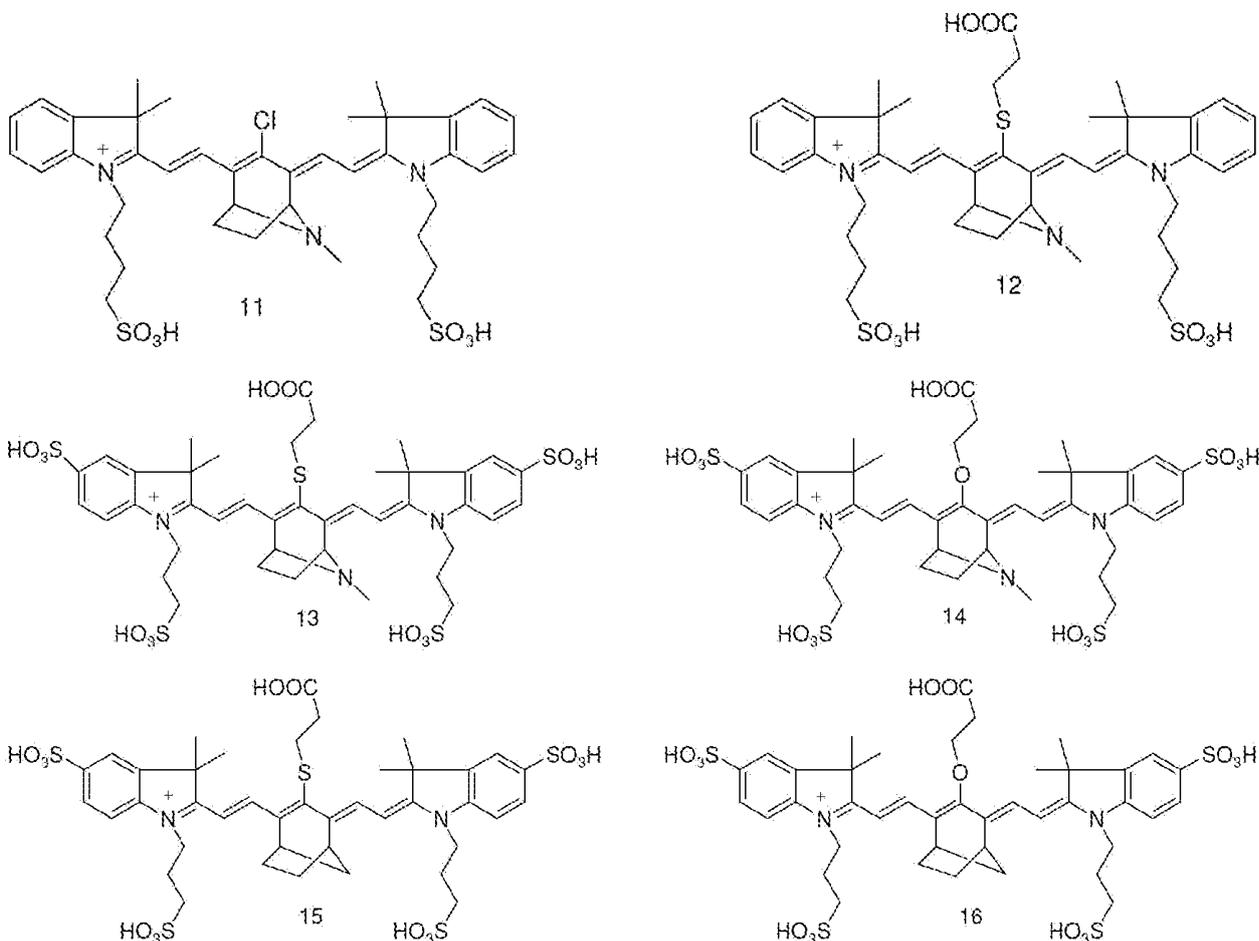
10 En otras realizaciones, X_1 y X_2 son $-C(CH_3)_2$.

Se entiende que W_1 y W_2 pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, W_1 y W_2 se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en:

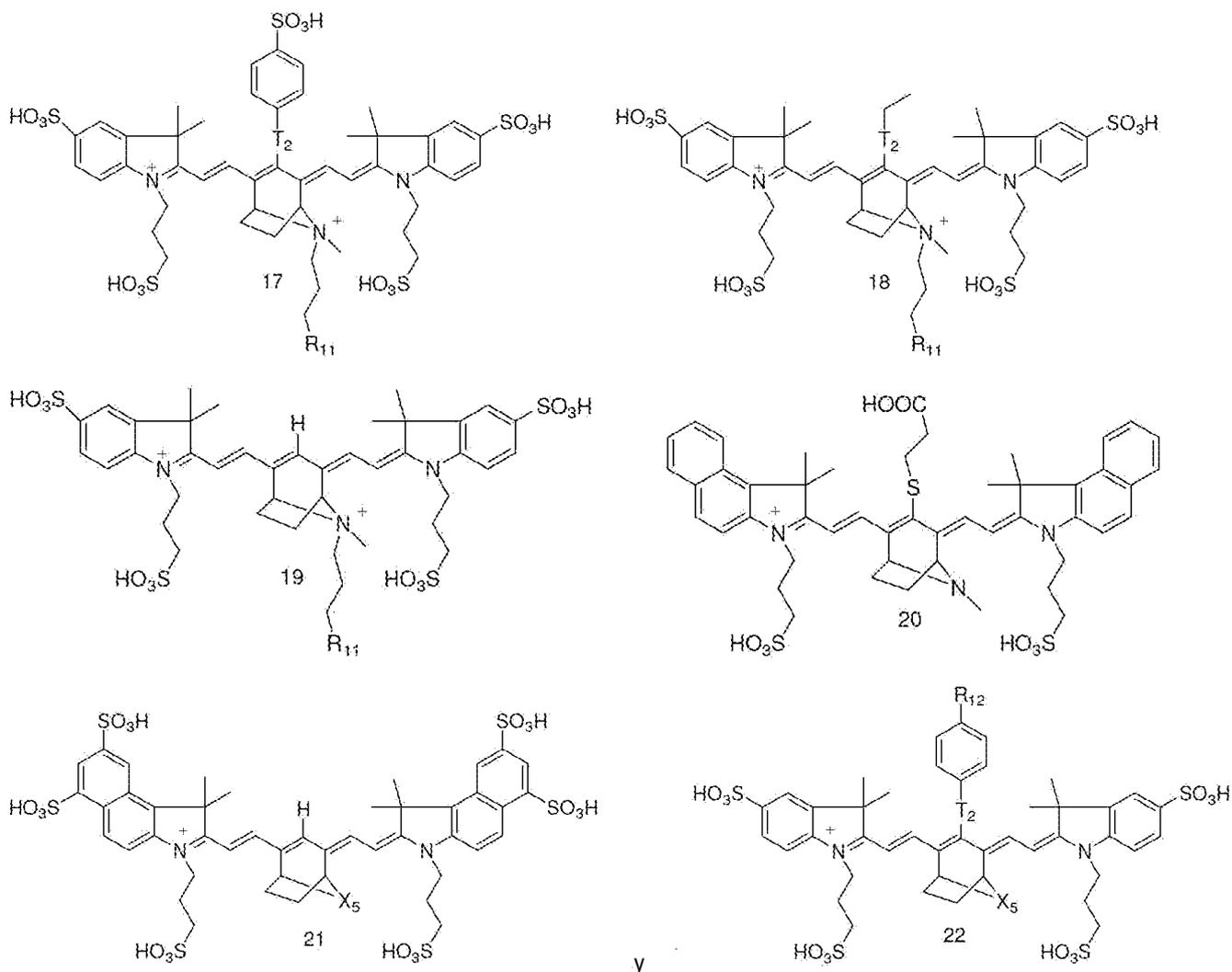


15 La incorporación de uno o varios sustituyentes que no son hidrógeno en los anillos condensados se puede utilizar para ajustar el espectro de absorción y de emisión del colorante resultante.

En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente invención se pueden representar por una cualquiera de las fórmulas 11-22:



20



5

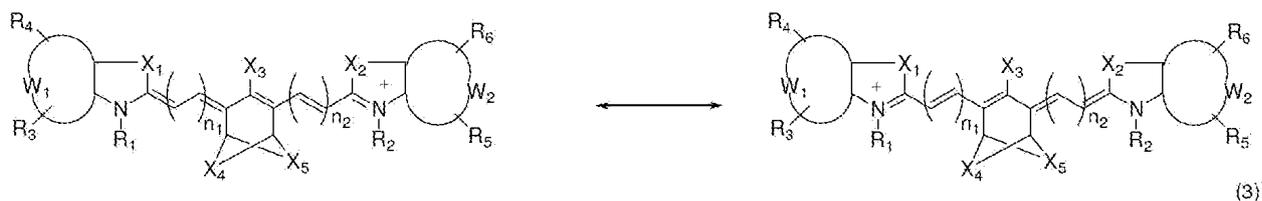
en donde T₂ es O o S; X₅ es N-Me o CH₂; R₁₁ se selecciona a partir del grupo que consiste en SO₃H, COOH, OH, SH y NH₂; y R₁₂ se selecciona a partir del grupo que consiste en: H, SO₃H, NCS, (CH₂)_kCOOH, en donde k es un número entero de 0 a 6.

10

La estructura del puente de polimetina puede afectar a las propiedades de absorción y de fluorescencia del fluorocromo. La longitud del puente de polimetina, que depende del número de átomos de carbono o del número de dobles enlaces entre Z¹ y Z², puede causar un cambio en las propiedades de absorción y de fluorescencia del fluorocromo. Por ejemplo, cuando n₁ = 0, n₂ = 0, X₃ = H y W₁ y W₂ son cada uno un heterociclo de indolinio no condensado con anillos adicionales, los fluorocromos resultantes muestran normalmente un máximo de absorción cerca de aproximadamente 650 nm. Compuestos similares, con n₁ = 1, n₂ = 1, muestran normalmente un máximo de absorción cerca de aproximadamente 750 nm.

15

Cuando un compuesto de la invención se describe en el presente documento mediante una estructura que indica las posiciones de los dobles enlaces en los anillos y el puente de polimetina, se entiende que la estructura también incluye cualquier estructura de resonancia, como se muestra, por ejemplo, en la figura siguiente:



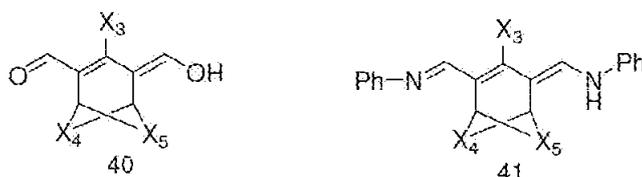
(3)

20

en donde, en cada una de las estructuras anteriores, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, W₁, W₂, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, n₁ y n₂, son como se han definido en el presente documento.

Generalmente, los compuestos descritos en este documento se pueden sintetizar del modo siguiente. En primer lugar, se prepara un heterociclo cuaternizado, Z¹. A continuación, la base heterocíclica se hace reaccionar con un puente de polimetina (PMB), que es un reactivo electrófilo, tal como PhNH-PMB-CH=NPh.HCl o RO-PMB-CH(OR)₂, en donde PMB incluye una cadena con doble enlace conjugado, (CH=CH)_n, que incluye un resto policiclo como parte de dicha cadena, y en donde Ph es un anillo de fenilo y R es un grupo metilo o etilo, para obtener hemicianinas tales como Z¹-PMB-CH=NPh o Z¹-PMB-CH=NAcPh (en donde Ac es el radical acetilo) o Z¹-(CH=CH)_n-OR. Estos compuestos intermedios se hacen reaccionar después con un heterociclo cuaternario diferente, Z². El brazo lateral funcionalizado está fijado o bien al primer heterociclo cuaternizado (Z¹) o al segundo (Z²). El resultado final es un reactivo marcador de polimetina no simétrico, Z¹-PMB-Z². Los ejemplos de compuestos intermedios de hemicianina se describen en F. M. Hamer, "Some Unsymmetrical Pentamethincyanine Dyes and their Tetramethin 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).

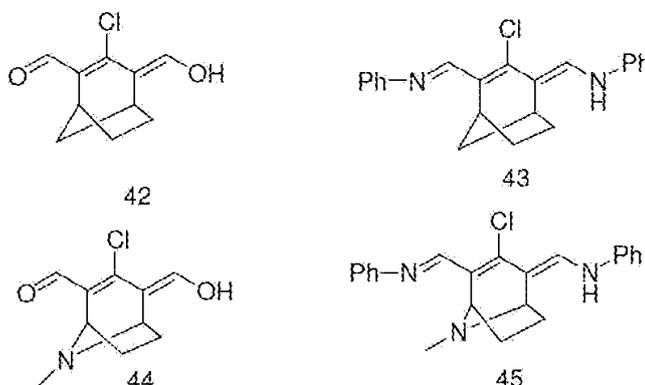
En otro aspecto, la invención proporciona compuestos de fórmulas estructurales generales 40 y 41:



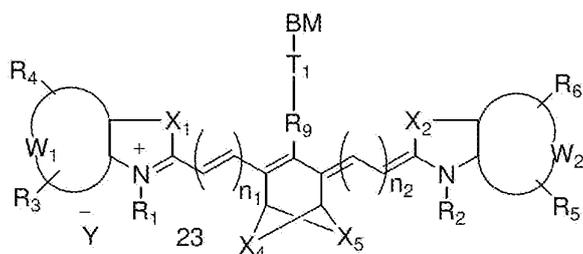
en las que X₃, X₄ y X₅ son como se han definido anteriormente y Ph es fenilo.

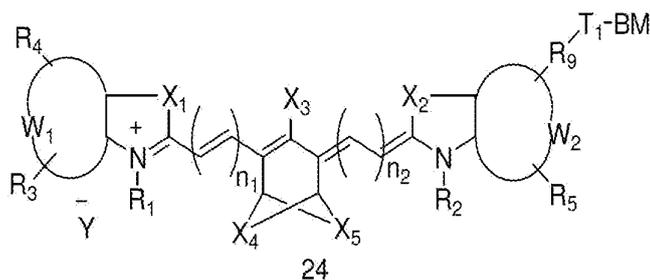
En ciertas realizaciones, X₄ y X₅ se seleccionan cada uno independientemente a partir del grupo que consiste en CH₂-CH₂, NMe y CMe₂.

En ciertas otras realizaciones, se contemplan las siguientes estructuras representadas por las fórmulas 42-45:

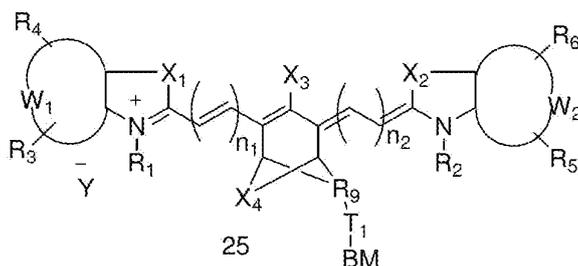


En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención pueden estar ligados químicamente a una molécula biológica o biomolécula (BM). El conjugado de compuesto-biomolécula resultante puede tener una alta afinidad de unión hacia una diana, por ejemplo, debido a una interacción entre la molécula biológica y la diana, por ejemplo, a través de una interacción receptor-ligando, una interacción enzima-sustrato, una interacción anticuerpo-antígeno o similar. Tales compuestos ligados químicamente, con la forma general [Z¹-(PMB)-Z²]-BM, se pueden representar, por ejemplo, como:





y



5 en donde, en cada una de las estructuras anteriores, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₉, W₁, W₂, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, T₁, n₁ y n₂, son como se han definido en el presente documento, Y es un contraión y BM es una biomolécula. Las estructuras anteriores son a modo de ejemplo y se entiende que una biomolécula (BM) se puede ligar químicamente con un compuesto de este tipo a través de uno cualquiera o varios de los grupos identificados como R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₉, W₁, W₂, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ y T₁.

10 Los compuestos se pueden marcar con biomoléculas o células del modo siguiente. Los compuestos (fluorocromos) de la presente invención se incuban con una o varias biomoléculas a diversas concentraciones durante desde aproximadamente 5 minutos a 24 horas o más a una temperatura desde aproximadamente 4°C a aproximadamente 37°C. Después de la incubación, el fluorocromo libre o el fluorocromo que no se ha ligado químicamente a la biomolécula, se pueden eliminar usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como por ejemplo, métodos de cromatografía o de ultrafiltración.

15 Las células se pueden centrifugar después de la incubación para crear un sedimento de células a partir del cual se elimina el material sobrenadante. Las células se pueden resuspender en medio de cultivo o solución salina fisiológica para eliminar por lavado el fluorocromo residual, no unido o libre. Esto se puede repetir varias veces. De esta manera, las células se pueden marcar o bien mediante una conjugación directa con moléculas celulares internas o externas o mediante una captación celular no específica en varios compartimentos intracelulares, que incluyen pero no se limitan al citosol, endosomas, núcleo, aparato de Golgi y otros orgánulos intracelulares.

20 Los compuestos y/o composiciones descritas se pueden envasar como un kit, que puede incluir opcionalmente instrucciones para el uso de los compuestos. Ejemplos no limitantes incluyen kits que contienen, por ejemplo, una composición en forma de polvo o liofilizada, e instrucciones de empleo, incluyendo información de la reconstitución, la dosificación e información sobre el almacenamiento para aplicaciones *in vivo* y/o *in vitro*. Los kits pueden contener opcionalmente recipientes con una composición en forma líquida lista para el uso o que requieren una mezcla adicional con soluciones para la administración, tales como viales para la reconstitución de formas en polvo, jeringas para inyección, sistemas de administración IV a medida, inhaladores, etc. Tales recipientes pueden contener dosis únicas o múltiples para los sujetos. Además, un kit puede contener componentes que ayudan en la detección de las composiciones *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, endoscopios especializados, filtros de luz.

30 Los compuestos descritos en este documento, incluyendo aquellos compuestos ligados químicamente a una biomolécula, se pueden formular en una composición farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto, por ejemplo, un sujeto animal o humano. En consecuencia, las formulaciones incluyen los compuestos junto con un vehículo fisiológicamente aceptable, adecuado para la forma y/o la dosis de administración deseada. Los vehículos fisiológicamente aceptables pueden incluir agua, solución salina y pueden incluir además agentes tales como tampones y otros agentes tales como conservantes que son compatibles para un uso en formulaciones farmacéuticas. El vehículo preferido es un fluido, preferiblemente un líquido, más preferiblemente una solución acuosa; sin embargo, los vehículos para formulaciones sólidas, formulaciones tópicas, formulaciones inhaladas, formulaciones oftálmicas y formulaciones transdérmicas también se considera que están dentro del alcance de la invención.

40 Además, las composiciones farmacéuticas pueden incluir uno o varios agentes estabilizadores en un vehículo

fisiológicamente aceptable. Un ejemplo adecuado de agente estabilizador para uso en tales composiciones incluye, por ejemplo, hidratos de carbono de bajo peso molecular, por ejemplo, un polialcohol lineal, tal como sorbitol y glicerol. Otros hidratos de carbono de bajo peso molecular, tales como inositol, también se pueden utilizar.

5 Se considera que los compuestos de la invención se pueden administrar por vía oral o parenteral. Para una administración parenteral, los compuestos se pueden administrar por vía intravenosa, intramuscular, cutánea, percutánea, subcutánea, rectal, nasal, vaginal y ocular. Por lo tanto, la composición puede estar en forma, por ejemplo, de comprimidos sólidos, cápsulas, píldoras, polvos, incluyendo polvos liofilizados, suspensiones coloidales, microesferas, liposomas, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles, incluyendo hidrogeles, pastas, unguentos, cremas, emplastos, soluciones de irrigación, pociones, dispositivos de administración osmótica, supositorios, enemas, agentes inyectables, implantes, pulverizaciones o aerosoles. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000, compilador. A.R. Germaro, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, compiladores J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

15 III Aplicaciones de los compuestos con fluorocromo de la invención

Los compuestos de la invención se pueden usar en una variedad de aplicaciones *in vivo* e *in vitro*. Estas aplicaciones se explican en las siguientes secciones.

(a) *Aplicaciones in vivo*

20 La invención proporciona compuestos fluorescentes novedosos que se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones de formación de imágenes, por ejemplo, aplicaciones de formación de imágenes ópticas. 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; Weissleder, Nature Biotechnology 19, 316 - 317 (2001); Ntziachristos et al., Eur. Radiol. 13:195-208 (2003); Graves et al., Curr. Mol. Med. 4:419-430 (2004); Citrin et al., Expert Rev. Anticancer Ther. 4:857-864 (2004); Ntziachristos, Ann. Rev. Biomed. Eng. 8:1-33 (2006); Koo et al., Cell Oncol. 28:127-139 (2006); y Rao et al., Curr. Opin. Biotechnol. 18:17-25 (2007).

Un sistema de formación de imágenes útil en la práctica de esta invención, normalmente incluye tres componentes básicos: (1) una fuente de luz apropiada para excitar los compuestos con fluorocromo de la invención, (2) un sistema para separar o distinguir las emisiones de luz utilizada para inducir la excitación del fluorocromo y (3) un sistema de detección. Este sistema de detección se puede utilizar manualmente o estar incorporado en otros dispositivos útiles de formación de imágenes, tales como endoscopios, catéteres, microscopios intraoperatorios y/o visores.

Preferiblemente, la fuente de luz proporciona una luz monocromática (o sustancialmente monocromática). La fuente de luz puede ser una luz blanca filtrada de forma adecuada, es decir, luz con paso banda procedente de una fuente de banda ancha. Por ejemplo, la luz de una lámpara halógena de 150 vatios puede pasar a través de un filtro de paso banda adecuado disponible comercialmente en Omega Optical (Brattleboro, VT). Dependiendo del sistema, la fuente de luz puede ser un láser. Véase, por ejemplo, Boas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4887-4891, 1994; Ntziachristos et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:2767-2772, 2000; y Alexander, J. Clin. Laser Med. Surg. 9:416-418, 1991. Una información sobre los láseres para la formación de imágenes se puede encontrar, por ejemplo, en Imaging Diagnostic Systems, Inc., Plantation, FL y otras fuentes diversas. Un filtro de paso o de paso banda alto se puede utilizar para separar las emisiones ópticas de la luz de excitación. Un filtro de paso o de paso banda alto, adecuado está disponible comercialmente en Omega Optical, Burlington, VT.

En general, el sistema de detección de luz se puede visualizar como que incluye un componente de recogida de luz/formación de imágenes y un componente de detección de luz/registro de imágenes. Aunque el sistema de detección de luz puede ser un único dispositivo integrado que incorpora los dos componentes, el componente de recogida de luz/formación de imágenes y el componente de detección de luz/registro de imágenes se analizan por separado.

Un componente de recogida de luz/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 ovario cancer (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 y regiones de la cabeza y el cuello, se pueden emplear en la puesta en práctica de la presente invención.

55 Otros tipos de componentes de recogida de luz son dispositivos basados en un catéter, incluyendo los dispositivos de fibra óptica. Tales dispositivos son particularmente adecuados para la formación de imágenes intravasculares. Véase, por ejemplo, Tearney et al., Science 276: 2037-2039, 1997; y Circulation 94: 3013, 1996.

Todavía otras tecnologías de formación de imágenes, incluyendo la tecnología de red de fase (Boas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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. USA 96:8461-8466, 1999; Rajadhyaksha et al., J. Invest. Dermatol 104:946-952, 1995; y Gonzalez et al., J. Med. 30:337-356, 1999) y tomografía molecular con fluorescencia (FMT) (Nziachristos et al., Nature Medicine 8:757-760, 2002; documentos de Patente de EE.UU. n° 6.615.063, solicitud PCT n° WO 03/102558 y PCT US/03/07579) se pueden usar con los compuestos con fluorocromo de la invención. Del mismo modo, los compuestos con fluorocromo se pueden utilizar en una variedad de sistemas de formación de imágenes, por ejemplo, [1] los sistemas de formación de imágenes IVIS[®]: 100 Series, 200 Series (Xenogen, Alameda, CA), [2] SPECTRUM y LUMINA (Xenogen, Alameda, CA), [3] SoftScan[®] o eXplore Optix[®] (GE Healthcare, Reino Unido), [4] MaestroTM y NuanceTM-2 Systems (CRi, Woburn, MA), [5] Image Station In-Vivo FX de Carestream Molecular Imaging, Rochester, NY (anteriormente Kodak Molecular Imaging Systems), [6] OV100, IV100 (Olympus Corporation, Japón), [7] Cellvizio Mauna Kea Technologies, Francia) [8] NanoSPECT/CT o HiSPECT (Bioclean, Washington, DC), [9] CTLM[®] o LILATM (Imaging Diagnostic Systems, Plantation, FL), [10] DYNOTTM (NIRx Medical Technologies, Glen Head, NY) y [11] NightOWL Imaging Systems de Berthold Technologies, Alemania.

Una variedad de componentes de detección de luz/registro de imágenes, por ejemplo, sistemas de dispositivos acoplados por carga (CCD) o de película fotográfica, se pueden utilizar en tales sistemas. La elección de la detección de luz/registro de imágenes depende de factores que incluyen el tipo de componente de recogida de luz/formación de imágenes que se utiliza. Se entiende, sin embargo, que la selección de los componentes adecuados, ensamblarlos en un sistema de formación de imágenes ópticas y el funcionamiento de los sistemas está dentro de la experiencia ordinaria en la técnica.

Las técnicas de formación de imágenes ópticas y de medición incluyen, pero no se limitan a, formación de imágenes con fluorescencia, formación de imágenes con luminiscencia; endoscopia; endoscopia con fluorescencia; tomografía de coherencia óptica; formación de imágenes por transmitancia; formación de imágenes por transmitancia con resolución temporal; formación de imágenes confocales; microscopía no lineal; formación de imágenes fotoacústicas; formación de imágenes acústico-ópticas; espectroscopia; espectroscopia con reflectancia; formación de imágenes intravitales; formación de imágenes con dos fotones; interferometría; interferometría de coherencia; tomografía óptica difusa y tomografía molecular con fluorescencia.

Se contempla que los compuestos con fluorocromo de la inyección se pueden acoplar o incorporar dentro de un soporte sólido, por ejemplo, una partícula. De acuerdo con ello, se entiende que los compuestos con fluorocromo se pueden acoplar a nanopartículas de óxidos de metales que tienen propiedades magnéticas para producir partículas que son también fluorescentes. De acuerdo con ello, las partículas resultantes también se pueden usar en la formación de imágenes por MRI, usando métodos conocidos en la técnica. Para una revisión de las técnicas de MRI, véase Westbrook. Handbook of MRI Technique, 2^a edición, 1999, Blackwell Science. Es posible que las imágenes obtenidas, por ejemplo, mediante tomografía molecular fluorescente y por la formación de imágenes por resonancia magnética se puedan registrar conjuntamente o fusionar con otra para proporcionar una información adicional sobre el elemento del que se están formando imágenes. Además, los sistemas de formación de imágenes de múltiples modalidades (es decir, sistemas de formación de imágenes ópticas y MR combinadas) se pueden utilizar para crear imágenes MR ópticas combinadas.

Además, las composiciones y métodos de la presente invención se pueden usar en combinación con otras composiciones y métodos de formación de imágenes. Por ejemplo, los compuestos con fluorocromo de la invención se pueden utilizar para visualizar regiones de interés a través de protocolos de formación de imágenes ópticas, ya sean solos o en combinación con otras modalidades tradicionales de formación de imágenes, tales como rayos X, tomografía computarizada (CT), formación de imágenes MR, ultrasonidos, tomografía por emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada de fotón único (SPECT). Por ejemplo, las composiciones y los métodos de la presente invención se pueden usar en combinación con formación de imágenes CT o MR para obtener simultáneamente una información tanto anatómica como molecular, por ejemplo, mediante el registro conjunto de una imagen generada por otra modalidad de formación de imágenes. Las composiciones y los métodos de la presente invención también se pueden emplear en combinación con rayos X, CT, PET, ultrasonidos, SPECT, MR y otros agentes de contraste ópticos o, alternativamente, los compuestos con fluorocromo de la presente invención también pueden contener agentes de formación de imágenes tales como átomos de yodo, gadolinio e isótopos radiactivos que se pueden detectar empleando modalidades de formación de imágenes CT, PET, SPECT y MR en combinación con la formación de imágenes ópticas.

Un método a modo de ejemplo de la formación de imágenes ópticas *in vivo* comprende las etapas de (a) administrar a un sujeto, por ejemplo, un ser humano o un animal, un compuesto fluorescente de la presente invención; (b) conceder un tiempo suficiente para que el compuesto con fluorocromo se distribuya dentro del sujeto o para que se ponga en contacto o interaccione con una diana biológica; (c) exponer el sujeto a una radiación electromagnética, por ejemplo, luz con una longitud de onda absorbible por el compuesto con fluorocromo; y (d) detectar una señal óptica emitida por el compuesto con fluorocromo.

Se entiende que 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 de modelos de investigación, etc.). La diana biológica puede incluir, sin limitación, células, cultivo de células, tejidos, secciones de tejidos, órganos, secciones de órganos, muestras de citospina, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos o similares.

Las etapas anteriores, incluyendo, por ejemplo, las etapas (a) - (d), se pueden repetir a intervalos de tiempo predeterminados, permitiendo de ese modo una evaluación de las señales emitidas de los compuestos con fluorocromo en el sujeto con el paso del tiempo. Las etapas de iluminación y de detección (etapas (c) y (d), respectivamente) se pueden realizar utilizando un sistema de formación de imágenes planas, un endoscopio, un catéter, un sistema de tomografía, un sistema de formación de imágenes ópticas portátil, gafas o un microscopio intraoperatorio. La señal emitida por el compuesto con fluorocromo se puede utilizar para construir una imagen, por ejemplo, una imagen tomográfica.

Antes o durante estas etapas, un sistema de detección se puede colocar alrededor o en las proximidades de un sujeto (por ejemplo, un animal o un ser humano) para detectar señales ópticas y/u otras señales (por ejemplo, MR, nucleares, rayos X) emitidas desde el sujeto. Las señales ópticas y/o las otras señales emitidas se pueden procesar para construir una imagen, por ejemplo, una imagen tomográfica o plana. Además, las señales procesadas se pueden visualizar como imágenes, ya sea aisladas o como imágenes fusionadas (combinadas).

Además, es posible poner en práctica un método de formación de imágenes *in vivo* que detecta selectivamente y visualiza uno o varios agentes de formación de imágenes de forma simultánea. En un enfoque de este tipo, por ejemplo, en la etapa (a) como se ha señalado anteriormente, dos o más agentes formadores de imágenes cuyas propiedades de señalización son distinguibles entre sí, se administran al sujeto, ya sea al mismo tiempo o secuencialmente, en donde al menos uno de los agentes formadores de imágenes contiene un compuesto con fluorocromo de la invención. El uso de múltiples agentes permite el registro de múltiples procesos, funciones o dianas biológicas.

También se describe un método de formación de imágenes *in vivo*, en donde se administran células marcadas al sujeto. Las células se pueden marcar con el compuesto con fluorocromo *ex vivo*. Las células se pueden obtener directamente a partir de un sujeto o de otra fuente (por ejemplo, a partir de otro sujeto, cultivo celular, etc.). El compuesto con fluorocromo se puede mezclar con las células para marcar de manera eficaz las células y las células marcadas resultantes administrarlas a un sujeto en la etapa (a). Las etapas (b) - (d) a continuación, se aplican como se ha descrito anteriormente. Este método se puede utilizar para supervisar la circulación y la localización de ciertos tipos de células, incluyendo células T, células tumorales, células inmunes y células madre y otros tipos de células. En particular, este método se puede emplear para supervisar terapias basadas en células.

Se entiende que la formulación de los compuestos con fluorocromo, la elección del modo de administración, las dosificaciones de los compuestos con fluorocromo administrados al sujeto y la coordinación entre la administración de los compuestos con fluorocromo y su exposición a la luz (y también otras formas de radiación electromagnética, si son apropiadas en esas circunstancias) están dentro del nivel de habilidad en la técnica.

Los métodos de la invención se pueden usar para determinar una serie de señales, incluyendo el seguimiento de la localización de los compuestos con fluorocromo en el sujeto con el paso del tiempo o la evaluación de cambios o alteraciones en el metabolismo y/o la excreción de los compuestos con fluorocromo en el sujeto a lo largo del tiempo. Los métodos también se pueden utilizar para supervisar una terapia para tales enfermedades mediante la formación de imágenes de eventos moleculares y rutas biológicas moduladas por una terapia de ese tipo, incluyendo, pero no limitadas a la determinación de la eficacia, el momento óptimo, los niveles de dosificación óptimos (incluso para pacientes individuales o sujetos de un ensayo) y los efectos sinérgicos de combinaciones de la terapia.

Los métodos y las composiciones de la invención también se pueden usar para ayudar a un médico o un cirujano a identificar y caracterizar áreas de enfermedad, tales como artritis, cáncer y específicamente pólipos del colon, o una placa vulnerable o inestable, para distinguir entre tejido enfermo y normal, tal como para la detección de los márgenes de un tumor que son difíciles de detectar usando un microscopio de funcionamiento ordinario, por ejemplo, en la cirugía del cerebro, para ayudar a ordenar una intervención terapéutica o quirúrgica, por ejemplo, mediante la determinación de si una lesión es cancerosa y debe ser eliminada o no es cancerosa y no hacer nada, o en la estadificación quirúrgica de una enfermedad, por ejemplo, una estadificación intraoperatoria de los ganglios linfáticos, el cartografiado de un ganglio linfático centinela o la evaluación de una hemorragia intraoperatoria o para delimitar los márgenes de un tumor.

Los métodos y las composiciones de la invención también se pueden usar en la detección, caracterización y/o la determinación de la localización de una enfermedad, especialmente una enfermedad temprana, la gravedad de una enfermedad o un estado asociado con una enfermedad, la estadificación de una enfermedad y/o el seguimiento de una enfermedad. La presencia, la ausencia o el nivel de una señal emitida pueden ser indicativos de un estado de enfermedad. Los métodos y las composiciones de la invención también se pueden usar para supervisar y/o guiar diversas intervenciones terapéuticas, tales como procedimientos quirúrgicos y el seguimiento de una terapia con

fármacos, incluyendo terapias basadas en células. Los métodos de la invención también se pueden usar en el pronóstico de una enfermedad o un estado de enfermedad.

Con respecto a cada uno de los anteriores, los ejemplos de tales enfermedades o estados de enfermedad que se pueden detectar o supervisar (antes, durante o después de una terapia) incluyen, por ejemplo, inflamación (por ejemplo, la inflamación causada por artritis, por ejemplo, artritis reumatoide), cáncer (por ejemplo, colorrectal, de ovario, pulmón, mama, próstata, cervical, testicular, de piel, cerebro, gastrointestinal, de páncreas, hígado, riñones vejiga, estómago, leucemia, boca, esófago, hueso), enfermedad cardiovascular (por ejemplo, aterosclerosis y estados inflamatorios de los vasos sanguíneos, isquemia, apoplejía, trombosis, coagulación intravascular diseminada), enfermedad dermatológica (por ejemplo, sarcoma de Kaposi, psoriasis, dermatitis alérgica), enfermedad oftálmica (por ejemplo, degeneración macular, retinopatía diabética), enfermedad infecciosa (por ejemplo, infecciones bacterianas, víricas, fúngicas y parasitarias, incluyendo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, malaria, enfermedad de Chagas, esquistosomiasis), enfermedad inmunológica (por ejemplo, un trastorno autoinmune, linfoma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes mellitus, lupus eritematoso, miastenia grave, enfermedad de Graves), enfermedad del sistema nervioso central (por ejemplo, una enfermedad neurodegenerativa, tal como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad priónica), enfermedades heredadas, enfermedades metabólicas, enfermedades ambientales (por ejemplo, envenenamiento con plomo, mercurio y radiactivo, cáncer de piel), enfermedad relacionada con los huesos (por ejemplo, osteoporosis, tumores óseos primarios y metastásicos, osteoartritis), enfermedad neurodegenerativa y complicaciones relacionadas con una cirugía (tales como rechazo de injertos, rechazo de órganos, alteraciones en la curación de heridas, fibrosis u otras complicaciones relacionadas con implantes quirúrgicos).

Los métodos y las composiciones de la invención, por lo tanto, se pueden utilizar, por ejemplo, para determinar la presencia y/o la localización de células tumorales, la presencia y/o la localización de una inflamación, incluyendo la presencia de macrófagos activados, por ejemplo en la aterosclerosis o la artritis, la presencia y la localización de una enfermedad vascular incluyendo áreas con riesgo de oclusión aguda (es decir, placas vulnerables) en arterias coronarias y periféricas, regiones de aneurismas en expansión, placa inestable en arterias carótidas y áreas isquémicas. Los métodos descritos de la invención se pueden utilizar, por ejemplo, en la identificación y la evaluación de la apoptosis, necrosis, hipoxia y angiogénesis. Alternativamente, los métodos descritos también se pueden usar para evaluar el efecto de un compuesto terapéutico o una terapia sobre una diana molecular especificada, por ejemplo, mediante la formación de imágenes de un sujeto antes y después de un tratamiento con el compuesto terapéutico o una terapia, y comparando las imágenes correspondientes.

(b) Aplicaciones *in vitro*

Además, se apreciará que los compuestos con fluorocromos se pueden utilizar en una variedad de ensayos *in vitro*, por ejemplo, experimentos de unión y experimentos de formación de imágenes *in vitro*. Se entiende que las tecnologías de formación de imágenes descritas en la sección anterior también se pueden aplicar a los experimentos de formación de imágenes *in vitro*.

A modo de ejemplo, un método de formación de imágenes *in vitro* comprende: (a) poner en contacto una muestra con una sonda que comprende un compuesto con fluorocromo de la invención; (b) permitir que el compuesto con fluorocromo (i) se vuelva activo y/o (ii) se una a una diana biológica; (c) opcionalmente eliminar el compuesto con fluorocromo no activado o no unido; (d) exponer la muestra a una radiación electromagnética, por ejemplo, luz con una longitud de onda absorbible por el compuesto con fluorocromo; y (e) detectar la señal emitida desde los compuestos con fluorocromo para determinar de ese modo si las sondas se han activado o se han unido con la diana biológica.

La muestra puede ser una muestra líquida o sólida que contiene, por ejemplo, células primarias, cultivos de células o tejidos. La diana biológica puede ser, por ejemplo, una célula, un agregado de células, un tejido o una muestra de tejido, una estructura (tanto a nivel macrocelular (por ejemplo, hueso o tejido) o a nivel subcelular (por ejemplo, una mitocondria o un núcleo)) y un componente celular, por ejemplo, una proteína (por ejemplo, una enzima o una proteína estructural), un lípido, un ácido nucleico o un polisacárido.

Los compuestos con fluorocromo se pueden utilizar en una variedad de ensayos de unión de ligandos *in vitro* de modo que, cuando se incorporan en partículas magnéticas, se pueden utilizar en ensayos basados en una detección magnética (véanse los documentos de Patente de EE.UU. n° 6.046.585 y 6.275.031, Patente de EE.UU. n° 5.445.970; Patente de EE.UU. n° 4.219.335, Chemla, et al (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97, 14268-72). También se pueden utilizar en ensayos de unión de ligandos basados en la resonancia magnética, tales como los descritos en el documento de Patente de EE.UU. n° 5.164.297 y Pérez et al. Nature Biotechnol. 2002, 20(8):816-20. Los compuestos con fluorocromo también se pueden utilizar para la clasificación de células y aplicaciones de recuento.

Los compuestos con fluorocromo también se pueden utilizar como grupos informadores en ensayos basados en ácidos nucleicos. Por ejemplo, los compuestos con fluorocromos se pueden acoplar a ácidos nucleicos, por ejemplo, ADN o ARN, ácidos nucleicos modificados, PNAs, balizas moleculares u otras moléculas que se unen a ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN pequeños de interferencia o ARNs) para uso en ensayos de hibridación, por ejemplo,

5 en ensayos de hibridación *in situ*, reacciones de secuenciación, reacciones de amplificación, por ejemplo, reacciones de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. Por ejemplo, para la detección de un ácido nucleico monocatenario (es decir, ARNm, ADNc o ADN de doble cadena desnaturalizado) en una muestra a través de los principios de hibridación de ácidos nucleicos, un compuesto con fluorocromo de la invención está ligado químicamente a un ácido nucleico monocatenario (sonda) y está en contacto con una muestra que se sospecha que contiene uno o varios ácidos nucleicos monocatenarios (ácidos nucleicos diana), opcionalmente inmovilizados sobre un soporte sólido. La sonda se incuba con la muestra en condiciones que permitan que la sonda se hibride con el ácido nucleico diana en la muestra para formar un dúplex. La sonda no unida se puede eliminar mediante lavado y la sonda unida se puede detectar, en donde la presencia o el nivel de fluorescencia emitida por el compuesto con fluorocromo en la sonda, es indicativo de la presencia o la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra.

La invención se ilustrará ahora por medio de los siguientes ejemplos, que se proporcionan únicamente con el fin de ilustrar y sin ninguna intención de limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

15 Los materiales y métodos representativos que se pueden emplear en la preparación de los compuestos de la invención se describen adicionalmente a continuación. Todos los productos químicos y disolventes (grado reactivo) disponibles en el mercado se utilizan tal y como se suministran sin una purificación adicional en general. Los métodos de HPLC analíticos y preparativos incluyen:

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

20 Fase móvil: acetonitrilo, acetato de trietilamonio 25 mM.

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

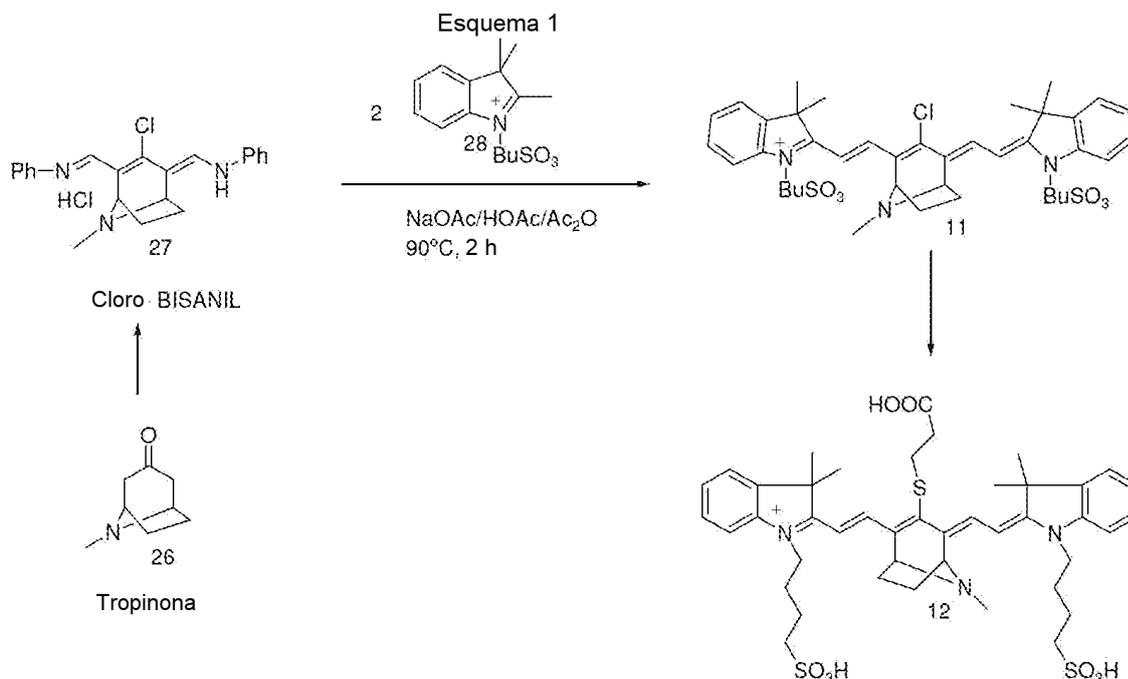
Fase móvil: acetonitrilo, acetato de trietilamonio 25 mM.

Columna C: Phenomenex Jupiter, 300 Å, C18

Fase móvil: acetonitrilo, acetato de trietilamonio 25 mM.

25 Ejemplo 1 - Síntesis del Compuesto **12**

El Compuesto **12** se sintetizó de acuerdo con el siguiente esquema (Esquema 1).



A. Preparación del Compuesto **27**

Se añadieron 2 ml de POCl₃ gota a gota a 3 ml de DMF enfriada a 0°C durante dos minutos. Después de agitar

durante cinco minutos, se añadió 1 g de tropinona **26** en 2 ml de DMF durante un período de 10 minutos. Se desarrolló un color naranja brillante instantáneo. Después de agitar a 0°C durante 30 minutos, el baño de refrigeración se retiró y la mezcla de reacción se dejó calentar hasta la temperatura ambiente durante 30 minutos y después se calentó a 70°C en un baño de agua. Después de 3 horas, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 1,4 ml de anilina en 3 ml de etanol con enfriamiento en hielo. La mezcla se vertió posteriormente en 30 g de hielo que contenían 2 ml de ácido clorhídrico concentrado (HCl) en un vaso de precipitados. La mezcla se agitó a fondo y se almacenó a 4°C durante una noche. El precipitado del Compuesto **27** se recogió mediante centrifugación de la solución de color pardo. El residuo se lavó suavemente con 50% de etanol acuoso y se secó a vacío para producir 1,0 g de producto con un rendimiento del 35%.

10 B. Preparación de la sal cuaternaria (**28**)

Una mezcla de 20 mmol de 2,3,3-trimetil indolinina y 25 mmol de butano sulfona se calentó en 20 ml de 1,2 diclorobenceno en un tubo sellado a 125°C durante 8 horas. Después de decantar el disolvente orgánico, el residuo precipitó repetidamente en metanol-acetona hasta que se obtuvo un polvo rosa pálido de flujo libre de la sal cuaternaria **28** con un rendimiento del 75-80%.

15 C. Preparación del Compuesto **11**

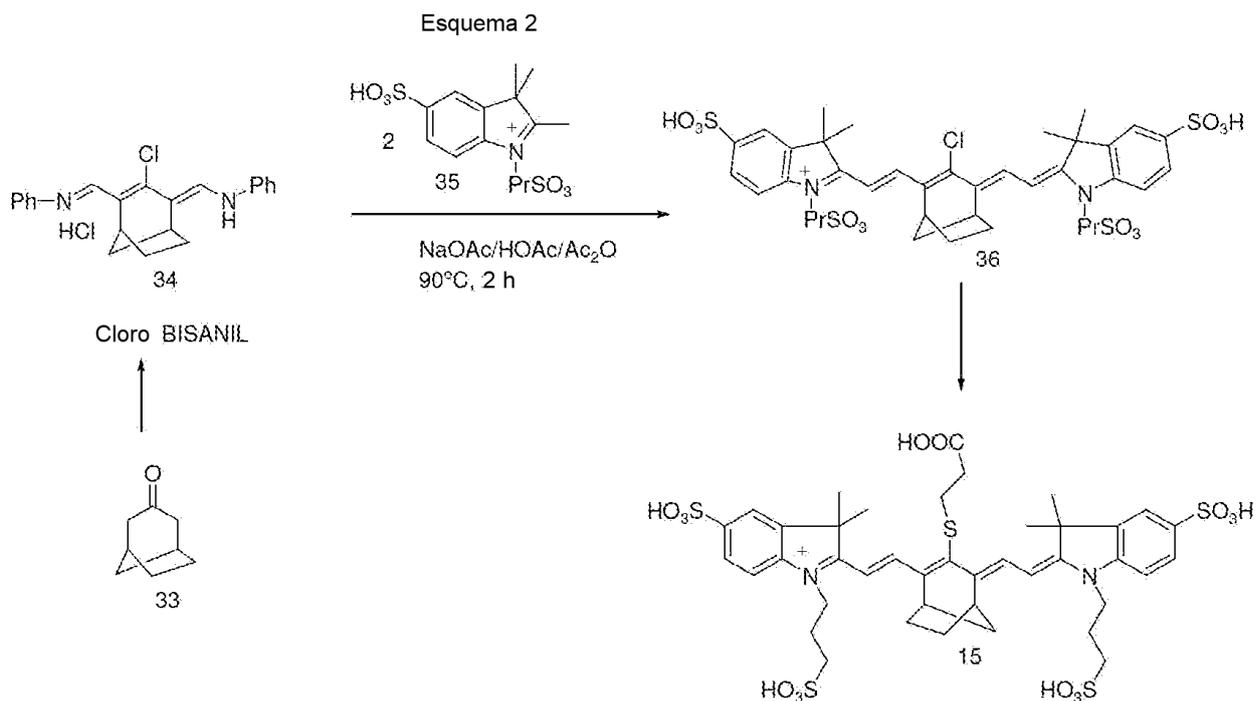
Se mezclaron 120 mg de la sal cuaternaria **28** (0,4 mmol) y 80 mg de clorobisanil **27** (0,2 mmol) en un tubo de vidrio de 15 ml. Se añadieron 2 ml de ácido acético, 2 ml de anhídrido acético y 82 mg de acetato de sodio (1 mmol). El tubo se selló y se calentó a 110°C durante 3 horas, tiempo durante el cual la mezcla de reacción se volvió lentamente de color verde. Después de enfriar, se añadieron 5 ml de acetato de etilo a la mezcla de reacción, en donde el colorante en bruto precipitó como un residuo oscuro. El residuo oscuro se purificó en una columna de HPLC RPC18 semi-prep. El secado con Speed Vac de la fracción de HPLC proporcionó 110 mg del Compuesto **11**, con un rendimiento del 71% y se identificó mediante MALDI. Calculado para la sal de K (C₄₀H₅₁ClKN₃O₆S₂) 808,53; observado 808,81. Abs. máx.: 760 nm (agua), 770 nm (MeOH); Em. máx.: 775 nm (agua), 790 nm (MeOH).

D. Preparación del Compuesto **12**

25 Se disolvieron 110 mg del Compuesto **11** en 1 ml de DMF a los que se añadieron 25 µl de ácido mercaptopropiónico y 5 µl de trietilamina en un tubo de 2 ml. El contenido se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El análisis de la mezcla de reacción mediante HPLC reveló una conversión completa del Compuesto **11** a Compuesto **12**. El producto se aisló mediante precipitación repetida en DMF-acetato de etilo. Rendimiento 80 mg, 69%. Identificado por MALDI: Calculado para C₄₃H₅₇N₃O₈S₃⁺: 840,12; observado 841,70. Abs. máx.: 768 nm (agua), 780 nm (MeOH); Em. máx.: 787 nm (agua), 810 nm (MeOH).

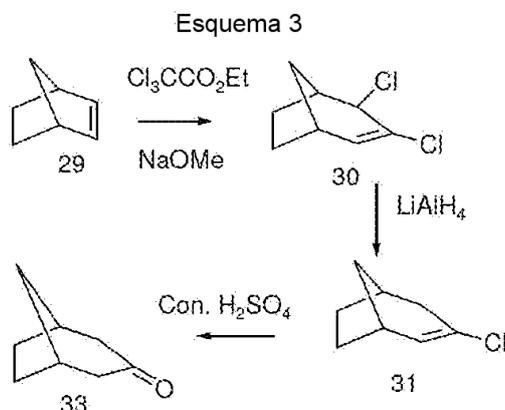
Ejemplo 2 - Síntesis del Compuesto **15**

El Compuesto **15** se preparó como se describe en el siguiente esquema (Esquema 2).



A. Preparación del Compuesto **33**

El Compuesto **33** se sintetizó de acuerdo con el procedimiento de la bibliografía (Organic Syntheses, CV6, p 142) a partir de norborneno **29** comercialmente disponible, como se ilustra en el Esquema 3.

5 B. Preparación del Compuesto **34**

El Compuesto **34** se preparó a partir de 1 g del Compuesto **33** mediante una reacción de Vilsmeier, usando el procedimiento descrito para el Compuesto **27**.

C. Preparación del Compuesto **35**

10 El Compuesto **35**, N(4-sulfonato)-2,3,3-trimetil-5-sulfo-indolinina se preparó de la misma manera que la descrita para el Compuesto **28**.

D. Preparación del Compuesto **36**

15 Se mezclaron 0,1 mmol del Compuesto **34** y 0,2 mmol del Compuesto **35** en un tubo de vidrio al que se añadieron 2 ml de ácido acético, 2 ml de anhídrido acético y acetato de sodio 1 mmol. El tubo se selló y se calentó a 110°C. La formación de colorante se indicó porque la mezcla de reacción se volvió verde. Después de 5 horas, la mezcla de reacción se enfrió, se añadieron 5 ml de acetato de etilo y el colorante precipitado se lavó dos veces con acetato de etilo. Los disolventes sobrenadantes se retiraron y el residuo después de secar a vacío con velocidad, se purificó en una columna de HPLC RPC18 semi prep, lo que proporcionó 65% de Compuesto **36** puro. Se identificó mediante MALDI. PM 886,49 calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{ClN}_2\text{O}_{12}\text{S}_4^+$, encontrado 886,01. Abs. máx.: 794 nm (agua), 802 nm (MeOH); Em. máx.: 814 nm (agua), 823 nm (MeOH).

20 E. Preparación del Compuesto **15**

El Compuesto **15** se obtiene a partir del Compuesto **36** mediante la reacción de ácido mercaptopropiónico en DMF y trietilamina a temperatura ambiente durante una noche, seguido de purificación por HPLC.

Ejemplo 3 - Síntesis del Compuesto **38**A. Preparación del Compuesto **37**

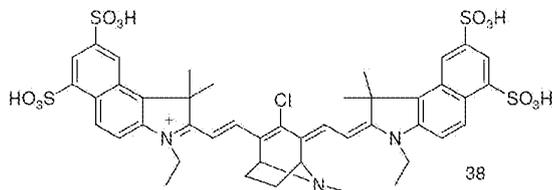
25 Se disolvió 2,3,3-trimetilbencindol-5,7-disulfonato (3,1 g, 7 mmol) en 25 ml de DMF seca, dando como resultado una solución de color naranja claro. Se añadió yoduro de etilo, 3 ml (5,85 g, 37,5 mmol, Aldrich) y la solución se calentó a 130°C en un tubo sellado durante 16 horas. La mezcla de reacción, que se volvió de color púrpura oscuro, se enfrió y se vertió en 150 ml de éter etílico. La mezcla se centrifugó y el disolvente se separó por decantación. El producto sólido se lavó adicionalmente en el tubo con tres porciones de 25 ml de 2-propanol, seguidas de 25 ml de éter y se secó a vacío. Se obtuvieron 2,6 g de un sólido de color púrpura oscuro (85%) y se confirmó por MALDI-TOF-MS. m/e 397,1 [M]⁺ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{S}_2$, encontrado 397,6.

30



B. Preparación del Compuesto 38

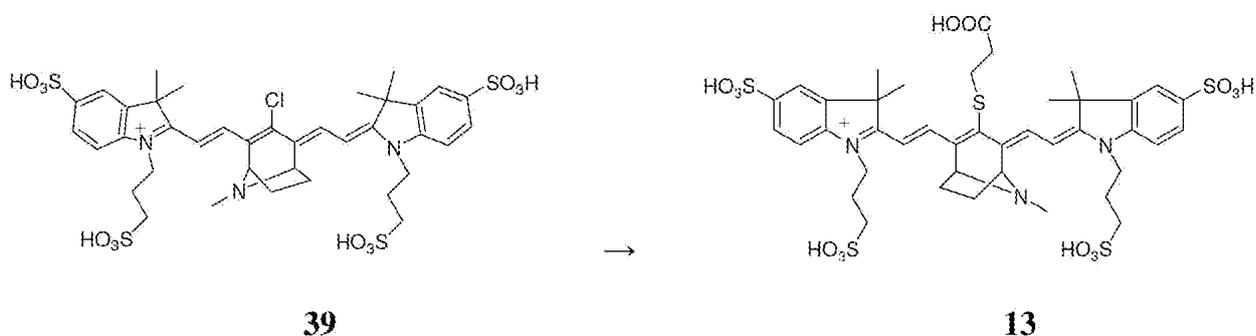
El Compuesto **38** se sintetizó utilizando los compuestos **27** y **37**, siguiendo el mismo procedimiento que el que se ha descrito para la síntesis del Compuesto **11**. El rendimiento fue del 65%. Abs. máx.: 805 nm (agua), 814 nm (MeOH); Em. máx.: 827 nm (agua), 835 nm (MeOH).



5

Ejemplo 4 - Síntesis del Compuesto 13

El Compuesto **13** (estructura que se muestra a continuación) se produjo a partir del Compuesto **39** (estructura mostrada a continuación), tal y como se describe en este Ejemplo.



10 A. Preparación del Compuesto 39

El Compuesto **39** se sintetizó a partir del Compuesto **27** y de la respectiva sal cuaternaria **35** mediante un procedimiento similar al descrito para el Compuesto **11**. MALDI calculada para $C_{38}H_{47}ClN_3O_{12}S_4^+$: 901,51; encontrada: 901,27. Abs. máx.: 768 nm (agua), 780 nm (MeOH); Em. máx.: 788 nm (agua), 802 nm (MeOH).

B. Preparación del Compuesto 13

15 El Compuesto **13** se obtuvo a partir del Compuesto **39** mediante la realización de una reacción con ácido 3-mercaptopropiónico y trietilamina en DMF a temperatura ambiente, usando el procedimiento descrito para los Compuestos **15** y **12**. MALDI calculada para $C_{41}H_{51}KN_3O_{14}S_5^+$: 1009,28; encontrada: 1008,99. Abs. máx.: 777 nm (agua), 788 nm (MeOH); Em. máx.: 797 nm (agua), 810 nm (MeOH).

Ejemplo 5 - Marcado celular

20 Esplenocitos de ratón se preparan como una suspensión de células aisladas y la subpoblación de células T dentro de la preparación de esplenocitos se enriquece mediante pases por una columna que elimina las células B y los macrófagos (kit de R&D, columnas de enriquecimiento de células T de ratón, MTCC500). Los células T se centrifugan a continuación para generar un sedimento celular de 10^7 células. Se elimina el material sobrenadante del sedimento celular y se añade una solución de 10 mg/ml de éster de N-hidroxisuccinimida del Compuesto **12** en 100 μ l. Las células se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos, continuando con 2 rondas de centrifugación y resuspensión en tampón fisiológico para eliminar por lavado el Compuesto **12** no unido. Las células se evalúan mediante microscopía de fluorescencia.

Ejemplo 6 - Marcado celular y formación de imágenes *in vivo*

30 Las células de adenocarcinoma de mama de ratón 4T1 se centrifugan para generar un sedimento celular de 10^7 células. Se elimina el material sobrenadante del sedimento celular y se añade una solución de 10 mg/ml de éster de N-hidroxisuccinimida del Compuesto **12** en 100 μ l. Las células se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos, continuando con 2 rondas de centrifugación y resuspensión en tampón fisiológico para eliminar por lavado el Compuesto **12** no unido. Las células se evalúan mediante microscopía de fluorescencia.

35 Las células se inyectan por vía intravenosa en ratones a 5×10^5 células por ratón y en los ratones vivos se forman imágenes mediante tomografía molecular fluorescente, inmediatamente después de la inyección y 24 horas después de la inyección. Como las células 4T1 forman metástasis principalmente en los pulmones, la fluorescencia del pulmón se puede cuantificar,

Ejemplo 7 - Formación de imágenes FMT con un conjugado de Compuesto **12**-péptido

Una solución del éster de N-hidroxisuccinimida del Compuesto **12** está ligada químicamente a un péptido que contiene Arg-Gly-Asp en condiciones básicas, para producir una molécula fluorescente biocompatible mediante la formación de imágenes ópticas *in vivo*.

- 5 La línea celular de tumor HT-29 (carcinoma de colon humano/HTB-38) se obtiene a partir del ATCC (Manassas, VA). Las células HT-29 se cultivan en medio McCoy complementado con 10% de FRS a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene 5% de CO₂. Las células en crecimiento exponencial se tripsinizan y se suspenden de nuevo en solución salina equilibrada con Hank a una concentración de 3 x 10⁷ células/ml. A ratones NU/NU hembras de 6-8 semanas de edad (Charles River Laboratory, Wilmington, MA) se les inyecta por vía subcutánea 3 x 10⁶ células HT-29 de forma bilateral en los primeros panículos adiposos mamarios. Una semana más tarde, cuando los tumores tienen un tamaño de aproximadamente 30 mm³, a los ratones se les inyecta por vía intravenosa la molécula fluorescente (en 150 µl de 1 x PBS) y se visualiza la imagen después de 24 horas en un sistema de reflectancia con fluorescencia (FRI, Kodak 2000MM) y un sistema de tomografía por fluorescencia (FMT) de VisEn Medical, Inc. (Woburn, MA).

- 15 Ejemplo 8 - Formación de imágenes *in vivo* del crecimiento óseo con el Compuesto **12**

Una solución del éster de N-hidroxisuccinimida del Compuesto **12** está ligada químicamente a una biomolécula que contiene bisfosfonato en condiciones básicas para producir una molécula fluorescente biocompatible para la formación de imágenes ópticas *in vivo*.

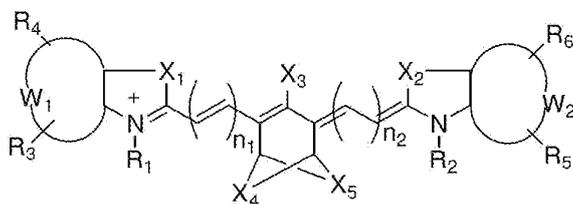
- 20 A ratones F₁ de cinco días de edad BALB/c x CF-1 se les inyecta por vía subcutánea la molécula fluorescente (en 15 µl de 1 x PBS) y se visualiza la imagen 24 horas más tarde, usando un sistema de formación de imágenes por reflectancia con fluorescencia (FRI) (Kodak 2000MM). Se forman imágenes de las áreas de crecimiento óseo.

Ejemplo 9 - Marcado con nanopartículas

- 25 Una solución del éster de N-hidroxisuccinimida del Compuesto **12** está ligada químicamente a grupos amina dispuestos sobre una superficie polimérica de nanopartículas de óxido de hierro para producir una plataforma fluorescente biocompatible, para la formación de imágenes *in vivo* con fluorescencia. Un acoplamiento posterior de polietilenglicol a estas nanopartículas produce un agente de formación de imágenes biocompatible, adecuado para la formación de imágenes con fluorescencia y microscopía intravital.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto con fluorocromo representado por:



o una sal del mismo, en donde:

- 5 X_1 y X_2 cada uno independientemente, se seleccionan a partir del grupo que consiste en $C(CH_2K_1)(CH_2K_2)$, O, S y Se; en donde
- K_1 y K_2 cada uno independientemente, se seleccionan a partir del grupo que consiste en H y alquilo C_1 - C_{20} : en donde K_1 y K_2 juntos pueden formar parte opcionalmente de un anillo cíclico;
- 10 R_1 y R_2 cada uno independientemente, se seleccionan a partir del grupo que consiste en H, alquilo C_1 - C_{20} , alquilarilo y $-R_9T_1$; en donde
- R_9 se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en alquilo C_1 - C_{20} , arilo, alquilarilo y $-(CH_2-O-CH_2)_yCH_2$; en donde y es un número entero seleccionado de 1 a 100, y
- 15 T_1 es un resto enlazador capaz de formar un enlace covalente con una biomolécula y se selecciona a partir del grupo que consiste en $-NH_2$, $-OH$, $-SH$, $-SO_3H$, carboxilo, $-COCl$, $-(CO)O(CO)R_{13}$, $-CONHNH_2$, ésteres de N-hidroxisuccinimido sustituidos y no sustituidos, ésteres de N-hidroxisulfosuccinimido sustituidos y no sustituidos, ésteres de nitro-fenol o fluoro-fenol, $-NCS$, $-CHO$, azida, $-COCH_2I$, ftalamido y maleimida, en donde
- R_{13} se selecciona a partir del grupo que consiste en H, alquilo y arilo;
- X_3 se selecciona a partir del grupo que consiste en H, halógeno, $-T_2R_{10}$, $-T_2R_9T_1$ y $-R_9T_1$, en donde
- T_2 se selecciona a partir del grupo que consiste en S, O y NR' ;
- 20 R_{10} se selecciona a partir del grupo que consiste en H, alquilo C_1 - C_{20} , arilo, arilalquilo;
- X_4 y X_5 cada uno independientemente, se seleccionan a partir del grupo que consiste en $(CK_1K_2)_i$ y NR' , en donde
- i es un número entero seleccionado de 1 a 7, y
- R' se selecciona a partir del grupo que consiste en H y alquilo;
- 25 W_1 y W_2 representan cada uno átomos no metálicos como parte de un resto arilo;
- n_1 y n_2 cada uno independientemente, se seleccionan de 0 a 4;
- R_3 , R_4 , R_5 y R_6 cada uno independientemente, se seleccionan a partir del grupo que consiste en H, halógeno, carboxilato, ácido carboxílico, éster carboxílico, amina, amida, sulfonamida, hidroxilo, O-alquilo, S-alquilo, alquilo, ácido sulfónico, sulfonato, un fosforilo, $SO_2NR_7-Q-CHR_8-[(CH_2)_m-Y-(CH_2)_p-(O)_k]_h(CH_2)_dT_1$ y $-R_9T_1$, en donde
- 30 R_7 se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en alquilo C_1 - C_{20} , arilo; alquilarilo,
- R_8 se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en H, alquilo C_1 - C_{20} , arilo, alquilarilo y arilalquilo;
- 35 R_7 y R_8 , cuando se toman en combinación, forman opcionalmente un anillo de 4, 5, 6 o 7 miembros, opcionalmente sustituido, saturado o insaturado,
- Q se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en un enlace, carbonilo, alquilo C_1 - C_6 y cicloalquilo C_1 - C_6 ,
- Y se selecciona independientemente a partir del grupo que consiste en un enlace, $-SO_2NR^1$ -, $-O$ -, $-COO$ - y $-CONR^1$ -,
- 40 h es un número entero seleccionado de 0 a 70,

k es 0 o 1,

d es un número entero de 0 a 12,

m es un número entero de 0 a 12, y

p es un número entero de 0 a 12.

5 2. El compuesto según la reivindicación 1, en donde la molécula tiene una longitud de onda de absorción y emisión en el intervalo de:

a) desde 500 nm a 1100 nm; o

b) desde 600 nm a 900 nm.

10 3. El compuesto según la reivindicación 1, en donde: X_3 se selecciona a partir del grupo que consiste en: $O-(CH_2)_j-T_1$, $S-(CH_2)_j-T_1$, $O-Ph-(CH_2)_j-T_1$, $S-Ph-(CH_2)_j-T_1$, en donde

j es un número entero de 0 a 6; y

Ph es fenilo.

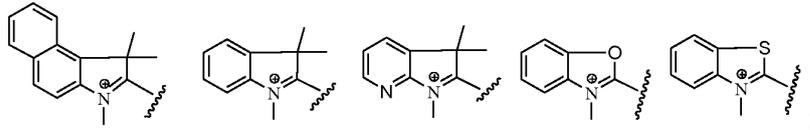
4. El compuesto según la reivindicación 1, en donde:

a) X_4 es $-CH_2-CH_2-$ y X_5 se selecciona a partir del grupo que consiste en $-CH_2$, $-NCH_3$ y $-C(CH_3)_2$; o

15 b) n_1 y n_2 son 1; o

c) W_1 y W_2 son iguales; o

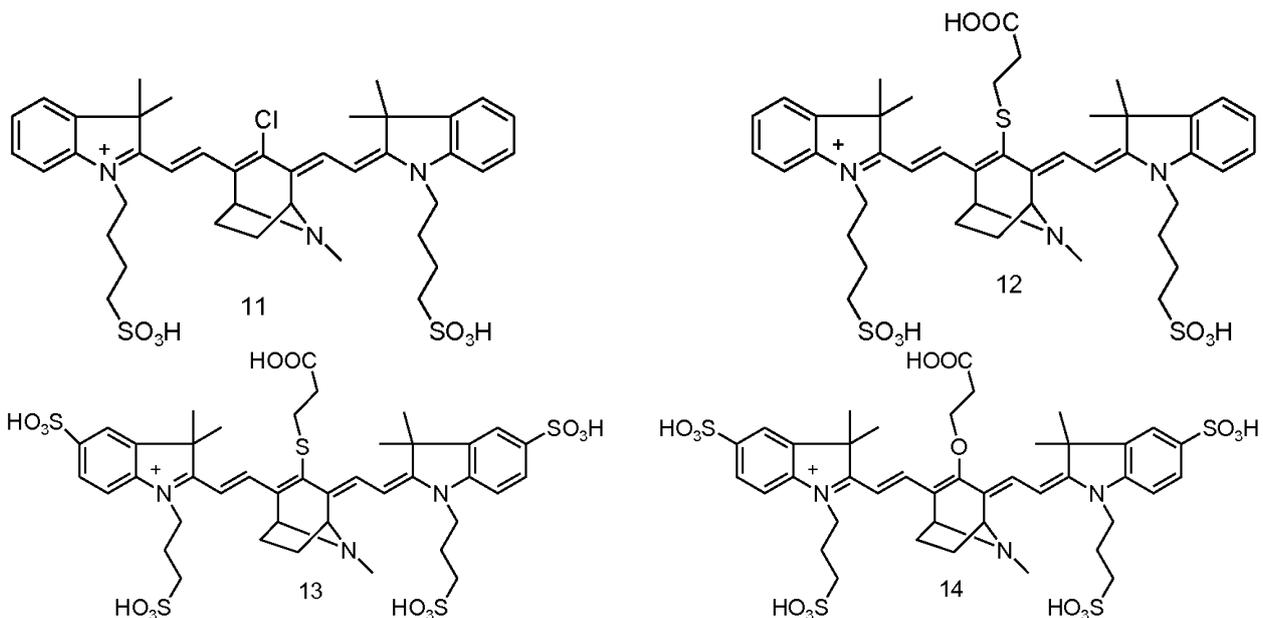
d) W_1 y W_2 son iguales y se seleccionan a partir del grupo que consiste en:

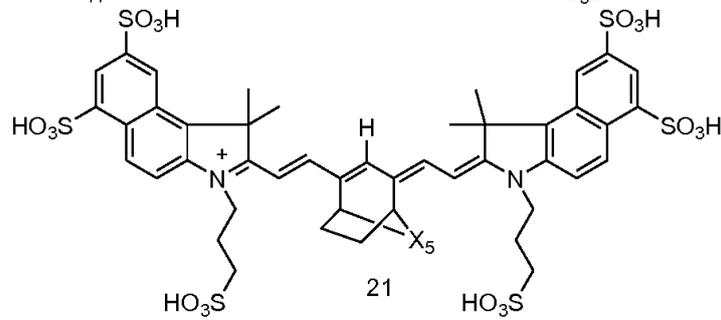
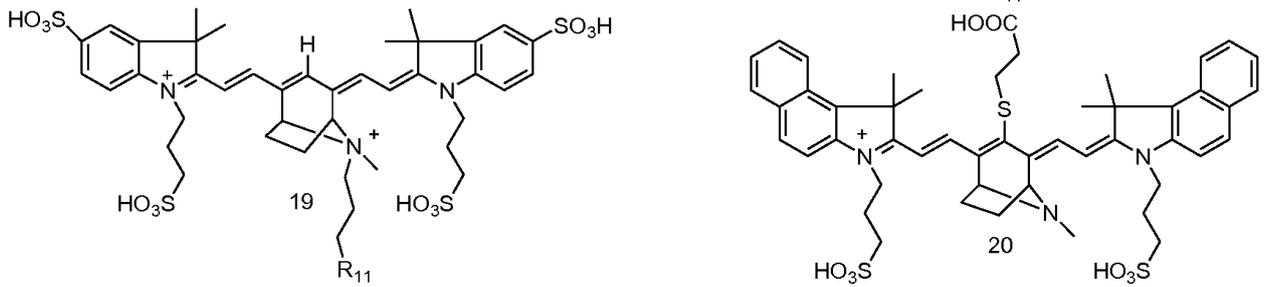
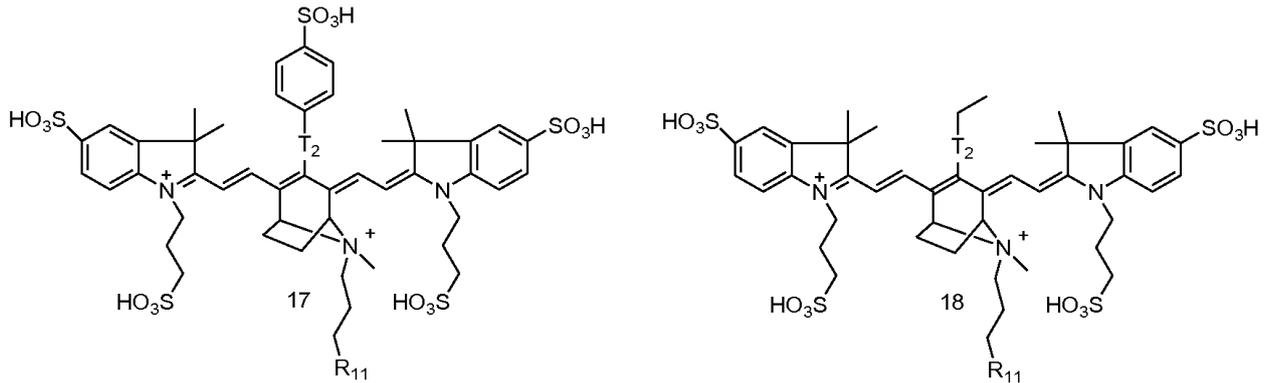
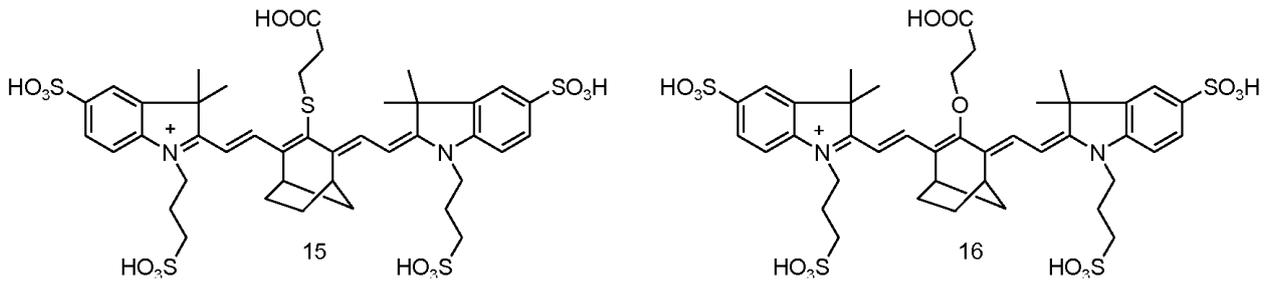


o

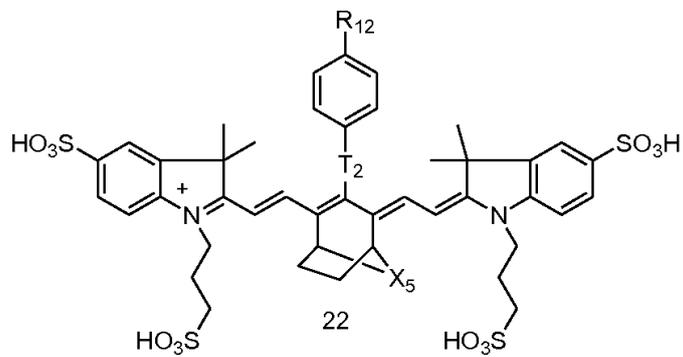
20 e) X_1 y X_2 son $C(CH_3)_2$; o

f) el compuesto tiene una cualquiera de las fórmulas 11-22:





5 y



y una sal de las mismas, en donde:

T₂ es O o S;

X₅ es N-Me o CH₂;

R₁₁ se selecciona a partir del grupo que consiste en: SO₃H, COOH, OH, SH y NH₂;

R₁₂ se selecciona a partir del grupo que consiste en: H, SO₃H, NCS, (CH₂)_kCOOH, en donde k es un número entero de 0 a 6; o

5 g) el compuesto está ligado a una biomolécula a través de uno o varios de los grupos identificados como R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, W₁, W₂, X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅.

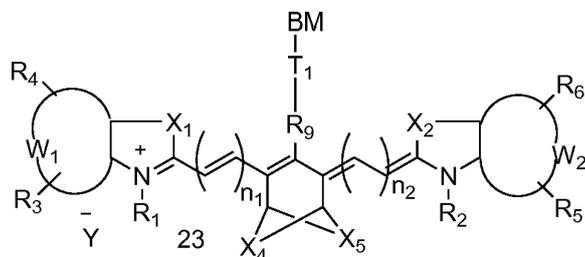
5. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el compuesto es biocompatible.

6. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende un resto enlazador capaz de formar un enlace covalente con una biomolécula.

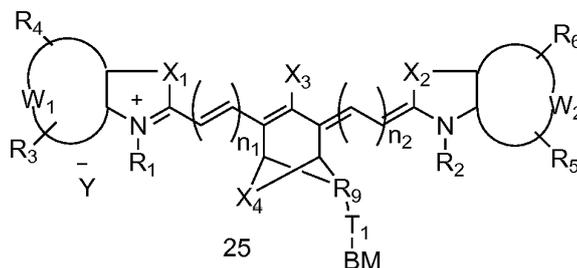
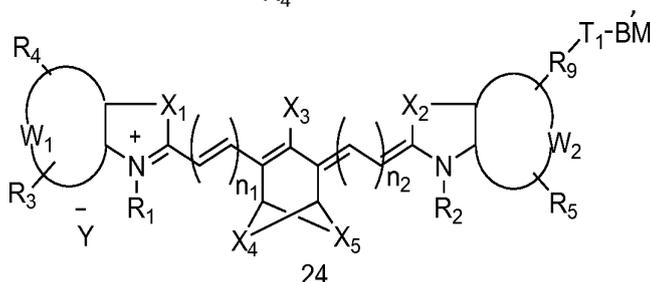
10 7. Una biomolécula fluorescente que comprende una biomolécula ligada químicamente con el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

8. La biomolécula fluorescente según la reivindicación 7, en donde el compuesto está ligado a una biomolécula a través de uno o varios de los grupos identificados como R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, W₁, W₂, X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅.

9. La biomolécula fluorescente según la reivindicación 7, representada por las fórmulas



15



en donde BM es una biomolécula, Y es un contraión y R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₉, W₁, W₂, X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, T₁, n₁ y n₂ son como se han definido en la reivindicación 1.

20 10. La biomolécula fluorescente según la reivindicación 7, en donde la biomolécula es una célula, una proteína o un ácido nucleico.

11. Un compuesto según las reivindicaciones 1 a 6 o una biomolécula fluorescente según las reivindicaciones 7 a 10, para uso en la formación de imágenes ópticas *in vivo*, en donde la formación de imágenes comprende:

(a) administrar a un sujeto un compuesto con fluorocromo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;

25 (b) permitir que el compuesto con fluorocromo se distribuya dentro del sujeto o se ponga en contacto o interaccione con una diana biológica;

(c) exponer el sujeto a luz de una longitud de onda absorbible por el compuesto; y

(d) detectar una señal óptica emitida por el compuesto con fluorocromo.

12. El compuesto o la biomolécula fluorescente para uso según la reivindicación 11, en donde:

a) una señal emitida por el compuesto se utiliza para construir una imagen; o

5 b) una imagen creada a partir del compuesto es una imagen tomográfica; o

c) una imagen creada a partir del compuesto es una imagen tomográfica y la imagen tomográfica se registra conjuntamente con una imagen obtenida mediante resonancia magnética o tomografía computarizada con rayos X; o

10 d) la presencia, la ausencia o el nivel de señal emitida por el compuesto es indicativo de un estado de enfermedad opcionalmente seleccionado a partir del grupo que consiste en enfermedad de los huesos, cáncer, enfermedad cardiovascular, enfermedad dermatológica, enfermedad ambiental, enfermedad inmunológica, enfermedad infecciosa, inflamación, enfermedad hereditaria, enfermedad metabólica, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad oftálmica y enfermedad respiratoria; o

15 e) la presencia, la ausencia o el nivel de señal emitida por el compuesto es indicativo de un estado de enfermedad y la enfermedad es una enfermedad inflamatoria; o

f) la presencia, la ausencia o el nivel de señal emitida por el compuesto es indicativo de un estado de enfermedad y la enfermedad es cáncer; o

g) la presencia, la ausencia o el nivel de señal emitida por el compuesto es indicativo de un estado de enfermedad y la enfermedad es una enfermedad cardiovascular.

20 13. Un compuesto según las reivindicaciones 1 a 6 o una biomolécula fluorescente según las reivindicaciones 7 a 10, para uso en la formación de imágenes ópticas de diagnóstico *in vivo* de una muestra.

14. Formación de imágenes ópticas *in vitro* de una muestra empleando un compuesto según las reivindicaciones 1 a 5 o una biomolécula fluorescente según las reivindicaciones 7 a 10.

25 15. El compuesto o la biomolécula fluorescente según la reivindicación 13 o la formación de imágenes ópticas según la reivindicación 14, en donde la muestra es una muestra biológica.