

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 697**

51 Int. Cl.:

A61B 5/00	(2006.01)
A61B 6/00	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)
C07D 209/02	(2006.01)
C07D 209/42	(2006.01)
C07D 255/02	(2006.01)
C09B 23/01	(2006.01)
C12Q 1/02	(2006.01)
G01N 33/58	(2006.01)
C09B 23/08	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2010 PCT/US2010/023305**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.08.2010 WO10091243**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2010 E 10739160 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2393420**

54 Título: **Agentes de obtención de imágenes de carga equilibrada**

30 Prioridad:

06.02.2009 US 150522 P

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

04.10.2018

73 Titular/es:

BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC. (50.0%)
330 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US y
GEORGIA STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

FRANGIONI, JOHN, V. y
HENARY, MAGED M.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 684 697 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Agentes de obtención de imágenes de carga equilibrada

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos de obtención óptica de imágenes de tejidos o células que tienen propiedades *in vivo* deseables que dan como resultado una relación de señal a fondo mejorada.

Antecedentes de la invención

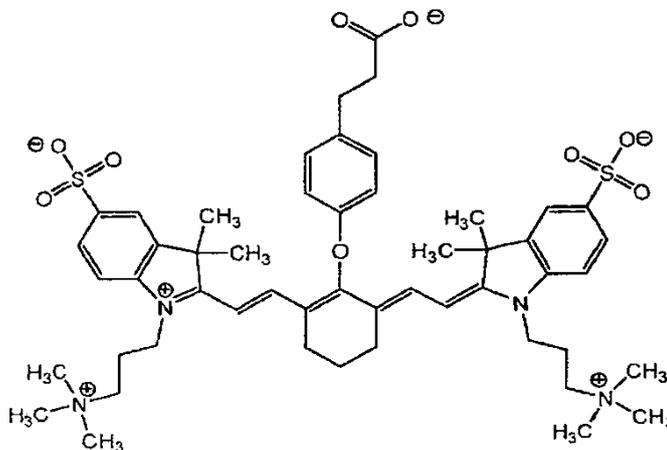
10 La fluorescencia en el infrarrojo cercano (NIR) tiene una importancia potencial en el campo médico, particularmente en el diagnóstico y la cirugía guiada por imágenes. Sin embargo, la disponibilidad de fluoróforos adecuados ha sido un obstáculo importante. Para que sea clínicamente viable, el fluoróforo de NIR ideal debe tener tanto buenas propiedades ópticas como propiedades *in vivo* superiores con respecto a la solubilidad, la biodistribución y la depuración. La mayoría de los fluoróforos actuales contemplados para el uso como agentes de obtención de imágenes fallan en relación con sus propiedades *in vivo*. Por ejemplo, los fluoróforos conocidos tienden a depurarse a través del hígado, lo que da como resultado una fluorescencia no deseada a través del tracto gastrointestinal. Y, en algunos casos, los fluoróforos conocidos padecen una captación de fondo no específica significativa en tejidos normales, dando como resultado una baja relación de señal a fondo. Según esto, existe una necesidad actual de agentes de obtención de imágenes fluorescentes NIR nuevos y mejorados, particularmente los que puedan equilibrarse rápidamente entre los espacios intravascular y extravascular y se depuren eficazmente mediante filtración renal. Los agentes de obtención de imágenes de la invención se dirigen a estas y otras necesidades.

20 Los documentos WO 2007/005222, WO 2007/136996, WO 2009/014513, WO 2008/017074 y WO 02/24815 se refieren a colorantes de cianuro adecuados para técnicas de obtención de imágenes NIR que tienen una carga neta de +1, 0 o -1 conjugados a un ligando de elección de diana.

Sumario de la invención

25 La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que si se equilibra, o casi se equilibra, la carga global sobre una molécula del agente de obtención de imágenes, entonces la molécula de carga equilibrada resultante tiene propiedades *in vivo* mejoradas que conducen a características clínicas de obtención de imágenes mejoradas.

30 En un aspecto, la presente invención proporciona métodos de obtención de imágenes de tejido o células, incluyendo los métodos (a) poner en contacto el tejido o las células con un agente de obtención de imágenes que comprende un colorante o un conjugado del mismo, comprendiendo el conjugado un ligando de elección de diana enlazado al colorante, en donde el colorante o el conjugado tiene una carga neta de +1, 0 o -1 y comprende uno o más grupos iónicos; (b) irradiar el tejido o las células a una longitud de onda absorbida por el colorante o conjugado; (c) detectar una señal óptica a partir del tejido o las células irradiados, en donde la relación de señal a fondo de la señal óptica detectada es al menos aproximadamente 1,1, de ese modo obteniendo imágenes del tejido o las células, en donde el colorante tiene la Fórmula X:



X.

La presente invención proporciona además un colorante que tiene la Fórmula X y proporciona un conjugado que comprende el conjugado de colorante a un ligando de elección de diana, en donde la carga neta total de dicho conjugado es -1, 0 o +1.

5 Además, la presente invención incluye agentes de obtención de imágenes para obtener imágenes de tejido o células, en donde los agentes de obtención de imágenes incluyen un conjugado que se caracteriza por tener una fluorescencia detectable con una relación de señal a fondo de al menos aproximadamente 1,1, y en donde el conjugado comprende el colorante de Fórmula X.

10 Los agentes de obtención de imágenes de carga equilibrada de la invención son particularmente ventajosos debido a que se cree que su comportamiento *in vivo* contribuye a propiedades de obtención de imágenes óptico superiores. Más específicamente, se cree que el equilibrio de carga imparte buenas propiedades de biodistribución y depuración a los agentes, y reduce la unión no específica no deseable. Estas propiedades *in vivo* ayudan a mejorar la relación de señal a fondo de los tejidos de los que se han obtenido imágenes, conduciendo a una obtención de imágenes de resolución superior.

15 A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la puesta en práctica o las pruebas de la presente invención, posteriormente se describen métodos y materiales adecuados.

20 En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

25 Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 una representación de moléculas de colorante que tienen un intervalo de cargas netas.

La FIG. 2 es un esquema de la síntesis de la molécula de colorante ZW+1 (MM-19).

30 La FIG. 3 es un esquema de la síntesis de la molécula de colorante ZW+5.

La FIG. 4 es una representación de cinco moléculas de colorante, cuyas propiedades se compararon *in vitro* e *in vivo*.

La FIG. 5 es una representación de resultados experimentales que se refieren a la biodistribución y la depuración *in vivo* de las moléculas de colorante de la FIG. 4 en un modelo en ratas.

35 La FIG. 6 es una representación de resultados experimentales que se refieren a la biodistribución y la depuración *in vivo* de las moléculas de colorante de la FIG. 4 en un modelo en cerdos.

La FIG. 7 es una representación de dos colorantes diferentes conjugados al ligando de elección de diana cRGD.

La FIG. 8 es una representación de resultados experimentales *in vivo* en modelos de tumor de rata para los dos conjugados de la FIG. 7.

40 La FIG. 9 es una representación de la preparación de un ligando de elección de diana basado en adamantano ejemplar que contiene un grupo iónico para el equilibrio de carga y restos que se unen selectivamente a PSMA.

Descripción detallada

45 La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, a agentes de obtención de imágenes que están compuestos por una molécula de colorante opcionalmente conjugada a un ligando de elección de diana a través de un grupo de conexión. Los agentes de obtención de imágenes descritos en la presente son útiles, por ejemplo, en la detección de tejidos biológicos y células anormales o enfermas. Los conjugados son particularmente útiles para obtener imágenes de organismos enteros, debido a que tienen un comportamiento *in vivo* mejorado, tal como una baja unión no específica a tejidos no elegidos como diana, dando como resultado una relación de señal a fondo mejorada en relación con la señal óptica detectada. Se cree que estas propiedades *in vivo* mejoradas resultan del equilibrio de

cargas formales en el conjugado, que dan una molécula de "carga equilibrada" que tiene una carga neta que es neutra o casi neutra.

Métodos de obtención de imágenes

- 5 Los nuevos métodos para obtener imágenes de un tejido o células incluyen las siguientes etapas básicas:
- (a) poner en contacto el tejido o las células con un agente de obtención de imágenes que comprende un colorante o conjugado del mismo, comprendiendo el conjugado un ligando de elección de diana enlazado al colorante, en donde el colorante o conjugado tiene una carga neta de +1, 0 o -1 y comprende uno o más grupos iónicos;
- 10 (b) irradiar el tejido o las células a una longitud de onda absorbida por el colorante o conjugado;
- (c) detectar una señal óptica procedente del tejido o las células irradiados,
- en donde la relación de señal a fondo de la señal óptica deseada es al menos aproximadamente 1,1, de ese modo obteniendo imágenes del tejido o las células. El colorante tiene la Fórmula X que se muestra posteriormente.
- 15 Los agentes de obtención de imágenes descritos en la presente son sustancias o moléculas que se pueden usar para obtener imágenes de tejidos o células, tales como los de un organismo vivo, con propósitos de diagnóstico, terapia, cirugía guiada por imágenes y similares. En algunas realizaciones, el organismo es un mamífero, tal como un ser humano.
- 20 Los agentes de obtención de imágenes contienen generalmente un colorante que es capaz de absorción de radiación electromagnética, típicamente en el intervalo ultravioleta (UV), visible o del infrarrojo cercano (NIR). El agente de obtención de imágenes también puede ser capaz de emisión fluorescente, tal como en el intervalo visible o NIR. La señal óptica detectada a partir del colorante o conjugado puede ser, por ejemplo, absorción, o emisión fluorescente. En algunas realizaciones, la emisión fluorescente procedentes del colorante es la principal señal óptica detectada con propósitos de obtención de imágenes. En algunas realizaciones, el colorante tiene una absorbancia máxima a de aproximadamente 525 nm a aproximadamente 850 nm, a de aproximadamente 550 nm a aproximadamente 825 nm, de aproximadamente 600 nm a aproximadamente 825 nm, de aproximadamente 700 nm a aproximadamente 825 nm, o a de aproximadamente 750 nm a aproximadamente 825 nm. En algunas realizaciones, el colorante tiene una emisión fluorescente máxima a de aproximadamente 700 nm a 875 nm, de aproximadamente 725 a aproximadamente 850 nm, de aproximadamente 750 a aproximadamente 850 nm o de aproximadamente 775 a aproximadamente 850 nm.
- 30 Colorantes adecuados para la obtención de imágenes mediante emisión fluorescente incluyen la clase de colorantes de cianina que son moléculas catiónicas en las que dos grupos cíclicos están conectados a través de un puente de metino o polimetino. Véanse las siguientes referencias para ejemplos de diversos derivados de colorantes de cianina: Mojzych, M. y cols. "Synthesis of Cyanine Dyes" Top. Heterocycl. Chem. (2008) 14:1-9; Sysmex Journal International (1999), Vol. 9, Nº 2, pg 185 (apéndice); Strekowski, L. y cols. Synthetic Communications (1992), 22(17), 2593-2598; Strekowski, L. y cols. J. Org. Chem. (1992) 57, 4578-4580; Narayanan, N. y cols. J. Org. Chem. (1995), 60(8), 2391-2395; Makin, S.M. y cols. Journal of Organic Chemistry of the USSR (1977) 13(6), parte 1, 1093-1096;
- 40 Lee, H. y cols. J. Org. Chem. (2006) 71, 7862-7865, documentos WO 2009/006443, WO 2008/015415, WO 2007/136996, WO 2007/005222, WO 2003/082988, WO 2001/090253, U.S. Nº Ser. 12/376.243 (presentado el 3 de febrero de 2009) y U.S. Nº Ser. 12/376.225 (presentado el 3 de febrero de 2009).
- 45 Se describen en la presente colorantes ejemplares y sus conjugados adecuados para el uso en los presentes métodos de obtención de imágenes.
- Los agentes de obtención de imágenes pueden incluir conjugados, lo que se refiere a un colorante que está conjugado a un ligando de elección de diana. El "ligando de elección de diana" es un resto que se une con alguna especificidad o selectividad a un tejido o diana biológica particular. El tejido o la diana biológica puede incluir tejidos normales así como tejidos anormales o enfermos. Los ligandos de elección de diana se pueden seleccionar de proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, anticuerpos, carbohidratos o antígenos específicos descritos, p. ej., en Frangioni y cols. en "Modified PSMA Ligands and Uses Related Thereto", documento WO 02/098885, presentado el 7 de febrero de 2002 (ahora publicado como Patente de EE. UU. Nº 6.875.886).
- 50 Un ligando de elección de diana ejemplar es el péptido cRGD, que se une selectivamente a la diana biológica integrina $\alpha_v\beta_3$. Se sabe que esta integrina es sobreexpresada por diversos tumores y, así, estos péptidos que eligen como diana RGD permiten que los colorantes marquen preferentemente tumores que sobreexpresan estas integrinas. Otros ligandos de elección de diana incluyen hormona estimulante de melanocitos (MSH), que se une a células de melanoma; o bombesina, somatostatina o Sandostatín™ (sintética), que eligen como diana receptores de somatostatina. Otros ligandos de elección de diana incluyen "KUE" y otras moléculas pequeñas, que se unen
- 60

selectivamente a la diana biológica antígeno membranario específico de la próstata (PSMA) (Véase Humblet, V. y cols. Mol. Imaging, 2005, 4: 448-62; Misra P. y cols. J. Nucl. Med. 2007, 48: 1379-89; Chen, Y., y cols. J. Med. Chem, 2008, 51: 7933-43; Chandran, S.S., y cols. Cancer Biol. Ther., 2008, 7:974-82; Banerjee, S.R., J. Med. Chem. 2008, 51: 4504-17; Mease, R.C., y cols. Clin. Cancer Res., 2008, 14:3036-43; Foss, C.A. y cols. Clin. Cancer. Res., 2005, 11:4022-8. Ejemplos de ligandos de elección de diana adecuados se describen en otras partes en la presente.

Los agentes de obtención de imágenes son generalmente "de carga equilibrada", a menos que se especifique otra cosa, lo que se refiere a tener una carga global neta de cero, o cercana a cero, tal como +1 o -1. El equilibrio de carga se produce cuando sustituyentes cargados negativamente en el agente de obtención de imágenes son contrarrestados por la presencia de un número igual, o un número casi igual, de sustituyentes cargados positivamente en la misma molécula, y viceversa. En alguna realización, la carga neta es 0 o +1. En algunas realizaciones, la carga neta es 0. En algunas realizaciones, la carga neta es +1. En realizaciones adicionales, la carga neta es -1. El valor "n" en las fórmulas proporcionadas en la presente representa carga neta.

Los agentes de obtención de imágenes descritos en la presente tienen generalmente una "relación de señal a fondo" (SBR) mejorada en comparación con los agentes de obtención de imágenes fluorescentes conocidos actualmente. Se cree que la mejora en la SBR es un resultado de las propiedades *in vivo* mejoradas debidas al "equilibrio de carga". La SBR es una medida de la intensidad de la señal fluorescente obtenida a partir de una diana (señal máxima) sobre la medida de la intensidad de la señal fluorescente obtenida cerca de la diana (señal de fondo), siendo la diana los tejidos o las células elegidos como diana por el agente de obtención de imágenes. Las medidas de SBR se pueden obtener fácilmente a través de procedimientos de medida habituales. Para sistemas de obtención de imágenes fluorescentes, y otros sistemas de tipo óptico, imágenes digitales que registran señales ópticas de la diana facilitan la medida de SBR. Son más deseables valores de SBR superiores, que dan como resultado una resolución mayor de los tejidos de los que se han obtenido imágenes. En algunas realizaciones, los agentes de obtención de imágenes alcanzan una SBR de al menos aproximadamente 1,1 (es decir, la señal máxima es al menos 10% sobre el fondo). En realizaciones adicionales, los agentes de obtención de imágenes alcanzan una SBR de al menos aproximadamente 1,2, al menos aproximadamente 1,3, al menos aproximadamente 1,4, al menos aproximadamente 1,5, al menos aproximadamente 1,6, al menos aproximadamente 1,7, al menos aproximadamente 1,8, al menos aproximadamente 1,9 o al menos aproximadamente 2,0. En otras realizaciones adicionales, los agentes de obtención de imágenes alcanzan una SBR de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 30, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 20, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 5,0 o de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 10.

Los agentes de obtención de imágenes incluyen generalmente uno o más grupos iónicos. En algunas realizaciones, los agentes de obtención de imágenes incluyen dos o más, tres o más, cuatro o más o cinco o más grupos iónicos. Los grupos iónicos sirven para incrementar la solubilidad de las porciones de colorante generalmente hidrófobas del agente de obtención de imágenes, mejorando así la biodistribución. Los grupos iónicos pueden estar situados en cualquier porción del agente de obtención de imágenes, tal como la porción de colorante, el ligando de elección de diana o ambos.

El término "grupo iónico" se refiere a un resto que comprende uno o más sustituyentes cargados. El "sustituyente cargado" es un grupo funcional que generalmente es aniónico o catiónico en condiciones acuosas sustancialmente neutras (p. ej. un pH de aproximadamente 6,5 a 8,0, o preferiblemente pH aproximadamente fisiológico (7,4)). Ejemplos de sustituyentes aniónicos cargados incluyen aniones de ácidos inorgánicos y orgánicos tales como sulfonato ($-\text{SO}_3^-$), sulfinato, carboxilato, fosfinato, fosfonato, fosfato y ésteres (tales como ésteres alquílicos) de los mismos. En la presente invención el sustituyente cargado es sulfonato. Ejemplos de sustituyentes catiónicos cargados incluyen aminas cuaternarias ($-\text{NR}_3^+$), donde R se selecciona independientemente de alquilo C_{1-6} , arilo y arilalquilo. Otros sustituyentes catiónicos cargados incluyen aminas primarias, secundarias y terciarias protonadas, y bien como guanidinio. En la presente invención, el sustituyente cargado es $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$. Ejemplos adicionales de grupos iónicos se describen posteriormente.

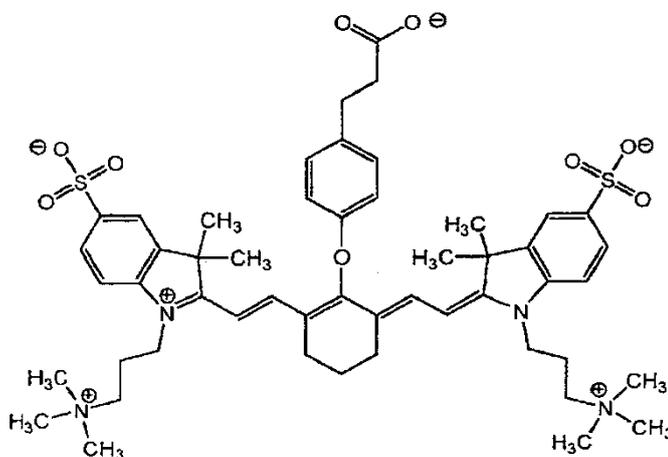
Los agentes de obtención de imágenes descritos en la presente tienen generalmente buena solubilidad en medios acuosos sustancialmente neutros y, en particular, sangre y suero sanguíneo. En algunas realizaciones, el agente de obtención de imágenes tiene una solubilidad en solución de HEPES 10 mM, pH 7,4, de al menos aproximadamente 10 μM . En realizaciones adicionales, el agente de obtención de imágenes tiene una solubilidad en solución de HEPES 10 mM, pH 7,4, de al menos aproximadamente 15 μM , al menos aproximadamente 20 μM , al menos aproximadamente 25 μM , al menos aproximadamente 30 μM , al menos aproximadamente 40 μM o al menos aproximadamente 50 μM .

Los agentes de obtención de imágenes pueden ser moléculas neutras o sales. Por ejemplo, si el colorante o el conjugado de colorante está cargado, el agente de obtención de imágenes puede ser o contener una sal un ácido (o una combinación de los mismos) del colorante o conjugado de colorante. Para colorantes o conjugados cargados positivamente, contraiones adecuados incluyen aniones tales como fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, acetato, perclorato, PF_6^- y similares. Para colorantes o conjugados cargados negativamente, contraiones adecuados incluyen cationes tales como Na^+ , K^+ y aminas cuaternarias.

Los agentes de obtención de imágenes de la invención se pueden administrar mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo métodos tanto enterales como parenterales. En algunas realizaciones, los agentes de obtención de imágenes pueden formularse en formulaciones farmacéuticamente aceptables y administrarse intravenosamente a un organismo para la obtención de imágenes. Se pueden obtener imágenes del organismo dosificado usando, por ejemplo, un sistema quirúrgico guiado por imágenes FLARE™, que es un sistema de obtención de imágenes intraoperatorio de onda continua (CW) que es capaz de la adquisición y la presentación simultáneas en tiempo real de video a color (es decir, anatomía quirúrgica) y dos canales de luz fluorescente NIR invisible (700 nm y 800 nm). El sistema de obtención de imágenes puede irradiar al organismo dosificado con radiación absorbida por el agente de obtención de imágenes y detectar señales ópticas, tales como fluorescencia NIR, que emanan de las porciones elegidas como diana del organismo que contiene el agente de obtención de imágenes. Las señales detectadas se pueden registrar y analizar al obtener imágenes o video digitales del organismo en cuestión, facilitando de ese modo procedimientos de diagnóstico y técnicas médicas guiadas por imágenes.

Colorantes y conjugados

El colorante de la presente invención tiene la Fórmula X:



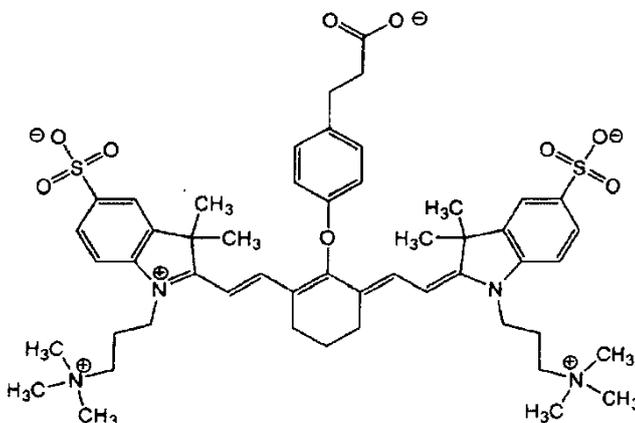
X.

Conjugados

Conjugados adecuados descritos en la presente comprenden el colorante de Fórmula X conjugado a un ligando de elección de diana (TL), en donde la carga neta total de dicho conjugado es -1, 0 o +1.

TL es un ligando de elección de diana que comprende al menos un resto de unión que se une a una diana biológica;

El compuesto colorante tiene la Fórmula X:



X.

Definiciones y realizaciones adicionales

Según se usa en la presente, "ligando de elección de diana" (TL) se refiere a cualquier entidad molecular que contenga un resto de unión que se una con alguna especificidad o selectividad a una diana biológica, y es el principal medio para que los conjugados de la invención se unan a tejidos específicos en un organismo o una muestra. Los ligandos de elección de diana pueden incluir además grupos funcionales cargados que equilibrarían la carga en una molécula de colorante conjugada. Generalmente, se desea que la carga sobre el ligando de elección de diana neutralice sustancialmente cualquier carga sobre el compuesto colorante de modo que la carga neta total del conjugado sea -1, 0 o +1. En algunas realizaciones, la carga neta total es 0.

El ligando de elección de diana se puede enlazar covalentemente al grupo de conexión reactivo de un compuesto de colorante de la invención a través de procedimientos de acoplamiento estándar. Por ejemplo, el grupo carboxilo o carboxilo activado del grupo de conexión reactivo puede reaccionar con una funcionalidad nucleófila sobre el ligando de elección de diana, tal como un derivado de amina o alcoxi, para formar una conexión amida o éster. Detalles adicionales para la conjugación de colorantes se pueden encontrar en el documento WO 2008/017074 y en Frangioni y cols. Molecular Imaging, Vol. 1(4), 354-364 (2002), cada uno de los cuales se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad.

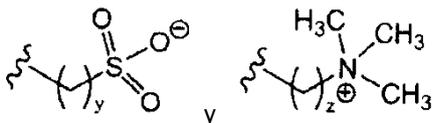
El ligando de elección de diana puede incluir además un resto de andamiaje molecular al que se pueden enlazar el resto de unión y otros grupos. Por ejemplo, el andamiaje molecular puede tener uno o más de los siguientes: (1) un resto diseñado para reaccionar con el grupo de conexión reactivo del colorante para formar una unión covalente, (2) un resto equilibrador de la carga, tal como cualquiera de los grupos iónicos descritos en la presente, y (3) un resto que se une a la diana biológica. Un ejemplo de un andamiaje molecular es un derivado de adamantano, tal como el descrito en la Pub. Sol. Pat. EE. UU. N° 2006/0063834, que se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad, e ilustra la preparación de un ligando de elección de diana que incorpora un andamiaje de adamantano. Específicamente, el núcleo de adamantano mantiene (1) un grupo amino capaz de reaccionar con los compuestos colorantes, (2) un resto equilibrador de carga que neutralizará una carga negativa sobre la molécula de colorante, y (3) dos restos que se unen a la diana biológica PSMA. Para una descripción restos que se unen a PSMA, véanse Humblet, V. y cols. Mol. Imaging, 2005, 4: 448-62; Misra P. y cols. J. Nucl. Med. 2007, 48: 1379-89; Chen, Y., y cols. J. Med. Chem, 2008, 51: 7933-43; Chandran, S.S., y cols. Cancer Biol. Ther., 2008, 7:974-82; Banerjee, S.R., J. Med. Chem. 2008, 51: 4504-17; Mease, R.C., y cols. Clin. Cancer Res., 2008, 14:3036-43; Foss, C.A. y cols. Clin. Cancer. Res., 2005, 11 :4022-8, cada una de la cuales se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad.

Según se usa en la presente, el término "poner en contacto" se refiere a la reunión de sustancias en contacto físico de modo que las sustancias puedan interactuar entre sí. Por ejemplo, cuando un agente de obtención de imágenes se "pone en contacto" con tejido o células, el tejido o las células pueden interactuar con el agente de obtención de imágenes, por ejemplo, permitiendo la posibilidad de interacciones de unión entre el agente y componentes moleculares del tejido o las células. Se entiende que "poner en contacto" incluye la administración de una sustancia tal como un agente de obtención de imágenes de la invención a un organismo. La administración puede ser, por ejemplo, oral o parenteral.

Según se usa en la presente, el término "grupo iónico" se refiere a un resto que comprende uno o más sustituyentes cargados. El "sustituyente cargado" es un grupo funcional que generalmente es aniónico o catiónico cuando está en condiciones acuosas sustancialmente neutras (p. ej. un pH de aproximadamente 6,5 a 8,0 o aproximadamente fisiológico pH (7.4)).

Según se cita anteriormente, el sustituyente aniónico cargado es sulfonato. El sustituyente aniónico cargado es $-N(CH_3)_3^+$.

Grupos iónicos ejemplares son grupos de Fórmula:



donde y es 0 y z es 3.

Según se usa en la presente, la expresión "grupos solubilizadores oligómeros o polímeros no iónicos" se refiere a polímeros solubles tales como, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno), un carbohidrato, un dextrano, poli(acrilamida) y similares. El grupo solubilizador puede estar enlazado por cualquier modo apropiado. El punto de enlace puede ser, p. ej., una unión carbono-carbono, una unión carbono-oxígeno o una unión nitrógeno-carbono. El grupo de enlace puede ser, p. ej., un grupo éster, un grupo

carbonato, un grupo éter, un grupo sulfuro, un grupo amino, un grupo alquileo, un grupo amida, un grupo carbonilo o un grupo fosfato.

5 Algunos ejemplos de grupos solubilizadores incluyen polietilenglicoles tales como $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a\text{-H}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a\text{H}$, $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a\text{CH}_3$, $-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a\text{CH}_3$ y $-\text{S}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_a\text{CH}_3$, siendo "a" un número entero entre aproximadamente 2 y aproximadamente 250. En algunas realizaciones, "a" es de 4 a 12 o de 5 a 10. En realizaciones adicionales, "a" es 6, 7 u 8. Otros ejemplos de grupos solubilizadores incluyen dextranos tales como $-\text{OC}(=\text{O})\text{O}(\text{dextrano})$.

10 El resto solubilizador puede tener un peso molecular absoluto de aproximadamente 500 amu a aproximadamente 100.000 amu, p. ej., de aproximadamente 1,000 amu a aproximadamente 50.000 amu o de aproximadamente 1.500 a aproximadamente 25.000 amu.

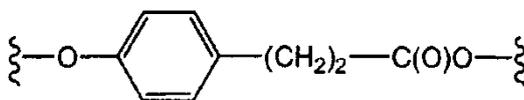
15 En algunas realizaciones, R^9 y R^{10} son grupos solubilizadores oligómeros o polímeros no iónicos.

Ejemplos adicionales de grupos solubilizadores incluyen: $-(\text{CH}_2)_c-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_d-\text{OR}^a$, en donde "c" es de 0 a 6, "d" es de 1 a 200 y R^a es H o alquilo C_{1-6} . En algunas realizaciones, "c" es de 1 a 4, "d" es de 1 a 10 y R^a es H. En algunas realizaciones, "d" es 6 o 7.

20 Véanse el documento WO 2008/017074, U.S. N° Ser. 12/376.243 (presentada el 3 de febrero de 2009) y U. S. N° Ser. 12/376.225 (presentada el 3 de febrero de 2009), para una descripción adicional de grupos solubilizadores oligómeros o polímeros no iónicos adecuados y un método para incorporarlos en colorantes.

25 Según se usa en la presente, "grupo de conexión reactivo" (L') se refiere a cualquier entidad molecular que tenga un peso molecular de aproximadamente 50 a aproximadamente 500 Da que sea capaz de conjugarse con un ligando de elección de diana (TL). En particular, el grupo de conexión reactivo incluye al menos un grupo reactivo seleccionado de un grupo ácido carboxílico o un anhídrido o éster del mismo, así como un grupo isotiocianato. El grupo de conexión reactivo contiene un grupo ácido carboxílico.

30 L tiene la Fórmula:



35 Véase Lee, H. y cols. J. Org. Chem. (2006) 71(20), 7862-7865.

Se aprecia además que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una sola realización. A la inversa, diversas características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, también se pueden proporcionar separadamente o en cualquier subcombinación adecuada.

40 Los compuestos de la invención también pueden incluir todos los isótopos de átomos que se presentan en los productos intermedios o los productos finales. Los isótopos incluyen los átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. Por ejemplo, isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio.

45 Se entiende que las sustancias químicas representadas en la presente por el nombre, la fórmula química o la estructura incluyen todos los estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros, estructuras de resonancia e isótopos de los mismos, a menos que se especifique otra cosa.

50 Las sustancias químicas descritas en la presente pueden estar cargadas o incluir sustituyentes con cargas formales. Cuando estas sustancias químicas están representadas como cargadas, se entiende que, a menos que se especifique otra cosa, las cargas generalmente se contrarrestan con un contraión apropiado. Por ejemplo, se entiende que las sustancias químicas o los grupos funcionales que tienen una carga de -1 son contrarrestados con un ion tienen una carga +1. Contraiones adecuados con carga +1 incluyen Na^+ , K^+ iones tetraalquilamonio y similares. A la inversa, se entiende que las sustancias químicas o los grupos funcionales que tienen una carga de +1 son contrarrestados con un ion que tiene una carga -1. Contraiones adecuados con carga -1 incluyen F^- , Cl^- , Br^- , I^- , perclorato, acetato, trifluoroacetato y similares.

Métodos para preparar colorantes y conjugados

60 Se describen en la presente métodos para preparar colorantes y conjugados adecuados para los métodos de obtención de imágenes. En algunas realizaciones, los métodos incluyen:

(a) seleccionar un colorante que tenga una absorción máxima a de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 850 nm y una emisión fluorescente máxima a de aproximadamente 550 nm a aproximadamente 875 nm; (b) opcionalmente modificar el colorante para incluir un grupo de conexión; y (c) modificar el colorante, y opcionalmente el grupo de conexión, para incluir uno o más grupos iónicos para alcanzar una solubilidad del colorante de al menos aproximadamente 10 μ M en solución de HEPES 10 mM a pH 7,4; en donde el uno o más grupos iónicos se seleccionan de modo que la carga neta del colorante sea +1, 0 o -1, y en donde la relación de señal a fondo de la emisión fluorescente detectada a partir del compuesto colorante mientras se obtiene la imagen es al menos aproximadamente 1,1.

Se describen además métodos para preparar un conjugado para obtener imágenes de tejido o células, en donde el conjugado incluye un colorante y un ligando de elección de diana. Estos métodos incluyen: (a) seleccionar un colorante que tiene una absorción máxima a de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 850 nm y una emisión fluorescente máxima a de aproximadamente 550 nm a aproximadamente 875 nm; (b) opcionalmente modificar el colorante para incluir un grupo de conexión; (c) modificar el colorante and opcionalmente el grupo de conexión para incluir uno o más grupos iónicos para alcanzar una solubilidad de al menos aproximadamente 10 μ M en solución de HEPES 10 mM a pH 7,4; y (d) conjugar el ligando de elección de diana al colorante opcionalmente a través del grupo de conexión para formar el conjugado, en donde el ligando de elección de diana y el uno o más grupos iónicos se seleccionan de modo que la carga neta del conjugado sea +1, 0 o -1, y en donde la relación de señal a fondo de la emisión fluorescente detectada a partir del conjugado mientras se obtienen imágenes es al menos aproximadamente 1.1

Los colorantes descritos en la presente se pueden sintetizar según procedimientos estándar conocidos en la especialidad de la química orgánica. Se han publicado numerosas preparación de colorantes de cianina. Según esto, los colorantes de la invención se pueden preparar según cualquiera de los métodos conocidos de la bibliografía. Véanse, por ejemplo, Mojzych, M. y cols. "Synthesis of Cyanine Dyes" Top. Heterocycl. Chem. (2008) 14:1-9; Sysmex Journal International (1999), Vol. 9, No.2, pg 185 (apéndice); Strekowski, L. y cols. Synthetic Communications (1992), 22(17), 2593-2598; Strekowski, L. y cols. J. Org. Chem. (1992) 57, 4578-4580; Narayanan, N. y cols. J. Org. Chem. (1995), 60(8), 2391-2395; Makin, S.M. y cols. Journal of Organic Chemistry of the USSR (1977) 13(6), parte 1, 1093-1096; Lee, H. y cols. J. Org. Chem. (2006) 71, 7862-7865, los documentos WO 2009/006443, WO 2008/015415, WO 2007/136996, WO 2007/005222, WO 2003/082988, WO 2001/090253, U.S. N° Ser. 12/376.243 (presentado el 3 de febrero de 2009) y U.S. N° Ser. 12/376.225 (presentado el 3 de febrero de 2009).

Los colorantes, los conjugados y los agentes de obtención de imágenes se pueden aislar como sales, ácidos, bases o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, los colorantes, los conjugados y los agentes de obtención de imágenes que tienen múltiples sustituyentes cargados se pueden aislar al introducir contraiones y/o protones suficientes para contrarrestar las cargas de los diversos sustituyentes normalmente presentes en pH neutro de modo que el colorante, el conjugado o el agente de obtención de imágenes se pueda aislar, por ejemplo, como una sustancia sólida.

Aplicaciones, propiedades y composiciones

Los conjugados descritos en la presente se pueden usar, p. ej., para aplicaciones tomográficas ópticas, endoscópicas, fotoacústicas y sonofluorescentes para la detección, la obtención de imágenes y el tratamiento de tumores y otras anomalías. Los conjugados también se pueden usar para la terapia localizada. Esto se puede efectuar, p. ej., al enlazar una porfirina u otro agente terapéutico fotodinámico a un conjugado; dirigir los conjugados a una zona diana deseada o permitir que los conjugados se acumulen selectivamente en la zona diana; dando luz de una longitud de onda apropiada para activar el agente. Así, los nuevos conjugados se pueden usar para detectar, obtener imágenes de y tratar una sección de tejido, p. ej., un tumor.

Además, los conjugados se pueden usar para detectar la presencia de tumores y otras anomalías al comprobar el perfil de depuración de la sangre de los conjugados, para cirugía guiada asistida por láser para la detección de pequeñas micrometástasis de, p. ej., tumores positivos a somatostatina subtipo 2 (SST-2), y para el diagnóstico de placas ateroscleróticas y coágulos de sangre.

Los conjugados se pueden formular como composiciones diagnósticas y terapéuticas para la administración enteral o parenteral. Generalmente, estas composiciones contienen una cantidad eficaz del conjugado, junto con vehículos y excipientes farmacéuticos convencionales apropiados para el tipo de administración contemplado. Por ejemplo, las formulaciones parenterales incluyen el colorante o conjugado de colorante en una solución o suspensión acuosa estéril. Las composiciones parenterales se pueden inyectar directamente en un sujeto en una zona deseada, o mezcladas con una composición parenteral de gran volumen para la administración sistémica. Estas soluciones también pueden contener tampones farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, electrolitos, tales como cloruro sódico.

Las formulaciones para la administración enteral, en general, pueden contener líquidos, que incluyen una cantidad eficaz del colorante o conjugado de colorante deseado en solución o suspensión acuosa. Estas composiciones enterales pueden incluir opcionalmente tampones, tensioactivos y agentes tixotrópicos. Las composiciones para la administración oral también pueden contener agentes saborizantes y otros ingredientes para mejorar sus cualidades organolépticas.

Generalmente, las composiciones diagnósticas se administran en dosis eficaces para alcanzar la intensidad de señal deseada para permitir la detección. Estas dosis pueden variar, dependiendo del colorante o conjugado de colorante particular empleado, los órganos o tejidos de los que se van a obtener imágenes y el equipo de obtención de imágenes que se use. Por ejemplo, Zeheer y cols., *Nature Biotechnology*, 19, 1148-1154 (2001) usa 0,1 $\mu\text{mol/kg}$ como una dosis para conjugados IRDye78 in vivo. Las composiciones diagnósticas se pueden administrar a un paciente sistémicamente o localmente al órgano o el tejido del que se van a obtener imágenes, y el paciente se somete al procedimiento de obtención de imágenes.

Generalmente, los conjugados o compuestos colorantes absorben y emiten luz en la región visible e infrarroja del espectro electromagnético, p. ej., pueden emitir luz verde, amarilla, naranja, roja o luz del infrarrojo cercano ("NIR").

En algunas realizaciones, los colorantes emiten y/o absorben radiación que tiene una longitud de onda de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 1000 nm, p. ej., de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 900 nm o de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 850 nm.

En algunas realizaciones, los conjugados y los compuestos colorantes tienen una excitación máxima y/o una emisión máxima, medida en solución de HEPES 10 mM, pH 7,4, de aproximadamente 525 nm a aproximadamente 875 nm, p. ej., de aproximadamente 550 nm a aproximadamente 825 nm, o de aproximadamente 550 nm a aproximadamente 800 nm.

La invención se describirá con mayor detalle por medio de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen con propósitos ilustrativos y no pretenden limitar de ningún modo la invención o las reivindicaciones. Una variedad de parámetros no críticos de estos ejemplos se puede cambiar o modificar para dar esencialmente los mismos resultados.

Ejemplos

Ejemplo 1: Colorantes

La Figura 1 representa ciertos colorantes que se pueden usar en los métodos de obtención de imágenes de la invención. Nótese que para las moléculas ZW-3, ZW-1, ZW+1, ZW+3 y ZW+5, se tendría que introducir un ligando de elección de diana que tuviera una carga de +3, +1, -1, -3 y -5, respectivamente, para alcanzar la neutralidad. El colorante ZW+1 es el colorante de la presente invención.

Ejemplo 2: Preparación del colorante ZW+1

El colorante ZW+1 (véase la Figura 1) se elaboró según el procedimiento sintético representado en la Figura 2. Se hizo reacción 4-hidracinilbencenosulfonato sódico (**1**) con 3-metilbutan-2-ona para formar el derivado de 2,3,3-trimetil-3H-indol (**2**). A continuación, el nitrógeno del indol se protegió mediante la reacción con bromuro de 3-bromo-N,N,N-trimetilpropan-1-aminio y el producto (**3**) se hizo reaccionar con el compuesto de 2-cloro-3-((fenilamino)metil)ciclohex-1-enil)metil)benzenaminio (**4**) para dar el colorante de cianina (**5**). Un grupo de conexión se enlazó mediante la reacción de (**5**) con ácido 3-(4-hidroxifenil)propanoico para formar el colorante ZW+1 (**6**). Véanse además Mojzych, M. y cols. "Synthesis of Cyanine Dyes" *Top. Heterocycl. Chem.* (2008) 14:1-9; *Systemex Journal International* (1999), Vol. 9, Nº 2, pg 185 (apéndice); Strekowski, L. y cols. *Synthetic Communications* (1992), 22(17), 2593-2598; Strekowski, L. y cols. *J. Org. Chem.* (1992) 57, 4578-4580; y Makin, S.M. y cols. *Journal of Organic Chemistry of the USSR* (1977) 13(6), parte 1, 1093-1096,

Ejemplo de referencia 3: Preparación del colorante ZW+5

El colorante ZW+5 (véase la Figura 1) se puede elaborar según el procedimiento sintético representado en la Figura 3. La primera etapa implica la alquilación de indolnina **7**. La sal cuaternaria **8** resultante se puede dejar reaccionar con cloruro de 3-aminopropanoilo (en la forma de una sal amónica para proteger el grupo amino). A continuación, el grupo amino terminal se puede cuaternizar con exceso de yoduro de metilo para dar la sal bis-cuaternaria **9**. Las etapas posteriores **9**→**10**→**11** son análogas a la síntesis descritas en el Ejemplo 2 anteriormente. Se puede usar intercambio iónico para preparar los productos finales con un solo contraión tal como cloruro o bromuro.

La presencia de un catión de amonio cuaternario cerca del anillo aromático puede inhibir la formación del colorante final. Según esto, se puede introducir un espaciador corto entre el anillo aromático y el grupo amonio de ZW+5.

5 La purificación se puede conseguir a través de cromatografía en gel de sílice o cromatografía en fase inversa bajo condiciones de alta y baja presión. También puede ser útil la cromatografía de exclusión por tamaño.

Ejemplo 4: Caracterización de colorantes

10 Después de la purificación hasta homogeneidad, las propiedades ópticas de los colorantes se pueden medir en suero de ternero al 100%. Se puede realizar espectrometría de absorbancia (de 200 a 870 nm) usando un espectrómetro de fibra óptica USB2000 y una fuente luminica CHEM2000-UV-VIS con soporte para cubetas (Ocean Optics, Dunedin, FL). Se puede realizar espectrometría fluorescente (de 200 a 1100 nm) usando un espectrómetro de fibra óptica HR2000, un soporte para cubetas de 4 vías CUV-ALL-UV (Ocean Optics) y un diodo láser de 770 nm de 250 mW (Electro Optical Components, Santa Rosa, CA). El rendimiento cuántico se puede medir bajo condiciones de igual absorbancia y excitación láser de 770 nm, usando ICG en DMSO (QY = 13%) como el patrón de calibración.

15 Ejemplo 5: Preparación de conjugados de carga equilibrada

20 Antes de la prueba *in vivo*, los colorantes se convierten en agentes de obtención de imágenes "de carga equilibrada" con una carga neta = 0, de modo que recapitulen la carga neta después de la conjugación a un ligando de elección de diana. Se puede introducir carga puramente aniónica o catiónica a través de un ácido carboxílico libre sobre el grupo de conexión de los colorantes usando, por ejemplo, derivados de aminoadamantano, descritos con detalle previamente (Maison, W., J.V. Frangioni, y N. Pannier, Synthesis of rigid multivalent scaffolds based on adamantane. Org Lett, 2004. 6: 4567-9; Nasr, K., N. Pannier, J.V. Frangioni, y W. Maison, Rigid Multivalent Scaffolds Based on Adamantane. J Org Chem, 2008; y la Pub. Sol. Pat. EE. UU. N° 2006/0063834.

25 Brevemente, para introducir grupos "equilibradores" catiónicos, uno, dos o tres de los grupos ácido carboxílico de cabeza de puente disponibles del amino-tri-carboxi-adamantano (ATCA) (véase la Figura 9) pueden conjugarse bien a cloruro de (2-aminoetil)trimetilamonio o bien a cloruro de 2,2'-iminobis(N,N,N-trimetiletanaminio), y cualesquiera ácidos carboxílicos restantes bloquearse con etanolamina, para crear moléculas con una carga de +1, +2, +3, +4, +5 y +6. De forma similar, para crear grupos equilibradores con una carga de -1, -2, -3, -4, -5 y -6, los tres ácidos carboxílicos de cabeza de puente del ATCA pueden estar bien desprotegidos (es decir, ácidos carboxílicos remanentes), bien protegidos con etanolamina o bien conjugados a glutamato. El grupo equilibrador apropiado se puede 30 conjugar covalentemente a cada colorante para producir un conjugado final, que tiene una carga neta = 0, antes de la caracterización *in vivo*.

Ejemplo 6: Obtención de imágenes de organismos

35 El sistema quirúrgico guiado por imágenes FLARE™ es un sistema de obtención de imágenes intraoperatorio de onda continua (CW) que es capaz de la adquisición y la presentación simultáneas en tiempo real de video a color (es decir, anatomía quirúrgica) y dos canales de luz fluorescente NIR invisible (700 nm y 800 nm). Se han descrito con detalle previamente detalles de la teoría, la ingeniería y el funcionamiento del sistema de obtención de imágenes. Véanse Tanaka, E., H.S. Choi, H. Fujii, M.G. Bawendi, y J.V. Frangioni, Image-guided oncologic surgery using invisible light: completed pre-clinical development for sentinel lymph node mapping. Ann Surg Oncol, 2006. 13: 1671-81; De Grand, A.M. y J.V. Frangioni, An operational near-infrared fluorescence imaging system prototype for large animal surgery. Technol Cancer Res Treat, 2003. 2: 553-562; y Nakayama, A., F. del Monte, R.J. Hajjar, y J.V. Frangioni, Functional near-infrared fluorescence imaging for cardiac surgery and targeted gene therapy. Molecular Imaging, 2002. 1: 365-377,

45 Especificaciones para el sistema quirúrgico guiado por imágenes FLARE™ se proporciona en la Tabla 1 posterior.

Categoría	Especificación	Descripción
Física	Tamaño	Carro móvil: 76 cm W x 76 cm D x 105 cm H (32" W x 32" D x 41,4" H); Altura del mástil: 208 cm (82")
	Peso	306 kg (675 libras), incluyendo toda la electrónica
	Brazo	6 grados de libertad; Alcance: 109 cm - 178 cm (43" - 70") desde el suelo, 128,8 cm (50,7") desde el carro
Eléctrica	Voltaje y enchufe	120 V AC, 60 Hz; enchufe AC NEMA 5-15 120 V/15 A individual

Tabla 1 - Especificaciones del sistema de obtención de imágenes por fluorescencia NIR FLARE™		
Categoría	Especificación	Descripción
	Corriente	15 A máx
	Puesta a tierra	Transformador de aislamiento para todos los componentes; puesta a tierra del chasis redundante
	Corriente de fuga	< 300 μ A (por AAMI/IEC #60601)
Esterilidad	Protección	Protección acrílica desechable con \geq 95% de transmisión
	Cubierta	Cubierta de plástico a medida desechable unida a la protección
Fuente lumínica	Carcasa	Aluminio anodizado con placa de enfriamiento secundaria de 400 W
	Elementos	Serie de LED circulares de 25 mm adaptadas con accionadores lineales integrados
	Electrónica	Cuadros pasivos y activos con controlador embebido
	Grados de fluencia	Luz blanca de 40.000 lx (400-650 nm), 4 mW/cm ² de luz de excitación de 700 nm (656-678 nm), 14 mW/cm ² de luz de excitación de 800 nm (745-779 nm)
Óptica	Distancia de trabajo	46 cm (18") desde la superficie del paciente
	Campo de visión	2,2 W x 1,7 H cm a 15 W x 11,3 cm (zoom ajustable)
	Canales de emisión/reflectancia	Video a color (400-650 nm), fluorescencia de 700 nm (689-725 nm), fluorescencia de 800 nm (800-848 nm), todos con adquisición simultánea
	Resolución en píxeles	640 x 480 para cada cámara
	Sistema de resolución	125 x 125 μ m (x,y) a 625 x 625 μ m (x,y)
	Actualización de la pantalla	Hasta 15 Hz de adquisición simultánea en las 3 cámaras
	Tiempo de exposición a NIR	Ajustable desde 100 μ s hasta 8 s
Manos libres	Óptica	Zoom/foco automáticos
	Control	Interruptor de pie de 6 pedales
Monitores	Número	Montado a 2 carros 51 cm (20") para el operario; 1 satélite 51 cm (20") en posición para el cirujano

Ejemplo 7: Caracterización *in vivo* de colorantes y conjugados

5 Para la caracterización *in vivo*, 40 pmol/g (promedio 10 nmol) de cada colorante o conjugado se pueden inyectar IV en ratas Sprague-Dawley de 250 g cuyas vísceras principales están expuestas quirúrgicamente. El sistema de obtención de imágenes FLARE™ se puede graduar hasta un grado de fluencia de excitación a 760 nm de 5 mW/cm². Se pueden adquirir imágenes de video a color y fluorescencia NIR (800 nm) simultáneas antes de la inyección, cada 1 s para los primeros 20 s y a continuación cada 1 min durante 2 h. La adquisición de la cámara se puede mantener constante (típicamente 100 ms) y se elige para asegurar que todas las medidas de la intensidad estén dentro del intervalo lineal de la cámara de NIR de 12 bits Orca-AG (Hamamatsu). La sangre se puede muestrear a los 0, 1, 2, 5, 10, 15, 30, 60 y 120 min a través de la vena caudal. Se pueden cuantificar curvas de intensidad-tiempo para todos los órganos y tejidos principales. La intensidad de fluorescencia máxima y el tiempo se pueden determinar para cada tejido/órgano, junto con la intensidad en cada uno 1 h después de la inyección. A continuación, el experimento se puede repetir en cerdos, con medida de la intensidad fluorescente NIR de la piel y todos los tejidos y órganos internos. Una justificación estadística para la utilización de los rata y cerdo se puede encontrar en los animales vertebrados.

Ejemplo 8: Propiedades ópticas y de estabilidad *in vitro* de los colorantes

Cinco colorantes de heptametinindocianina, que varían en carga neta de -4 a +2, se muestran en la Figura 4 y se caracterizaron con respecto a sus propiedades ópticas y estabilidad *in vitro*. Los fluoróforos de NIR comerciales, tales como IRDy™800-RS (RS-800), IRDye800-CW (CW-800), Cy5.5 y Cy7, tienen diversos grados de sulfonación a

fin de alcanzar solubilidad acuosa. El fluoróforo de NIR MM-25 (carga neta +2) se preparó al emplear cationes de amonio cuaternario (cuats). MM-19 se sintetizó al emplear tanto grupos sulfonato como cuats, siguiendo el esquema sintético esbozado en la Figura 2 (véase el Ejemplo 2). Nótese que MM-19 (ZW+1, véase la Figura 1) tiene una carga neta de cero.

5 La Tabla 2 posterior resume las propiedades ópticas y de estabilidad de cada uno de estos colorantes en suero de ternero al 100% (complementado con HEPES 50 mM, pH 7,4).

Tabla 2 - Propiedades ópticas de fluoróforos de NIR diversamente cargados en suero al 100%.

Fluoróforo de NIR	PM	Carga neta (Cargas individuales)	Absorbancia máxima	Coefficiente de extinción ($M^{-1}cm^{-1}$)	Emisión máxima	QY	Estabilidad a las 4 h, 37°C
CW-800	1.069	-4 (-5,+1)	786 nm	237.000	801 nm	14,2%	95%
RS-800	865	-2 (-3,+1)	784 nm	240.000	800 nm	16,9%	97%
ICG	774	-1 (-2,+1)	807 nm	121.000	822 nm	9,3%	96%
MM-19	1.230	0 (-3,+3)	773 nm	249.000	790 nm	13,7%	95%
MM-25	1.026	+2 (+3,-1)	772 nm	309.000	790 nm	16,1%	97%

10 Ejemplo 9: Comportamiento comparativo de colorantes *in vivo*

Aunque las propiedades ópticas y de estabilidad *in vitro* para los cinco colorantes probados en el Ejemplo 8 eran similares, se mostraba que el comportamiento *in vivo* de estos colorantes era drásticamente diferente. Los resultados se muestran en la Figura 5. Los colorantes se inyectaron IV en ratas a una dosis de 40 pmol/g (10 nmol). Se muestran en la Figura 5 imágenes de video a color (fila superior) y de fluorescencia NIR a 800 nm (fila inferior) de todos los órganos y tejidos principales, expuestos quirúrgicamente. El grado de fluencia de excitación era 5 mW/cm². El tiempo de integración de la cámara era 200 ms. Todas las imágenes fluorescentes NIR tienen normalizaciones idénticas. B1 = vejiga urinaria. Li = hígado. In = Intestinos.

20 Como se puede observar en la Figura 5, el colorante con carga neta de 0 (MM-19) superaba a los otros colorantes. Los colorantes con carga neta -1 (ICG) o -2 (RS-800) y que tienen un alto "momento hidrófobo" (es decir, la mitad de la molécula es altamente hidrófoba y la otra mitad es hidrófila), daban como resultado una absorción rápida no deseada por el hígado (es decir, una semivida corta en sangre) y la excreción final a la bilis. El colorante con carga neta -4 (CW-800) era igualmente depurado por el hígado y los riñones, dando como resultado una alta señal intestinal, pero también demostraba una retención relativamente alta en la piel y otros tejidos y órganos principales. El colorante con carga neta +2 (MM-25) era depurado por el riñón más que el hígado, sin embargo, la absorción inespecífica en órganos y tejido era relativamente alta. Finalmente, MM-19, que tiene una carga neta de cero, demostraba una equilibración rápida entre los espacios intravascular y extravascular, una absorción hepática inmedible, una excreción renal rápida a la orina y una retención de fondo extremadamente baja en tejidos y órganos normales.

30 Estos resultados se confirmaron en el cerdo (Figura 6). Todos los colorantes se inyectaron IV en cerdos en una dosis de 40 pmol/g (1,6 μ mol). Se muestran en la Figura 6 imágenes de video a color y de fluorescencia NIR (800 nm) de la piel, junto con la SBR medida de la piel 1 h después de la inyección. El grado de fluencia de excitación era 5 mW/cm². El tiempo de integración de la cámara era 200 ms. Todas las imágenes de fluorescencia NIR tenían normalizaciones idénticas. Incluso después de solo 1 h de depuración, la señal de MM-19 en la piel era solo 11% de la fluorescencia máxima (Figura 6) y no se observó absorción inespecífica en ninguno otro de los tejidos u órganos. Esto está en contraste con ICG, RS-800 y CW-800, que daban como resultado una absorción muy alta en el hígado y los intestinos del cerdo. Las semividas en sangre de CW-800, RS-800, ICG, MM-19 y MM-25 eran 30,6, 6,5, 4,6, 13,4 y 44,0 min, respectivamente.

40 Ejemplo 10: Comportamiento *in vivo* comparativo de los conjugados

Los colorantes CW-800 (véase la Figura 4) con una carga neta -4 y MM-19 (véase la Figura 4) con una carga neta de 0 se conjugaron con cRGD, un aglutinante específico para integrina $\alpha_v\beta_3$. Véase la Figura 7 para las estructuras de los conjugados.

45 Se usaron en este experimento ratones nu/nu atímicos con tumores que expresan integrina $\alpha_v\beta_3$ en el costado izquierdo (T+; flechas) y tumores negativos a integrina $\alpha_v\beta_3$ (T-; punta de flecha) en el costado derecho. Se muestran

imágenes de video a color (fila superior) y fluorescencia NIR 800 (fila inferior) a las 0 y 4 h después de la inyección IV de 40 pmol/g (1 nmol) de cRGD-CW-800 (izquierda) y cRGD-MM-19 (derecha).

5 Aunque la carga neta en el conjugado cRGD-MM-19 fuera +1 debido al nitrógeno del indol, los resultados aclaraban que este conjugado tenían propiedades de obtención de imágenes superiores. Después de la inyección IV de dosis idénticas de cRGD-MM-19 y cRGD-CW-800, el conjugado basado en MM-19 tenía una relación de tumor a fondo (TBR) muy superior en todos los puntos temporales y exhibía una depuración renal rápida (véase la Figura 8). El conjugado basado en CW-800 (carga neta -3) tenía una absorción inespecífica muy alta en la piel, el músculo y el hueso (Figura 8). A las 4 h después de la inyección, cRGD-CW-800 tenía una TBR de 5,0 y cRGD-MM-19 tenía una
10 TBR de 17,2, correspondiente a una mejora de 3,4 veces en la TBR.

REIVINDICACIONES

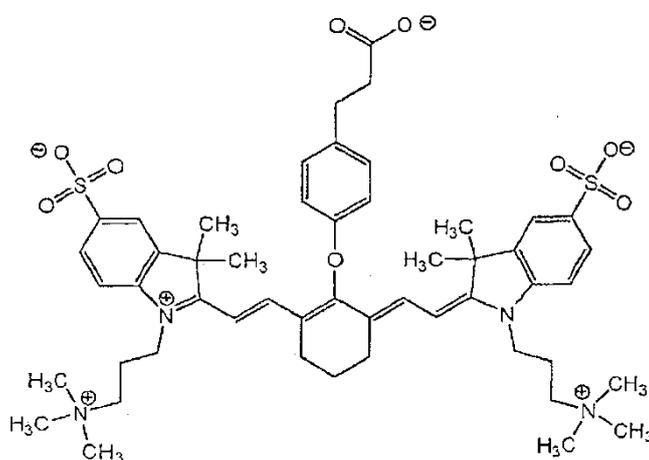
1. Un método para obtener imágenes de tejido o células, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto el tejido o las células con un agente de obtención de imágenes que comprende un colorante o conjugado del mismo, comprendiendo el conjugado un ligando de elección de diana enlazado al colorante, en donde el colorante o conjugado tiene una carga neta de +1, 0 o -1 y comprende uno o más grupos iónicos;

(b) irradiar el tejido o las células a una longitud de onda absorbida por el colorante o conjugado;

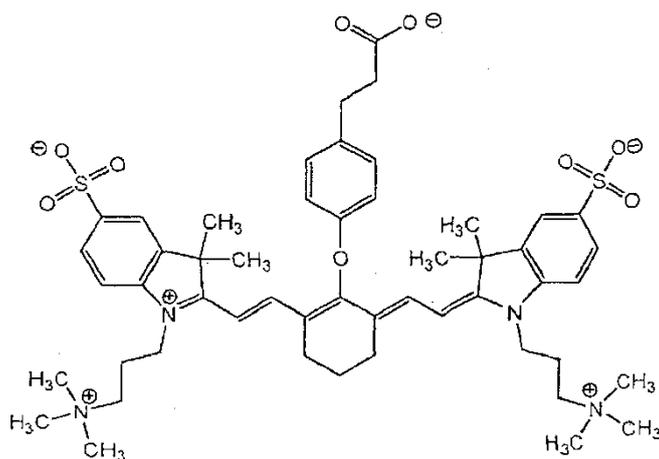
(c) detectar una señal óptica procedente del tejido o las células irradiados, en donde la relación de señal a fondo de la señal óptica detectada es al menos aproximadamente 1,1, obteniendo de ese modo imágenes del tejido o las células,

en donde el colorante tiene la Fórmula X:



X.

2. Un colorante que tiene la Fórmula X:



X.

3. Un conjugado que comprende el colorante según la reivindicación 2 conjugado a un ligando de elección de diana, en donde la carga neta total de dicho conjugado es -1, 0 o +1.

4. El colorante según la reivindicación 2, aislado como una sal, un ácido o combinaciones de los mismos.

5. Un agente de obtención de imágenes que comprende el conjugado según la reivindicación 3.

FIGURA 1

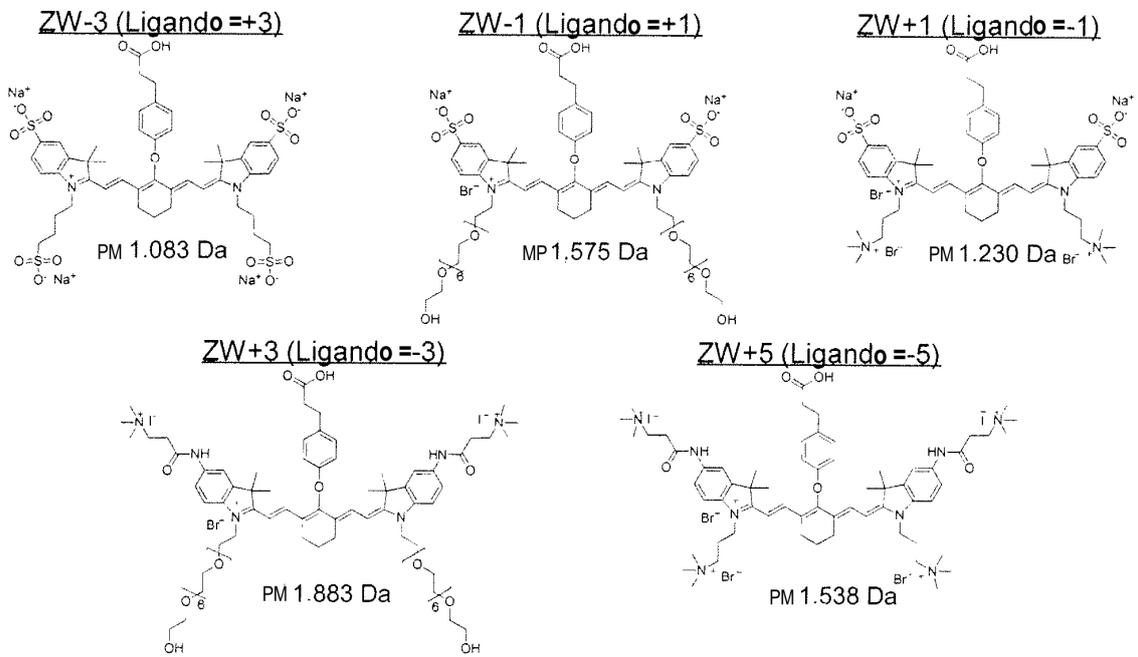


FIGURA 2

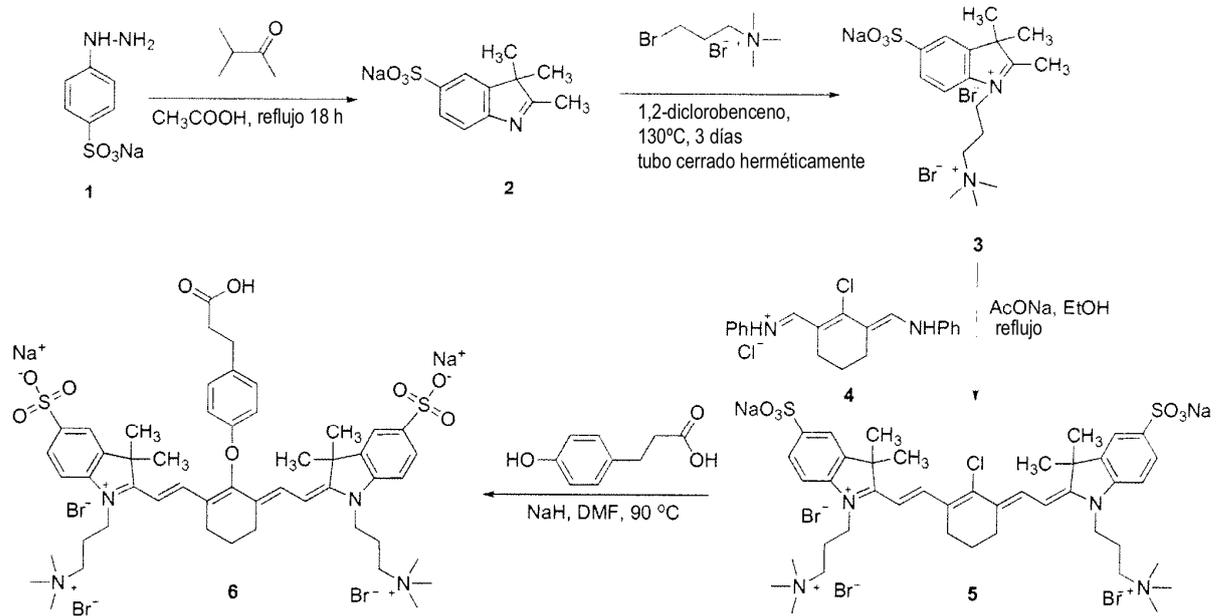


FIGURA 3

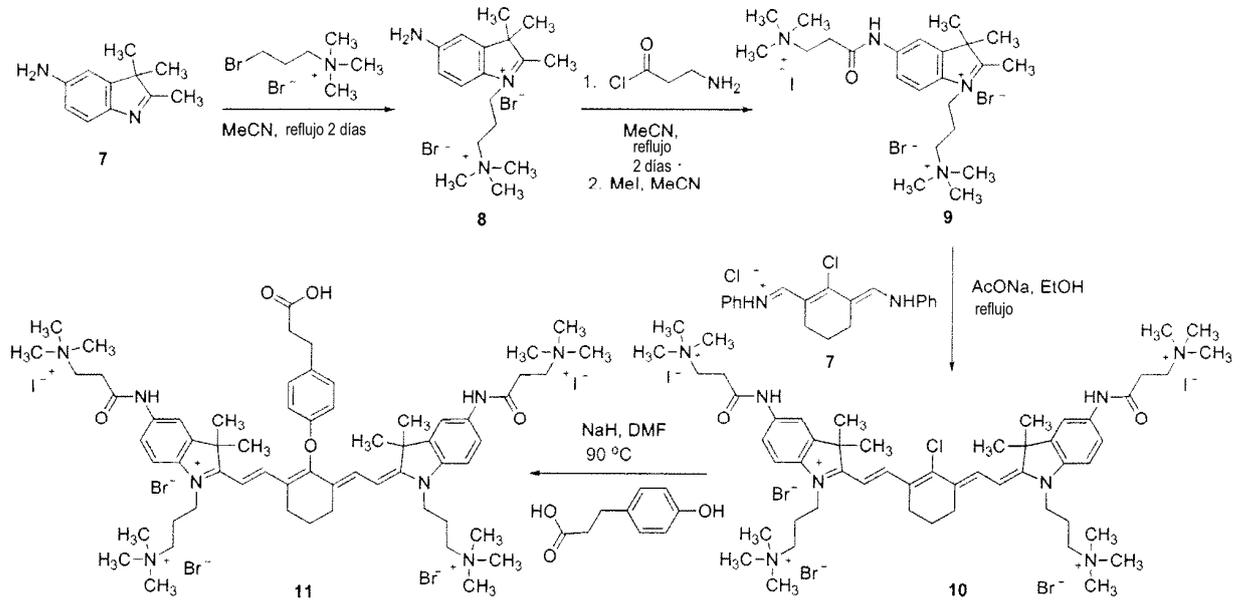


FIGURA 4

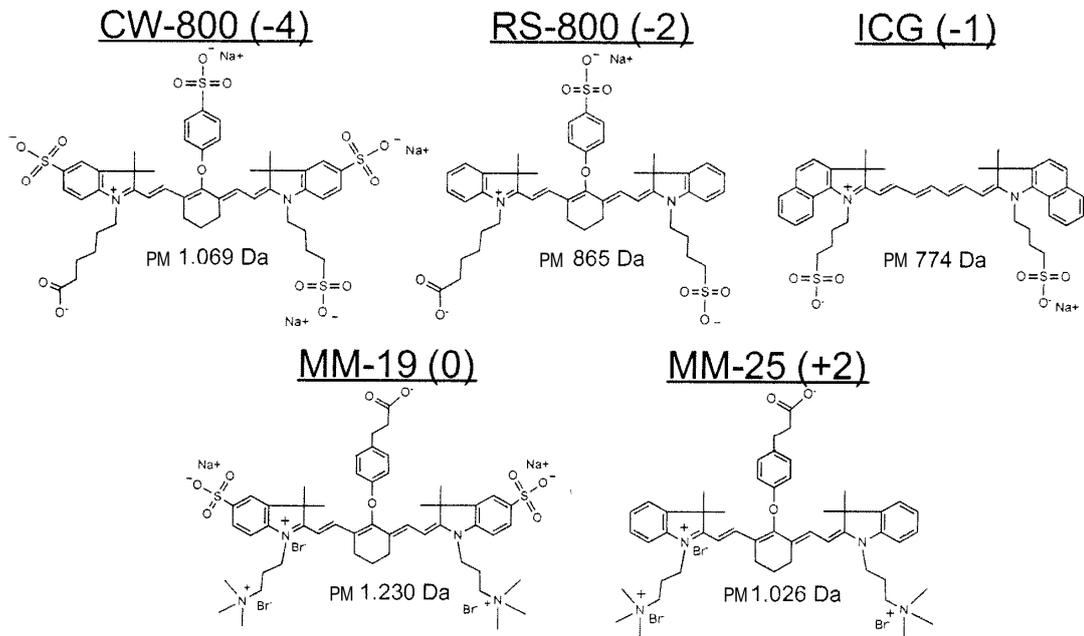


FIGURA 5

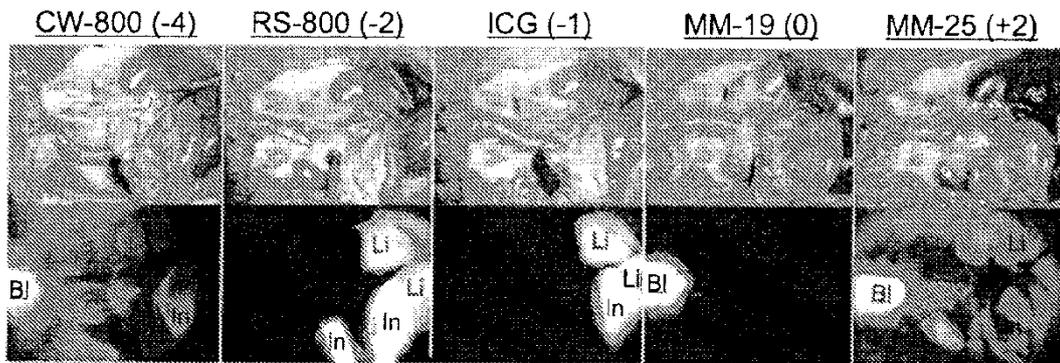


FIGURA 6

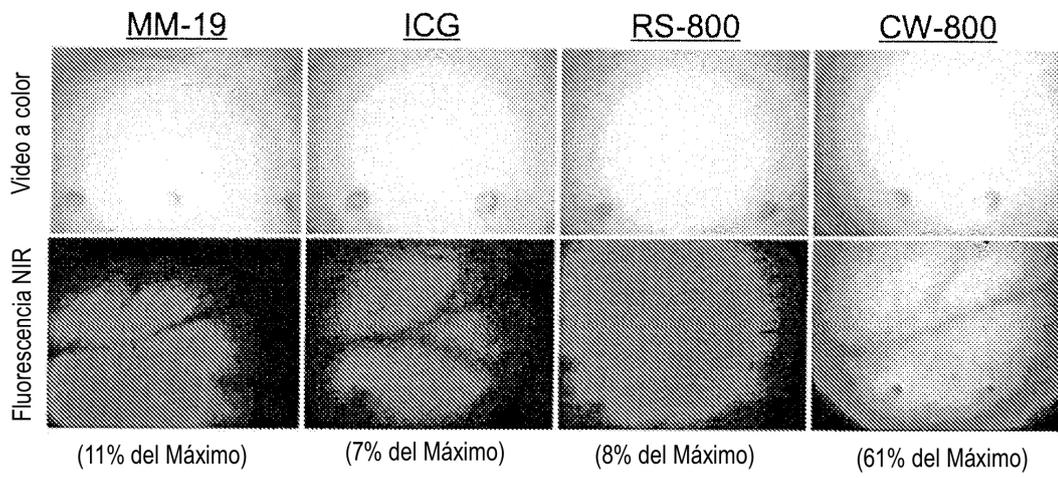


FIGURA 7

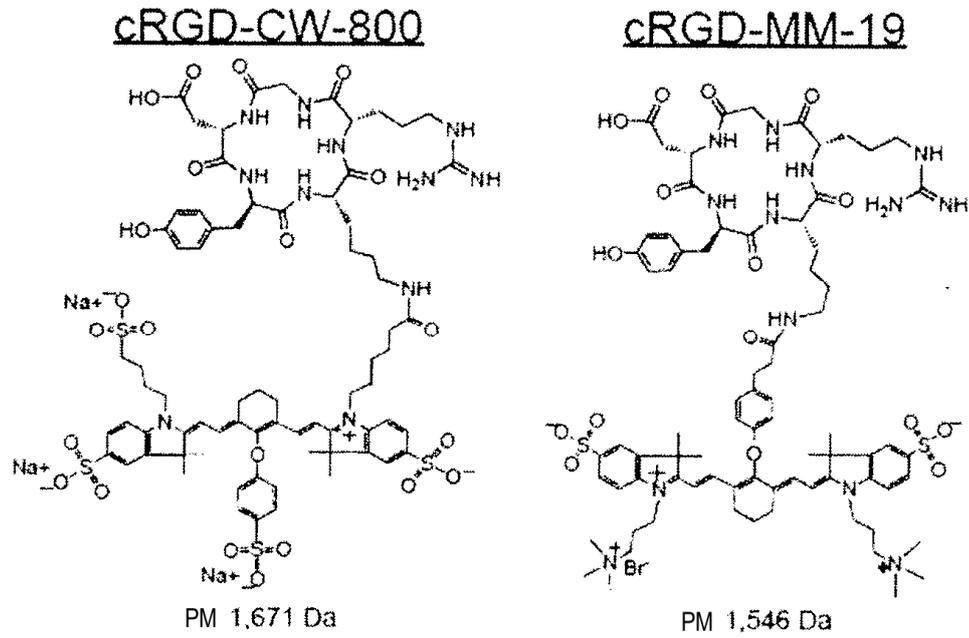


FIGURA 8

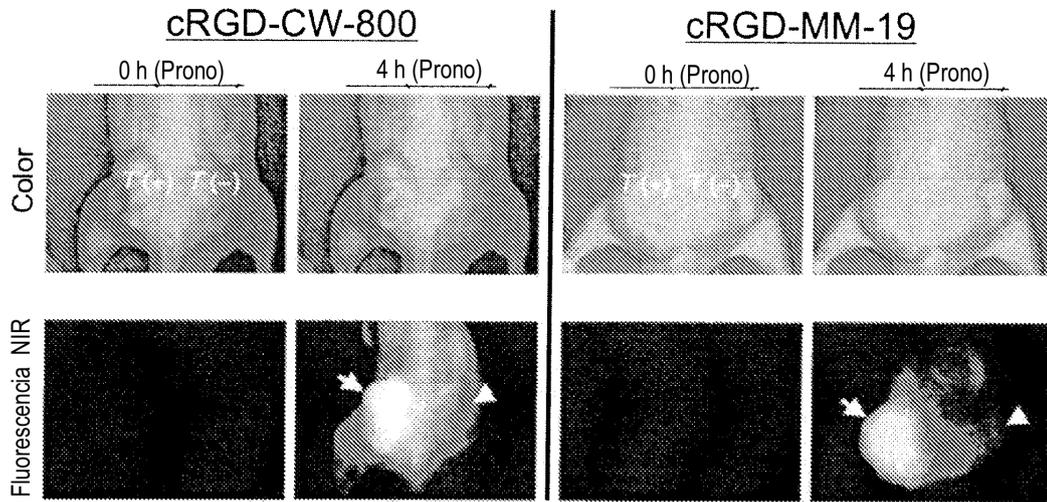


FIGURA 9

