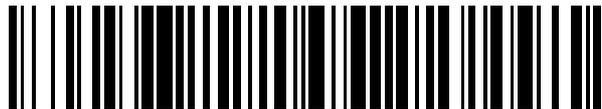


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 835**

51 Int. Cl.:

C07F 5/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2010 PCT/EP2010/065991**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11048217**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2010 E 10778590 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 2493898**

54 Título: **Colorantes fluorescentes en el infrarrojo cercano (NIR)**

30 Prioridad:

23.10.2009 IE 20090823

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

04.07.2019

73 Titular/es:

**ROYAL COLLEGE OF SURGEONS IN IRELAND
(100.0%)**

**123 St. Stephens Green
Dublin 2, IE**

72 Inventor/es:

O'SHEA, DONAL

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 718 835 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 fluorescentes en el infrarrojo cercano (NIR)

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a colorantes fluorescentes en el infrarrojo cercano (NIR) novedosos y a métodos para preparar los colorantes. La invención también se refiere a conjugados de colorantes que comprenden los colorantes de la invención unidos de manera covalente a moléculas de interés.

10

Antecedentes de la invención

15

Los colorantes fluorescentes, también denominados en el presente documento compuestos fluorescentes, fluoróforos y fluorocromos, tienen muchas aplicaciones útiles. Por ejemplo, puede usarse fluorescencia como modo no destructivo de rastrear o analizar muchas moléculas diversas. Tales moléculas se marcan con un colorante fluorescente, permitiendo que la fluorescencia del colorante se detecte.

20

25

30

35

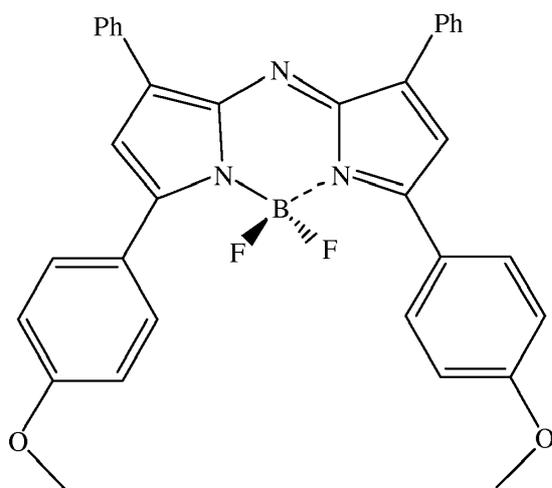
En los últimos años, ha habido un interés creciente en colorantes fluorescentes en el infrarrojo cercano (NIR) y rojo visible (>700 nm) para ensayos cualitativos y cuantitativos. Su simplicidad de uso, junto con una alta sensibilidad también garantiza una expansión continua de su uso para obtención de imágenes *in vitro* e *in vivo*. En cuanto a aplicación comercial, la obtención de imágenes de fluorescencia en el NIR de alta sensibilidad se ha vuelto una herramienta indispensable para explorar los procesos moleculares de sistemas biológicos en células vivas. Su aplicación a la obtención de imágenes de animales y seres humanos *in vivo* no invasiva es actualmente un campo reemergente con aplicaciones que varían entre mapeo vascular y diagnóstico tumoral. La obtención de imágenes ópticas en el NIR de tejidos es una técnica económica, en tiempo real y no invasiva que no requiere el uso de radionúclidos. Las cámaras acopladas ultra sensibles de bajo ruido recientemente desarrolladas, los modelos matemáticos de propagación de fotones en el tejido y las sondas moleculares más específicas de la diana, han creado posibilidades interesantes en este campo. Las ventajas inherentes de los fluorocromos en el NIR sobre aquellos que absorben en las longitudes de onda azul y verde más cortas radican en la reducción dramática de la autofluorescencia de fondo, que conduce a una sensibilidad mucho mayor, una mayor penetración de luz del tejido biológico y un daño mínimo de las células/tejido en observación. Como ejemplo, en el caso de la obtención de imágenes *in vivo*; es muy preferible usar fluoróforos con perfiles de absorción/emisión en las regiones espectrales del infrarrojo cercano o rojo visible lejano (700 nm-1400 nm), ya que a una menor longitud de onda, la fuerte interferencia de los cromóforos endógenos es problemática.

40

A pesar de los beneficios ópticos, existe una sorprendente escasez de compuestos en el NIR que tengan las propiedades de absorción y emisión deseadas. Entre las plataformas fluorescentes usadas para la construcción de sondas fluorescentes en el NIR/rojo visible para la bioconjugación, los colorantes de cianina son, con mucho, los más ampliamente utilizados. Hasta la fecha, de los colorantes de cianina, solo el verde de indocianina (ICG) ha sido aprobado para uso clínico. Además, a pesar de su uso generalizado, los colorantes de cianina tienen desventajas, que incluyen poca fotoestabilidad y largas rutas sintéticas.

45

Se ha encontrado que la clase de compuestos de tetraarilazadipirrometeno quelado con boro se sintetiza con relativa facilidad y presenta excelentes propiedades espectrales. Su fuerte absorción y emisiones dentro de la región espectral de NIR, junto con una alta fotoestabilidad los hacen candidatos prometedores para aplicaciones de obtención de imágenes biológicas. Por ejemplo, el compuesto 1 tiene una absorción $\lambda_{\text{máx}}$ a 696 nm y emisión a 727 nm ($\varphi_F = 0,36$) en disoluciones acuosas formuladas, y absorción $\lambda_{\text{máx}}$ a 688 nm ($\epsilon = 85.000 \text{ dm}^{-3}\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y emisión a 716 nm ($\varphi_F = 0,36$) en cloroformo.



1 (comparativo)

Estas características fotofísicas prometedoras han alentado la adaptación de esta clase a funciones específicas
 5 tales como terapia fotodinámica. El documento WO 03/080627 da a conocer el uso de estos compuestos 1 como
 agentes terapéuticos fotodinámicos. Sin embargo, tales compuestos, aunque útiles, también tienen desventajas. Por
 ejemplo, su aplicación comercial se ha limitado hasta la fecha por su incapacidad de unirse a una molécula o
 partícula de interés para rastrear o analizar la molécula. Específicamente, no es factible añadir un grupo de
 conjugación al carbono de los grupos metoxilo del compuesto. Por los motivos anteriores, existe una clara necesidad
 10 de colorantes fluorescentes en el NIR novedosos.

Loudet A *et al.*, Tetrahedron, 2008, describen compuestos para su uso como sondas, en particular un subconjunto
 de colorantes BODIPY denominados colorantes aza-BODIPY. El documento WO2006/058448 describe compuestos
 de azadipirrometeno y su uso en terapia fotodinámica.

15 Un objeto de la invención es evitar o mitigar los problemas asociados con colorantes fluorescentes en el NIR
 conocidos.

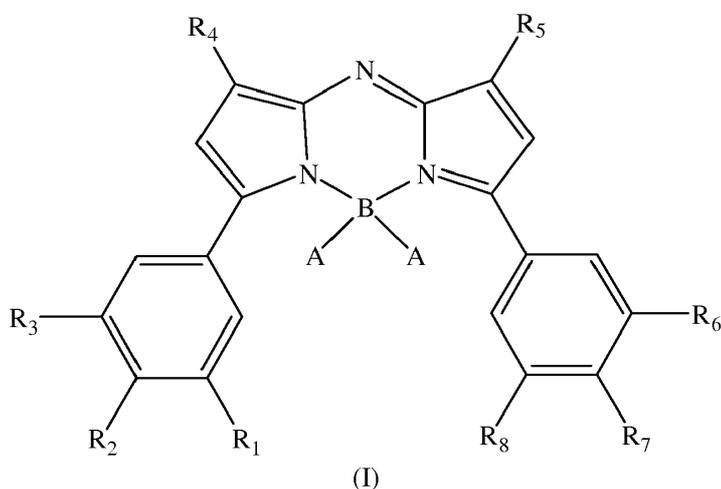
Un objeto adicional de la invención es proporcionar colorantes fluorescentes en el NIR novedosos que sean estables
 20 y puedan unirse a una molécula o partícula de interés.

Todavía otro objeto de la invención es proporcionar colorantes fluorescentes en el NIR novedosos que sean solubles
 en agua.

25 Todavía otro objeto de la invención es proporcionar colorantes fluorescentes en el NIR novedosos que tengan una
 respuesta de intensidad de fluorescencia predecible a cambios ambientales, por ejemplo, pH.

Declaraciones de la invención

30 Según la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I)



en la que cada A es fluoruro,

R₁, R₂, R₃, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, OH, NO₂ u O-L-X, en donde L es un grupo espaciador seleccionado de alquilos de cadena lineal o ramificada que tienen hasta 25 átomos de carbono, metilenos, aminas, amidas o éteres y X es un grupo de conjugación o un grupo de solubilización en agua; con la condición de que al menos uno de R₁, R₂, R₃ sea OH u O-L-X y al menos uno de R₆, R₇ y R₈ sea OH u O-L-X; y

R₄ y R₅, que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno independientemente un resto arilo o un resto alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene hasta 25 átomos de carbono.

Tal como se usa en el presente documento, el término "cíclico" se pretende que abarque restos sustituidos o no sustituidos, saturados o insaturados, que contienen uno o más anillos. Si está presente más de un anillo, los anillos pueden condensarse juntos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "arilo", que se incluye dentro del alcance de "cíclico", se pretende que abarque restos de hidrocarburos aromáticos sustituidos o no sustituidos, insaturados, monocíclicos o policíclicos (condensados o separados). Los restos aromáticos monocíclicos preferidos incluyen fenilo, restos fenilo sustituido que incluyen, pero no se limitan a, tolilo, xililo, mesitilo, cumenilo (isopropilfenilo) y derivados de fenileno sustituido que incluyen, pero no se limitan a, bencilo, benzhidrilo, cinamilo, fenetilo, estirilo y tritilo. Los restos policíclicos condensados preferidos incluyen restos naftaleno y antraceno sustituidos y no sustituidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "heterocíclico" se pretende que abarque restos heterocíclicos sustituidos o no sustituidos, saturados o insaturados, monocíclicos o policíclicos (condensados o separados). Restos no aromáticos adecuados son restos piperidina, dioxano, piperazina y pirrolidina sustituidos o no sustituidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "heteroarilo", que se incluye dentro del alcance de "heterocíclico", se pretende que abarque restos heterocíclicos aromáticos sustituidos o no sustituidos, insaturados, monocíclicos o policíclicos (condensados o separados). Se prefieren restos piridina, piridazina, pirimidina, pirazina, purina, furano, pirrol, benzofurano, indol y tiofeno sustituidos o no sustituidos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aromático" se pretende que abarque un resto cíclico totalmente insaturado, sustituido o no sustituido.

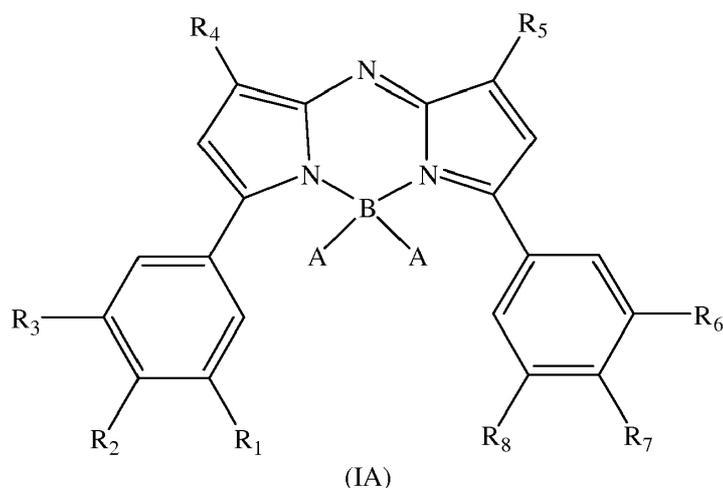
Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo" se pretende que abarque restos alquilo, alqueno o alquinilo sustituidos o no sustituidos, de cadena lineal o ramificada, saturados o insaturados que tienen hasta 25 átomos de carbono. Se prefieren restos alquilo tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, pentilo, isopentilo, hexilo, metilpentilo, isohexilo, heptilo, isoheptilo, octilo, isooctilo, nonilo, isononilo, decilo, isodecilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octodécilo, nonadecilo, icosilo, hencosilo, docosilo, tricosilo, tetracosilo y pentacosilo, todos los cuales pueden sustituirse adicionalmente. Los restos alqueno y alquinilo preferidos incluyen vinilo, etinilo, alilo, isopropenilo, propinilo, butenilo, butinilo, pentenilo, pentinilo, hexenilo, hexinilo, heptenilo, heptinilo, octenilo, octinilo, nonenilo, noninilo, decenilo, decinilo, undecenilo, undecinilo, dodecenilo, dodecinilo, tridecenilo, tridecinilo, tetradecenilo, tetradecinilo, pentadecenilo, pentadecinilo, hexadecenilo, hexadecinilo, heptadecenilo, heptadecinilo, octadecenilo (oleico o elaídico), octadecinilo, nonadecenilo, nonadecinilo, icosenilo, icosinilo, hencosenilo, hencosinilo, docosenilo, docosinilo, tricosenilo, tricosinilo, tetracosenilo, tetracosinilo, pentacosenilo y pentacosinilo, todos los cuales pueden sustituirse adicionalmente.

Cada uno de R₄ y R₅ puede ser, independientemente, un resto heterocíclico, preferiblemente heteroarilo. Preferiblemente, cada uno de R₄ y R₅ es, independientemente, un resto cíclico, preferiblemente arilo, más preferiblemente un resto arilo monocíclico. Estos restos pueden estar sustituidos o no sustituidos. Lo más preferiblemente, cada uno de R₄ y R₅ es fenilo (Ph).

En una realización especialmente preferida, cada A es F, R₄ es Ph y R₅ es Ph.

Incluidos en los compuestos de fórmula (I) están los compuestos de fórmula (IA).

En los compuestos de fórmula (IA),



cada A y R₄ y R₅ son tal como se definieron anteriormente para los compuestos de fórmula (I);

- 5 R₁, R₂, R₃, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, OH, NO₂ u O-L-X, en donde L y X son tal como se definieron anteriormente para los compuestos de fórmula (I); bajo la condición tal como se indica para los compuestos de fórmula (I); y con la condición adicional de que al menos uno de R₁, R₂, R₃, R₆, R₇ y R₈ sea O-L-X.

- 10 Preferiblemente, sólo uno de R₁, R₂, R₃ es OH u O-L-X, y los grupos restantes de R₁, R₂ y R₃ son cada uno independientemente H o NO₂; y/o sólo uno de R₆, R₇ y R₈ es OH u O-L-X, y los grupos restantes de R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H o NO₂.

- 15 Preferiblemente, cuando uno de R₁, R₂, R₃ es OH u O-L-X, los grupos restantes de R₁, R₂ y R₃ son cada uno independientemente H.

- Preferiblemente, cuando uno de R₆, R₇ y R₈ es OH u O-L-X, los grupos restantes de R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H.

- 20 En una realización de compuestos de fórmula (IA), sólo uno de R₁, R₂ y R₃ es O-L-X y sólo uno de R₆, R₇ y R₈ es OH, en el que X es un grupo de conjugación o un grupo de solubilización en agua.

En otra realización de compuestos de fórmula (IA), sólo uno de R₁, R₂ y R₃ es OH y sólo uno de R₆, R₇ y R₈ es O-L-X, en el que X es un grupo de conjugación o un grupo de solubilización en agua.

- 25 En una realización preferida de compuestos de fórmula (IA), sólo uno de R₁, R₂ y R₃ es O-L-X y sólo uno de R₆, R₇ y R₈ es O-L-X, en donde:

- 30 (a) cada X es un grupo de conjugación; o
 (b) cada X es un grupo de solubilización en agua; o
 (c) una X es un grupo de conjugación y la otra X es un grupo de solubilización en agua.

En una realización particularmente preferida, R₁ es H, R₂ es O-L-X, R₃ es H, R₆ es H, R₇ es O-L-X y R₈ es H, en donde una X es un grupo de conjugación y la otra X es un grupo de solubilización en agua.

- 35 En una realización especialmente preferida, cada A es F, R₁ es H, R₂ es O-L-X, R₃ es H, R₄ es Ph, R₅ es Ph, R₆ es H, R₇ es O-L-X y R₈ es H, en donde una X es un grupo de conjugación y la otra X es un grupo de solubilización en agua.

- 40 Los grupos espaciadores adecuados L incluyen restos seleccionados de alquilo, metileno, amina, amida y éteres sustituidos o no sustituidos, saturados o no saturados, de cadena lineal o ramificada, o derivados de los mismos. Los restos alquilo incluyen restos alquilo sustituidos o no sustituidos, saturados o insaturados, de cadena lineal o ramificada que tienen hasta 25 átomos de carbono, más preferiblemente hasta 10 átomos de carbono, incluso más preferiblemente hasta 5 átomos de carbono. Los restos metileno incluyen -(CH₂)_n, en donde n es un número entero desde 1 hasta 16, preferiblemente desde 1 hasta 10, más preferiblemente desde 1 hasta 5, incluso más preferiblemente desde 1 hasta 3. Los restos amina incluyen -(CH₂)₂NH-. Los restos amida incluyen -(CH₂)₂NHCO(CH₂)-, -(CH₂)₂NHCO(CH₂)₂- y -CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₂-. Los restos éter incluyen -CH₂CH₂OCH₂CH₂-. Se apreciará que cualquier grupo espaciador adecuado no enumerado en este documento puede incluirse en los compuestos de la invención. También se apreciará que puede incluirse más de un grupo espaciador, y que la longitud y el número del/de los grupo(s) espaciador(es) puede variar según el uso previsto del compuesto.

Los grupos de conjugación adecuados incluyen restos seleccionados de ácidos carboxílicos, aminas, alquinos, ésteres succinimidílicos, azidas, azidas de acilo, maleimidias, ésteres diarilfosfonil-arílicos y biotina, o derivados de los mismos.

5

Un éster diarilfosfonil-arílico adecuado es éster *orto*-diarilfosfonil-aril-metilico.

Se prefieren restos seleccionados de ácidos carboxílicos, aminas, alquinos y ésteres succinimidílicos, más preferiblemente seleccionados de alquinos y ésteres succinimidílicos, lo más preferiblemente ésteres succinimidílicos. Se apreciará que cualquier grupo de conjugación adecuado no indicado en este documento puede incluirse en los compuestos de la invención. Ventajosamente, el grupo de conjugación se escoge según el uso previsto, tal como se comenta en más detalle a continuación.

10

Los grupos de solubilización en agua adecuados incluyen restos seleccionados de ácidos carboxílicos, aminas, ácidos sulfónicos, alcoholes, éteres, poliéteres, amidas, sulfonamidas y tetrazoles, o derivados de los mismos.

15

Se prefieren restos seleccionados de ácidos sulfónicos, ácidos carboxílicos, éteres y poliéteres, más preferiblemente seleccionados de ácidos sulfónicos y ácidos carboxílicos, lo más preferiblemente ácidos sulfónicos. Se apreciará que cualquier grupo de solubilización en agua adecuado no indicado en este documento puede incluirse en los compuestos de la invención.

20

En una realización preferida, uno de R_1 , R_2 y R_3 es O-L-X y uno de R_6 , R_7 y R_8 es O-L-X, en donde una X es un resto ácido sulfónico y la otra X es un resto éster succinimidílico. En esta realización, preferiblemente, cada A es F, R_4 es Ph y R_5 es Ph.

25

En una realización especialmente preferida, uno de R_1 , R_2 y R_3 es O-L-X, en donde O-L-X es $O-(CH_2)_3-SO_3Na$ u $O-(CH_2)_3-SO_3H$ u $O-(CH_2)_3-SO_3^-$, y uno de R_6 , R_7 y R_8 es O-L-X, en donde O-L-X es O-CH₂-éster succinimidílico u $O-(CH_2)_2NHCO(CH_2)_2$ -éster succinimidílico u O-CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₂-éster succinimidílico; o uno de R_6 , R_7 y R_8 es O-L-X, en donde O-L-X es $O-(CH_2)_3-SO_3Na$ u $O-(CH_2)_3-SO_3H$ u $O-(CH_2)_3-SO_3^-$, y uno R_1 , R_2 y R_3 es O-L-X, en donde O-L-X es O-CH₂-éster succinimidílico u $O-(CH_2)_2NHCO(CH_2)_2$ -éster succinimidílico u O-CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₂-éster succinimidílico. En esta realización, preferiblemente, cada A es F, R_4 es Ph y R_5 es Ph.

30

El experto apreciará que, según el uso previsto, algunos de los restos usados como grupos de conjugación pueden funcionar alternativamente como grupos de solubilización en agua. Por ejemplo, pueden usarse ácido carboxílico y restos amina como grupos de conjugación o como grupos de solubilización en agua. Por tanto, cuando un compuesto de las fórmulas (I) o (IA) incluye dos ácidos carboxílicos como X, un ácido carboxílico puede, si se desea, funcionar como un grupo de conjugación y el otro como un grupo de solubilización en agua; de manera similar para dos aminas como X; también de manera similar para un compuesto que comprende un resto ácido carboxílico como X y un resto amina como X.

35

40

Un experto apreciará además que según el uso previsto, restos éter usados normalmente como grupos de solubilización en agua también pueden funcionar como grupos espaciadores. Por ejemplo, cuando más de un grupo éter está presente, formando un poliéter, uno o más de los grupos éter presentes pueden proporcionar la función de un grupo espaciador.

45

Preferiblemente, los compuestos según la invención tienen una absorbancia máxima $\lambda_{m\acute{a}x}$ a más de 660 nm, preferiblemente más de 670 nm, y una emisión máxima a más de 690 nm, preferiblemente más de 720 nm, tal como se mide en disoluciones acuosas.

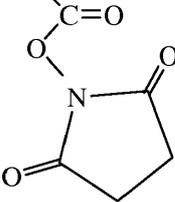
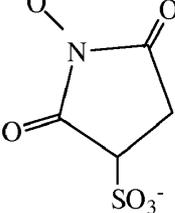
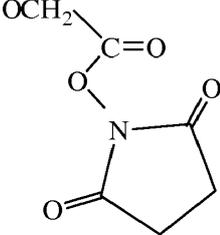
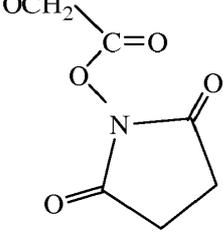
50

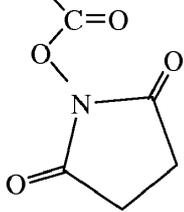
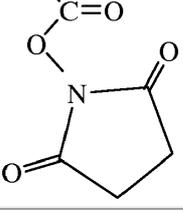
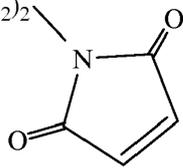
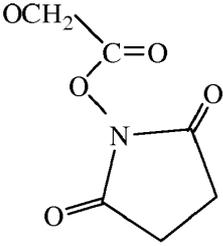
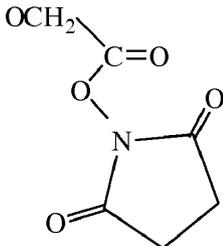
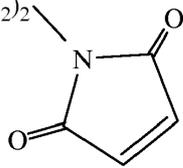
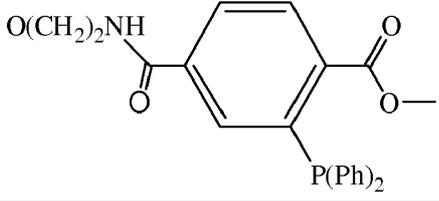
La tabla 1 contiene compuestos representativos según las fórmulas (I) y (IA), en donde cada A es F, R_1 es H, R_3 es H, R_4 es Ph, R_5 es Ph y R_8 es H. Los compuestos proporcionados en la tabla 1 son compuestos representativos únicamente y no se pretende que sean una lista exhaustiva.

55

Tabla 1

Número de referencia de compuesto en ejemplos donde sea aplicable	R_2	R_6	R_7
2 (Ejemplo 2(A))	OH	H	OCH ₂ -C≡CH
9 (Ejemplo 3(A))	O((CH ₂) ₂ O) ₃ CH ₃	H	O(CH ₂) ₂ NHBoc
Variación de 9 (Ejemplo 3(A))	O((CH ₂) ₂ O) ₃ CH ₃	H	O(CH ₂) ₂ NH ₂

10 (Ejemplo 3(A))	$O((CH_2)_2O)_3CH_3$	H	$O(CH_2)_2NHCO(CH_2)_2CO_2H$
11a (Ejemplo 3(A))	$O((CH_2)_2O)_3CH_3$	H	$O(CH_2)_2NHCO(CH_2)_2$ 
11b (Ejemplo 3(A))	$O((CH_2)_2O)_3CH_3$	H	$O(CH_2)_2NHCO(CH_2)_2$ 
16 (Ejemplo 4)	OCH_2CO_2	H	$OCH_2CO_2^-$
Variación de 16 (Ejemplo 4)	OCH_2CO_2H	H	OCH_2CO_2H
17 (Ejemplo 4)	$O(CH_2)_3SO_3^-$	H	$O(CH_2)_3SO_3^-$
Variación de 17 (Ejemplo 4)	$O(CH_2)_3SO_3H$	H	$O(CH_2)_3SO_3H$
26 (Ejemplo 6)	$OCH_2CH_2CH_2SO_3Na$	H	$OCH_2-C\equiv CH$
---	OCH_2CO_2H	H	$OCH_2-C\equiv CH$
---	$O(CH_2)_3SO_3Na$	H	$O(CH_2)_2NH_2$
---	$O(CH_2)_3SO_3Na$	H	OCH_2CO_2H
---	$O(CH_2)_3SO_3Na$	H	OCH_2 
27 (Ejemplo 6)	$O(CH_2)_3SO_3Na$	H	OH
---	OCH_2CO_2H	H	OH
---	OCH_2CO_2H	NO ₂	OH
---	OCH_2 	H	OH
---	$O(CH_2)_3SO_3Na$	H	

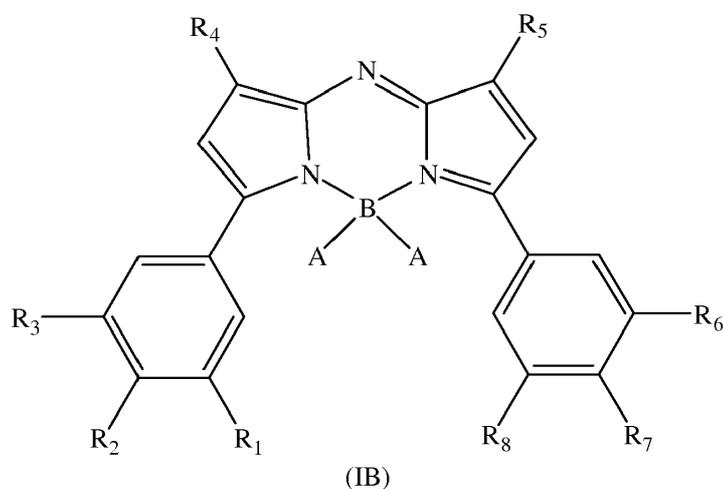
			$\text{OCONH(CH}_2)_2\text{NHCO(CH}_2)_2$ 
28 (Ejemplo 6)	$\text{O(CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$	H	$\text{O(CH}_2)_2\text{NHCO(CH}_2)_2$ 
---	$\text{O(CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$	H	$\text{O(CH}_2)_2\text{NHCO(CH}_2)_2$ 
-		H	
29 (Ejemplo 6)	$\text{O((CH}_2)_2\text{O)}_3\text{CH}_3$	H	$\text{O(CH}_2)_2\text{NHCO(CH}_2)_2$ 
30 (Ejemplo 6)	$\text{O((CH}_2)_2\text{O)}_3\text{CH}_3$	H	

31 (Ejemplo 6)	$O((CH_2)_2O)_3CH_3$	H	
----------------	----------------------	---	--

Incluidos en los compuestos de fórmula (I) están los compuestos de fórmula (IB).

En los compuestos de fórmula (IB),

5



cada A y R₄ y R₅ son tal como se definieron anteriormente para los compuestos de fórmula (I); y

- 10 R₁, R₂, R₃, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, OH o NO₂; con la condición de que al menos uno de R₁, R₂, R₃ sea OH y al menos uno de R₆, R₇ y R₈ sea OH.

Preferiblemente, sólo uno de R₁, R₂, R₃ es OH, y los grupos restantes de R₁, R₂ y R₃ son cada uno independientemente H o NO₂; y/o sólo uno de R₆, R₇ y R₈ es OH, y los grupos restantes de R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H o NO₂.

15

Preferiblemente, cuando uno de R₁, R₂, R₃ es OH, los grupos restantes de R₁, R₂ y R₃ son cada uno independientemente H.

- 20 Preferiblemente, cuando uno de R₆, R₇ y R₈ es OH, los grupos restantes de R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H.

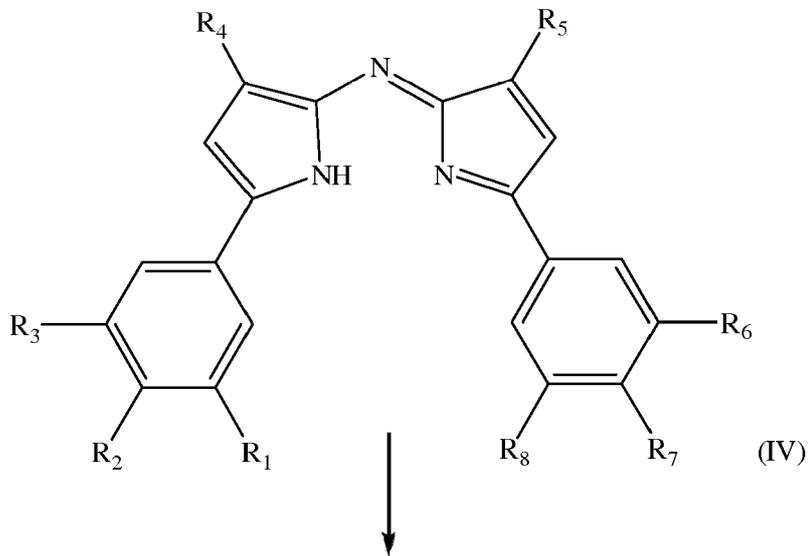
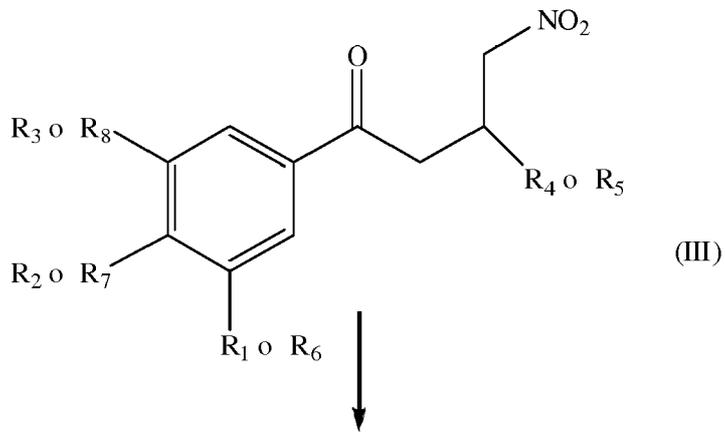
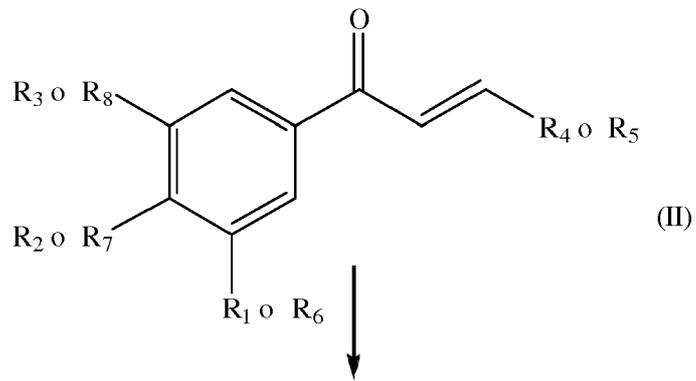
En una realización preferida del compuesto (IB), R₁ es H, R₂ es OH, R₃ es H, R₆ es H, R₇ es OH y R₈ es H. En una realización especialmente preferida del compuesto (IB), cada A es F, R₁ es H, R₂ es OH, R₃ es H, R₄ es Ph, R₅ es Ph, R₆ es H, R₇ es OH y R₈ es H.

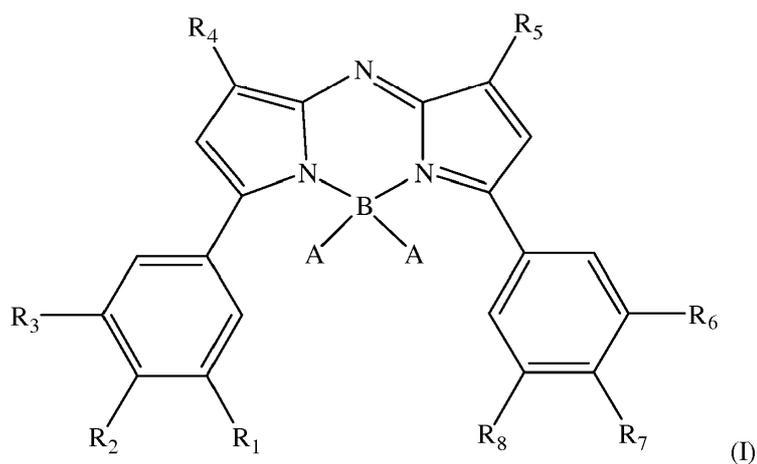
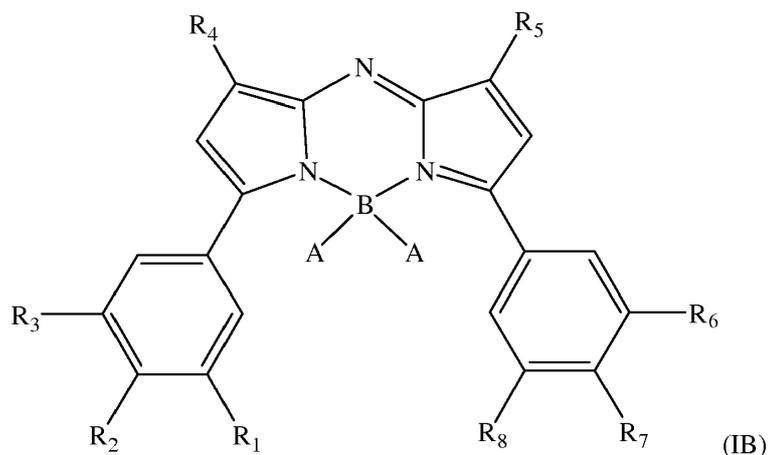
25

Los compuestos de fórmula (IB) son útiles en la preparación de compuestos de fórmula (I), incluyendo compuestos de fórmula (IA).

- 30 Los compuestos de la invención pueden prepararse según el esquema A:

Esquema A





Compuestos de fórmula (IV) a compuestos de fórmula (IB):

5 La invención proporciona además un método de preparación de un compuesto de fórmula (IB), en donde el método comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IV), en donde R₁ - R₈ son tal como se definieron anteriormente para los compuestos de fórmula (IB), con trihaluro de boro o un derivado del mismo.

10 Pueden formarse compuestos de fórmula (IB) en donde cada A es O-Y, haciendo reaccionar un producto formado por la reacción anterior con un alcóxido adecuado.

Los trihaluros de boro adecuados incluyen trifluoruro de boro, tricloruro de boro, tribromuro de boro y triioduro de boro, preferiblemente trifluoruro de boro. Se prefiere un derivado de trifluoruro de boro, especialmente dietileterato de trifluoruro de boro (BF₃OEt₂).

15 La reacción puede llevarse a cabo en presencia de una base adecuada. Las bases adecuadas incluyen diisopropilamina (DIEA, base de Hünig), trietilamina y carbonato de cesio, preferiblemente diisopropilamina.

20 Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo en presencia de un disolvente adecuado. Los disolventes adecuados incluyen THF, diclorometano (CH₂Cl₂), tolueno y benceno, preferiblemente diclorometano (CH₂Cl₂).

25 Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (IV), R₁ es H, R₂ es OH, R₃ es H, R₄ es Ph, R₅ es Ph, R₆ es H, R₇ es OH y R₈ es H, en donde el compuesto de fórmula (IV) es [5-(4-hidroxifenil)-3-fenil-1*H*-pirrol-2-il]-[5-(4-hidroxifenil)-3-fenilpirrol-2-ilidene]amina.

De manera conveniente, los compuestos de fórmula (IV) también forman parte de la invención.

Compuestos de fórmula (III) a compuestos de fórmula (IV):

5 El compuesto de fórmula (IV) puede prepararse haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (III), en donde $R_1 - R_8$ son tal como se definieron anteriormente para los compuestos de fórmula (IB), con una fuente de amonio en un disolvente adecuado.

10 Las fuentes de amonio adecuadas incluyen cloruro de amonio, acetato de amonio y formiato de amonio, preferiblemente acetato de amonio.

Los disolventes adecuados incluyen THF, diclorometano (CH_2Cl_2), etanol y alcohol isopropílico, preferiblemente etanol.

15 Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (III), R_1/R_6 es H, R_2/R_7 es OH, R_3/R_8 es H y R_4/R_5 es Ph, en donde el compuesto de fórmula (III) es 1-(4-hidroxifenil)-4-nitro-3-fenilbutan-1-ona.

De manera conveniente, los compuestos de fórmula (III) también forman parte de la invención.

20 Compuestos de fórmula (II) a compuestos de fórmula (III):

El compuesto de fórmula (III) puede prepararse haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (II), en donde $R_1 - R_8$ son tal como se definieron anteriormente para los compuestos de fórmula (IB), con una fuente de nitro-metileno en un disolvente adecuado.

25 Una fuente de nitro-metileno adecuada es nitrometano.

Los disolventes adecuados incluyen THF, diclorometano (CH_2Cl_2), metanol, etanol, preferiblemente etanol.

30 Preferiblemente, en el compuesto de fórmula (II), R_1/R_6 es H, R_2/R_7 es OH, R_3/R_8 es H y R_4/R_5 es Ph, en donde el compuesto de fórmula (II) es una chalcona conocida, disponible de TCI laboratory Chemicals.

Compuestos de fórmula (IB) a compuestos de fórmula (I):

35 La invención proporciona además un método de preparación de un compuesto de fórmula (I), en donde el método comprende convertir al menos un grupo OH de un compuesto de fórmula (IB) en O-L-X, en presencia de un disolvente adecuado.

40 Los disolventes adecuados incluyen THF, diclorometano (CH_2Cl_2), acetonitrilo, tolueno, DMF y acetona, preferiblemente THF.

La reacción puede llevarse a cabo en presencia de una base adecuada. Las bases adecuadas incluyen NaH, diisopropiletilamina (DIEA, base de Hünig), trietilamina y carbonato de cesio, preferiblemente NaH.

45 Preferiblemente, la conversión del al menos un grupo OH en O-L-X se logra mediante alquilación del al menos un grupo OH.

50 Preferiblemente, la conversión del al menos un grupo OH en O-L-X implica la conversión de al menos dos grupos OH en O-L-X. Además preferiblemente, al menos un grupo O-L-X se proporciona en uno de R_1 , R_2 y R_3 del compuesto de fórmula (I), y al menos un grupo O-L-X se proporciona en uno de R_6 , R_7 y R_8 del compuesto de fórmula (I). Más preferiblemente, sólo uno O-L-X grupo se proporciona en uno de R_1 , R_2 y R_3 del compuesto de fórmula (I), y sólo uno O-L-X grupo se proporciona en uno de R_6 , R_7 y R_8 del compuesto de fórmula (I), en donde, además preferiblemente, una X es un grupo de conjugación y la otra X es un grupo de solubilización en agua.

55 Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (IA).

La invención todavía proporciona además un conjugado de colorante, que comprende (i) un compuesto de fórmula (I) que tiene al menos un grupo de conjugación X, y (ii) un grupo de unión complementario; en donde el grupo de conjugación X puede unir de manera covalente el compuesto de fórmula (I) al grupo de unión complementario.

60 Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (IA).

Los grupos de unión adecuados incluyen ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, ésteres, aminas, tioles, azidas y avidinas.

65 Los grupos de conjugación y grupos de unión complementarios adecuados incluyen lo siguiente:-

(a) una amina como grupo de conjugación y un ácido carboxílico, aldehído, cetona o éster como grupo de unión complementario;

5 (b) un ácido carboxílico como grupo de conjugación y una amina como grupo de unión complementario;

(c) un éster succinimidílico como grupo de conjugación y una amina como grupo de unión complementario;

10 (d) una maleimida como grupo de conjugación y un tiol como grupo de unión complementario;

(e) un alquino como grupo de conjugación y una azida como grupo de unión complementario;

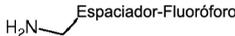
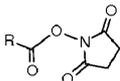
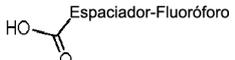
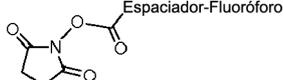
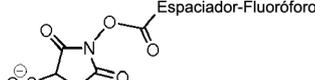
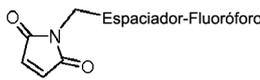
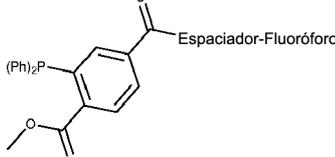
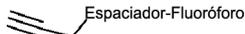
15 (f) un éster *ortho*-diarilfosfonil-aril-metilico como grupo de conjugación y una azida como grupo de unión complementario; y

(g) biotina como grupo de conjugación y avidina como grupo de unión complementario.

Algunos de estos grupos de conjugación y grupos de unión complementarios se indican en la tabla 2 a continuación, en donde el grupo de unión complementario se denomina resto reactivo:

20

Tabla 2

Grupo conjugable	Resto reactivo
	R-CO ₂ H o 
	R-NH ₂
	R-NH ₂
	R-NH ₂
	R-SH
	R-N ₃
	R-N ₃

25 El grupo de unión puede formar parte de una molécula mayor que incluye, pero no se limita a, ácidos nucleicos, nucleótidos, hidratos de carbono, fármacos, polímeros, péptidos, proteínas, anticuerpos, lípidos que incluyen formas de nanopartículas de los mismos; y otros materiales químicos sintéticos o derivados de manera biológica que incluyen formas de nanopartículas de los mismos.

30 Una molécula de este tipo puede, si se desea, estar en forma de o unirse a partículas sintéticas. Tales partículas pueden estar en forma de nanopelotas, que tienen preferiblemente un diámetro de desde aproximadamente 0,5 nm hasta aproximadamente 500 nm, más preferiblemente desde aproximadamente 5 nm hasta aproximadamente 500 nm, más preferiblemente desde aproximadamente 50 nm hasta aproximadamente 200 nm, lo más preferiblemente de aproximadamente 100 nm.

35 Las nanopelotas adecuadas incluyen poliestireno, oro o plata. Se apreciará que pueden usarse otras nanopelotas metálicas y/o inorgánicas.

La invención todavía proporciona además el uso de un compuesto de fórmula (I) en el marcaje fluorescente de una

molécula para producir un conjugado de colorante. Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (IA).

5 La invención incluso proporciona además el uso de un compuesto de fórmula (I) como un colorante fluorescente soluble en agua. Preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (IA).

Ventajas de la invención:

- 10 • Los compuestos tienen fuerte absorción y emisiones dentro de la región espectral de NIR.
- Los compuestos tienen alta fotoestabilidad.
- Los compuestos son versátiles y tienen muchos usos comerciales:
 - 15 ◦ Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando OH está presente, los compuestos pueden ser sensibles al pH, en donde la fluorescencia puede activarse o desactivarse según se desee.
 - En otras realizaciones, los grupos de solubilización en agua potencian ventajosamente la solubilidad de los compuestos de la invención en disolución acuosa.
 - 20 ◦ En todavía otras realizaciones, los grupos de conjugación permiten que el compuesto se una de manera covalente a un grupo de unión complementario, formando un conjugado de colorante. Cuando dos grupos X están presentes, y una X es un grupo de conjugación y la otra X es un grupo de solubilización en agua, preferiblemente facilitado por una etapa de desimetrización durante la fabricación, el compuesto puede unirse a un grupo de unión complementario, con el grupo de solubilización en agua de manera conveniente potenciando la solubilidad de los compuestos en disolución acuosa. Cuando dos grupos X están presentes, y ambas X son COOH, el compuesto puede unirse de manera conveniente a dos grupos de unión complementarios separados en moléculas pequeñas, por ejemplo, dos grupos amina en dos péptidos pequeños.
 - 25 ◦ Los compuestos pueden unirse a partículas tales como nanopérlas.
 - Se ha encontrado que los colorantes de conjugados de nanopartículas poliméricas de la invención presentan un aumento drástico en la intensidad fluorescente tras la entrada en una célula, normalmente al menos un aumento de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, o 10 veces en la intensidad fluorescente cuando se compara con la intensidad fluorescente cuando el colorante de conjugado está fuera de la célula.
 - 30
 - 35

La invención se describirá además, con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos:-

40 Breve descripción de los dibujos

La invención se entenderá más claramente a partir de la siguiente descripción de una realización de la misma, dada a modo ejemplo únicamente, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:-

45 Figura 1. Espectros de fluorescencia sensible al pH de 2. traza A pH = 6,0, traza B pH = 9,0. Excitación a 640 nm, anchuras de ranura 10 nm, 5×10^{-7} M en agua/CrEL. $I_{\text{NaCl}} = 150$ mmol/l. Inserción; gráfica sigmoidea que predice un valor de pKa de 6,9.

Figura 2. Espectros de UV-visible de 2 en diversos disolventes. Disolventes CHCl_3 (A); tolueno (B), etanol (C), $\text{H}_2\text{O/CrEl}$ (D).

50 Figura 3. Espectros de fluorescencia de 2 en diversos disolventes. Disolventes CHCl_3 (A); tolueno (B), etanol (C), $\text{H}_2\text{O/CrEl}$ (D).

Figura 4. Perfil de conversión de pH de UV-visible de 2 a $2 - \text{H}^+$ a 5×10^{-6} M en agua/CrEL, $I_{\text{NaCl}} = 150$ mmol/l. Recuadro: Respuesta colorimétrica de 2; LHS pH = 6,8, RHS pH = 8,8.

Figura 5. Espectros de UV-visible (5×10^{-6} M) y fluorescencia (5×10^{-7} M) normalizados de 8a ($\lambda_{\text{máx}} 687/716$ nm; A), 8b ($\lambda_{\text{máx}} 687/716$ nm; B) y 8c ($\lambda_{\text{máx}} 687/716$ nm; C) en MeOH.

60 Figura 6. Intensidad de fluorescencia relativa a 730 nm de 8a a pH 6,1, 6,6, 7,2, 7,6 y 8,0. Excitación a 640 nm, anchuras de ranura 20 nm, 5×10^{-7} M en agua/CrEL. $I_{\text{NaCl}} = 150$ mmol/l.

Figura 7. Imagen de fluorescencia confocal de células MDA-MB-231 tras tratamiento con tampones a pH 8,0 y 6,5. 8a (color rojo) y tinción DAPI nuclear (color azul).

65

- Figura 8. Obtención de imágenes de apilamiento Z mediante microscopía de barrido láser confocal de 8a en células CAKI-1.
- Figura 9. Perfil espectral de pH de UV-visible de 8a: pH = 6,0 = traza A; pH = 9,0 = traza B.
- 5 Figura 10. Perfil espectral de pH de fluorescencia de 8a: pH = 6,0 = traza A; pH = 9,0 = traza B.
- Figura 11. Gráfica sigmoidea de pH de fluorescencia para 8a.
- 10 Figura 12. Espectros de absorción (5×10^{-6} M) y emisión (5×10^{-7} M) normalizados de 9 (A), 10 (B) y 12 (C) en EtOH.
- Figura 13. Espectros de fluorescencia y UV-visible de 9 en diferentes disolventes.
- 15 Figura 14. Conjugación de 11a con lisosima en DMSO/agua.
- Figura 15. Conjugación de 11a con lisosima en THF/agua.
- Figura 16. Conjugación de 10 equiv. de 11b con lisosima en NaHCO_3 0,1 M a pH = 8,3.
- 20 Figura 17. Conjugación de 20 equiv. de 11b con lisosima en NaHCO_3 0,1 M a pH = 8,3.
- Figura 18. Conjugación de 10 equiv. de 11b con tripsina en PBS a pH = 7,5.
- 25 Figura 19. MALDI-MS de lisosima conjugada con cinco equiv. de 6b. Di-conjugado 15.904; tri-conjugado 16.704; tetra-conjugado 17.503; penta-conjugado 18.305.
- Figura 20. Espectros de absorción (izquierda) y emisión (derecha) normalizados de lisozima (A) y tripsina (B) en PBS acuoso.
- 30 Figura 21. Espectros de absorción (izquierda) y emisión (derecha) normalizados de 16 (A), 17 (B) y 21 (C) en CHCl_3 .
- Figura 22. La absorción (izquierda) y fluorescencia (derecha) de 16 (A), 17 (B) y 21 (C) en metanol. Los espectros de fluorescencia se tomaron tras excitación a 640 nm.
- 35 Figura 23. La estabilidad de 16 en PBS (pH = 7,0) que contiene el 3% de BSA. Se tomaron los espectros después de 24 h (A) y 48 h (B) de exposición a la luz del sol. Las líneas continuas y discontinuas representan la absorción relativa y fluorescencia respectivamente.
- 40 Figura 24. La estabilidad de 17 en PBS (pH = 7,0) que contiene el 3% de BSA. Se tomaron los espectros después de 24 h (A) y 48 h (B) de exposición a la luz del sol. Las líneas continuas y discontinuas representan la absorción relativa y fluorescencia respectivamente.
- 45 Figura 25. La estabilidad de 21 en PBS (pH = 7,0) que contiene el 3% de BSA. Se tomaron los espectros después de 24 h (A) y 48 h (B) de exposición a la luz del sol. Las líneas continuas y discontinuas representan la absorción relativa y fluorescencia respectivamente.
- 50 Figura 26. Espectros de absorción (izquierda) y emisión (derecha) normalizados de 16 (A), 17 (B), y 21 (C) en DMEM. El espectro de absorción por debajo de 600 nm no se muestra debido a enmascaramiento por el colorante rojo de fenol contenido en DMEM.
- Figura 27. Imágenes de CLSM de células MDA-MB-231 tras 1 h de incubación con disolución 5 μM de (a) 16 y (b) 17. Barras de escala, 10 μm .
- 55 Figura 28. Imágenes de CLSM de (a) células de *E. coli* y (b) *S. aureus* tras 10 min de incubación con disolución 4 μM de 21. Barras de escala, 1 μm .
- Figura 29. Célula MDA-MB-231 individual tras incubación con 16. Barra de escala 10 μm .
- 60 Figura 30. Análisis de apilamiento Z de CLSM de 16 en células MDA-MB-231.
- Figura 31. Análisis de apilamiento Z de CLSM 17 en células MDA y cotinción nuclear con DAPI (color azul). Barra de escala 5 μm .
- 65 Figura 32. Espectros de absorbancia (línea continua) y fluorescencia (línea discontinua) de 16 (A), 17 (B) y 21 (C) en

disoluciones de PBS/BSA.

Figura 33. Espectro de emisión de perlas funcionalizadas a 200 nm en H₂O. $\lambda_{\text{máx}}$ de fluorescencia de nanopérlas a 727 nm.

Figura 34. Imagen confocal de perlas funcionalizadas a 200 nm. Imagen adquirida usando un filtro de recogida de paso largo a 650 nm y excitación a 633 nm. Barra de escala, 1 μm .

Figura 35. Imagen confocal de células MDA con perlas funcionalizadas a 200 nm internalizadas. Imagen adquirida usando un filtro de recogida de paso largo a 650 nm y excitación a 633 nm.

Figura 36. Imagen confocal de una única célula MDA con perlas funcionalizadas a 200 nm internalizadas. Imagen adquirida usando un filtro de recogida de paso largo a 650 nm y excitación a 633 nm.

Figura 37. Transcurso temporal de imágenes confocales en tiempo real de fluorescencia de células HEK293T con nanopérlas conjugadas.

Figura 38. Transcurso temporal de imágenes confocales en tiempo real de fluorescencia de células CAKI-1 con nanopérlas conjugadas.

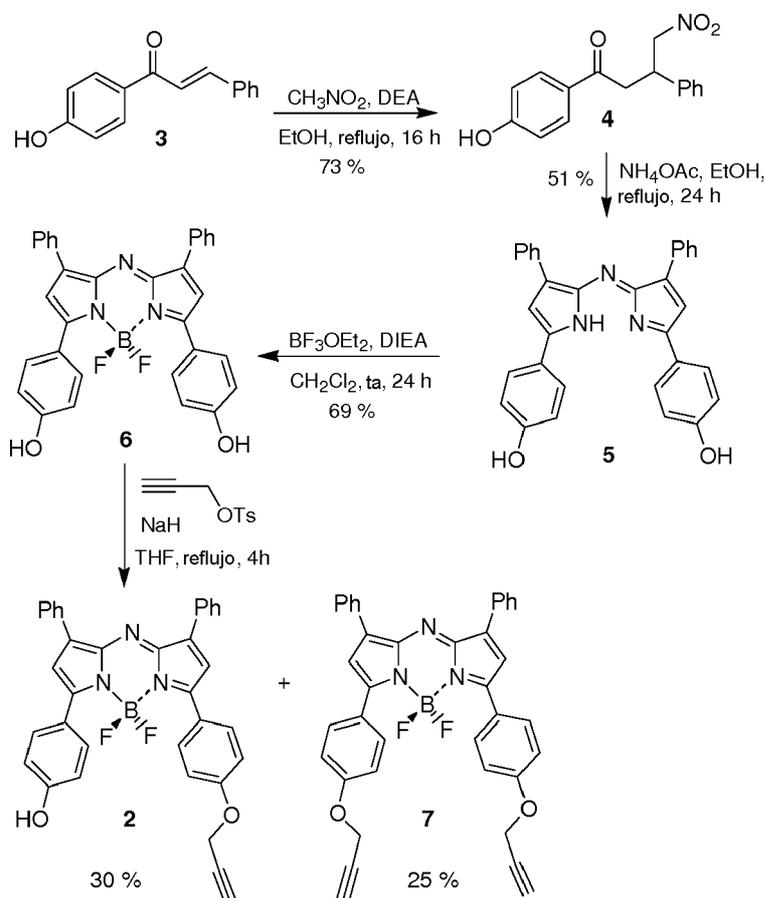
Figura 39. Obtención de imágenes de ganglios linfáticos por fluorescencia *in vivo* tomadas 30 segundos después de inyección intradérmica de partículas conjugadas de colorante en el pie izquierdo del ratón.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1: compuesto 6

Se preparó el compuesto 6, que es un compuesto de fórmula (IB), tal como sigue. Con referencia al esquema 1, la ruta de síntesis comenzó con una adición de nitrometano a chalcona 3, que es un compuesto de fórmula (II), que dio 1-(4-hidroxifenil)-4-nitro-3-fenilbutan-1-ona 4, que es un compuesto de fórmula (III), con un rendimiento del 73%.

Esquema 1



Se logró la generación posterior del azadipirrometeno sustituido con bis-fenol 5, que es un compuesto de fórmula (IV), mediante el reflujo de 4 con acetato de amonio en etanol durante 24 h. La filtración del precipitado a partir de la mezcla de reacción en bruto dio el producto puro con un rendimiento del 51%. Se convirtió el compuesto 5 en su análogo quelado BF₂ 6 con dietileterato de BF₃ y diisopropiltilamina (DIEA) en diclorometano durante 24 h. Se obtuvo un rendimiento aislado del 69% de 6 tras cromatografía sobre gel de sílice. Puede usarse el compuesto 6 ventajosamente para preparar una amplia variedad de compuestos (I) según la invención, tal como se describe en los ejemplos 2(A), 3(A), 4 y 6, y también una amplia variedad de conjugados de colorante según la invención, tal como se describe en los ejemplos 2(B), 3(B) y 5.

Detalles adicionales de los productos 4, 5 y 6 y síntesis de los mismos se proporcionan a continuación.

1-(4-Hidroxifenil)-4-nitro-3-fenilbutan-1-ona (4).

Se trató una disolución de 1-(4-hidroxifenil)-3-fenilpropenona 3 (9 mmol) en EtOH (15 ml) con dietilamina (4,6 ml, 45 mmol) y nitrometano (4,8 ml, 90 mmol) y se calentó a reflujo durante 16 h. Se enfrió la disolución y se acidificó con HCl 4 M, se repartió entre EtOAc (50 ml) y H₂O (50 ml). Se separó la fase orgánica, se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a presión reducida. Se agitó el residuo en Et₂O frío (30 ml) durante 10 min y se filtró para dar el producto 4 como un sólido incoloro (1,84 g, 73%), p.f. 112-113°C (MeOH). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7,86 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,35-7,26 (m, 5H), 6,85 (d, *J* = 8,5, 2H), 5,44 (s, 1H), 4,86-4,80 (m, 1H), 4,64-4,71 (m, 1H), 4,25-4,16 (m, 1H), 3,46-3,31 (m, 2H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 195,3, 160,3, 139,2, 130,6, 129,6, 129,0, 127,8, 127,4, 115,4, 79,6, 41,1, 39,4. IR (disco de KBr): 3427, 1646 cm⁻¹. ES-MS: *m/z* 284,1 [M - H]⁻. HRMS [M + Na]⁺: 308,0887, C₁₆H₁₅NNaO₄⁺ requiere 308,0899.

[5-(4-Hidroxifenil)-3-fenil-1H-pirrol-2-il]-[5-(4-hidroxifenil)-3-fenilpirrol-2-iliden]amina (5).

Se calentaron el compuesto 4 (2,0 g, 7,0 mmol) y acetato de amonio (18,9 g, 245 mmol) en EtOH (50 ml) a reflujo durante 24 h. Se enfrió la reacción hasta t.a., se filtró el precipitado y se lavó el sólido aislado lavado con etanol frío (20 ml) para dar el producto 5 como un sólido negro azulado (0,86 g, 51%), p.f. 245-246°C (MeOH). ¹H RMN (300 MHz, MeOD): δ 7,99 (d, *J* = 6,6 Hz, 4H), 7,79 (d, *J* = 8,7 Hz, 4H), 7,36-7,29 (m, 6H), 7,20 (s, 2H), 6,92 (d, *J* = 8,7 Hz, 4H), (NH, OH no observado). ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): δ 159,9, 154,5, 148,8, 141,5, 133,9, 128,6, 128,0, 127,7, 127,3, 123,4, 115,8, 113,8. IR (disco de KBr): 3054, 1603, 1265 cm⁻¹. ES-MS: *m/z* 482,3 [M + H]⁺. HRMS [M + H]⁺: 482,1851, C₃₂H₂₄N₃O₂ requiere 482,1869.

Quelato BF₂ de [5-(4-hidroxifenil)-3-fenil-1H-pirrol-2-il]-[5-(4-hidroxifenil)-3-fenilpirrol-2-iliden]amina (6).

Se disolvió el compuesto 5 (0,15 g, 0,31 mmol) en CH₂Cl₂ seco (15 ml), se trató con diisopropiltilamina (0,54 ml, 3,11 mmol) y dietileterato de BF₃ (0,55 ml, 4,35 mmol), y se agitó bajo N₂ durante 24 h. Se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc (30 ml), se lavó con agua (30 ml) y se evaporó la fase orgánica hasta sequedad. La purificación mediante cromatografía en columna sobre sílice que se eluye con CH₂Cl₂/EtOAc (4:1) dio el producto 6 como un sólido metálico rojo (113 mg, 69 %), p.f. 253-254°C (MeOH). ¹H RMN (300 MHz, MeOD): δ 8,08-8,05 (m, 8H), 7,40-7,30 (m, 6H), 7,20 (s, 2H), 6,91- 6,88 (m, 4H), (OH no observado). ¹³C RMN (125 MHz, MeOD): δ 160,5, 157,9, 144,8, 142,3, 132,3, 131,7, 128,9, 128,7, 128,0, 122,7, 118,3, 115,2. IR (disco de KBr): 3351, 1605 cm⁻¹. ES-MS: *m/z* 530,3 [M + H]⁺. HRMS [M + H]⁺: 530,1876, C₃₂H₂₃BF₂N₃O₂ requiere 530,1851.

Ejemplo 2(A): compuesto 2: compuesto sensible al pH que comprende un grupo de conjugación

Con referencia al esquema 1, la síntesis del compuesto 2, que es un compuesto de fórmula (I), específicamente, un compuesto de fórmula (IA), requirió una etapa de desimetrización que implica alquilación de uno de los dos grupos fenol de 6. Esta alquilación se llevó a cabo usando 2,2 equiv. de propargiltosilato y NaH en THF durante 4 h a reflujo. Se encontró que estas condiciones específicas sesgaban la distribución de productos mono- 2 y bis-alquilados 7 hacia el derivado mono sustituido (esquema 1). Aprovechar la gran diferencia de polaridad entre 2 y 7 permitía una fácil separación sobre cromatografía en gel de sílice y dio productos en rendimientos aislados del 30 y el 25% respectivamente.

A continuación se proporcionan detalles adicionales de los productos 2 y 7 y síntesis de los mismos.

Quelato BF₂ de 4-{4-fenil-5-[3-fenil-5-(4-prop-2-iniloxifenil)-pirrol-2-ilidenamino]-1H-pirrol-2-il}fenol (2).

Se agitaron el compuesto 6 (75 mg, 0,14 mmol) y NaH (dispersión de aceite al 60%) (12 mg, 0,52 mmol) en THF seco (8 ml) y se trataron con propargiltoluolsulfonato (12 mg, 0,31 mmol) a 0°C bajo N₂. Se templó la reacción hasta t.a. y luego se calentó a reflujo durante 3 h. Se enfrió la mezcla de reacción y se repartió entre EtOAc (10 ml) y salmuera (20 ml). Se separó la fase orgánica, se secó sobre sulfato de sodio y se eliminó el disolvente a presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna sobre sílice que se eluye con C₆H₁₂/EtOAc (4:1) eluyó en primer lugar el compuesto 7 (21 mg, 25%) 166-169°C seguido por el producto deseado eluido con C₆H₁₂/EtOAc

(3:2) 2 como un sólido metálico rojo (25 mg, 30%, p.f. 82-84°C).

Análisis para 2

5 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,09-7,99 (m, 8H), 7,47-7,38 (m, 6H), 7,07 (d, *J* = 8,7 Hz, 2H), 7,02 (s, 2H), 6,88 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H), 5,6 (s a, 1H), 4,75 (s, 2H), 2,55 (s, 1H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 159,8, 158,7, 158,4, 157,7, 145,5, 145,2, 143,5, 143,1, 132,4, 132,3, 131,8, 131,5, 131,4, 131,3, 129,3, 129,2, 128,5, 125,0, 124,1, 118,8, 118,5, 115,8, 115,0, 78,0, 76,0, 55,9. IR (disco de KBr): 3502, 1603 cm⁻¹. ES-MS: *m/z* 568,4, [M + H]⁺. HRMS [M + H]⁺: 568,2034, C₃₅H₂₅BF₂N₃O₂ requiere 568,2008.

10

Análisis para 7

15 ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8,12-8,07 (m, 8H), 7,49-7,42 (m, 6H), 7,06 (d, *J* = 9,1 Hz, 2H), 7,02 (s, 2H), 4,79 (s, 4H), 2,58 (s, 2H). ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 159,8, 158,1, 145,4, 143,4, 132,4, 131,6, 131,5, 129,2, 128,5, 124,9, 118,7, 115,0, 78,0, 76,0, 55,8. IR (disco de KBr): 1601, 1504 cm⁻¹. ES-MS: *m/z* 606,2, [M + H]⁺. HRMS [M + H]⁺: 606,2135, C₃₈H₂₇BF₂N₃O₂ requiere 606,2164.

20 Las propiedades espectrales de 2 en disolventes orgánicos fueron muy similares al compuesto de la técnica anterior 1 con los máximos de absorción y emisión de 2 en CHCl₃ a 680 y 708 nm respectivamente con un alto rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_f) de 0,37 (tabla 3).

Tabla 3

Propiedades de absorción/emisión de 2

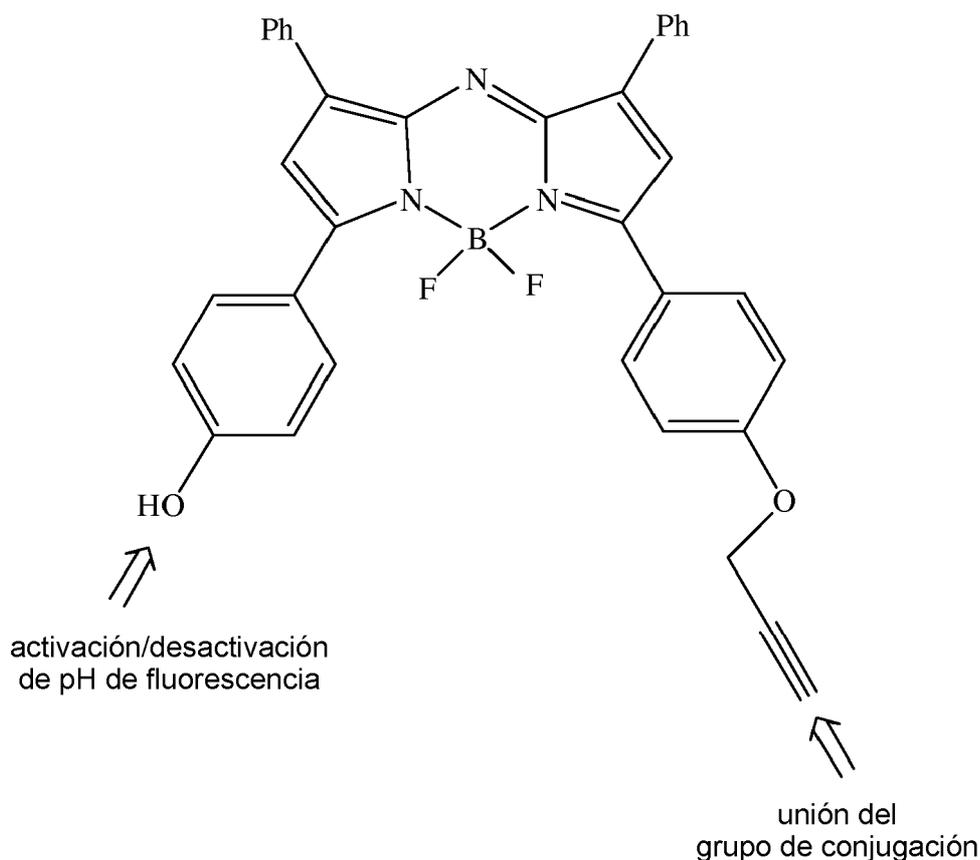
entrada	disolvente	λ _{máx} abs (nm) ^a	λ _{máx} flu (nm) ^b
1	CHCl ₃	680	708 ^c
2	C ₇ H ₈	685	711
3	CH ₃ OH	688	716
4	H ₂ O/CrEL	700	729

^a(5x10⁻⁶ M). ^b(5x10⁻⁷ M). ^c Φ_f = 0,37 (1 como patrón).

25 Las características espectrales mostraron una ligera dependencia tras dipolaridad de disolvente con un desplazamiento batocromático de 8 nm para máximo de absorbancia y emisión en metanol. Además, una disolución acuosa generada por formulación usando Cremophor EL (CrEL) mostró pequeños desplazamientos batocromáticos adicionales (700/729 nm) en comparación con disolventes orgánicos.

30 Al contrario que 1, las propiedades espectrales de 2 presentaron una respuesta sorprendente a través del intervalo de pH fisiológico (figura 1). La respuesta de estado excitado de 2 a la λ_{máx} de 729 nm en disoluciones acuosas mostró un diferencial de intensidad de fluorescencia de más de 15 veces entre pH 6 y 8 con supresión prácticamente completa de la señal de fluorescencia a pH 9 (figura 1). Una gráfica sigmoidea de pH frente a intensidad de fluorescencia predijo un pK_a aparente de 6,9 (figura 1, recuadro). Se ilustran propiedades espectrales adicionales en las figuras 2, 3 y 4. Tal como se esperaría para un proceso ICT, el espectro de UV-visible de 2 estaba influido fuertemente por el pH (figura 4). La banda de absorción a 700 nm se redujo progresivamente en intensidad con pH creciente y una nueva banda apareció a 775 nm con un punto isobéptico a 740 nm indicativo de la formación de una especie mono-desprotonada.

40 El compuesto 2 proporciona la ventaja de ser tanto sensible al pH por medio del grupo OH, como conjugable por medio del grupo alquino, tal como se ilustra a continuación.



2

Ejemplo 2(B): compuestos 8a, 8b, 8c: conjugados de colorante sensibles al pH

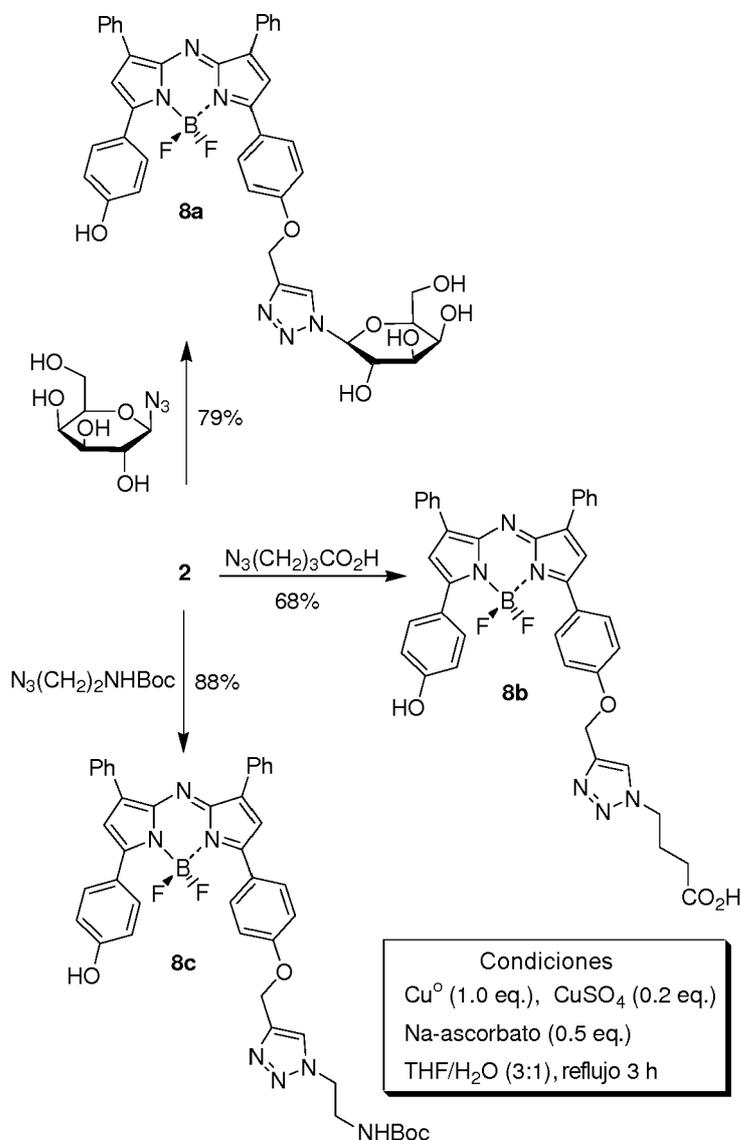
- 5 En la técnica anterior, junto con características fotofísicas óptimas, a menudo se han adoptado dos enfoques complementarios para potenciar la diferenciación del objetivo de obtención de imágenes a partir del fluoróforo de fondo. El primero, y más común, es el uso de fluoróforos conjugados generados por la unión covalente de una (bio)molécula de direccionamiento a la sonda fluorescente que facilita una acumulación selectiva objetivo de fluoróforo. Un enfoque alternativo es la modulación de la señal de intensidad de fluorescencia (de baja a alta) en respuesta a un reconocimiento molecular específico en la diana endógena. A pesar del éxito de ambas estrategias, una combinación de ambos procesos rara vez se investiga. En este caso, se señala una estrategia para lograr un prototipo de plataforma fluorescente en el NIR sensible al pH y conjugable con azida. Se propuso que la operación de activación/desactivación de la fluorescencia estaría regida por una interconversión de fenol/fenolato directa en el fluoróforo, con conjugación a un motivo de direccionamiento molecular por medio de una cicloadición de alquino-azida. Hasta la fecha, existen pocos informes de la bibliografía de fluoróforos sensibles al pH en el NIR a pesar de sus aplicaciones de imagen potenciales para estados patológicos que pueden inducir cambios localizados intra y extracelulares de pH, tales como cánceres, insuficiencia renal e isquemia.

20 Se investigó si 2 podría realizar conjugación por medio de cicloadición de azida y la modulación de pH de la salida de intensidad de fluorescencia se controlaría por una interconversión de fenol/fenolato. Las condiciones acuosas suaves requeridas para cicloadiciones de azida-alquino ofrecen claras ventajas cuando se utilizan para reacciones de bioconjugación.

25 Con referencia al esquema 2, con el fin de demostrar la tolerancia del grupo funcional de reacciones de azida con 2, se sometieron a prueba tres azidas que contienen sustituyentes amino, carboxilo e hidrato de carbono. Las condiciones de reacción optimizadas con 1-azido-1-desoxi- β -D-galactopiranosido, ácido 4-azidobutírico y éster *t*-butílico del ácido (2-azidoetil)carbámico se identificaron como $\text{CuSO}_4 / \text{Cu} / \text{ascorbato de sodio}$ en THF / H_2O (3:1) a reflujo durante 3 h (esquema 2). Se eliminaron las sales de cobre mediante extracción acuosa y se aislaron cicloaductos 8a-c con buenos rendimientos del 68 al 88% tras o bien recristalización en metanol o bien cromatografía en columna.

30

Esquema 2. Reacciones de cicloadición de azida



Detalles adicionales de los productos 8a, 8b y 8c, y síntesis de los mismos se proporcionan a continuación.

5 *2-Hidroximetil-6-[4-(4-{5-[5-(4-hidroxifenil)-3-fenil-1H-pirrol-2-ilimino]-4-fenil-5H-pirrol-2-il]-fenoximetil)-[1,2,3]triazol-1-il]-tetrahidropiran-3,4,5-triol (8a)*

Se trató una disolución de 2 (0,14 g, 0,24 mmol) y 1-azido-1-desoxi-β-D-galactopiranosido (0,12 g, 0,64 mmol) en THF:H₂O (20 ml, 3:1) con una disolución de THF:H₂O (15 ml, 3:1) de Cu(0) (15 mg, 0,24 mmol), CuSO₄·5H₂O (8 mg, 0,049 mmol) y Na-ascorbato (24 mg, 0,12 mmol). Se calentó la mezcla de reacción durante 3 h bajo N₂, se enfrió y se repartió entre EtOAc (30 ml) y agua (30 ml). Se volvió a extraer la fase acuosa con EtOAc (2 x 30 ml) y se secaron las fases orgánicas combinadas y se evaporaron hasta sequedad a presión reducida. La recristalización en MeOH dio el producto 8a como un sólido verde oscuro (142 mg, 79%, p.f. 180-182°C). ¹H RMN (300 MHz, MeOD): δ 8,36 (s, 1H), 8,14-8,10 (m, 8H), 7,48-7,35 (m, 6H), 7,34 (s, 1H), 7,21 (s, 1H), 7,17 (d, J = 9,1 Hz, 2H), 6,91 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 5,60 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 5,32 (s, 2H), 4,52 (s a, 1H), 4,18 (t, J = 9,5 Hz, 1H), 4,08 (m, 1H), 3,87-3,70 (m, 5H). ¹³C RMN (125 MHz, THF-d₈): δ 161,1, 160,9, 159,1, 156,9, 145,4, 144,7, 143,0, 142,9, 141,8, 132,8, 132,6, 132,2 (t, J = 5 Hz), 131,5 (t, J = 5 Hz), 129,1, 129,0, 128,8, 128,6, 128,2, 124,5, 122,5, 122,0, 119,0, 118,2, 115,4, 114,5, 88,8, 78,8, 74,5, 70,4, 69,0, 61,9, 61,4. IR (disco de KBr): 1596, 1455 cm⁻¹. ES-MS: m/z 771,6 [M-H]⁻. HRMS [M + H]⁺: 773,2717, C₄₁H₃₆BF₂N₆O₇ requiere 773,2707.

20 *Ácido 4-[4-(4-{5-[5-(4-Hidroxifenil)-3-fenil-1H-pirrol-2-ilimino]-4-fenil-5H-pirrol-2-il]-fenoximetil)-[1,2,3]triazol-1-il]butírico (8b)*

Se trató una disolución de **2** (0,12 g, 0,21 mmol) y ácido 4-azidobutírico (68 mg, 0,53 mmol) en THF:H₂O (15 ml, 3:1) con una disolución de THF:H₂O (15 ml, 3:1) de Cu(0) (13 mg, 0,21 mmol), CuSO₄·5H₂O (7 mg, 0,042 mmol) y Na-ascorbato (21 mg, 0,1 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 3 h bajo N₂, se enfrió hasta t.a. y se repartió entre EtOAc (25 ml) y agua (25 ml). Se volvió a extraer la fase acuosa con EtOAc (2 x 30 ml) y se secaron las fases orgánicas combinadas y se evaporaron hasta sequedad a presión reducida. La recristalización de MeOH dio el producto **8b** como un sólido metálico rojo (99 mg, 68%), p.f. 194-200°C. ¹H RMN (300 MHz, MeOD): δ 8,16-8,12 (m, 8H), 7,9 (s a, 1H) 7,47-7,38 (m, 6H), 7,35 (s, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,17 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,93 (d, J = 8,2 Hz, 2H), 5,30 (s, 2H), 4,43 (t, 7 Hz, 2H), 2,47 (s a, 1H), 2,30 (m, 2H), 2,17 (m, 2H). ¹³C RMN (125 MHz, THF-*d*8): δ 172,7, 161,0, 160,9, 159,0, 157,0, 145,4, 144,7, 142,8, 141,9, 132,8, 132,6, 132,2 (t, J = 5 Hz), 131,5 (t, J = 5 Hz), 129,1, 129,0, 128,8, 128,6, 128,2, 128,2, 124,5, 122,6, 118,9, 118,2, 115,4, 114,5, 62,1, 48,8, 29,8, 25,5. IR (disco de KBr): 3404, 3055, 1725, 1593 cm⁻¹. ES-MS: *m/z* 695,6 [M-H]⁻. HRMS [M + Na]⁺: 719,2382, C₃₉H₃₁BF₂N₆O₄Na requiere 719,2366.

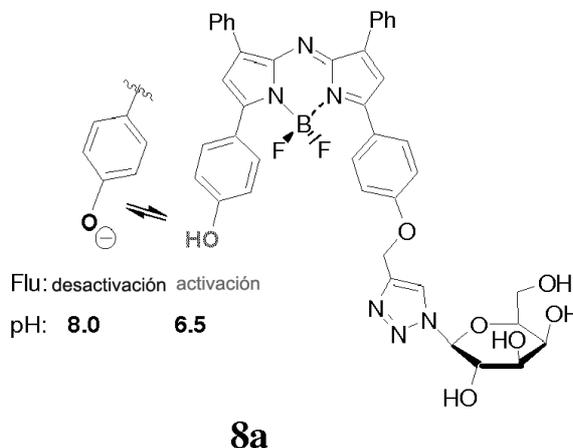
15 Éster *t*-butílico del ácido {2-[4-(4-{5-[5-(4-Hidroxifenil)-3-fenil-1H-pirrol-2-ilimino]-4-fenil-5H-pirrol-2-il)-fenoximetil]-1,2,3}triazol-1-il]etil}carbámico (**8c**).

Se trató una disolución de **2** (0,33 g, 0,59 mmol) y éster *t*-butílico del ácido (2-azidoetil)carbámico (0,19 g, 1,47 mmol) en THF:H₂O (40 ml, 3:1) con una disolución de THF:H₂O (20 ml, 3:1) de Cu(0) (37 mg, 0,59 mmol), CuSO₄·5H₂O (18 mg, 0,18 mmol) y Na-ascorbato (58 mg, 0,3 mmol) a t.a. bajo N₂. Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 3 h, se enfrió y se repartió entre EtOAc (30 ml) y agua (30 ml). Se secó la fase orgánica y se evaporó hasta sequedad. La cromatografía en columna sobre gel de sílice que se eluye con acetona : EtOAc (1:1) dio el producto **8c** como un sólido verde oscuro. (73,4 mg, 88 %, p.f. 128-130°C).

¹H RMN (600 MHz, acetona-*d*6): δ 8,22-8,20 (m, 8H), 8,19 (s a, 1H), 7,54-7,45 (m, 7H), 7,42 (s, 1H), 7,22 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 7,02 (d, J = 8,8 Hz, 2H), 6,20 (s a, 1H), 5,32 (s, 2H), 4,56 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 3,60 (t, J = 5,9 Hz, 2H), 1,40 (s, 9H), (OH no observado). ¹³C RMN (125 MHz, THF-*d*8): δ 161,0, 160,8, 159,0, 157,3, 145,3, 144,7, 143,1, 142,2, 132,5, 132,3 (t, J = 5 Hz), 131,7 (t, J = 5 Hz), 129,3, 129,4, 129,3, 129,2, 129,1, 128,6, 128,5, 124,4, 122,7, 119,5, 118,8, 115,7, 114,9, 49,5, 40,4, 31,7, 27,6. IR (disco de KBr): 3054, 1661, 1601 cm⁻¹. ES-MS: *m/z* [752,5]⁻ [M-H]⁻. HRMS [M + H]⁺: 754,3160, C₄₂H₃₉BF₂N₇O₄ requiere 754,3125.

Con referencia a la figura 5, se observó que los espectros de UV-Vis / fluorescencia de **8a-c** en metanol mostraron de manera conveniente poca diferencia entre sí o entre el derivado de alquino **2** lo que demuestra que la reacción de cicloadición tuvo un efecto despreciable sobre estas características espectrales. Como ejemplo representativo (figuras 9 - 11), la naturaleza sensible al pH del derivado conjugado de galactosa **8a** se examinó y mostró tener respuestas de estado excitado y base similares a las de **2** con pKa de 6,9. El análisis de la intensidad de fluorescencia de **8a** a cinco valores de pH diferentes ilustró cómo se logró un sesgo significativo hacia mayor intensidad de fluorescencia a regiones de pH fisiológico bajo. Por ejemplo, la comparación de la diferencia de intensidad de fluorescencia medida desde pH 6,1 hasta 7,2 fue más de 2 veces y la diferencia entre 6,6 y 8 fue de 6 veces (figura 6).

Se logró demostración de la internalización celular de **8a** mediante incubación con células MDA-MB-231 durante 1 h seguida por tinción nuclear azul con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). La obtención de imágenes a color dual con microscopía de barrido láser confocal mostró una emisión en el rojo diferenciada de **8a** ubicada en el citosol (figura 8). Pudo lograrse activación/desactivación reversible ilustrativa de **8a** intracelular tratando una población de células con tinción dual con tampón carbonato acuoso de pH 8,0 o tampón ácido de pH 6,6 (figura 7), y tal como se ilustra a continuación.



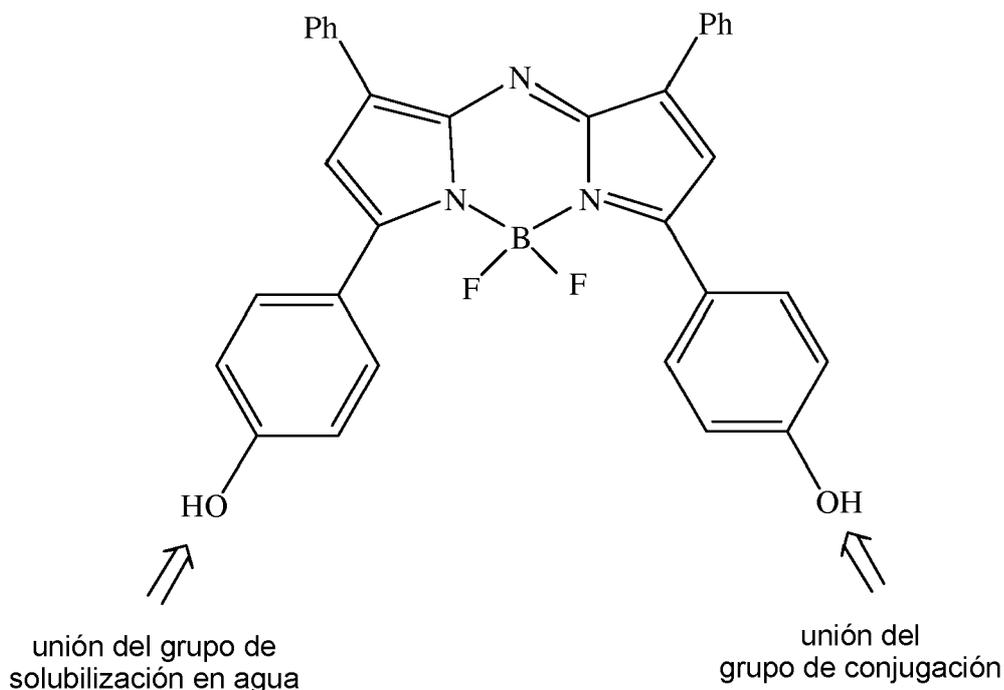
La obtención de imágenes de la misma población celular tras adición de tampón básico mostró extinción casi completa de la emisión en el rojo de 8a con la emisión de DAPI nuclear azul todavía claramente visible. En contraste tras la adición de tampón pH 6,6 a las células, la emisión de 8a se volvió a establecer. La diferencia en la fluorescencia en el rojo de células enteras promediadas tomadas de células extracelulares a células integradas fue seis veces mayor (figura 7).

En resumen, se ha demostrado una síntesis eficaz y características fotofísicas de una nueva plataforma de fluorocromo sensible al pH con emisión a 730 nm.

10 Ejemplo 3(A): compuestos 9, 10, 11a y 11b: compuestos que comprenden un grupo de solubilización en agua y un grupo de conjugación

En este ejemplo, se presentan la síntesis y las propiedades espectrales de los primeros fluorocromos basándose en el soporte de fluoróforo de la técnica anterior 1, y que pueden realizar conjugaciones de amina. La estrategia era explotar el compuesto 6 como punto de partida de síntesis clave para producir compuestos de fórmula (I), específicamente de fórmula (IA).

Se usó manipulación de síntesis por medio de alquilación de anillos fenólicos por alquilación de oxígeno para introducir un grupo de solubilización en agua en un anillo del compuesto 6 y un grupo de conjugación en el otro, tal como se indica a continuación. Se apreciará que las posiciones del grupo de solubilización en agua y grupo de conjugación pueden invertirse.

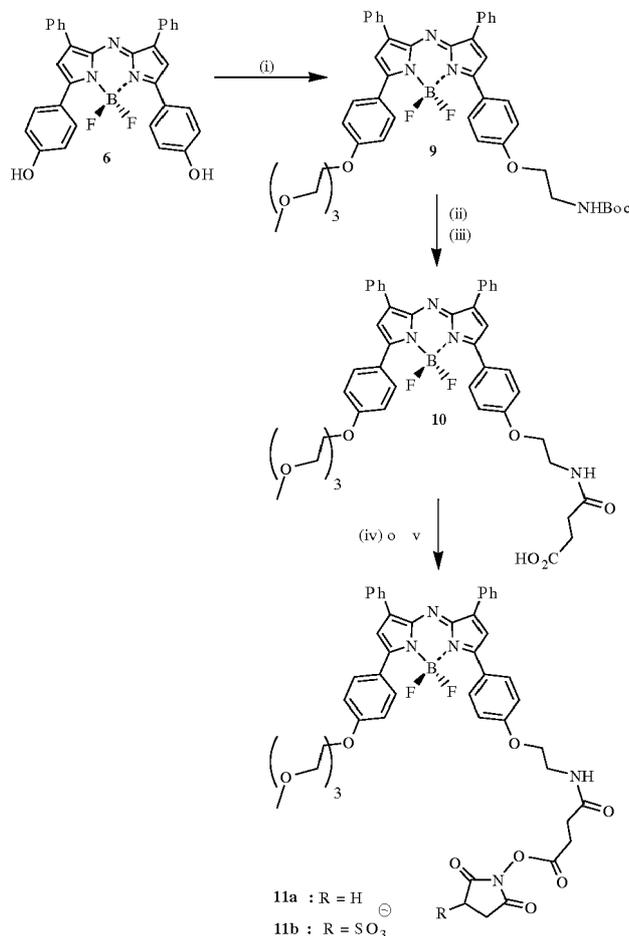


25 Para este ejemplo, el enfoque era impartir solubilidad acuosa parcial al fluoróforo introduciendo un poliéter en un anillo de fenol. Se anticipó que un único poliéter solo no sería suficiente para impartir una solubilidad completa en agua, pero tal vez sería suficiente para facilitar la reacción de conjugación. Mientras que otros grupos solubilizados cargados están actualmente bajo investigación, este enfoque ofrece el potencial de producir un fluorocromo neutro con carga global que puede limitar las complicaciones de las interacciones de carga no covalente del fluoróforo y la biomolécula conjugada. El otro anillo de fenol estaría sustituido con una unidad espaciadora y un grupo éster activado conjugable. Se investigaron dos ésteres activados diferentes, N-hidroxisuccinimida y una sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida sulfonada, esta última proporcionó una mayor solubilidad acuosa sin introducir carga directamente en el fluoróforo.

35 Se logró el desafío de síntesis de funcionalizar los fenoles equivalentes de 6 con sustituyentes diferentes utilizando acoplamiento de Mitsunobu simultáneo de 6 con dos alcoholes diferentes. Se encontró que en lugar de hacer reaccionar los fenoles en etapas sucesivas, se optimizaron las condiciones para lograr esto en una única operación. Con referencia al esquema 3, se logró desimetrización de 6 en una etapa mediante condensación con los dos alcoholes diferentes, el poliéter trietilenglicol-monometil éter, y etanolamina protegida con *N*-Boc en condiciones de

acoplamiento convencionales. Esto dio una mezcla de un bis-poliéster, una amina bis-*N*-Boc y el producto deseado mono-poliéster, producto sustituido con mono-amina 9 (esquema 3).

- Esquema 3. Síntesis de fluorocromos. *Reactivos y condiciones:* (i) trietilenglicol-monometil éter, etanolamina *N*-Boc, PPh₃, DIAD, THF, t.a., 16 h, 39%. (ii) TFA, EDCl, DMAP (cat.), CH₂Cl₂, t.a., 16 h, 99%. (v) sal sódica de *N*-hidroxisulfosuccinimida, EDCl, DMAP (cat.), DMSO, t.a., 16 h.



- 10 Se logró separación cromatográfica de 9 a partir de productos de acoplamiento simétricos no deseados debido a las grandes diferencias en factores de retención sobre sílice. Este enfoque demostró ser superior a una introducción gradual de sustituyentes fenólicos debido a peores conversiones globales y purificaciones más difíciles. La introducción de una unidad espaciadora de cuatro carbonos se logró mediante la desprotección de Boc de 9 con TFA en CH₂Cl₂ y reacción posterior con anhidrido de ácido succínico produciendo el ácido carboxílico 10. Después, 10 se transformó en el éster activado 11a o 11b por acoplamiento con *N*-hidroxisuccinimida o *N*-hidroxisulfosuccinimida respectivamente (esquema 3). El fluorocromo 11a era un sólido estable en la mesa de laboratorio y debido a la mayor reactividad de 11b se usó directamente tras la generación.

Detalles adicionales de los productos 9, 10, 11a y 11b y síntesis de los mismos se proporcionan a continuación.

- 20 Síntesis de 9. Se disolvieron el compuesto 6 (630 mg, 1,2 mmol), trietilenglicol-monometil éter (294 μ L, 1,8 mmol), *N*-Boc etanolamina (285 μ L, 1,8 mmol) y PPh₃ (1,257 g, 4 mmol) en THF seco (100 ml). Se añadió lentamente (20 min) DIAD (969 μ L, 4 mmol) en THF seco (5 ml) a la disolución y se agitó la mezcla de reacción a t.a. durante 16 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se sometió a cromatografía el residuo verde oscuro (sílice, gradiente de AcOEt/ciclohexano de 1:1, a 4:1). Se aisló la fracción verde del centro (R_f = 0,35, sílice, AcOEt/ciclohexano, 4:1).
- 25 Se evaporó y se volvió a someter a cromatografía (sílice, AcOEt/CH₂Cl₂, 1:4) para dar 9 (380 mg, 39%) como un sólido verde oscuro. p.f. = 51 - 53°C. δ_H (500 MHz, CDCl₃): 1,47 (s, 9H), 3,38 (s, 3H), 3,54 - 3,58 (m, 4H), 3,67 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 3,70 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 3,76 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 3,90 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 4,11 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 4,22 (t, J = 4,6 Hz, 2H), 4,99 (s a s, 1H), 6,97 - 7,06 (m, 6H), 7,39 - 7,48 (m, 6H), 8,04 - 8,10 (m, 8H). δ_C (125 MHz, CDCl₃): δ 161,2, 160,8, 158,3, 157,8, 155,8, 145,4, 143,2, 132,4, 131,6, 129,2, 128,5, 124,5, 124,2, 118,7, 118,5, 114,8, 114,6, 79,6, 71,9, 70,9, 70,7, 70,6, 69,6, 67,6, 67,3, 59,0, 40,0, 28,4. HRMS (ESI) calculado para C₄₆H₄₉N₄O₇NaBF₂ [M + Na]⁺: 841,3560, encontrado 841,3571. IR (disco de KBr) cm⁻¹: 1504, 1603, 1710. λ_{abs} (CHCl₃, $\epsilon \times 10^{-3}$) 689 (87,1),
- 30

450 (17,3), 367 (11,9), 318 (26,0) nm. λ_{emis} (CHCl₃): 717 nm, Φ 0,36 (1 usado como patrón $\Phi = 0,36$).

5 Síntesis de 10. Se disolvió el compuesto 9 (164 mg, 200 μ mol) en CH₂Cl₂ (10 ml), se añadió lentamente TFA (1 ml) y se agitó la mezcla de reacción a t.a. durante 2 h. Se añadió NaHCO₃ acuoso saturado y se extrajo la suspensión resultante con CH₂Cl₂ (2x30 ml) Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua, se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron hasta sequedad. Se disolvió el residuo verde resultante en THF seco (10 ml), se trató con anhídrido succínico (24 mg, 240 μ mol) y DIPEA (70 μ L, 400 mmol) y se agitó a t.a. durante 3 h. Se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se sometió a cromatografía (sílice, MeOH/CH₂Cl₂, 2:8) para dar 10 (93 mg, 57%) como un sólido verde oscuro. p.f. = 72 - 74°C. δ_H (500 MHz, CDCl₃): 2,45 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 2,65 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H), 3,36 (s, 3H), 3,52 - 3,55 (m, 2H), 3,56 - 3,61 (m, 2H), 3,62 - 3,68 (m, 4H), 3,70 - 3,74 (m, 2H), 3,85 (t, $J = 4,7$ Hz, 2H), 4,01 (t, $J = 4,7$ Hz, 2H), 4,16 (t, $J = 4,7$ Hz, 2H), 6,45 (s, 1H), 6,87 - 7,01 (m, 6H), 7,34 - 7,44 (m, 6H), 7,92 - 8,08 (m, 8H). δ_C (100 MHz, CDCl₃): 26,9, 58,9, 66,5 (a), 67,5, 69,4, 70,4, 70,5, 70,7, 71,8, 114,5, 114,7, 118,4, 118,6, 124,1, 124,2, 128,3, 128,4, 129,0, 129,14, 129,17, 131,5 (a), 131,6 (a), 132,1, 132,4, 142,56, 142,59, 142,7, 145,0, 145,2, 157,5, 157,8, 160,7, 161,0. HRMS (ESI) calculado para C₄₅H₄₅N₄O₈NaBF₂ [M + Na]⁺: 841,3196, encontrado 841,3215. IR (disco de KBr) cm⁻¹: 1509, 1602, 1655. λ_{abs} (CHCl₃) 689 nm. λ_{emis} (CHCl₃): 717 nm.

20 Síntesis de 11a. Se disolvieron el compuesto 10 (27 mg, 33 μ mol), N-hidroxisuccinimida (5,2 mg, 45 μ mol) y DMAP (cat.) en DCM seco (5 ml). Se añadió 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) (8,8 mg, 45 μ mol) a 0°C y se agitó la mezcla resultante a t.a. durante 16 h. Se lavó la fase orgánica con HCl (1 M, 1 ml), agua (2 ml) y se secó sobre Na₂SO₄. Se eliminó el disolvente a presión reducida para dar 11a (28 mg, 99%) como un sólido verde oscuro. δ_H (500 MHz, CDCl₃): 2,54 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 2,57 (s, 4H), 2,91 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 3,30 (s, 3H), 3,46 - 3,49 (m, 2H), 3,56 - 3,64 (m, 6H), 3,65 - 3,69 (m, 2H), 3,81 (t, $J = 5$ Hz, 2H), 4,01 (t, $J = 5$ Hz, 2H), 4,13 (t, $J = 5$ Hz, 2H), 6,18 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 6,87 - 6,97 (m, 6H), 7,31 - 7,39 (m, 6H), 7,95 - 8,00 (m, 8H). HRMS (ESI) calculado para C₄₉H₄₈BF₂N₅O₁₀Na [M + Na]⁺: 938,3360, encontrado 938,3886. IR (disco de KBr) cm⁻¹: 1603, 3054.

25 Síntesis de 11b. Se disolvieron el compuesto 10 (5 mg, 6,11 μ mol), sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida (1,4 mg, 6,4 μ mol), clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (1,2 mg, 6,2 μ mol) y DMAP (cat.) en DMSO seco (200 μ l), se agitaron a t.a. durante 16 h, bajo nitrógeno. Monitorización de la reacción por HPLC de fase inversa (columna C-18 que se eluye con acetonitrilo-agua 7:3), consumo completo del material de partida. Se usó la disolución directamente para experimentos de conjugación.

35 Los análisis espectroscópicos de 9 y 10 como elementos estructurales de constituyentes representativos de las sondas fluorescentes mostraron muy poca variación en sus propiedades con máximos de absorbanza a 688 y 691 nm respectivamente y máximos de fluorescencia a 714 nm para ambos (tabla 4, figura 12). Ambos tuvieron un coeficiente de extinción en exceso de 80.000 y buenos rendimientos cuánticos de fluorescencia (tabla 4).

Tabla 4

Propiedades espectroscópicas ^a					
Entrada	Comp.	$\lambda_{máxabs}$ nm ^b	ϵ M ⁻¹ cm ⁻¹	$\lambda_{maxemis}$ nm ^{c,d,e}	Φ_f^f
1	9	688	95000	714	0,23
2	10	691	85500	714	0,20
3	12	691	74500	714	0,22

^aEn etanol. ^bConc 5 x 10⁻⁶ M. ^cConc 5 x 10⁻⁷ M.
^dExcitación a 640 nm. ^eAnchuras de ranura 5 nm. ^f1 usado como patrón.^{6a}

40 Sus características espectrales también eran relativamente insensibles a la polaridad del disolvente (figura 13).

Ejemplo 3(B): Conjugados de colorante a partir de los compuestos 11a y 11b

45 Ejemplo 3(B)(I): Los ésteres de succinimida activados reaccionan normalmente con el grupo α -amino de extremo N-terminal y la amina de aminoácidos de constituyentes de lisina. Con referencia al esquema 3(A), y tal como se describe además a continuación, el acoplamiento ilustrativo de 11a en disoluciones orgánicas y 11b en disoluciones acuosas con N_ε-Boc-L-lisina dio rápidamente derivado de aminoácido sustituido 12 con buenos rendimientos tanto en disoluciones orgánicas como acuosas.

50 Esquema 3(A). Acoplamiento con lisina protegida con Boc. *Reactivos y condiciones*: (i) N_ε-Boc-L-lisina, DIPEA, CH₃CN, t.a., 0,5 h. (ii) N_ε-Boc-L-lisina, agua tamponada con NaHCO₃ a pH 8,3, t.a., 5 min.

saturada de ácido sinápico en mezcla de acetonitrilo/agua 1:1 que contiene TFA al 0,1%).

- De manera alentadora, el análisis MALDI de los conjugados identificó una distribución de conjugados de mono a penta de tanto 11a como 11b lo que ilustra la naturaleza altamente reactiva de los fluorocromos. Como podría esperarse, el acoplamiento de 11b era superior al de 11a, siendo los triconjugados los más abundantes, con cada conjugado separado por una masa aproximada de 800 amu (figura 19). Esta alta carga alcanzable ilustra la efectividad de la reacción de acoplamiento. El uso de mayores razones de fluorocromo 11b (20 equiv.) con respecto a proteína aumentó los niveles de carga, siendo los conjugados de tetra a hexa los más abundantes.
- Se llevó a cabo un acoplamiento confirmatorio adicional de 11b con la proteína tripsina de 23,3 kDa en PBS a pH 7,5, tal como se describe a continuación.

Conjugación de 11b con tripsina

- Se diluyó 1 ml de disolución de tripsina-EDTA 10X (que contiene tripsina al 0,5%, EDTA al 0,2%, sin rojo de fenol, en disolución salina) con PBS (1 ml, pH = 7,0) y se ajustó el pH a 7,5. Se añadió disolución de colorante (35 μ l) lentamente y se incubó la proteína durante 1 h en la oscuridad. Se cargó la disolución resultante en una columna BIO-GEL (P-2, 1 cm de diámetro, 15 cm de largo, eluida con agua destilada) dando disolución de proteína desalada, que se usó directamente para el análisis.

- Este acoplamiento de 11b con la proteína tripsina de 23,3 kDa en PBS a pH 7,5 dio una distribución de enzima mono y difuncionalizada (figura 18). Para los datos de MALDI-TOF, la preparación de muestra fue tal como sigue: se diluyeron fracciones obtenidas tras filtración BIO-GEL con disolución de matriz (disolución saturada de ácido sinápico en mezcla de acetonitrilo/agua 1:1 que contiene TFA al 0,1%).

- El análisis espectral de los conjugados de lisosima y tripsina muestra que se conservan las características espectrales atractivas de este cromóforo tales como absorción y bandas de emisión nítidas (figura 20). De manera importante, los máximos de emisión de ambos estaban por encima de 720 nm.

- En resumen, en el ejemplo 3, se ha descrito una breve síntesis de un nuevo fluorocromo en el NIR, y se ha ilustrado su potencial para conjugaciones de amina eficaces con aminoácidos y proteínas.

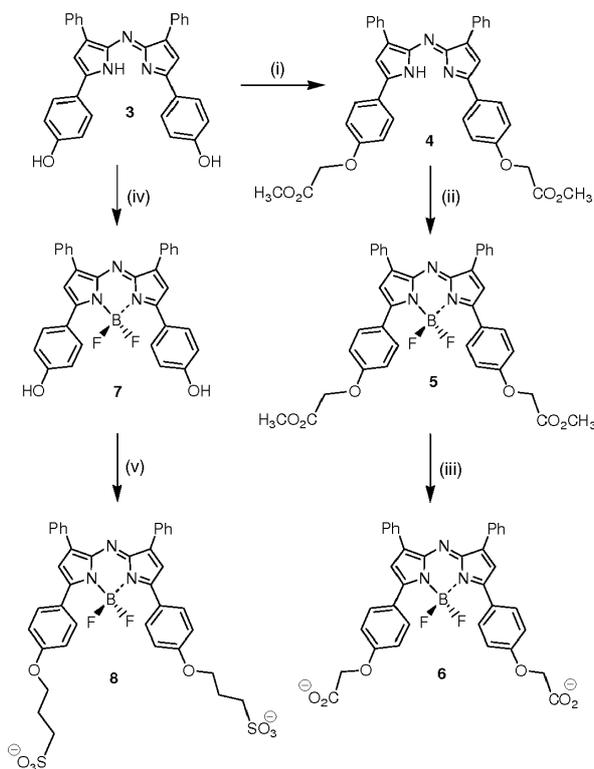
Ejemplo 4: Compuestos que comprenden dos grupos de solubilización en agua o dos grupos de conjugación

- En este ejemplo se preparan tetraarilazadipirrometanos quelados con BF₂ solubles en agua, y se demuestran sus propiedades espectroscópicas y administración *in vitro*. Se ha notificado previamente que la inclusión de un grupo para-alcoxilo donador de electrones en los anillos de arilo α al nitrógeno de pirrol, el compuesto de la técnica anterior da como resultado un desplazamiento batocrómico de emisión significativo de ~ 40 nm cuando se compara con el derivado no sustituido. Como tal, este patrón de sustitución se incluyó en el núcleo estructural de los sensibilizadores con ácido carboxílico adicional, ácido sulfónico y grupos funcionales de sal de amonio introducidos para proporcionar solubilidad acuosa.

- La síntesis de ácido bis-carboxílico y derivados de ácido bis-sulfónico, 16 y 17 respectivamente, que son ambos compuestos de fórmula (I), específicamente de fórmula (IA), tuvo un punto de inicio común del azadipirrometeno sustituido con bis-fenol 13, que es fácilmente accesible a partir de 1-(4-hidroxifenil)-3-fenilpropenona en dos etapas de síntesis. Con referencia al esquema 4, la alquilación de ambos fenoles de 13 con bromoacetato de metilo dio el diéster correspondiente 14 con altos rendimientos, tras purificación mediante cromatografía en gel de sílice (esquema 4).

- La saponificación de 15 con trimetilsilanolato de potasio (TMSOK) en THF a temperatura ambiente dio el derivado de ácido bis-carboxílico 16. Se apreciará, sin embargo, que 16 puede sintetizarse alternativamente a partir del compuesto 6. Las condiciones optimizadas para el análogo de ácido bis-sulfónico requerían quelación con BF₂ de 3 para generar 6 y una reacción posterior con propano-1,3-sultona en presencia de K₂CO₃ dando 17, con rendimiento moderado, como un polvo verde oscuro tras purificación cromatográfica.

- Esquema 4. Síntesis de derivados sustituidos bis-aniónicos. *Reactivos y condiciones:* (i) bromoacetato de metilo, K₂CO₃, acetona, reflujo, 16 h, 89%. (ii) BF₃.OEt₂, DIEA, CH₂Cl₂, t.a., 24 h, 73%. (iii) TMSOK, THF, t.a., 3 h, 34%. (iv) BF₃.OEt₂, t.a., 16 h, 78%. (v) propano-1,3-sultona, K₂CO₃, acetona, reflujo, 6 h, 41%.



Detalles adicionales de los productos 14, 15, 16 y 17 y síntesis de los mismos se proporcionan a continuación.

5 Compuesto 14:

Se colocaron el compuesto 13 (481 mg, 1 mmol), bromoacetato de metilo (368 μ l, 4 mmol), NaI (300 mg, 2 mmol) y K_2CO_3 (550 mg, 4 mmol) en un matraz de fondo redondo. Se le añadió acetona (100 ml) y se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 16 h. Se eliminó el disolvente, se disolvió el residuo en CH_2Cl_2 , se lavó con agua, se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad. La cristalización a partir de acetato de etilo / ciclohexano dio 14 como un sólido oscuro (554 mg, 89%), p.f. 194-196°C. δ_H (500 MHz, $CDCl_3$): 8,03 (d, $J = 7,4$, 4H), 7,85 (d, $J = 8,3$, 4H), 7,40 (t, $J = 7,4$, 4H), 7,34 (t, $J = 7,1$, 2H), 7,09 (s, 2H), 7,03 (d, $J = 8,3$, 4H), 4,72 (s, 4H), 3,85 (s, 6H). δ_C (100 MHz, $CDCl_3$): 169,0, 159,3, 154,1, 149,4, 142,3, 133,8, 129,0, 128,20, 128,15, 127,9, 126,1, 115,3, 114,4, 65,3, 52,4. HRMS (ESI) calculado para $C_{38}H_{32}N_3O_6$ [$M + H^+$] $^+$: 626,2291, encontrado 626,2304. IR (disco de KBr) cm^{-1} : 1767, 3055 cm^{-1} .

Compuesto 15:

Se disolvió el compuesto 14 (275 mg, 0,44 mmol) en CH_2Cl_2 seco (80 ml), se le añadió DIEA (0,8 ml, 4,6 mmol) seguido por $BF_3 \cdot OEt_2$ (1 ml, 8,12 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a t.a. durante 24 h bajo atmósfera de N_2 . Se lavó la mezcla de reacción dos veces con agua, se separó la fase orgánica, se secó y se evaporó. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna con gel de sílice (eluyente, $CH_2Cl_2/AcOEt$ 95:5) dando 15 como un sólido rojo (215 mg, 73%), p.f. 206-208°C. δ_H (500 MHz, $CDCl_3$): 8,04 - 8,09 (m, 8H), 7,54 - 7,36 (m, 6H), 7,07 - 6,94 (m, 6H), 4,71 (s, 4H), 3,84 (s, 6H). δ_C (100 MHz, $CDCl_3$): 168,9, 160,0, 158,1, 145,4, 143,5, 132,4, 131,7, 129,33, 129,30, 128,6, 125,2, 118,7, 114,9, 65,2, 52,4. HRMS (ESI) calculado para $C_{38}H_{31}BN_3O_6F_2$ [$M + H^+$] $^+$: 674,2274, encontrado 674,2277. IR (disco de KBr): 1602, 1732, 1763 cm^{-1} .

Compuesto 16:

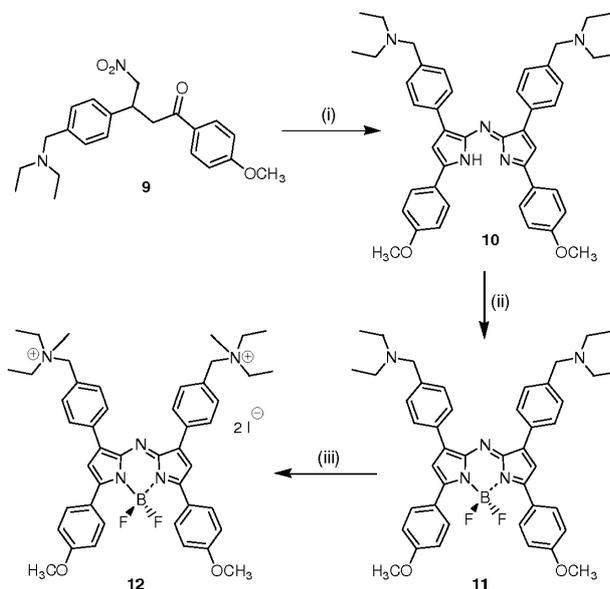
Se agitaron el compuesto 15 (248 mg, 400 μ mol) y trimetilsilanolato de potasio (600 mg, 4,8 mmol) en THF seco durante 3 h. Se le añadió HCl 2 N (12,5 ml), se eliminó THF a presión reducida y se extrajo la mezcla resultante con el 25% de isopropanol en CH_2Cl_2 . Se lavó la fase orgánica con agua, se secó y se evaporó. Una RP-HPLC preparativa posterior (C-18; acetonitrilo-agua, 90:10; tiempo de retención: 8 min) dio 16 como un polvo oscuro (86 mg, 34%), p.f. 214-216°C. δ_H (500 MHz, acetona- d_6): 8,04 - 8,09 (m, 8H), 7,54 - 7,36 (m, 6H), 7,07 - 6,94 (m, 6H), 4,71 (s, 4H), 3,84 (s, 6H). ^{13}C RMN (100 MHz, acetona- d_6): 168,9, 160,71, 158,2, 145,2, 143,0, 132,4, 131,8, 129,4, 129,3, 128,6, 124,5, 119,4, 114,8, 64,5. HRMS (ESI) calculado para $C_{36}H_{25}BN_3O_6F_2$ [$M - H^+$] $^+$: 644,1804, encontrado 644,1824. IR (disco de KBr): 1023, 1035, 1266, 1472, 1503, 1604 cm^{-1} .

Compuesto 17:

Se calentaron el compuesto 16 (168 mg, 320 mmol), propano-1,3-sultona (97 mg, 800 mmol) y K_2CO_3 (110 mg, 800 mmol) a reflujo en acetona (60 ml) durante 6 h, bajo atmósfera de N_2 . Se filtró el precipitado resultante, se lavó con acetona y metanol frío. La RP-HPLC preparativa (C-18; acetonitrilo-agua, 60:40; tiempo de retención: 3 min) dio 16 (102 mg, 41%) como un sólido verde p.f. > 300°C. Para el análisis de RMN, se transformó el compuesto en sal de tetrabutilamonio mediante extracción de disolución acuosa de 17 con $CHCl_3$ en presencia de cloruro de tetrabutilamonio. Se lavó la fase orgánica con agua dos veces, se secó y se evaporó. δ_H de 17-(NBu_4)₂ (500 MHz, $CDCl_3$): 8,11 - 8,00 (m, 8H), 7,51 - 7,35 (m, 6H), 7,04 (s, 2H), 6,99 (d, $J = 9,0$, 4H), 4,25 (t, $J = 6,4$, 4H), 3,32 - 3,17 (m, 16H), 2,98 (t, $J = 7,3$, 4H), 2,42 - 2,28 (m, 4H), 1,61 (dt, $J = 12,0$, 7,8, 16H), 1,51 - 1,31 (m, 16H), 0,98 (t, $J = 7,3$, 24H). δ_C (100 MHz, $CDCl_3$): 161,7, 158,0, 145,2, 142,9, 132,5, 131,6, 129,21, 129,18, 128,5, 123,7, 118,6, 114,8, 67,4, 58,7, 48,2, 25,6, 23,9, 19,7, 13,7. HRMS (ESI) calculado para $C_{38}H_{33}BN_3O_8F_2S_2$ [$M - H^+$]: 772,1770, encontrado 772,1757. IR (disco de KBr) cm^{-1} : 1468, 1505, 1603 cm^{-1} .

El enfoque de síntesis adoptado para el derivado bis-catiónico se señala en el esquema 5.

Esquema 5. Síntesis de derivado sustituido bis-catiónico. *Reactivos y condiciones:* (i) NH_4OAc , EtOH, reflujo, 48 h, 36%. (ii) $BF_3 \cdot OEt_2$, DIEA, CH_2Cl_2 , t.a., 24 h, 72%. (iii) MeI, CH_2Cl_2 , t.a., 24 h, 80%.



El calentamiento de la 1,3-diaril-4-nitrobutan-1-ona 18 con acetato de amonio dio el azadipirrometeno 19, y posterior quelación con BF_2 en condiciones convencionales generó 20 con un rendimiento del 72%. La reacción de 20 con yoduro de metilo a temperatura ambiente en diclorometano demostró ser un medio eficaz para garantizar la alquilación completa con 21 purificado obtenido tras la recristalización de CH_2Cl_2 /dielil éter.

Detalles adicionales de los productos 19, 20 y 21 y síntesis de los mismos se proporcionan a continuación

Compuesto 19:

Se calentaron 3-(4-dietilaminometilfenil)-1-(4-metoxifenil)-4-nitrobutan-1-ona 18 (7,88 g, 20,5 mmol), acetato de amonio (55,22 g, 0,72 mol) y etanol (200 ml) a reflujo durante 48 h. Se permitió que la reacción se enfriara hasta temperatura ambiente, se eliminó el disolvente y se repartió el residuo entre CH_2Cl_2 (200 ml) y H_2O (150 ml). Se basificó la fase acuosa con NaOH 1 M y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 100 ml). Se combinaron las fracciones orgánicas y se evaporó el disolvente. La cromatografía en columna sobre alúmina con CH_2Cl_2 /acetato de etilo (7:1) como eluyente dio 19 como un sólido metálico rojo (2,50 g, 36%), p.f. 172-173°C. δ_H (300 MHz, $CDCl_3$): 8,01 (d, $J = 8,2$ Hz, 4H), 7,87 (d, $J = 8,8$ Hz, 4H), 7,38 (d, $J = 8,2$ Hz, 4H), 7,10 (s, 2H), 7,03 (d, $J = 8,8$ Hz, 4H), 3,90 (s, 6H), 3,64 (s, 4H), 2,58 (q, $J = 7,2$ Hz, 8H), 1,10 (t, $J = 7,2$ Hz, 12H), NH no observado. δ_C (100 MHz, $CDCl_3$): 161,4, 154,4, 149,6, 142,3, 139,8, 132,7, 129,2, 129,0, 128,3, 125,3, 114,8, 114,1, 57,7, 55,7, 47,0, 12,1. ES-MS: m/z 680 [$M+H^+$]⁺. HRMS (ESI) calculado para $C_{44}H_{50}N_5O_2$ [$M + H^+$]⁺: 680,3965, encontrado 680,3967. IR (disco de KBr): 3455, 3421, 1606 cm^{-1} .

Compuesto 20:

Se disolvió el compuesto 19 (0,45 g, 0,66 mmol) en CH₂Cl₂ seco (80 ml) bajo N₂, se trató con diisopropiletilamina (0,86 g, 6,6 mmol) y BF₃·Et₂O (1,32 g, 9,3 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se lavó la disolución verde resultante con agua (3 x 50 ml), se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó hasta sequedad. Se recristalizó el material en bruto a partir de tolueno o se purificó por columna en alúmina eluyendo con CH₂Cl₂/acetato de etilo (8:1) para dar 20 como un sólido rojo metálico (0,35 g, 72%), p.f. 198-200°C. δ_H (500 MHz CDCl₃): 8,09-8,11 (m, 4H), 8,05 (d, *J* = 8,1 Hz, 4H), 7,46 (d, *J* = 8,1 Hz, 4H), 7,01-7,04 (m, 6H), 3,90 (s, 6H), 3,68 (s, 4H), 2,61 (q, *J* = 7,2 Hz, 8H), 1,12 (t, *J* = 7,2 Hz, 12H). δ_C (125 MHz CDCl₃): 162,1, 158,3, 145,6, 143,4, 141,6, 131,8, 131,3, 129,3, 129,3, 124,5, 118,5, 114,5, 57,6, 55,7, 47,1, 12,0. ESI-MS: *m/z* 728 [M+H]⁺. HRMS calculado para C₄₄H₄₉BF₂N₅O₂ [M+H]⁺: 728,3947, encontrado: 728,3936. IR (disco de KBr): 3419, 2966, 1602 cm⁻¹. λ_{máx} abs (CHCl₃): 691 nm (ε = 76,000 l mol⁻¹ cm⁻¹).

Compuesto 21:

Se disolvió el compuesto 20 (300 mg, 0,41 mmol) en CH₂Cl₂ seco (60 ml), se trató con yoduro de metilo (260 μl, 4,1 mmol) y se agitó bajo N₂ durante 24 h a t.a. Se eliminó el disolvente a presión reducida y la recristalización de CH₂Cl₂/Et₂O (8:1) dio el producto 21 (330 mg, 80%) como un sólido verde oscuro p.f. > 300°C. δ_H (500 MHz, DMSO-*d*₆): 8,30 (d, *J* = 8,0 Hz, 4H), 8,20 (d, *J* = 9,0 Hz, 4H), 7,77 (d, *J* = 8,0 Hz, 4H), 7,74 (s, 2H), 7,17 (d, *J* = 9,0 Hz, 4H), 4,62 (s, 4H), 3,90 (s, 6H), 3,43-3,39 (m, 4H), 3,31-3,26 (m, 4H), 2,95 (s, 6H), 1,35 (t, *J* = 7,0 Hz, 12H). δ_C (125 MHz, DMSO-*d*₆): 162,7, 158,1, 145,1, 141,2, 133,8, 132,4, 129,7, 129,4, 123,4, 121,0, 115,0, 63,5, 56,1, 55,8, 46,6, 8,30. IR (disco de KBr) cm⁻¹: 3434, 1603. ES-MS: *m/z* 884,7 [M-I]⁺. HRMS (ESI) calculado para C₄₆H₅₄BF₂IN₅O₂ [M-I]⁺ 884,3383, encontrado 884,3381.

Las propiedades espectroscópicas de 16, 17 y 21 en disolventes orgánicos se corresponden muy estrechamente con aquellas notificadas previamente para esta clase de compuesto. Por ejemplo, en cloroformo, los máximos de absorción oscilan entre 681 nm para 16, 694 nm para 17 y 702 nm para 12 con desplazamientos muy pequeños de estos valores registrados en metanol (tabla 5, figuras 21 y 22).

Tabla 5. Características espectroscópicas de 16, 17 y 21.

Entrada	Comp.	λ _{máx} abs. [nm] ^a				λ _{máx} emis. [nm] ^{b,c,d}				Φ ^f
		CHCl ₃	MeOH	DMEM	PBS/BSA	CHCl ₃	MeOH	DMEM	PBS/BSA	
1	16	681	681	694	692	711	715	722	718	0,30
2	17	694 ^e	687	694	692	726	716	728	718	0,31
3	21	702	702	709	706	735	732	737	730	0,22

^aConc. 1 x 10⁻⁶ M. ^bConc 5 x 10⁻⁷ M. ^cExcitación a 640 nm. ^dAnchuras de ranura 5 nm. ^eComo sal de *tetra*-butilamonio. ^fCHCl₃.

Cada fluoróforo presentó una fuerte emisión de fluorescencia con rendimientos cuánticos entre Φ = 0,22 - 0,31 y máximos a 711, 726 y 735 nm para 16, 17 y 21 respectivamente (tabla 5, figuras 21 y 22). La comparación de los tres fluoróforos mostró sólo pequeños desplazamientos batocrómicos para los derivados 16 y 17 cuando se compararon con 21 (tabla 5).

Se apreciará que cuando se usa 17, los restos COO⁻ pueden usarse como grupos de conjugación, para unirse a moléculas pequeñas, o como grupos de solubilización en agua, o uno como un grupo de conjugación y el otro como un grupo de solubilización en agua, según el uso preferido.

Como disolución acuosa biológica representativa, se tomaron espectros de 16, 17 y 21 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que es un medio comúnmente usado para manipulaciones celulares. Cada fluoróforo mostró un pequeño desplazamiento batocrómico en su λ máx de emisión (5 - 12 nm) en comparación con disolventes orgánicos, con bandas de emisión que se extienden desde 700 hasta 800 nm (figura 26).

Estas propiedades espectroscópicas se correlacionan perfectamente con los requisitos óptimos de instrumentos de microscopía de barrido láser confocal disponibles comercialmente (CLSM) e instrumentos de obtención de imágenes ópticas de animales pequeños. Se utilizó la captación celular de disoluciones de DMEM de 16 y 17 para ilustrar su potencial para obtención de imágenes *in vitro*. Se incubaron los compuestos 16 y 17 con células MDA-MB-231 durante 1 hora a una concentración de 5 μM y se eliminó el colorante en exceso lavando con PBS antes de la visualización.

A continuación se proporcionan detalles adicionales del procedimiento.

Condiciones de incubación de bacterias y células MDA-MB-231

55

Se sembraron células MDA-MB-231 en un portaobjetos de microscopía con cámara de 8 pocillos y se hicieron crecer durante la noche en medios DMEM a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Entonces se retiraron los medios y se añadió 16 y 17 (5 µM), seguido por un periodo de incubación de 1 hora en la oscuridad. Entonces se lavaron las células con PBS para eliminar el exceso de compuesto. Antes de la visualización, se fijaron células en una disolución de formaldehído al 3,7%, se tiñeron conjuntamente con DAPI y se montó un cubreobjetos sobre el portaobjetos de microscopía. De manera similar, se incubaron células *E. coli* con 21 (4 µM) en la oscuridad durante 10 minutos. Se lavaron las células bacterianas con PBS y se suspendió una alícuota de esta disolución en un portaobjetos de microscopía y se permitió que se secase. Antes de la obtención de imágenes, se montó un cubreobjetos sobre el portaobjetos de microscopía. Se obtuvieron imágenes usando un microscopio de barrido láser confocal LSM510 META equipado con un objetivo de apertura numérica 1,4 63×. Se excitó DAPI a 364 nm y se detectó con un filtro de paso de banda 385-470 nm, mientras que 16, 17 y 21 se excitaron a 633 nm y se detectó su fluorescencia a través de un filtro de paso largo a 650 nm.

Las imágenes obtenidas mostraron que 16 y 17 fueron tomados de manera eficaz por las células, después de un periodo de incubación relativamente corto, y se obtuvieron imágenes fácilmente mediante CSLM (figuras 27a, 27b). La reconstrucción en 3-D de la distribución celular determinada por la combinación de 10 secciones de plano focal y tinción nuclear con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) mostró que la localización subcelular de 16 y 17 fue principalmente en el citoplasma (figura 31).

Se preveía que la naturaleza bis-catiónica del sensibilizador 21 sería óptima para captación en células procariotas ampliando de ese modo su utilidad. La incubación de disoluciones acuosas de 21 con tanto células bacterianas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) como Gram-negativas (*Escherichia coli*) durante sólo 10 minutos fue suficiente para la captación celular. La obtención de imágenes confocal confirmó la unión de 21 a tanto células bacterianas Gram-positivas como Gram-negativas (figuras 28a, 28b). Se muestran imágenes adicionales en las figuras 29 y 30.

Para establecer las características espectrales de estos fluoróforos para posibles aplicaciones de obtención de imágenes *in vivo*, se examinaron sus propiedades en presencia de proteínas séricas. La albúmina sérica es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo a concentraciones típicas de -50 g/l. Puesto que una de sus funciones principales es actuar como proteína de unión y portadora dentro de la vasculatura, se esperaba que se produjeran fuertes interacciones entre la misma y los fluoróforos. Esto se conoce para ICG y los efectos espectroscópicos de plasma sobre ICG se han documentado concienzudamente. Como examen preliminar para probar si las propiedades espectrales están afectadas negativamente por tales proteínas, se registraron sus espectros en disoluciones acuosas de BSA (albúmina sérica bovina). Se observaron bandas de absorción y de emisión nítidas en cada caso con máximos de emisión a 718 nm para 16 y 17 y 730 nm para 21 en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía BSA 4×10^{-4} M. Estas disoluciones permanecieron estables durante periodos prolongados expuestas a luz ambiental con menos del 10% de variación en absorción e intensidad de fluorescencia tras 24 horas (figuras 23, 24, 25 y 32). Conjuntamente, estas propiedades son indicadores positivos para su uso como fluoróforos en el NIR *in vivo*.

En resumen, se han sintetizado derivados tetraarilazadipirrometeno quelados con BF₂ sustituidos aniónicos y catiónicos, que portan restos de ácido sulfónico, ácido carboxílico o amina cuaternaria. Estos fluoróforos muestran excelentes características fotofísicas tanto en disoluciones orgánicas como acuosas. La administración a y obtención de imágenes focales dentro de células eucariotas y procariotas puede lograrse fácilmente.

Ejemplo 5: nanoperlas fluorescentes

Este ejemplo demuestra la preparación de partículas fluorescentes, específicamente de nanoperlas fluorescentes del orden de 100 nm. Se propone que estas partículas fluorescentes puedan usarse para una amplia variedad de aplicaciones comerciales, incluyendo obtención de imágenes *in vivo* y como calibrantes para instrumentos analíticos basados en fluorescencia, tales como citometría de flujo.

Síntesis de éster activado PL-Latex SuperCarbonyl blanco 200 nm

Se centrifugó una suspensión acuosa de PL-Latex SuperCarbonyl blanco 200 nm (2 ml), disponible de Varian Inc, y se secó el sólido resultante durante la noche a presión reducida. Se dispersó el sólido (75 mg, 0,014 mmol) en DMSO seco (1,5 ml) y se trató con EDCI (27 mg, 0,14 mmol) y N-hidroxisuccinimida (16 mg, 0,14 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 16 horas. Entonces se diluyó la disolución con agua (3 ml) y se centrifugó. Se lavó el sólido obtenido y se centrifugó tres veces con agua/DMSO (3:1) y se secó a alto vacío. Se confirmó la conversión completa del residuo de ácidos en ésteres activados comparando el IR de PL-Latex Super Carbonyl white 200 nm (IR 1698,50, 1739,48 cm⁻¹) con el IR del producto obtenido (IR 1602,50, 1640,65 cm⁻¹). La perla de éster activado resultante 22 se muestra en el esquema 7.

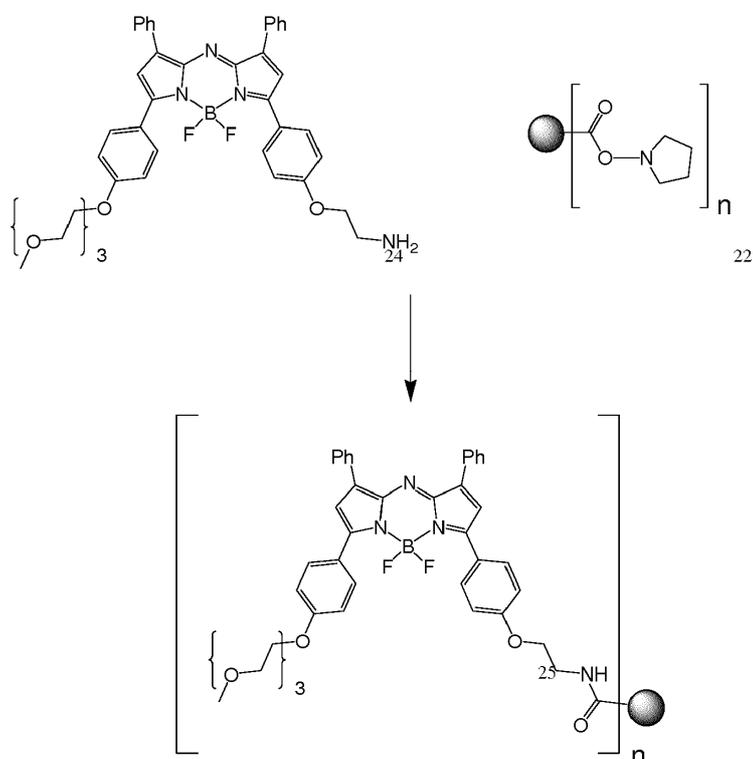
Síntesis de azadipirrometeno - perlas queladas con BF₂-PL-Latex 200 nm

Con referencia al esquema 6, se disolvió el azadipirrometeno quelado con BF₂ 23 (6 mg, 0,0075 mmol) en DCM

(10 ml) y se trató con TFA (1 ml) a temperatura ambiente. Se monitorizó la reacción mediante CCF y se detuvo cuando 23 se consumió completamente. Se extrajo la reacción con NaHCO_3 (x2) y con agua (x1) y se secó sobre sulfato de sodio dando 24 en cantidades cuantitativas.

5

Esquema 7



10

Con referencia al esquema 7, se cargó un matraz de fondo redondo con perlas de éster activado 22 (30 mg, 0,0058 mmol), azadipirrometeno quelado con BF_2 24 (5 mg, 0,0075 mmol) y THF seco (5 ml). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 24h. Entonces se añadió agua desionizada (5 ml) a la mezcla de reacción y se eliminó THF a presión reducida. Se filtró la disolución acuosa a vacío a través de un filtro C18 para dar las perlas funcionalizadas 25.

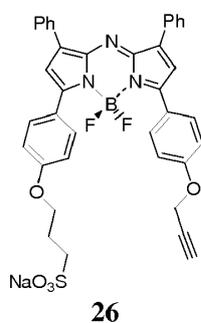
15

Se muestran imágenes obtenidas usando las perlas funcionalizadas en las figuras 33-36.

Ejemplo 6: compuestos adicionales

20

En este ejemplo, se describe la preparación de compuestos según la invención. Todos los compuestos descritos en el presente documento se producen aguas abajo del compuesto 6, que es un compuesto de fórmula (IB).

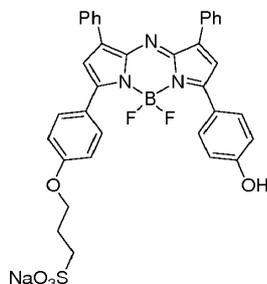


26

25

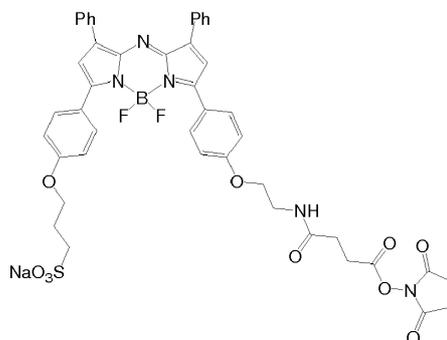
Se calentaron el compuesto 2 (75 mg, 125 mmol), propano-1,3-sultona (31 mg, 250 mmol) y K_2CO_3 (35 mg, 250 mmol) a reflujo en acetona (30 ml) durante 6 h, bajo una atmósfera de N_2 . Se eliminó el disolvente y se suspendió el residuo en HCl 2 N. Se filtró el sólido resultante, se lavó con agua y se secó dando el producto 26 (64 mg, 74%) como un sólido verde oscuro. Para análisis de RMN, el compuesto se transformó en sal de tetrabutilamonio mediante extracción de disolución acuosa de ácidos con CHCl_3 en presencia de cloruro de tetrabutilamonio. Se lavó la fase orgánica con agua dos veces, se secó y se evaporó. δ_{H} de ácido sulfónico $\cdot\text{NBu}_4$

- (500 MHz, CDCl₃): 8,10 - 8,04 (m, 8H), 7,48 - 7,38 (m, 6H), 7,10 - 7,06 (m, 3H), 7,02 - 6,99 (m, 3H), 4,77 (d, *J* = 2,5 Hz, 2H), 4,25 (t, *J* = 5 Hz, 2H), 3,32 - 3,25 (m, 8H), 3,01 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 2,58 (t, *J* = 2,5 Hz, 1H), 2,40 - 2,32 (m, 2H), 1,68 - 1,60 (m, 8H), 1,48 - 1,40 (m, 8H), 1,00 (t, *J* = 7,5 Hz, 12H). δ_c (100 MHz, CDCl₃): 162,0, 159,1, 145,7, 144,9, 143,6, 142,6, 132,6, 132,4, 131,7 (m), 131,4 (m), 129,3, 129,2, 129,1, 128,53, 128,52, 125,2, 123,4, 119,0 (m), 118,3 (m), 114,97, 114,91, 78,1, 76,1, 67,4, 58,8, 55,9, 48,2, 25,6, 25,0, 19,7, 13,6. HRMS (ESI) calculado para C₃₈H₂₉BN₃O₅F₂S [M - H⁺]⁻ 688,1889, encontrado 688,1877.



27

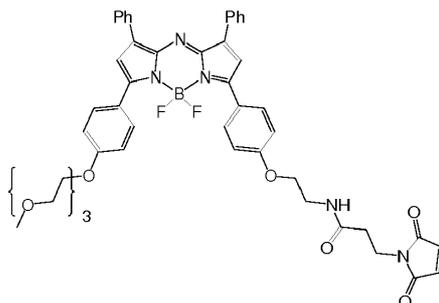
- 10 Se calentaron el compuesto 6 (168 mg, 320 μ mol), propano-1,3-sultona (97 mg, 800 μ mol) y K₂CO₃ (110 mg, 800 μ mol) a reflujo en acetona (60 ml) durante 6 h, bajo atmósfera de N₂. Se filtró el precipitado resultante, se lavó con acetona y metanol frío. La RP-HPLC preparativa (C-18; acetonitrilo-agua, 60:40) dio ácido bis-sulfónico (102 mg, 41%) y ácido monosulfónico 27 (34 mg, 18%) como un sólido verde p.f. > 300°C. Para análisis de RMN el compuesto se transformó en sal de tetrabutilamonio mediante extracción de disolución acuosa de ácidos con CHCl₃
- 15 en presencia de cloruro de tetrabutilamonio. Se lavó la fase orgánica con agua dos veces, se secó y se evaporó. δ_H de ácido monosulfónico. (NBu₄)₂ (400 MHz, CDCl₃): 8,06 - 7,96 (m, 8H), 7,45 - 7,32 (m, 6H), 7,11 - 7,05 (m, 3H), 6,97 - 6,93 (m, 3H), 4,26 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 3,19 - 3,12 (m, 16H), 3,02 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 2,40 - 2,29 (m, 2H), 1,60 - 1,49 (m, 16H), 1,42 - 1,30 (m, 16H), 0,95 (t, *J* = 8 Hz, 24H). δ_c (100 MHz, CDCl₃): 160,9, 159,3, 145,9, 144,1, 143,1, 142,5, 140,6, 132,9, 132,5 (m), 132,3, 131,2 (m), 129,2, 129,0, 128,6, 128,5, 128,4, 124,4, 120,9, 117,4, 117,2, 114,6, 67,1, 58,7, 48,1, 25,5, 23,9, 19,7, 13,6. HRMS (ESI) calculado para C₃₅H₂₇BN₃O₅F₂S [M - H⁺]⁻ 650,1733, encontrado 650,1750.



28

- 25 ¹H RMN (como sal de Bu₄N): (400 MHz, CDCl₃): 0,95 (t, *J* = 8 Hz, 24H), 1,42 - 1,30 (m, 16H), 1,60 - 1,49 (m, 16H), 2,48 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2,61 (s, 4H), 2,97 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 3,44 - 3,51 (m, 2H), 3,52 - 3,75 (m, 6H), 4,01 (t, *J* = 5 Hz, 2H), 4,13 (t, *J* = 5 Hz, 2H), 6,87 - 6,97 (m, 6H), 7,31 - 7,39 (m, 6H), 7,95 - 8,00 (m, 8H). HRMS (ESI) calculado para C₄₉H₃₉BN₅O₁₀F₂S [M - Na⁺]⁻ 890,2479, encontrado 890,2470.

30



29

Se disolvió Boc-Amina 9 (10 mg, 12,2 μmol) en CH_2Cl_2 (1 ml), se añadió lentamente TFA (0,15 ml) y se agitó toda la mezcla de reacción a t.a. durante 1 h. Se neutralizó el ácido mediante la adición de NaHCO_3 acuoso sat., se extrajo la suspensión resultante con CH_2Cl_2 (2×10 ml), se lavaron las fases orgánicas con agua y se secaron (Na_2SO_4). Tras la evaporación, se disolvió el residuo verde resultante en THF seco (1 ml) y se añadió DIPEA (10 μl), seguido por biotina-NHS (4 mg, 12,2 μmol). Tras agitar a t.a. durante 10 min, quedaba todavía algo de material de partida por lo que se añadió más biotina-NHS (4 mg, 12,2 μmol), lo que condujo a conversión completa tras 10 min. Se eliminó el disolvente a presión reducida y se sometió a cromatografía el residuo (sílice, MeOH/DCM, 5:95). Se recogieron fracciones que contenían el producto deseado y se evaporaron para dar 8 mg (69%) de producto como un sólido verde oscuro. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 1,37 - 1,45 (m, 2H), 1,60 - 1,72 (m, 4H), 2,17-2,30 (m, 2H), 2,56 - 2,60 (m, 1H), 2,76 - 2,82 (m, 1H), 3,02 - 3,07 (m, 1H), 3,38 (s, 3H), 3,54 - 3,57 (m, 2H), 3,64 - 3,70 (m, 6H), 3,73 - 3,77 (m, 2H), 3,88 (t, $J = 5$ Hz, 2H), 4,11 (t a, $J = 5$ Hz, 2H), 4,15 - 4,19 (m, 1H), 4,21 (t a, $J = 5$ Hz, 2H), 4,30 - 4,34 (m, 1H), 4,99 (s a, 1H), 5,95 (s a, 1H), 6,54 (s a, 1H), 6,97 - 7,04 (m, 6H), 7,38 - 7,47 (m, 6H), 8,02 - 8,07 (m, 8H). ^{13}C RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 173,4, 161,3, 160,8, 158,4, 157,7, 145,4, 145,2, 143,4, 143,2, 132,45, 132,40, 131,6 (m), 129,3, 128,6, 124,6, 124,2, 118,8, 118,5, 114,9, 114,7, 72,0, 70,9, 70,7, 70,6, 69,6, 67,7, 67,2, 61,7, 60,1, 59,0, 55,4, 40,5, 38,9, 35,8, 28,0, 25,6, 25,4. ESI-HR observado 945,4031 [$\text{M} + \text{H}^+$], masa exacta calculada 945,3992 ($\text{C}_{51}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_7\text{SBF}_2$). (Disco de KBr): 1036, 1474, 1504, 1602, 1701.

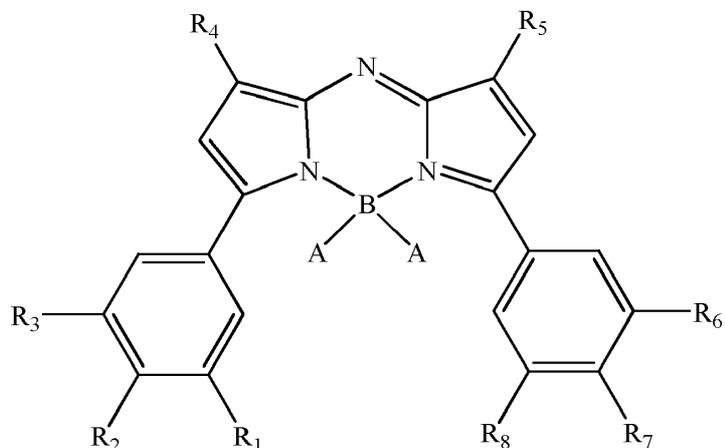
Una característica adicional del fluoróforo conjugado con las nanopartículas es que las partículas pueden construirse de manera tal que la intensidad de fluorescencia de la partícula pueda responder a cambios microambientales. Por ejemplo, en una realización, las partículas son prácticamente fluorescentes silenciosas en medios acuosos (debido a la autoagregación en la superficie de las partículas y a la extinción por las moléculas de agua), incluidos los medios de crecimiento celular. En contraste, después de la endocitosis y la internalización de las partículas dentro de las células, se vuelven altamente fluorescentes (debido a que las moléculas fluoróforas individuales se alejan de la superficie de la partícula y se protegen de las moléculas de agua circundantes, lo que da lugar a un gran aumento de su intensidad de fluorescencia). Esta propiedad de conmutación de fluorescencia activada a desactivada facilita la obtención de imágenes en tiempo real de los procesos de captación celular, ya que las partículas y las células conjugadas pueden incubarse conjuntamente sin un enmascaramiento o una señal fluorescente interferente de las partículas extracelulares.

En las figuras 37 y 38 se muestran seis marcos estáticos de la captación de partículas obtenida por obtención de imágenes en tiempo real de células HEK297T y CAKI-1 coincubadas con partículas conjugadas con fluoróforo. Está claro que la intensidad de la fluorescencia intracelular aumenta con el tiempo a medida que las células son absorbidas por las células, pero también que las partículas extracelulares son relativamente no fluorescentes (fondo oscuro).

En la figura 39, se ilustra un ejemplo de obtención de imágenes de nanopartículas *in vivo*. Fue posible obtener imágenes del ganglio linfático de un ratón tras inyección intradérmica de partículas conjugadas de colorante en el pie izquierdo del ratón. Se obtuvieron imágenes satisfactoriamente del ganglio linfático más próximo al sitio de inyección después de que se realizara la inyección.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)



5

en la que cada A es fluoruro,

10

R₁, R₂, R₃, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, OH, NO₂ u O-L-X, en donde L es un grupo espaciador seleccionado de alquilo de cadena lineal o ramificada que tienen hasta 25 átomos de carbono, metilenos, aminas, amidas o éteres

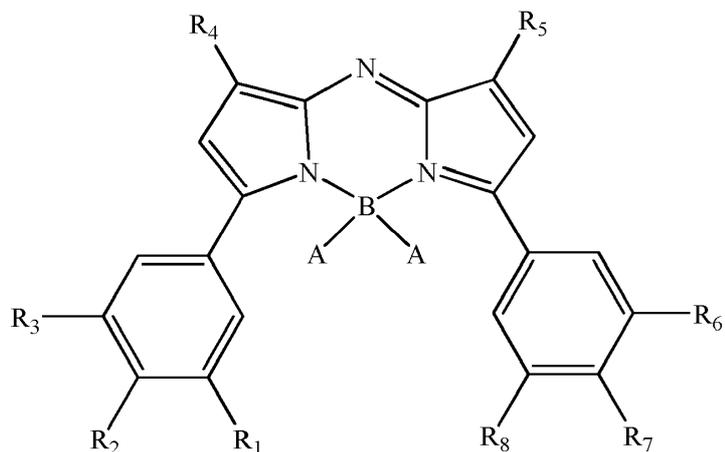
15

y X es un grupo de conjugación o un grupo de solubilización en agua; con la condición de que al menos uno de R₁, R₂, R₃ sea OH u O-L-X y al menos uno de R₆, R₇ y R₈ sea OH u O-L-X; y

R₄ y R₅, que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno independientemente un resto arilo; o un resto alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene hasta 25 átomos de carbono.

20

2. Compuesto según la reivindicación 1, y que tiene una fórmula (IA),



25

en la que R₁, R₂, R₃, R₆, R₇ y R₈ son cada uno independientemente H, OH, NO₂ u O-L-X, con la condición adicional de que al menos uno de R₁, R₂, R₃, R₆, R₇ y R₈ sea O-L-X.

30

3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que sólo uno de R₁, R₂, R₃ es OH u O-L-X, y sólo uno de R₆, R₇ y R₈ es OH en el que X es un grupo de conjugación o un grupo de solubilización en agua; o en el que sólo uno de R₁, R₂ y R₃ es OH y sólo uno de R₆, R₇ y R₈ es O-L-X, en el que X es un grupo de conjugación o un grupo de solubilización en agua.

30

4. Compuesto según la reivindicación 2, en el que cuando sólo uno de R₁, R₂ y R₃ es O-L-X y sólo uno de R₆, R₇ y R₈ es O-L-X, en el que:

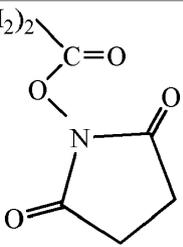
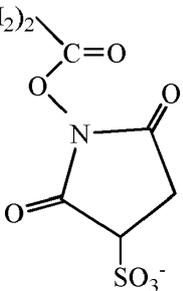
35

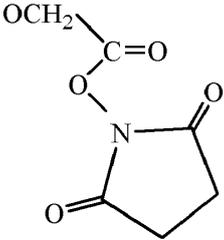
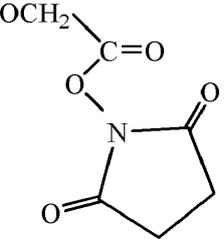
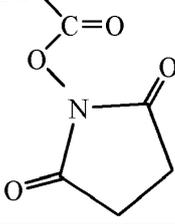
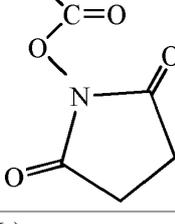
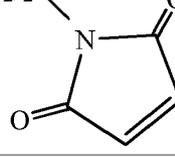
(a) cada X es un grupo de conjugación; o

(b) cada X es un grupo de solubilización en agua; o

(c) una X es un grupo de conjugación y la otra X es un grupo de solubilización en agua.

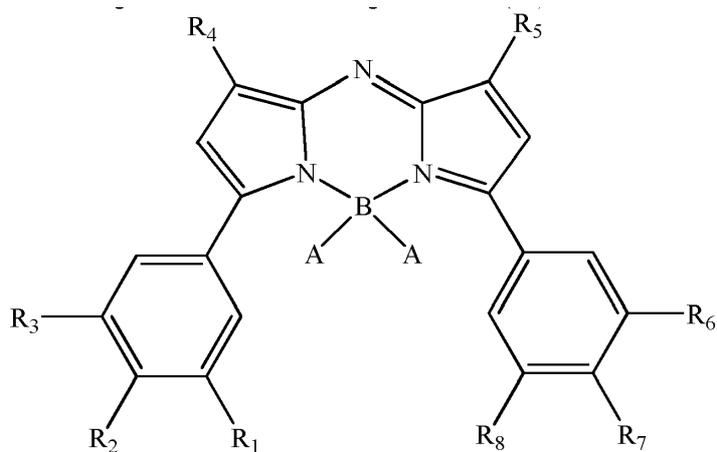
- 5
5. Compuesto según la reivindicación 4, en el que cada A es F, R₁ es H, R₂ es O-L-X, R₃ es H, R₄ es Ph, R₅ es Ph, R₆ es H, R₇ es O-L-X y R₈ es H, en el que una X es un grupo de conjugación y la otra X es un grupo de solubilización en agua.
- 10
6. Compuesto según cualquier reivindicación anterior, en el que L se selecciona de resto aminas, amidas y éter.
- 15
7. Compuesto según la reivindicación 6, en el que el resto amida se selecciona de (CH₂)₂NHCO(CH₂)-, -(CH₂)₂NHCO(CH₂)₂- y -CONH(CH₂)₂NHCO(CH₂)₂ y/o el resto amina es -(CH₂)₂-NH-; y/o el resto éter es CH₂CH₂OCH₂CH₂-.
- 20
8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los compuestos tienen una absorbancia máxima λ_{máx} a más de 660 nm, preferiblemente más de 670 nm, y una emisión máxima a más de 690 nm, preferiblemente más de 720 nm.
9. Compuesto según la reivindicación 1 seleccionado de los compuestos mostrados en la tabla a continuación y en el que cada A es F, R₁ es H, R₃ es H, R₄ es Ph, R₅ es Ph y R₈ es H.

Número de referencia de compuesto en ejemplos donde sea aplicable	R ₂	R ₆	R ₇
2 (Ejemplo 2(A))	OH	H	OCH ₂ -C≡CH
9 (Ejemplo 3(A))	O((CH ₂) ₂ O) ₃ CH ₃	H	O(CH ₂) ₂ NHBoc
Variación de 9 (Ejemplo 3(A))	O((CH ₂) ₂ O) ₃ CH ₃	H	O(CH ₂) ₂ NH ₂
10 (Ejemplo 3(A))	O((CH ₂) ₂ O) ₃ CH ₃	H	O(CH ₂) ₂ NHCO(CH ₂) ₂ CO ₂ H
11a (Ejemplo 3(A))	O((CH ₂) ₂ O) ₃ CH ₃	H	O(CH ₂) ₂ NHCO(CH ₂) ₂ 
11b (Ejemplo 3(A))	O((CH ₂) ₂ O) ₃ CH ₃	H	O(CH ₂) ₂ NHCO(CH ₂) ₂ 
16 (Ejemplo 4)	OCH ₂ CO ₂ ⁻	H	OCH ₂ CO ₂ ⁻
Variación de 16 (Ejemplo 4)	OCH ₂ CO ₂ H	H	OCH ₂ CO ₂ H
17 (Ejemplo 4)	O(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻	H	O(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻

Variación de 17 (Ejemplo 4)	$O(CH_2)_3SO_3H$	H	$O(CH_2)_3SO_3H$
26 (Ejemplo 6)	$OCH_2CH_2CH_2SO_3Na$	H	$OCH_2-C\equiv CH$
---	OCH_2CO_2H	H	$OCH_2-C\equiv CH$
---	$O(CH_2)_3SO_3Na$	H	$O(CH_2)_2NH_2$
---	$O(CH_2)_3SO_3Na$	H	OCH_2CO_2H
---	$O(CH_2)_3SO_3Na$	H	
27 (Ejemplo 6)	$O(CH_2)_3SO_3Na$	H	OH
---	OCH_2CO_2H	H	OH
---	OCH_2CO_2H	NO ₂	OH
---		H	OH
---	$O(CH_2)_3SO_3Na$	H	$OCONH(CH_2)_2NHCO(CH_2)_2$ 
28 (Ejemplo 6)	$O(CH_2)_3SO_3Na$	H	$O(CH_2)_2NHCO(CH_2)_2$ 
---	$O(CH_2)_3SO_3Na$	H	$O(CH_2)_2NHCO(CH_2)_2$ 
---		H	

29 (Ejemplo 6)	$O((CH_2)_2O)_3CH_3$	H	
30 (Ejemplo 6)	$O((CH_2)_2O)_3CH_3$	H	
31 (Ejemplo 6)	$O((CH_2)_2O)_3CH_3$	H	

10. Compuesto según la reivindicación 1, y que tiene una fórmula (IB),

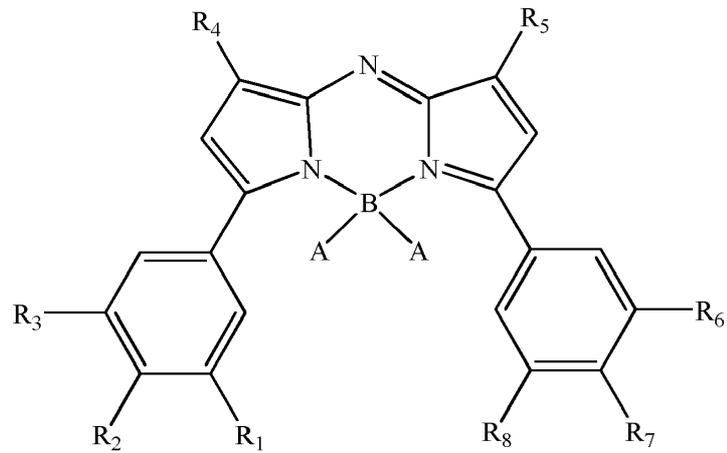


5

en la que R_1 , R_2 , R_3 , R_6 , R_7 y R_8 son cada uno independientemente H, OH o NO_2 ; con la condición de que al menos uno de R_1 , R_2 , R_3 sea OH y al menos uno de R_6 , R_7 y R_8 sea OH.

11. Método para la preparación de un compuesto de fórmula (IB)

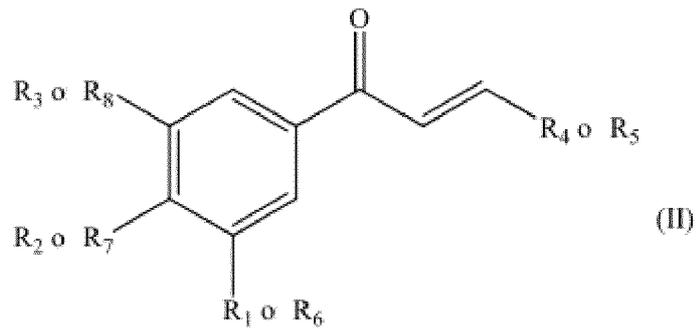
10



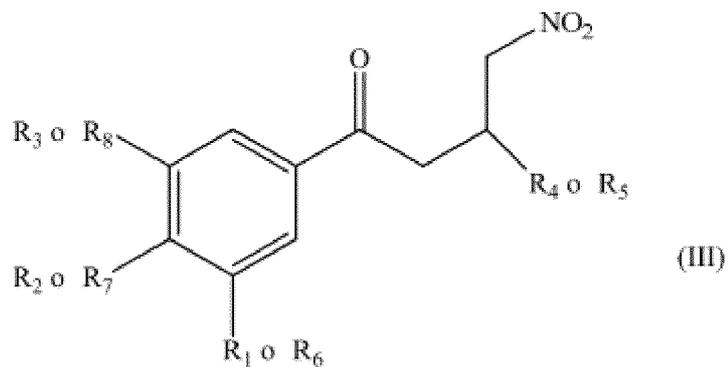
en la que A es fluoruro

5 R₄ y R₅, que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno independientemente H; o son un resto arilo; o resto alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene hasta 25 átomos de carbono, que comprende las etapas de:

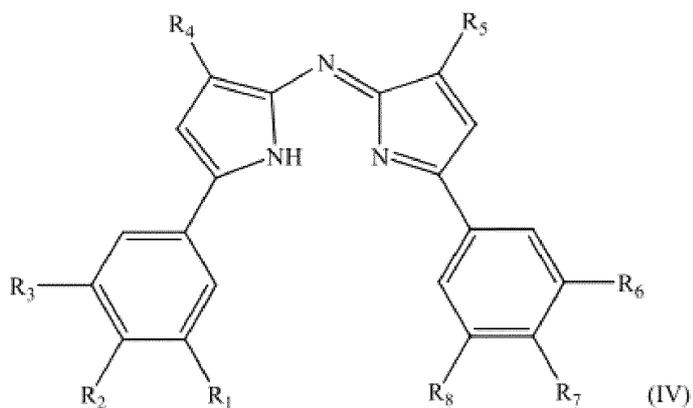
10 hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II)



con una fuente de nitro-metileno en un disolvente adecuado para formar un compuesto de fórmula (III)

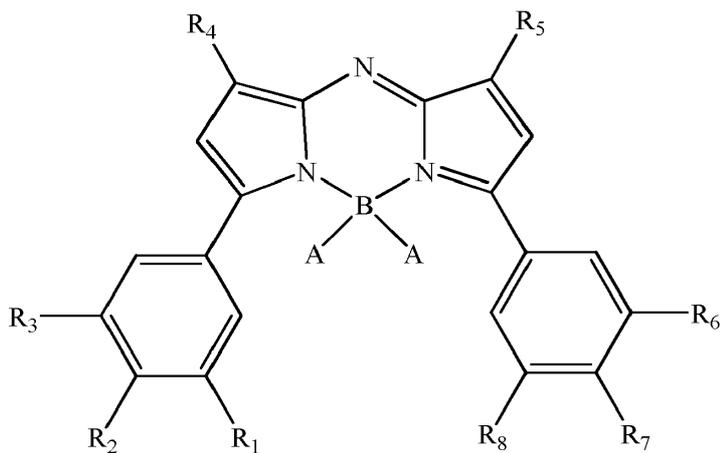


15 hacer reaccionar un compuesto de fórmula (III) con una fuente de amonio en un disolvente adecuado para formar un compuesto de fórmula (IV)



y

- 5 hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IV) con trihaluro de boro o un derivado del mismo para formar un compuesto de fórmula (IB).
12. Método de preparación de un compuesto de fórmula (IA)



10

en la que A es flúor; R₄ y R₅, que pueden ser iguales o diferentes, son cada uno independientemente H; o son un resto arilo; o un resto alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene hasta 25 átomos de carbono,

15 que comprende una etapa de convertir al menos un grupo OH del compuesto de fórmula (IB) en O-L-X en presencia de un disolvente adecuado.

13. Conjugado de colorante, que comprende (i) un compuesto de fórmula (I) que tiene al menos un grupo de conjugación X, y (ii) un grupo de unión complementario; en el que el grupo de conjugación X puede unir de manera covalente el compuesto de fórmula (I) al grupo de unión complementario.

20

14. Conjugado de colorante según la reivindicación 13, en el que el al menos un grupo de conjugación y el al menos un grupo de unión complementario se selecciona de los grupos que consisten en:-

25 (a) una amina como grupo de conjugación y un ácido carboxílico, aldehído, cetona o éster como grupo de unión complementario;

(b) un ácido carboxílico como grupo de conjugación y una amina como grupo de unión complementario;

30 (c) un éster succinimídico como grupo de conjugación y una amina como grupo de unión complementario;

(d) una maleimida como grupo de conjugación y un tiol como grupo de unión complementario;

(e) un alquino como grupo de conjugación y una azida como grupo de unión complementario;

(f) un éster *orto*-diarilfosfonil-aril-metílico como grupo de conjugación y una azida como grupo de unión complementario; y

5

(g) biotina como grupo de conjugación y avidina como grupo de unión complementario.

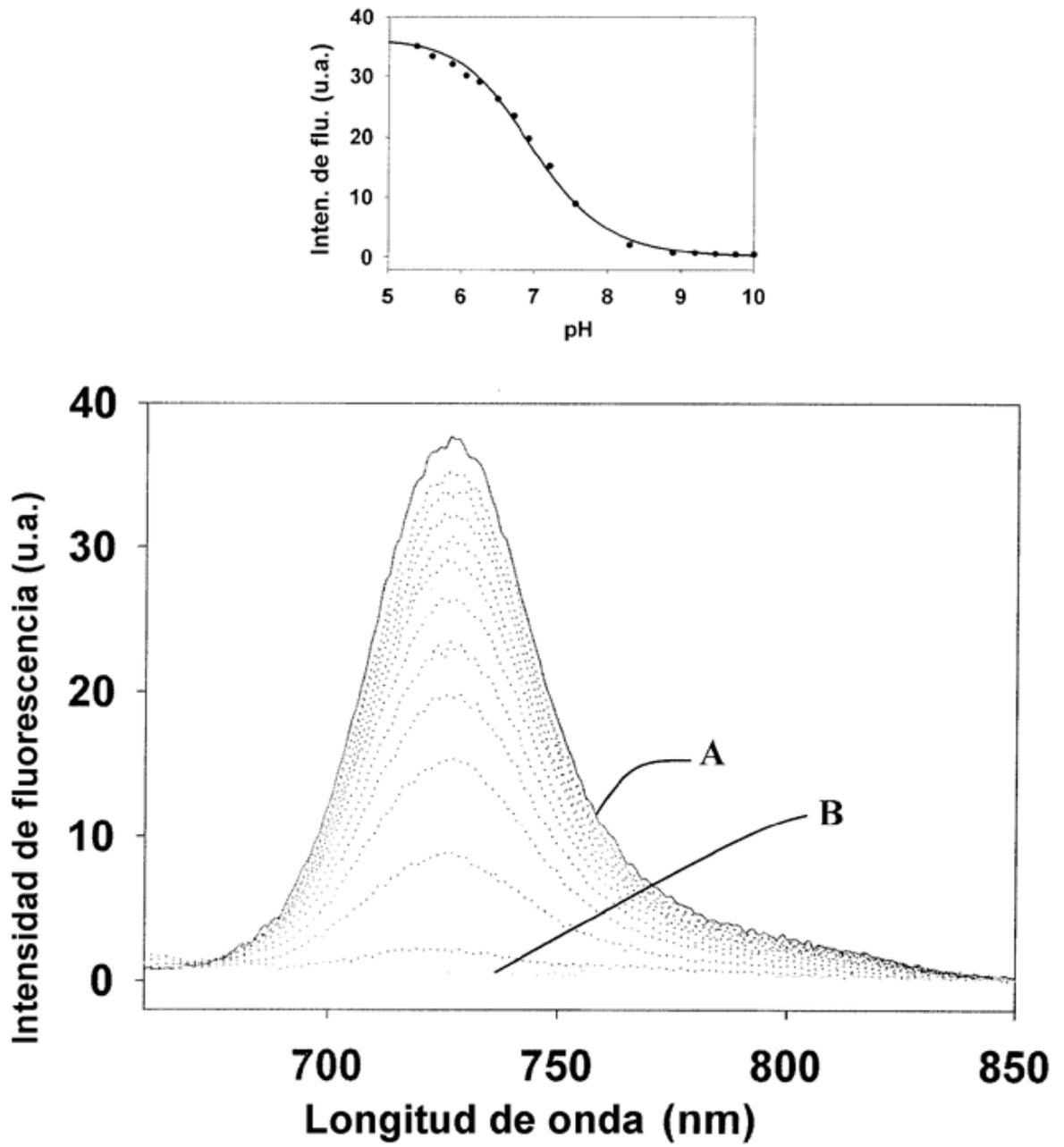


Figura 1

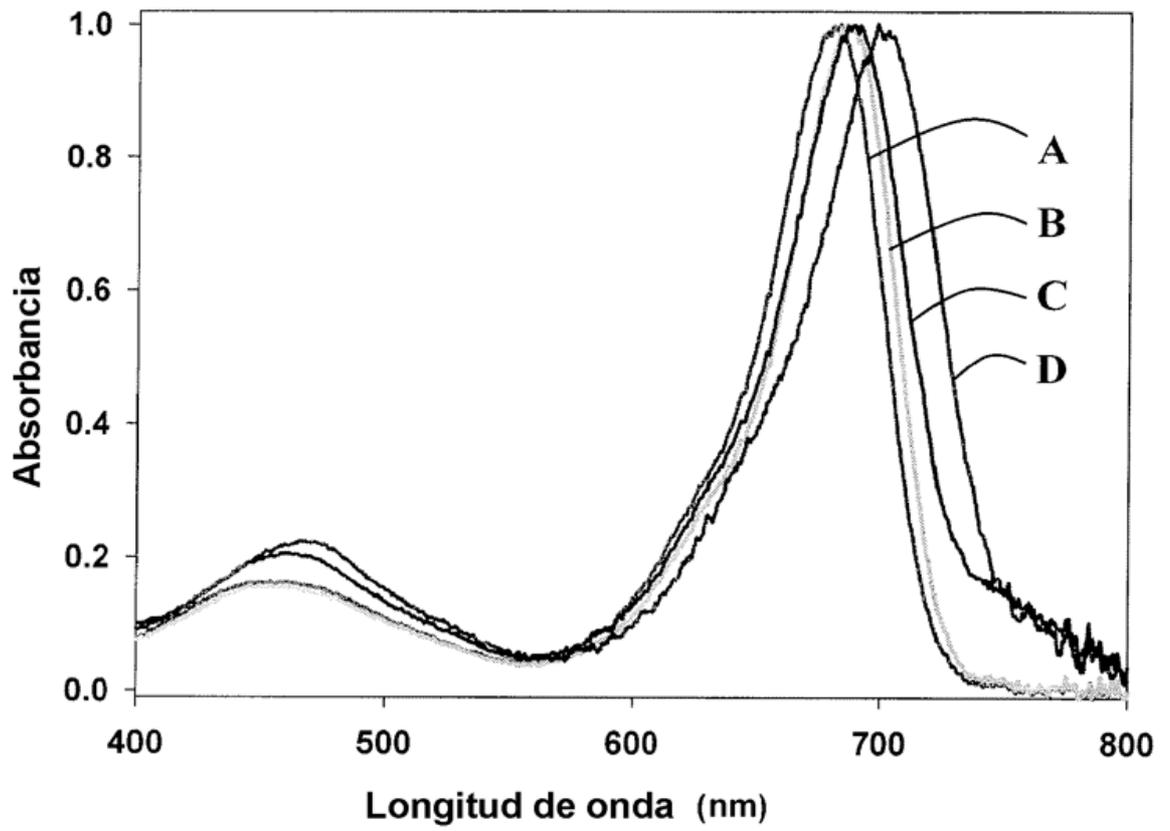


Figura 2

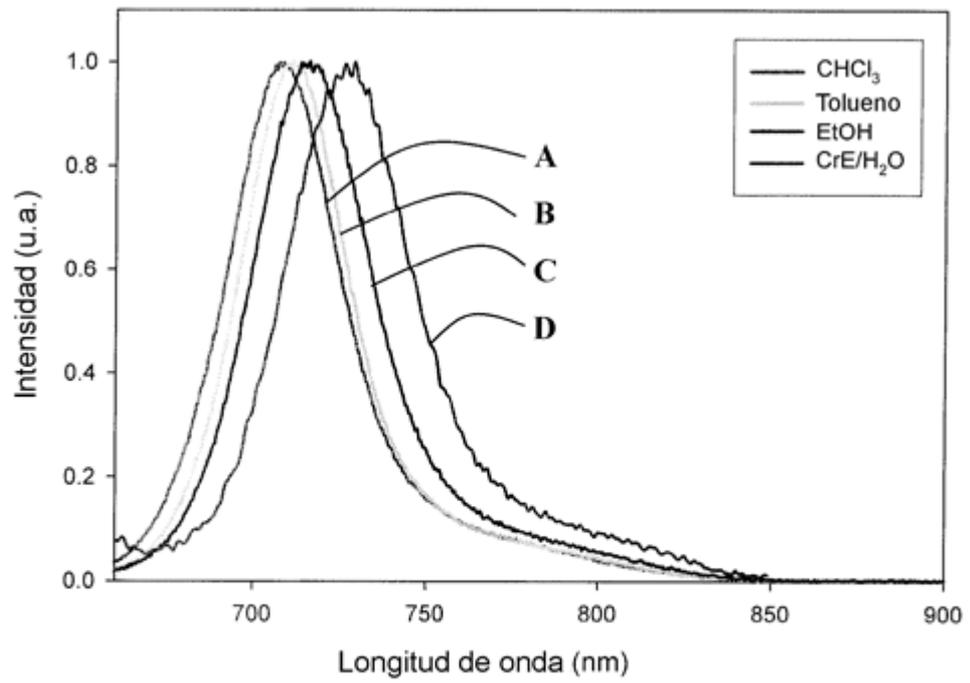


Figura 3

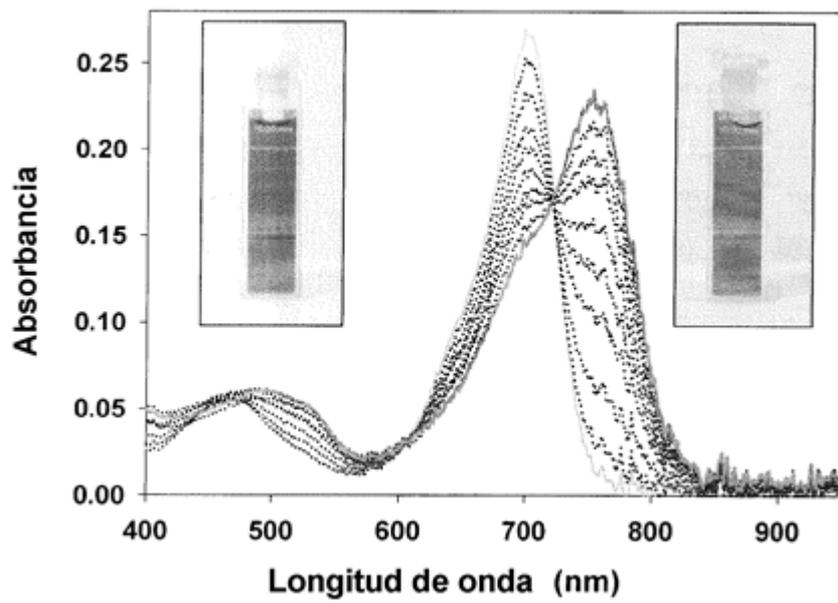


Figura 4

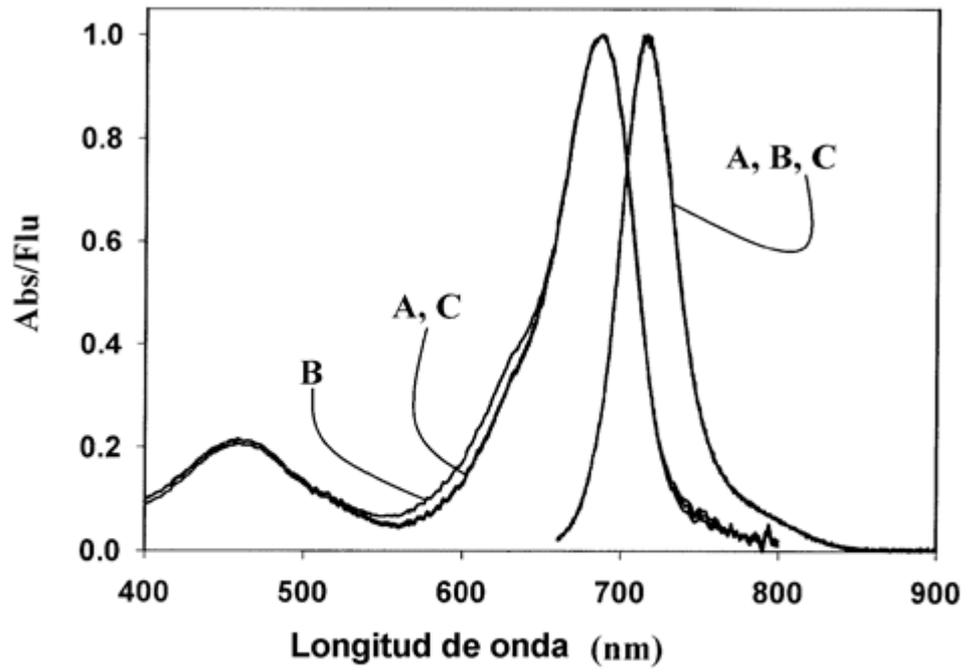


Figura 5

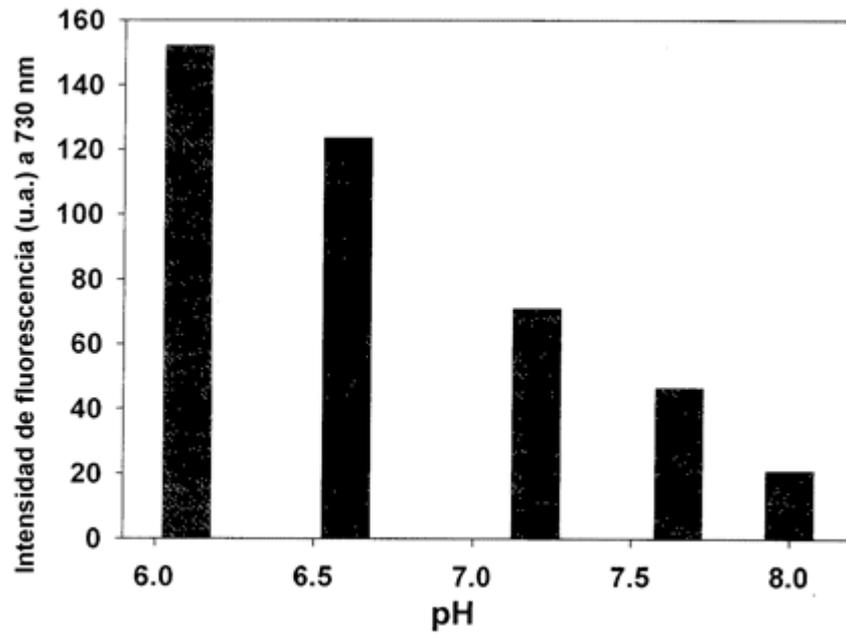


Figura 6

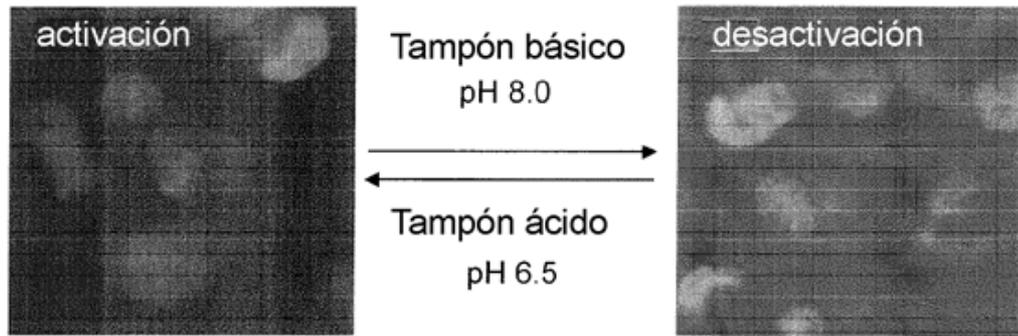


Figura 7

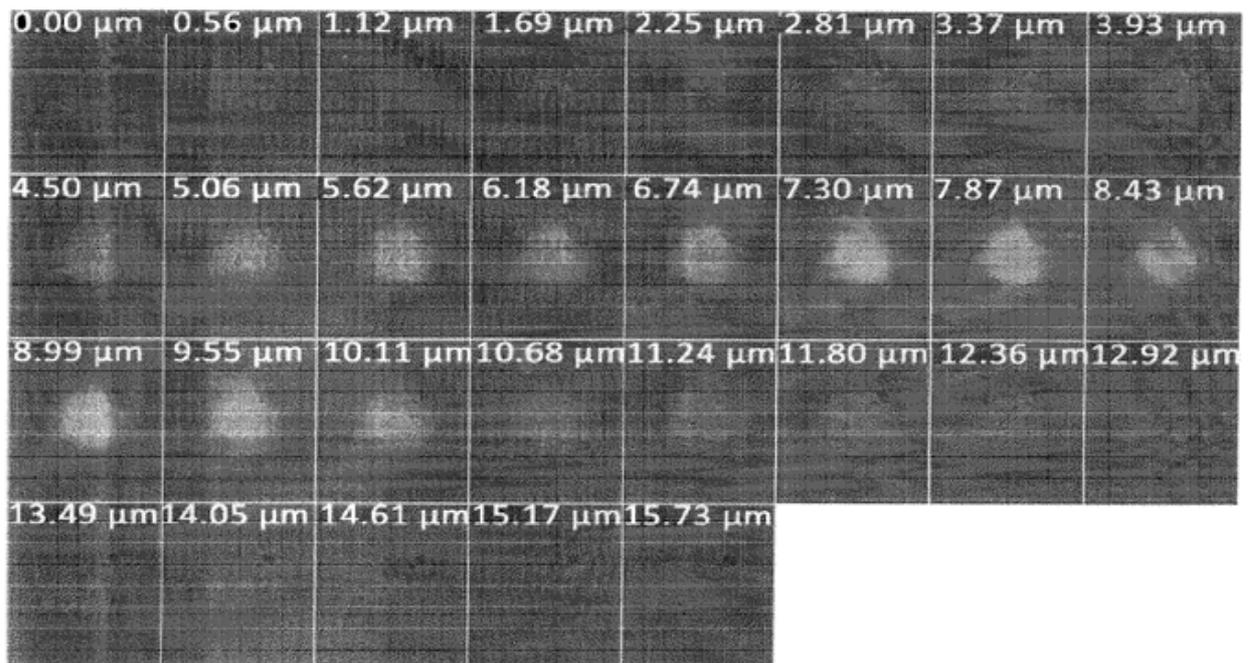


Figura 8

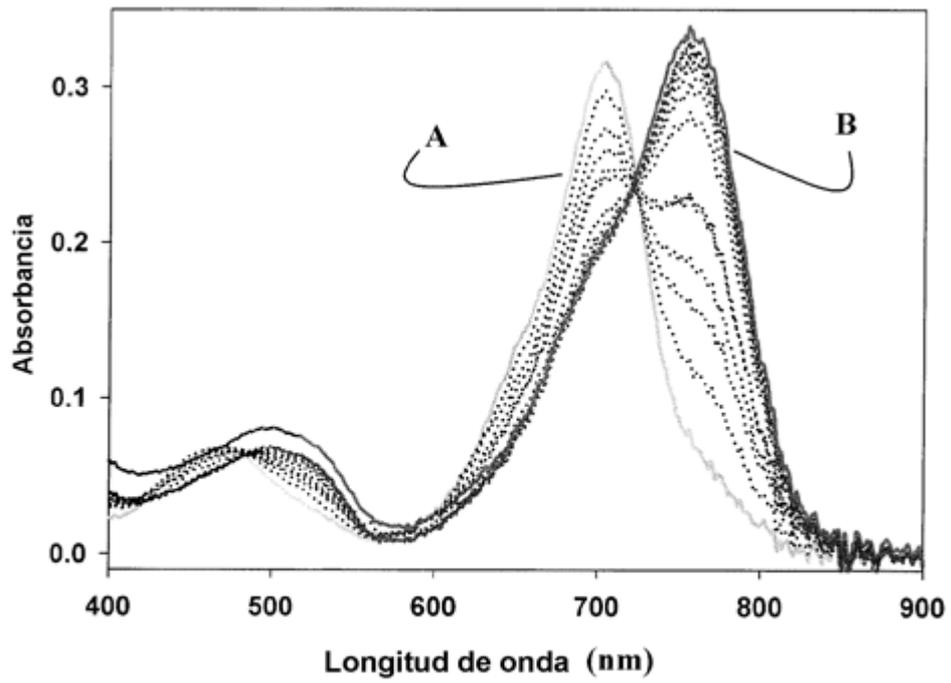


Figura 9

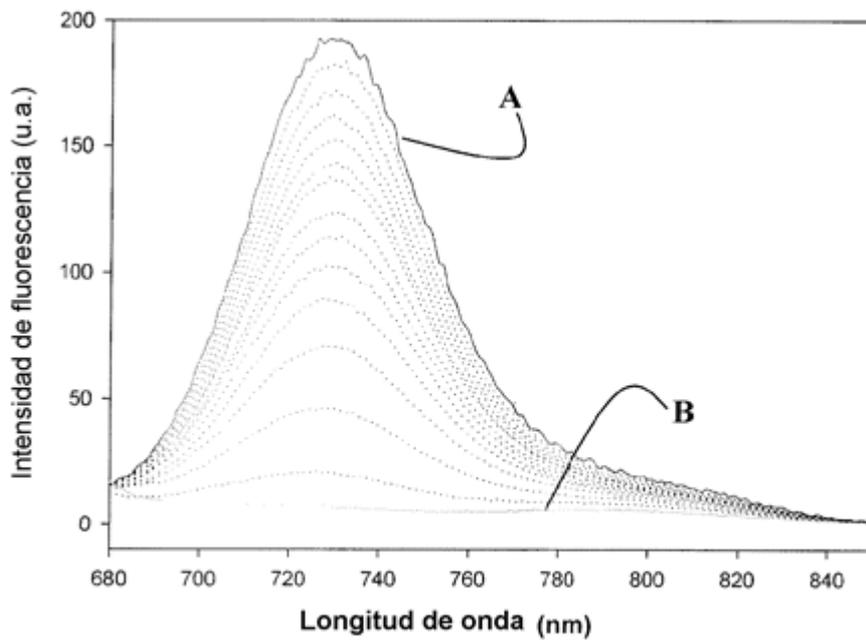


Figura 10

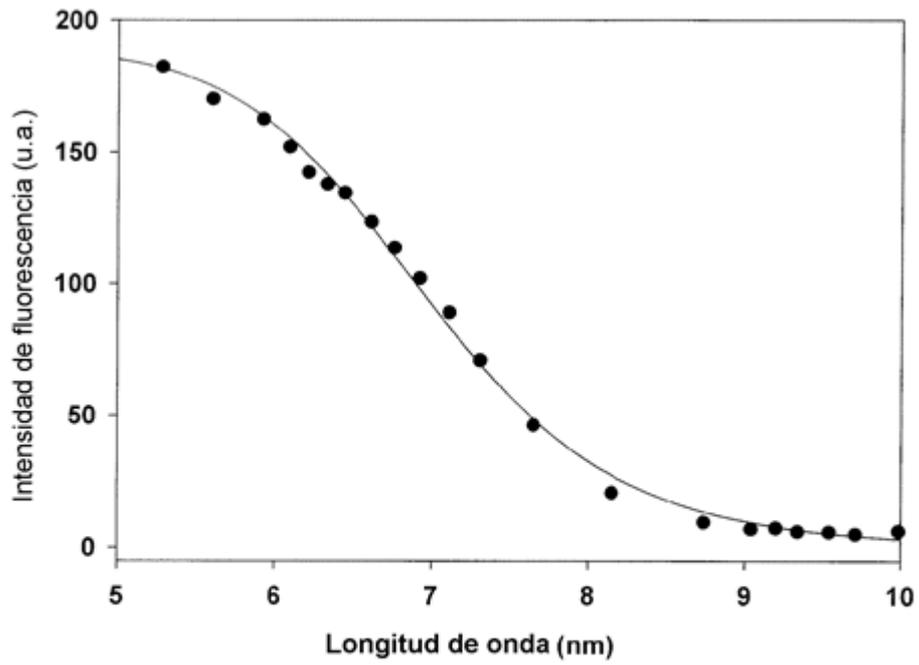


Figura 11

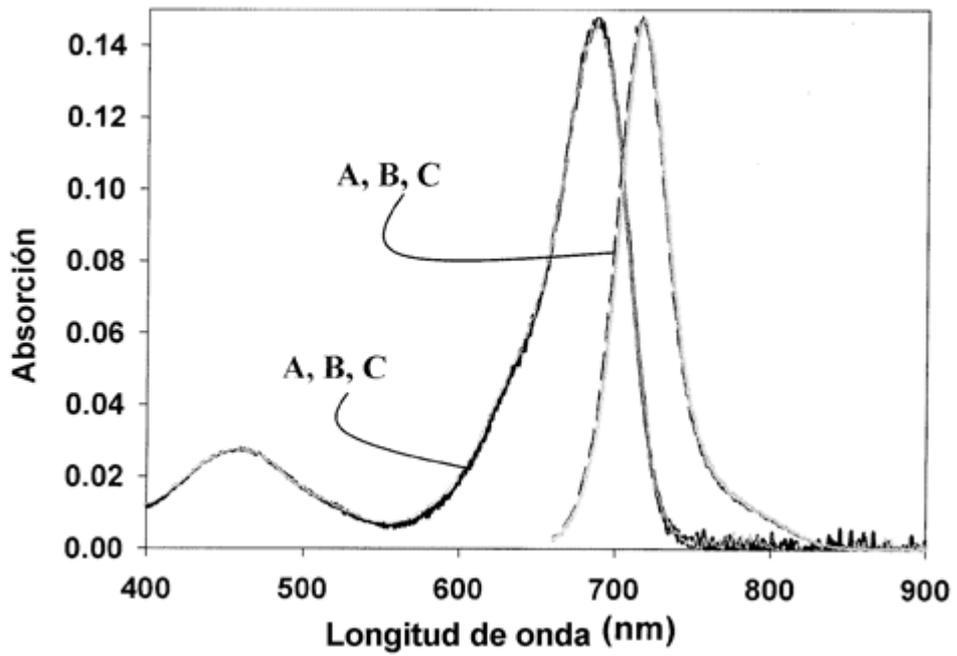


Figura 12

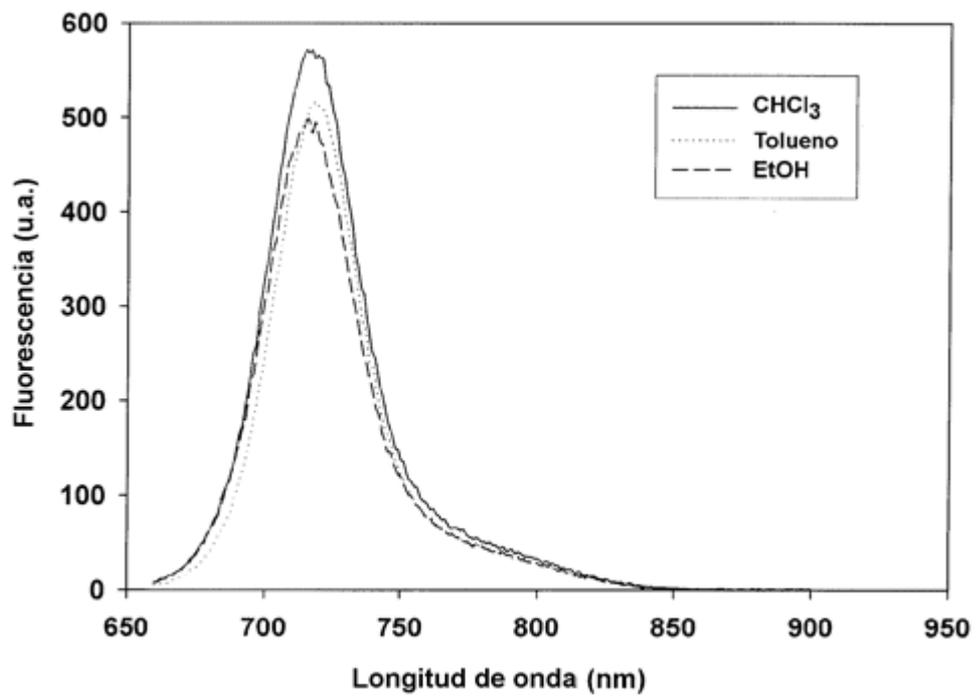
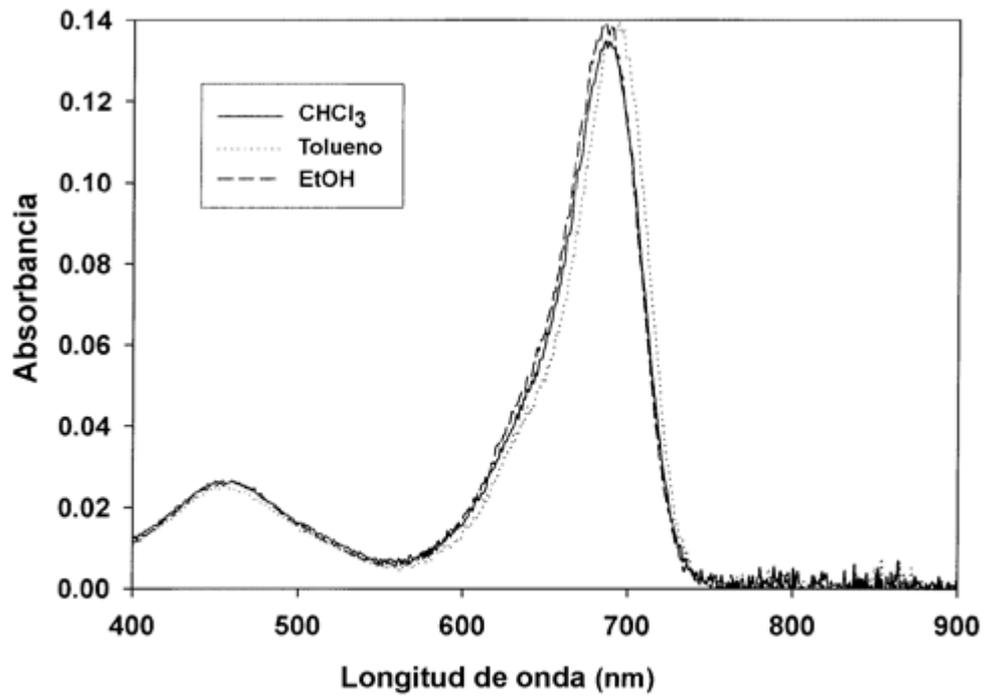


Figura 13

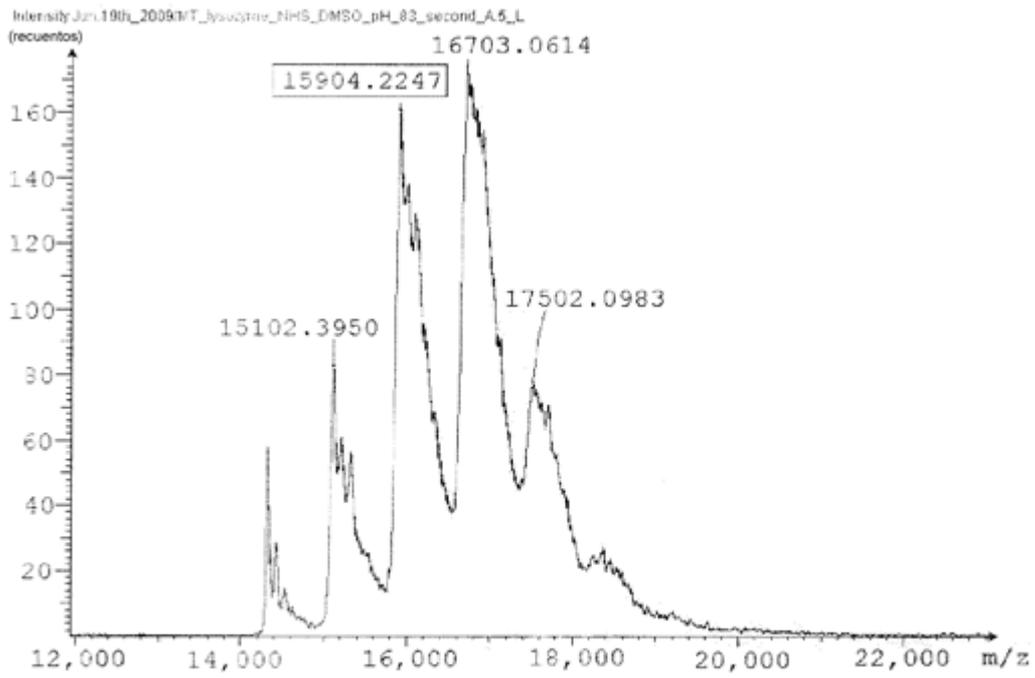


Figura 14

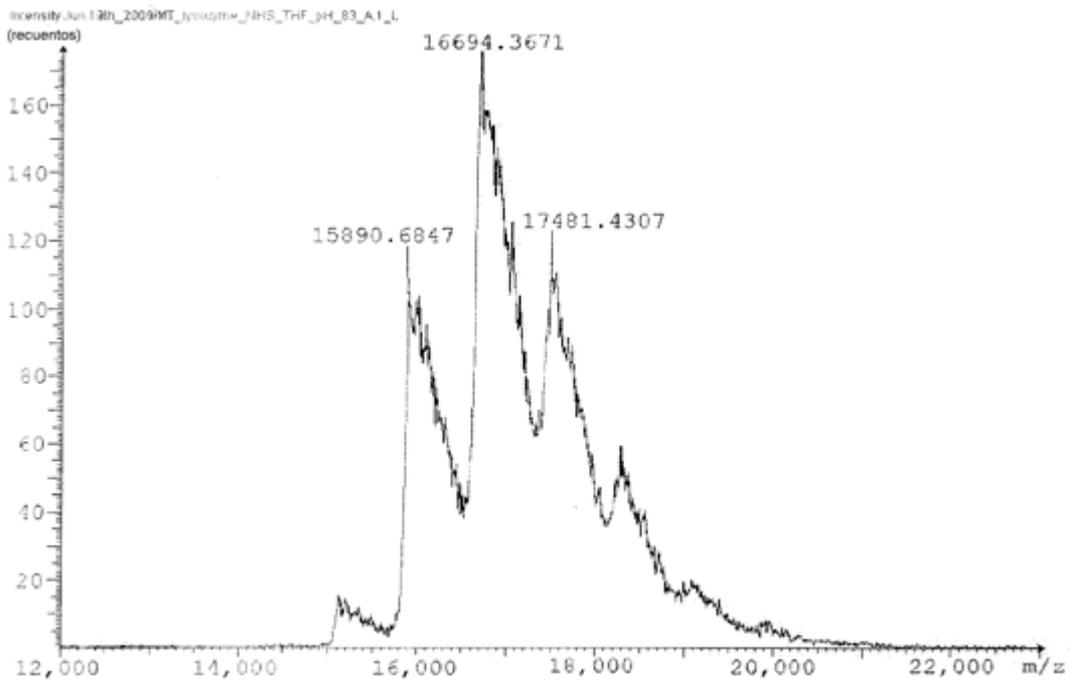


Figura 15

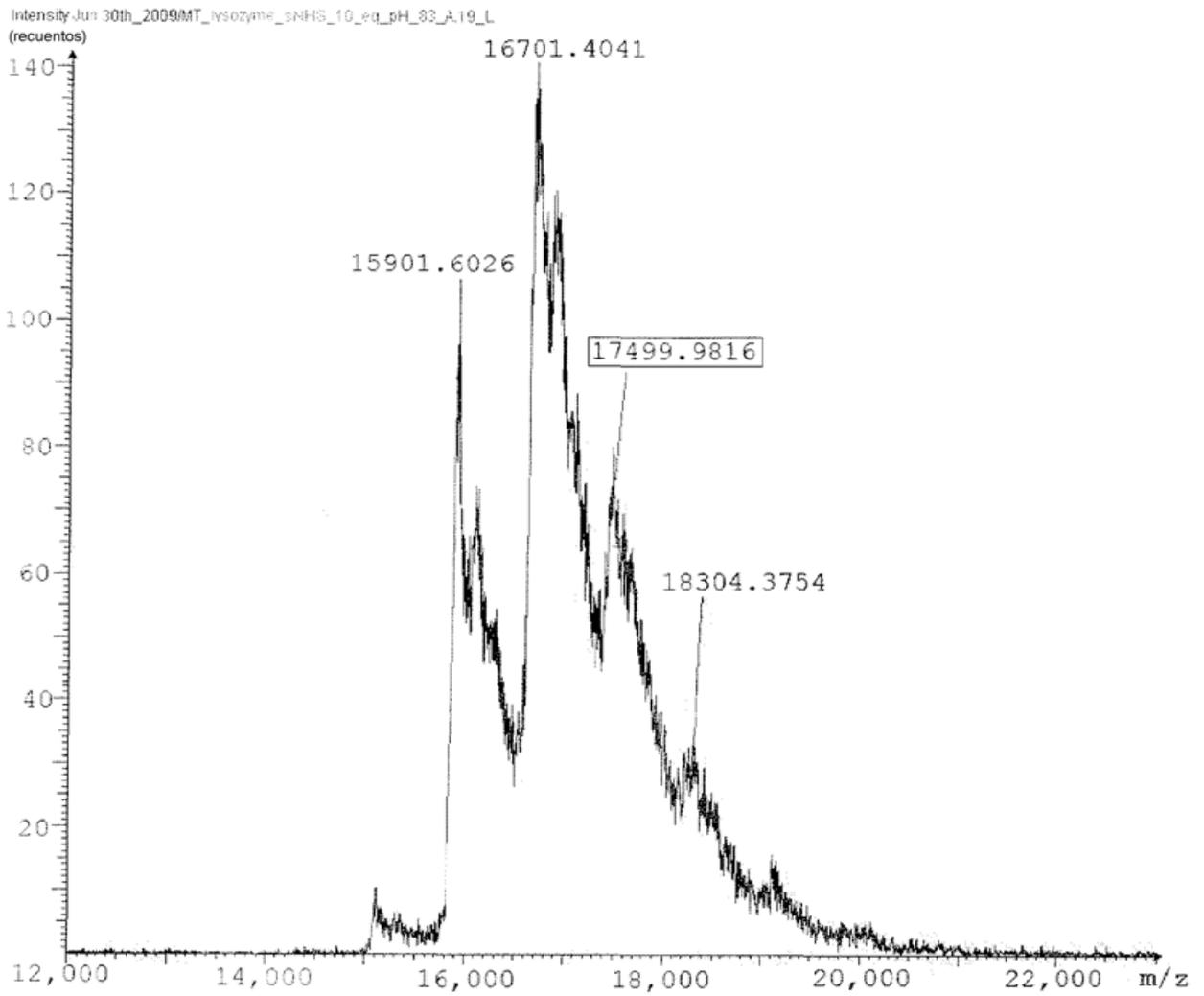


Figura 16

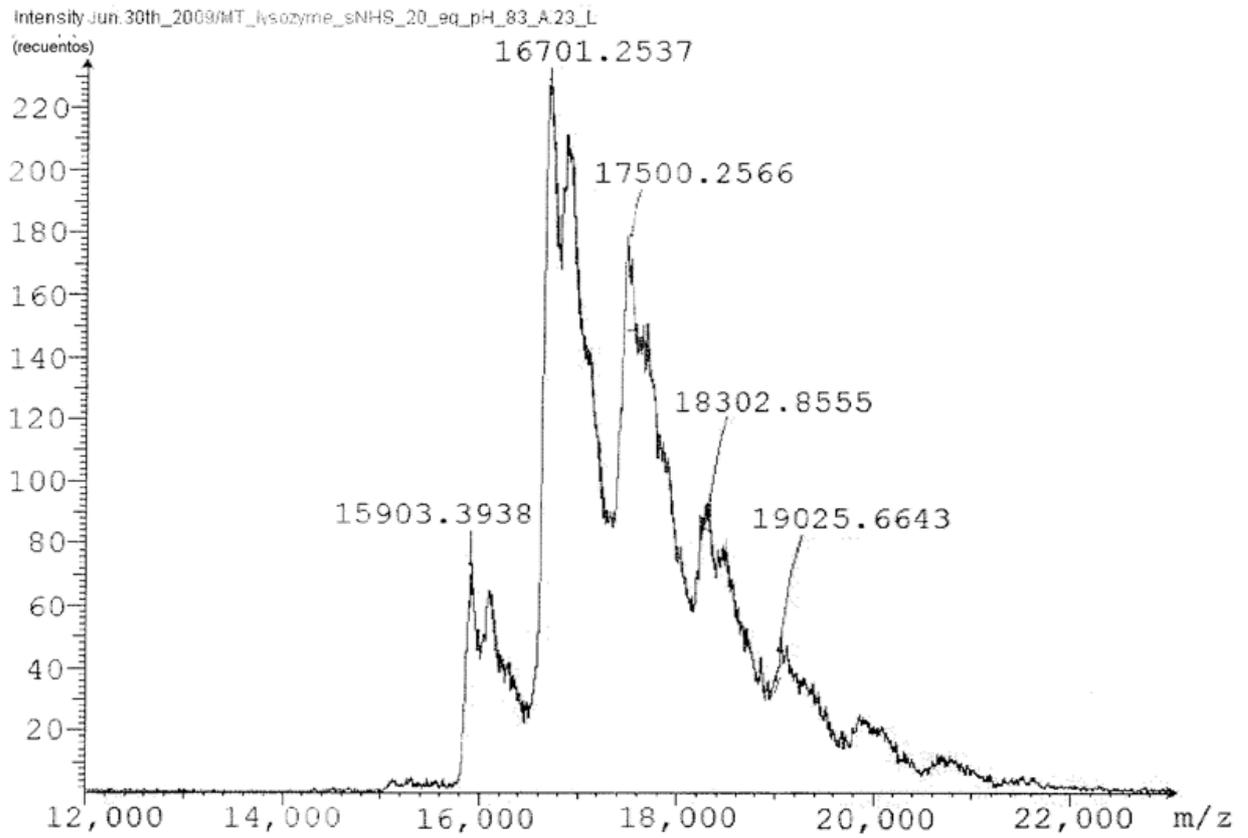


Figura 17

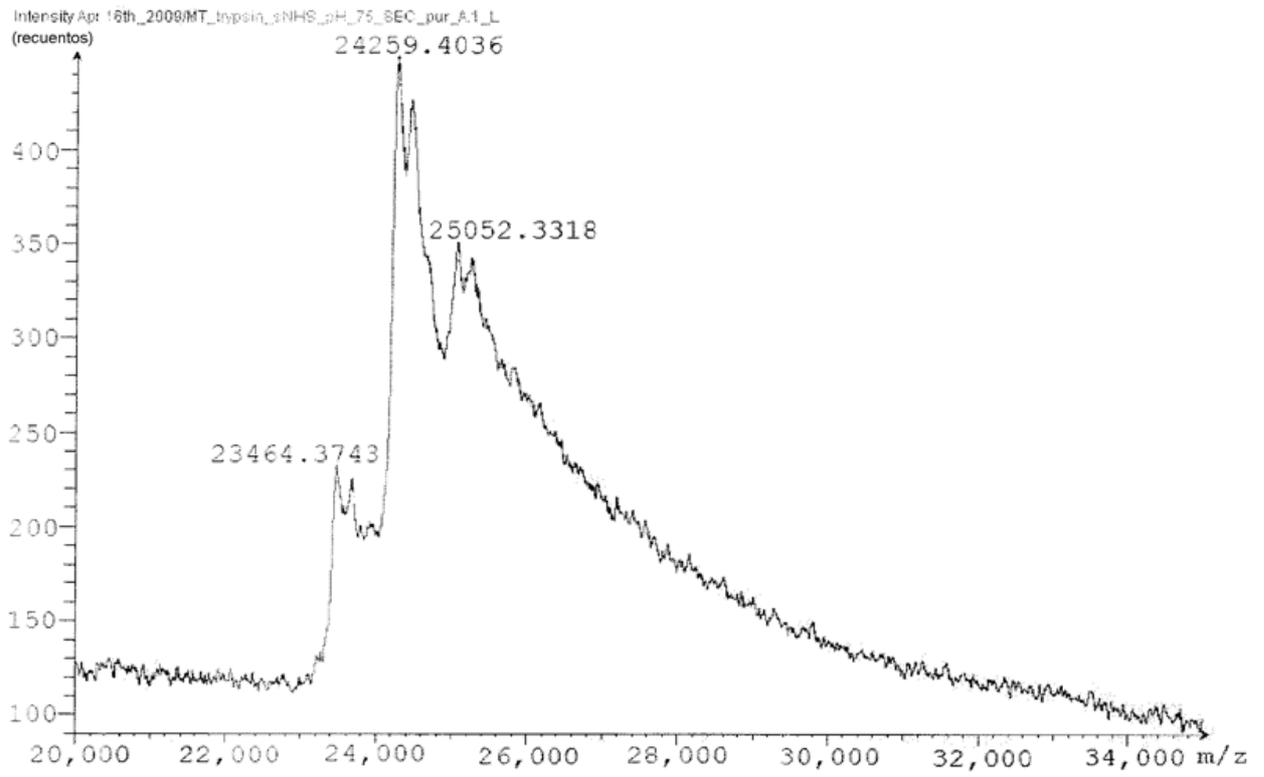


Figura 18

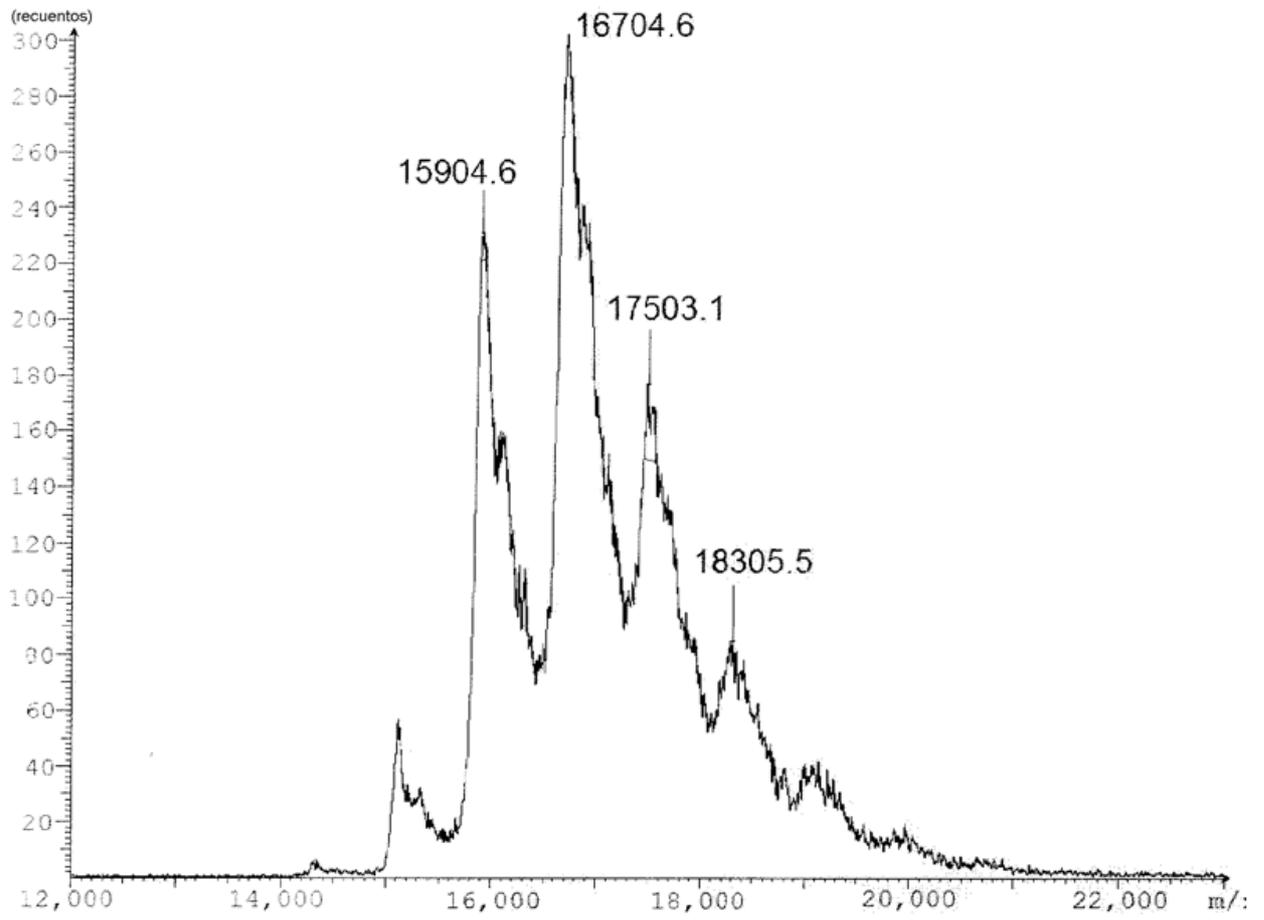
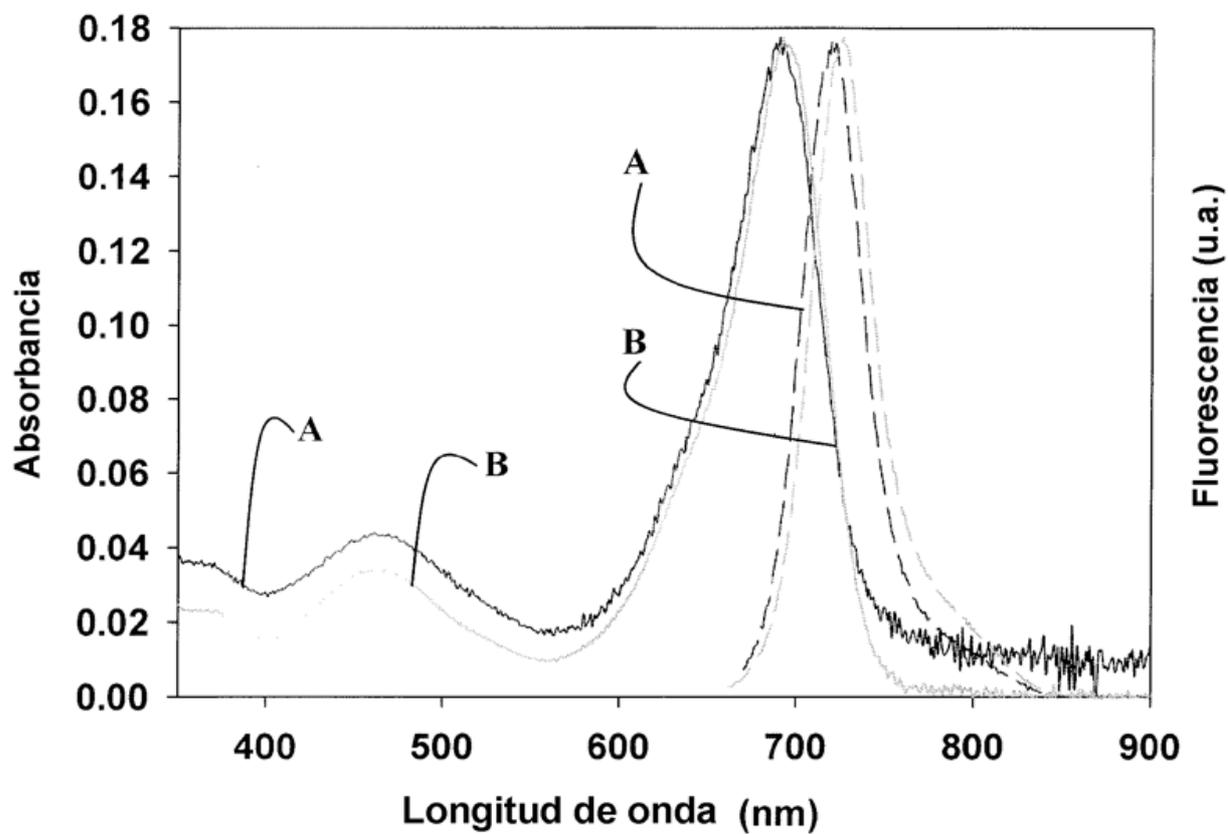


Figura 19



Entrada	Conjugado	$\lambda_{\text{máx}} \text{abs nm}^a$	$\lambda_{\text{máx}} \text{emis nm}^{a,b,c}$
1	lisosima	690	720
2	tripsina	692	725

^aPBS pH 7.0 con SDS al 0,4%. ^b excitación a 640 nm. ^c anchuras de ranura 5 nm.

Figura 20

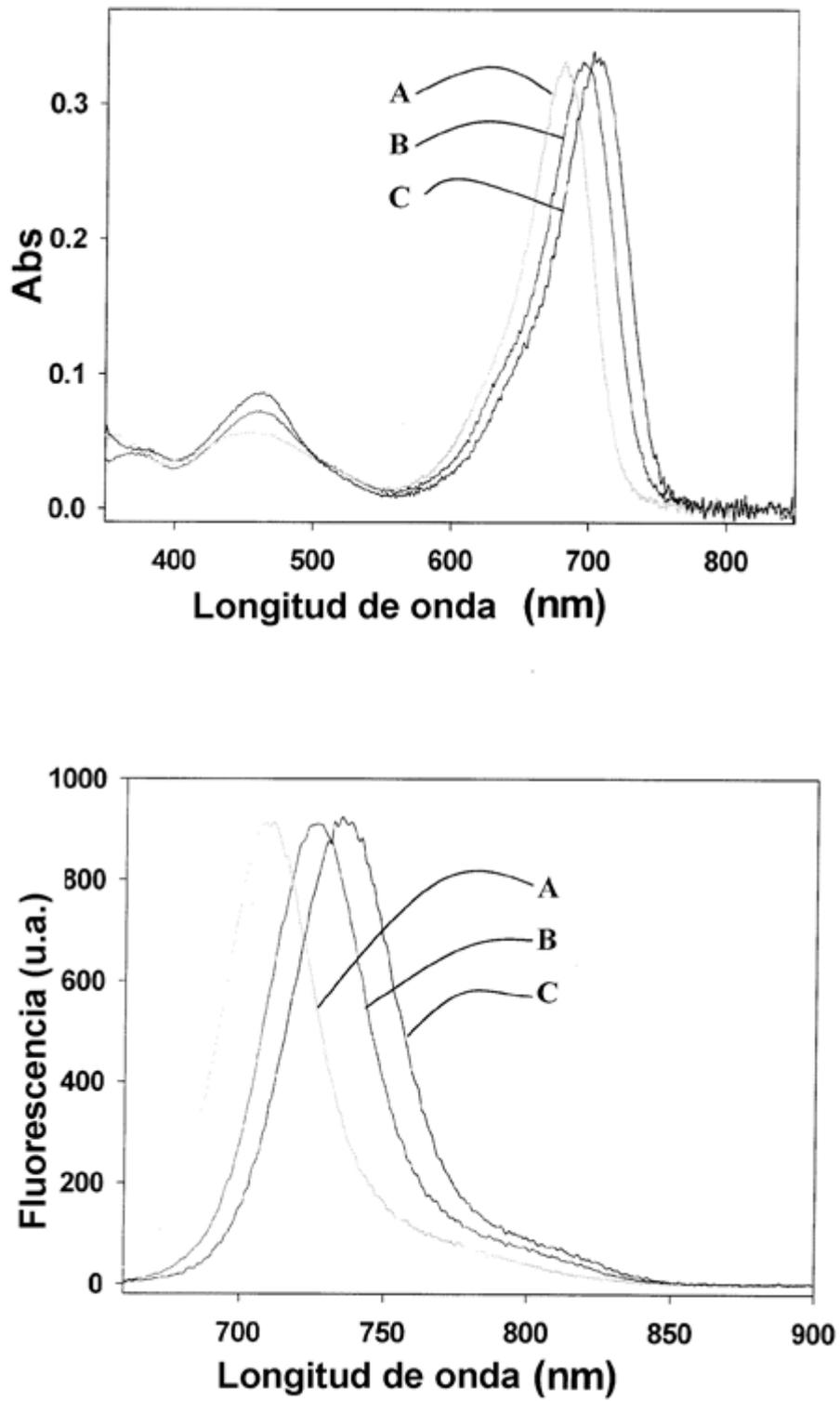


Figura 21

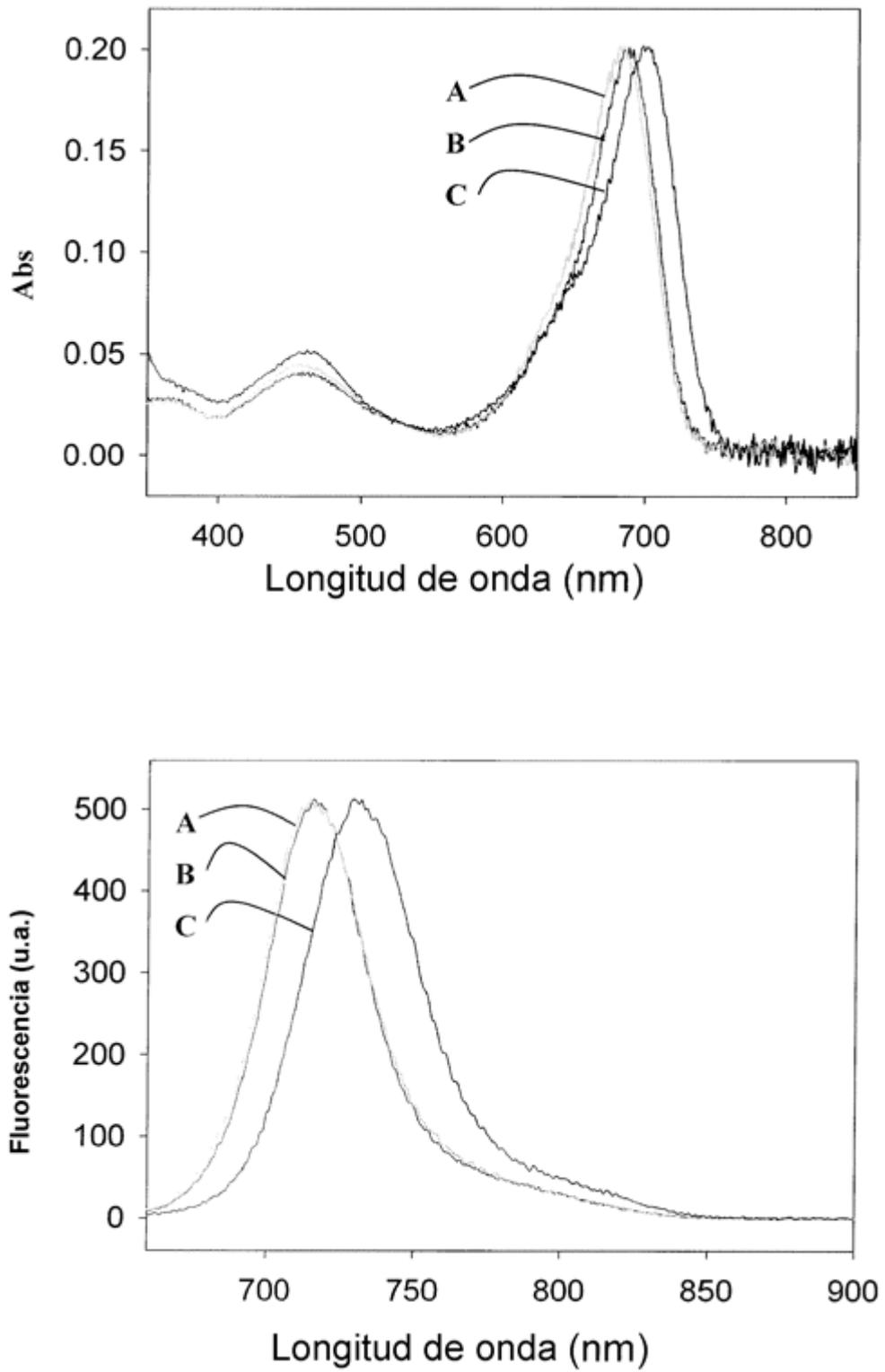


Figura 22

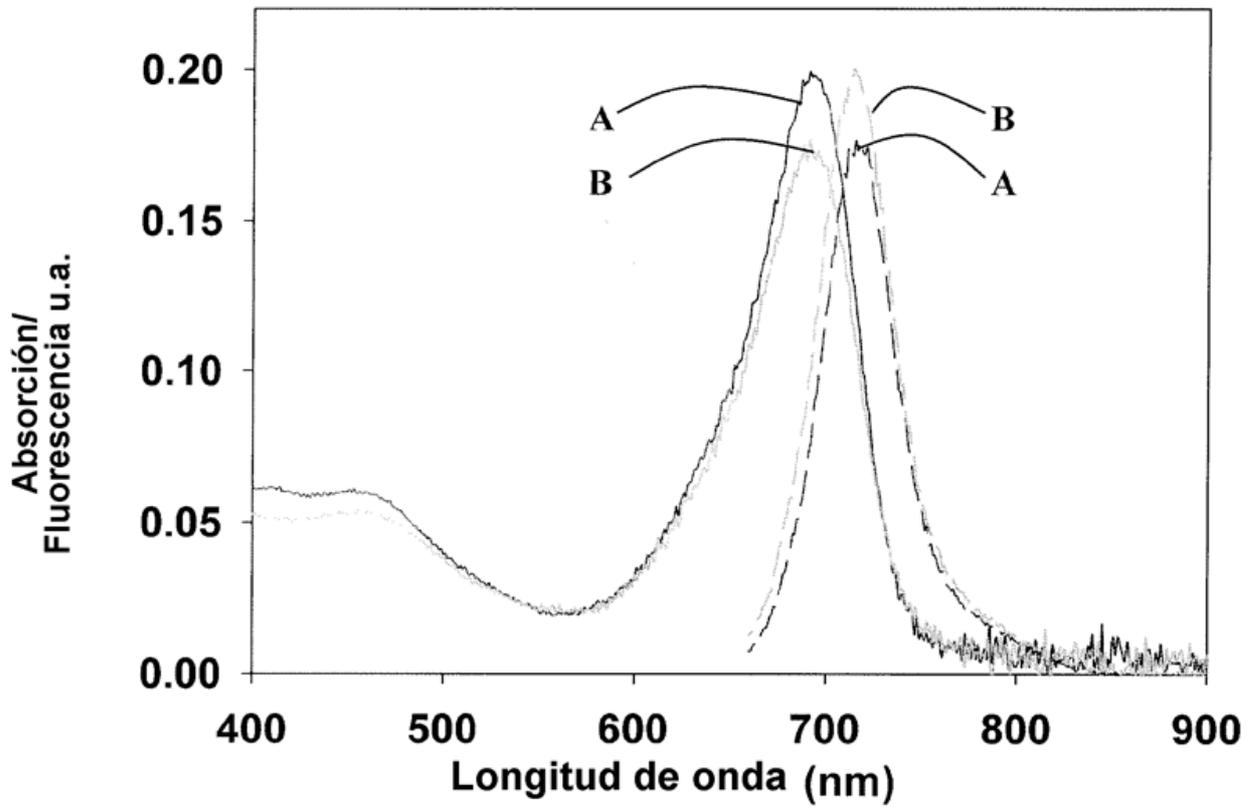


Figura 23

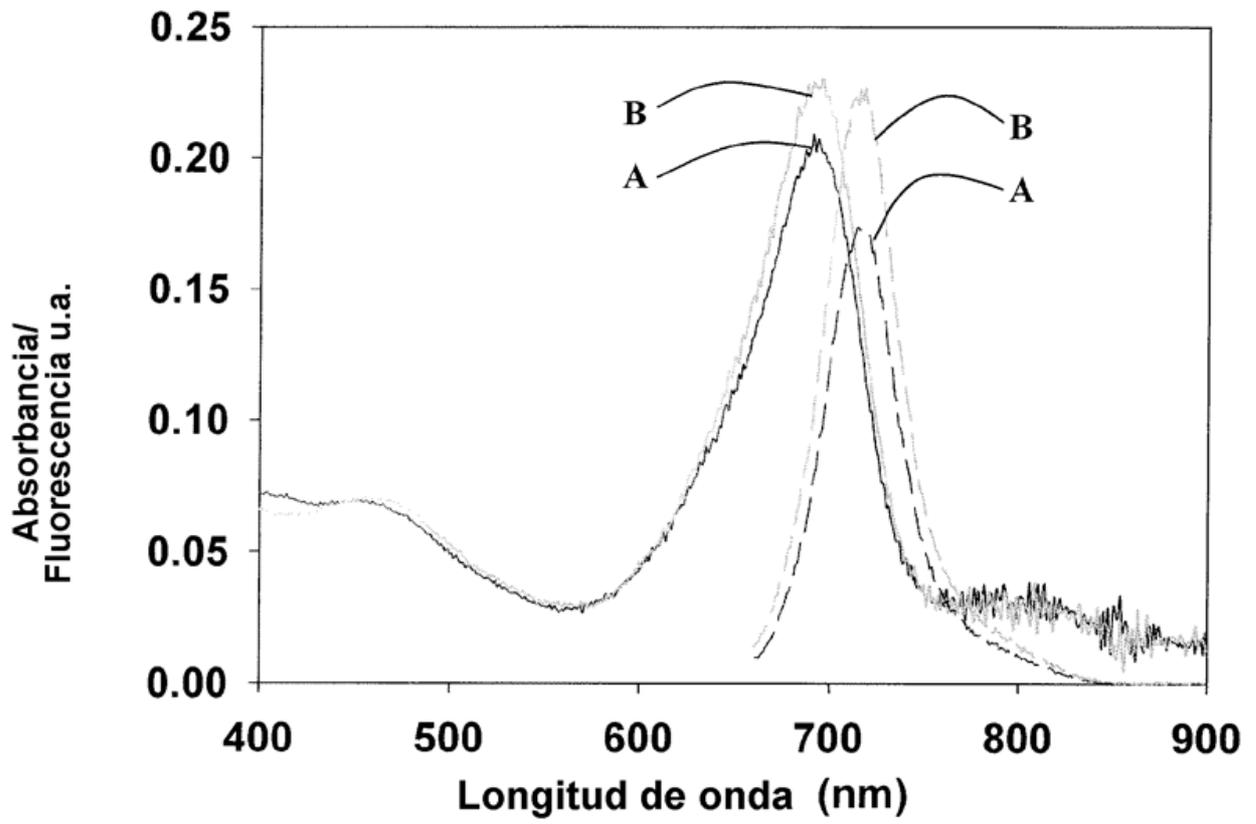


Figura 24

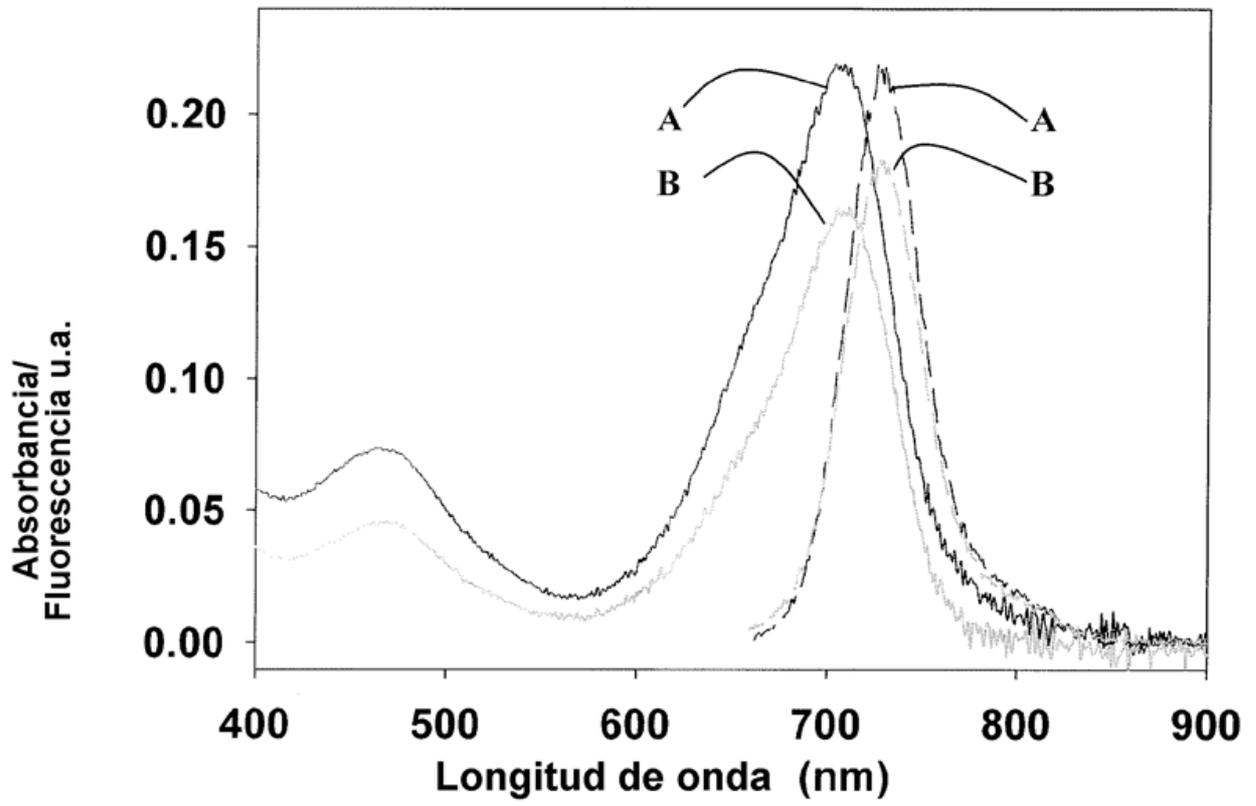


Figura 25

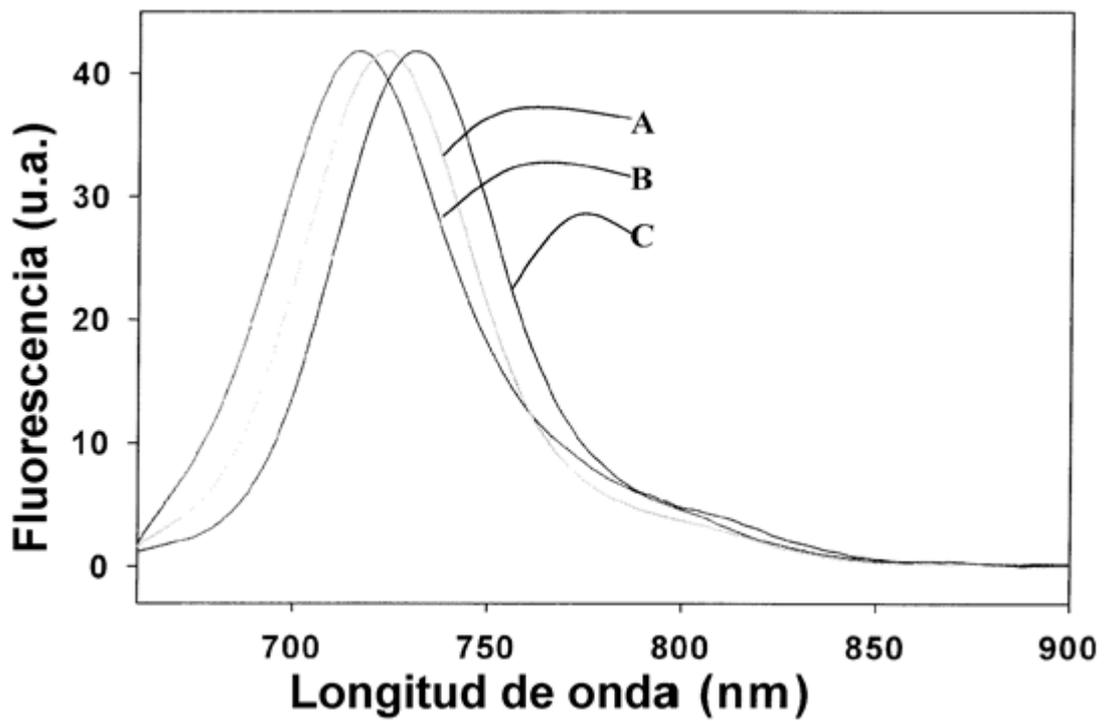
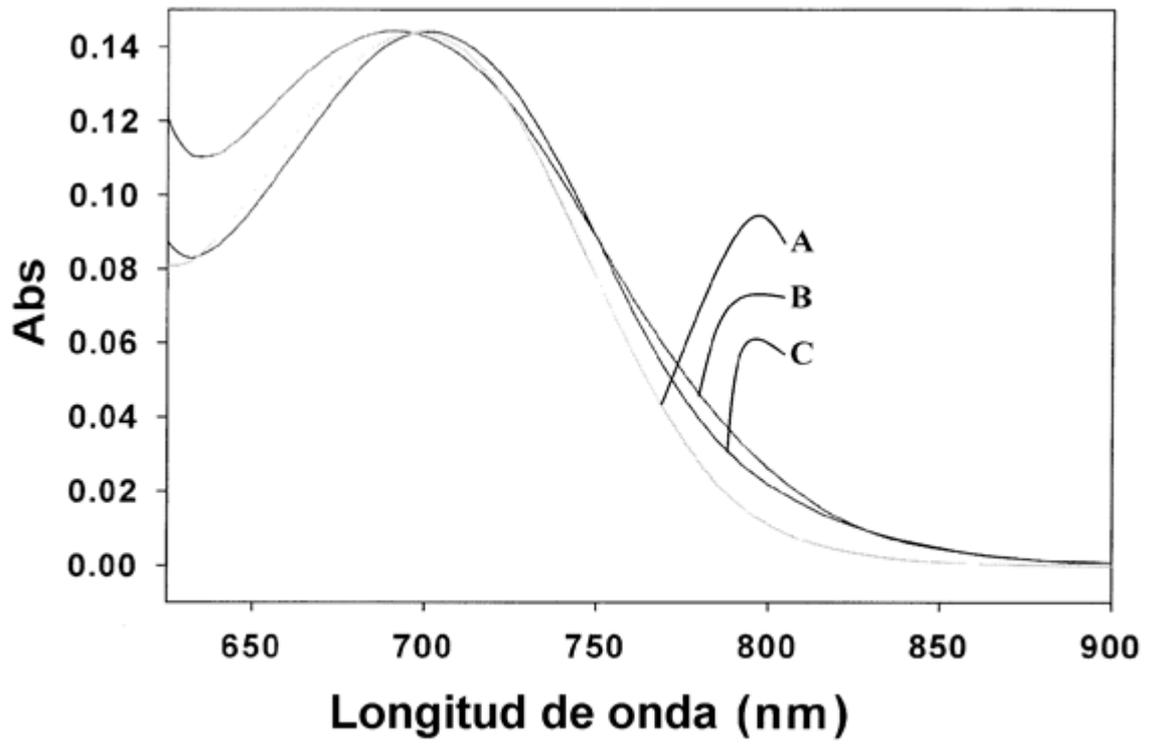


Figura 26

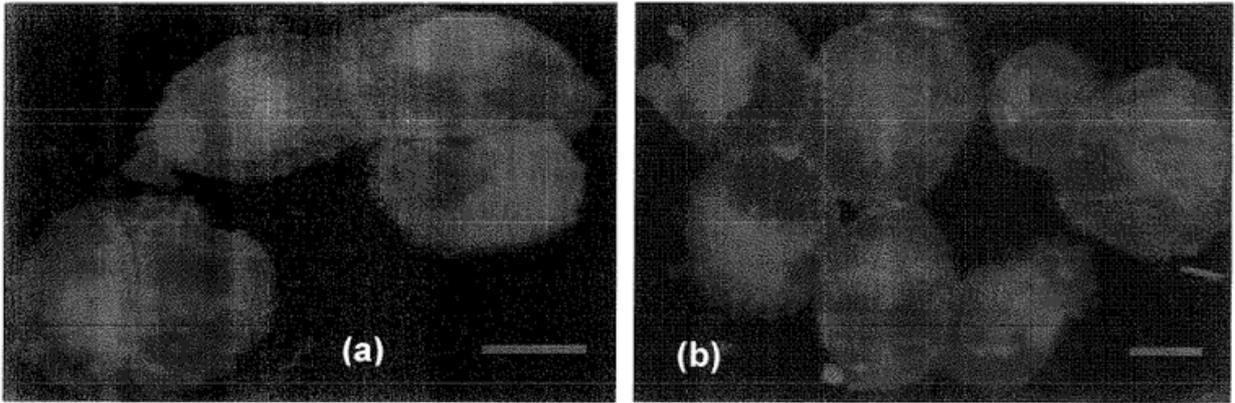


Figura 27

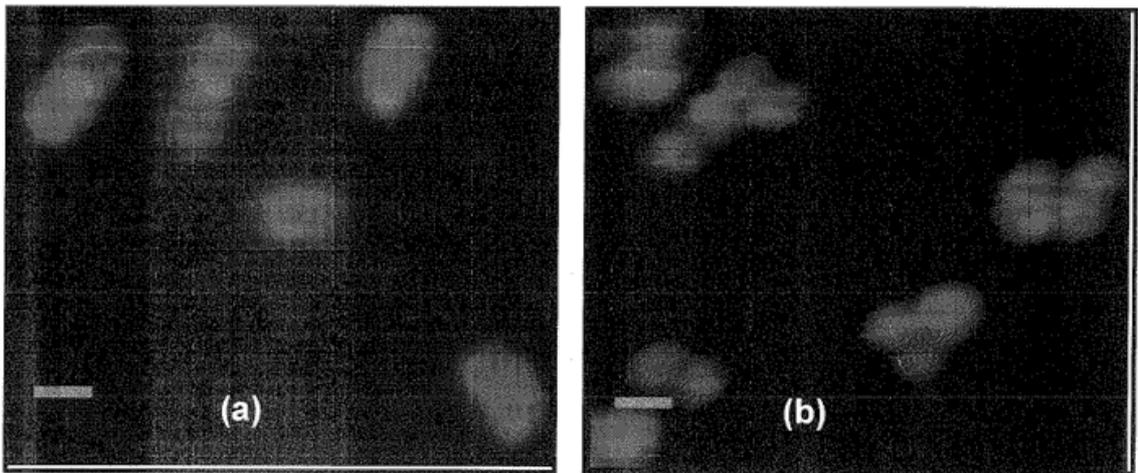


Figura 28

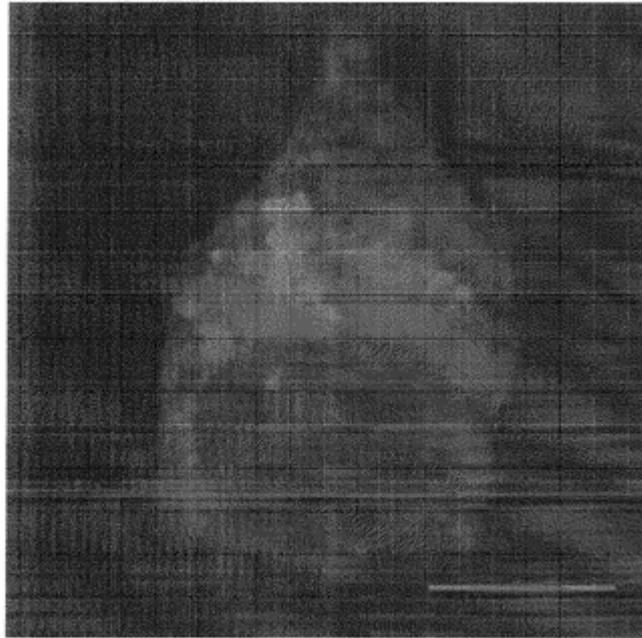


Figura 29

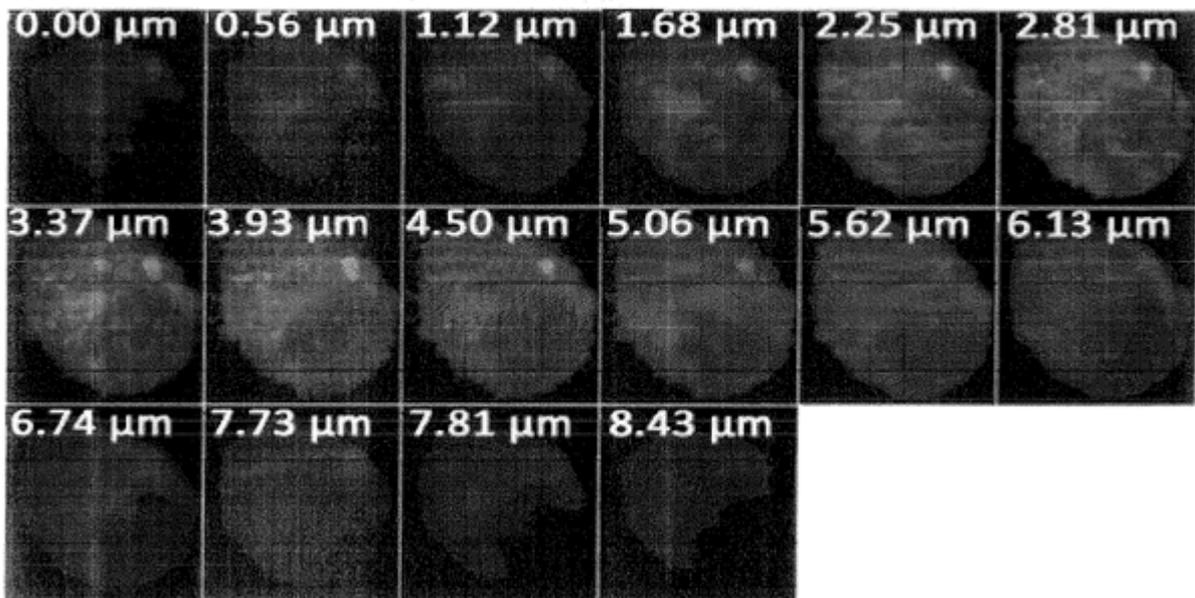
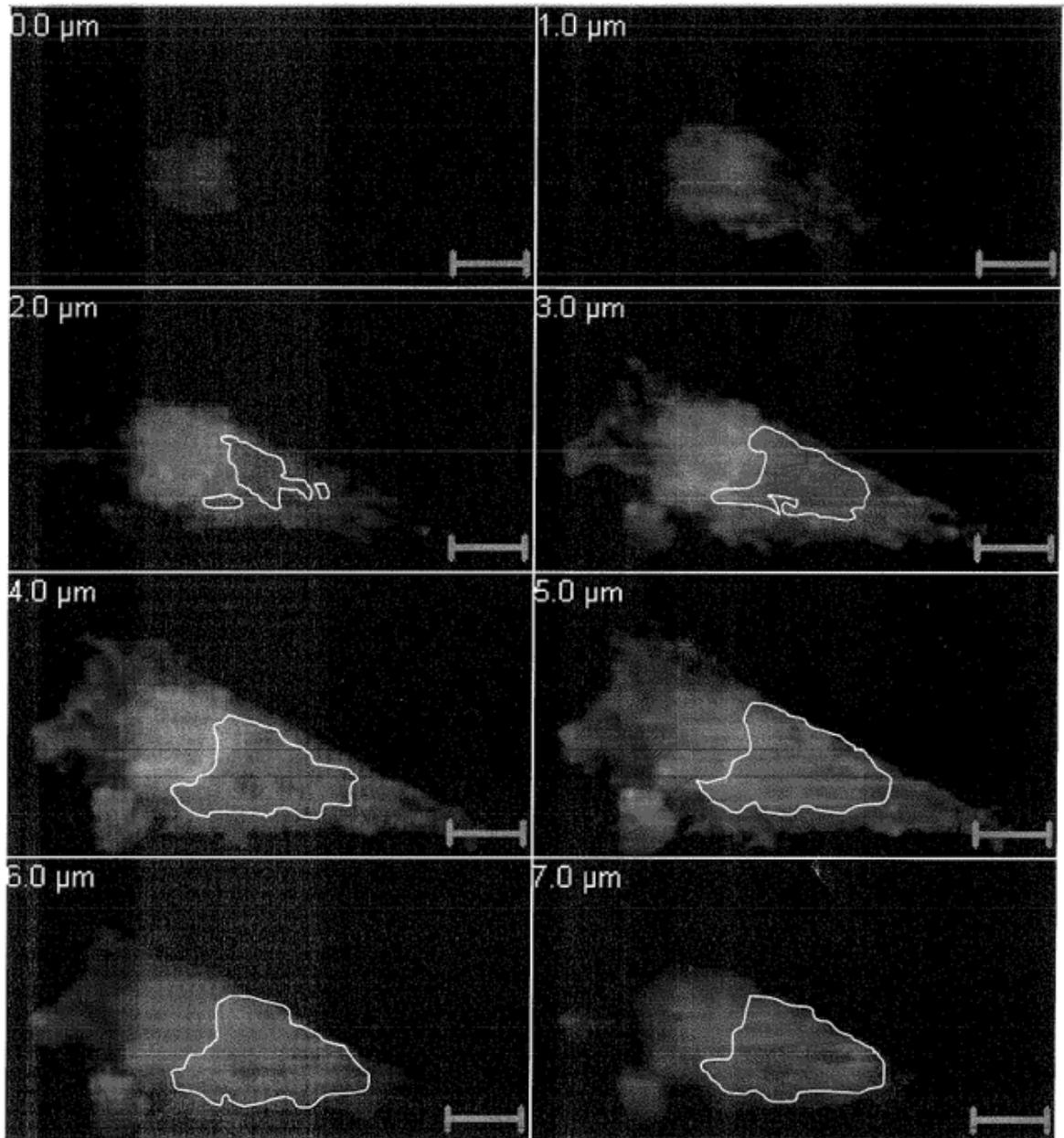


Figura 30



(el área redondeada es azul)

Figura 31

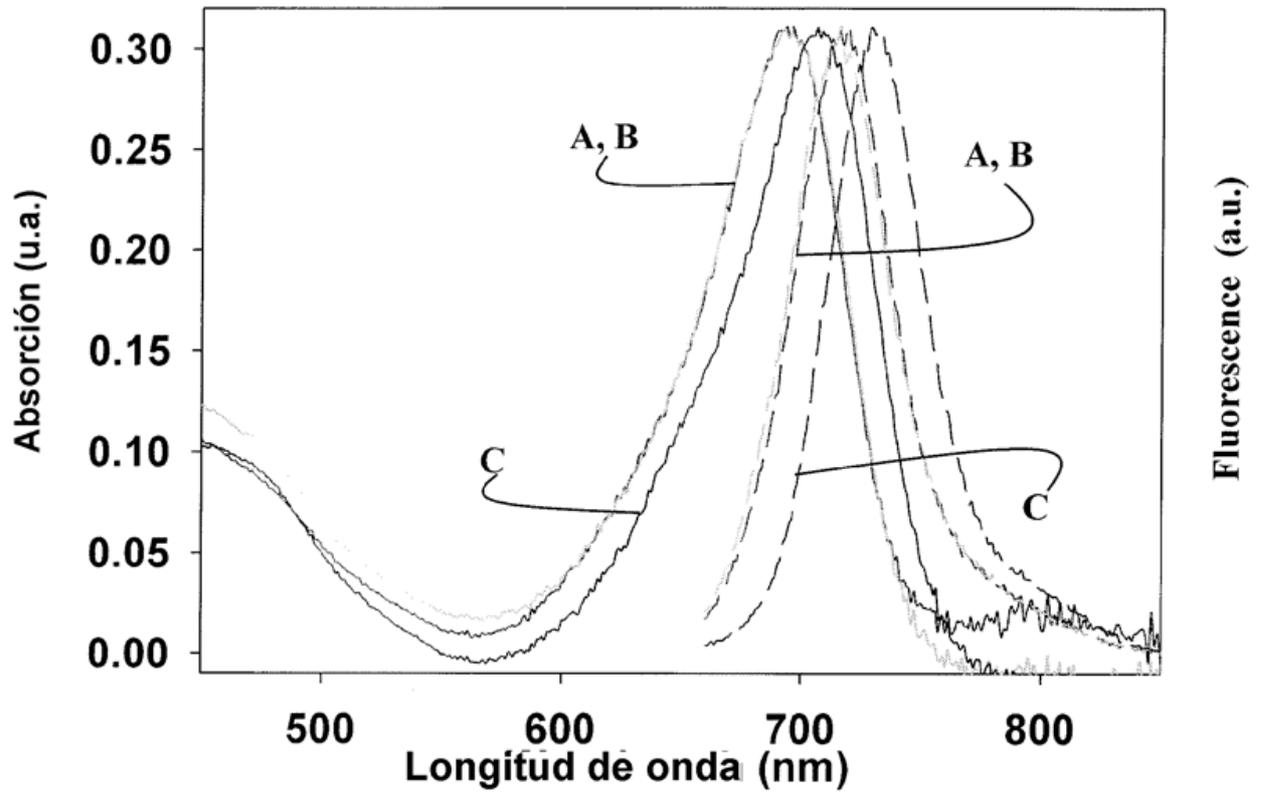


Figura 32

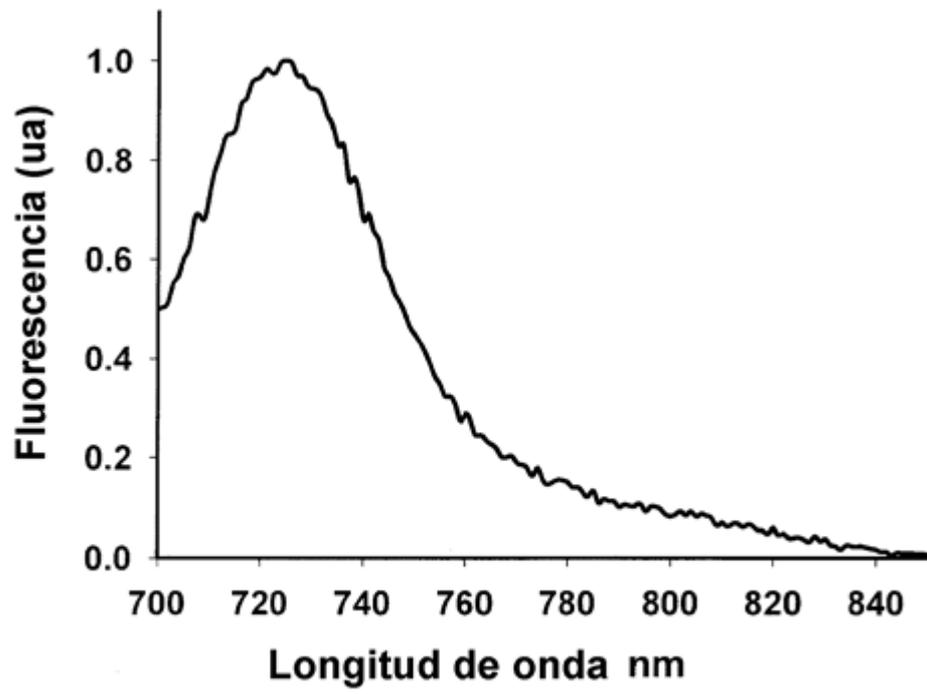


Figura 33

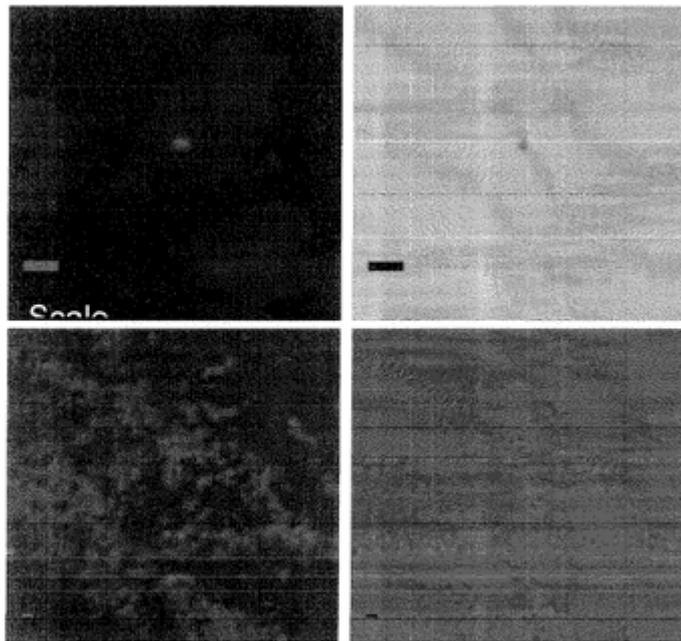


Figura 34

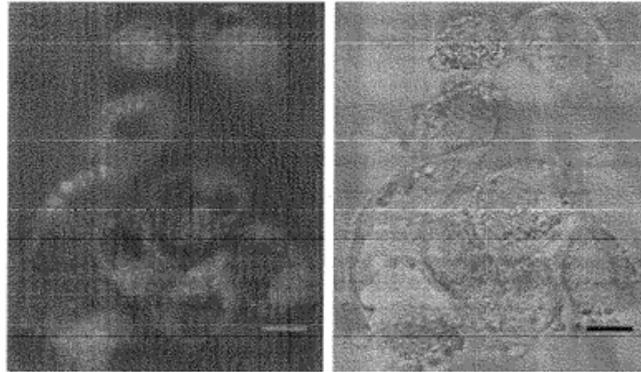


Figura 35

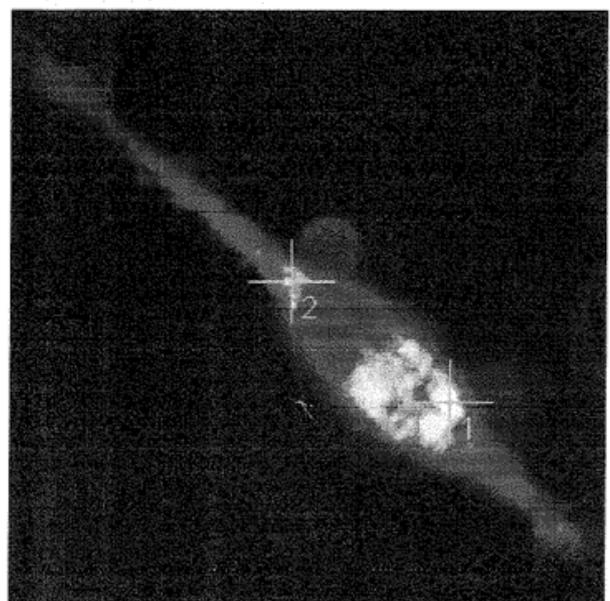
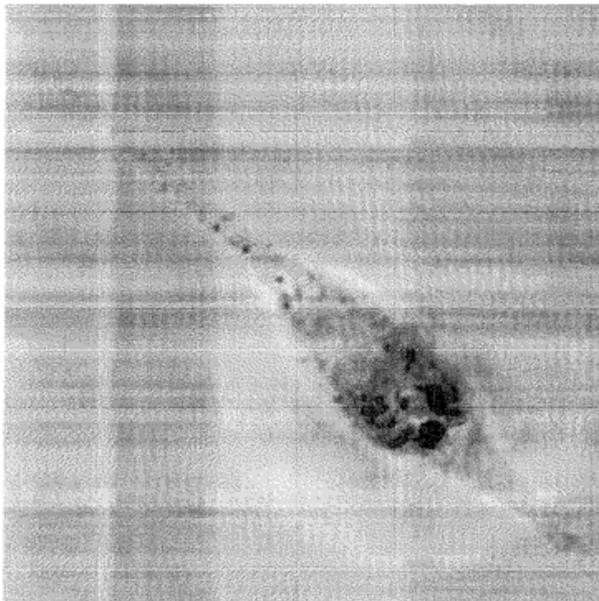


Figura 36

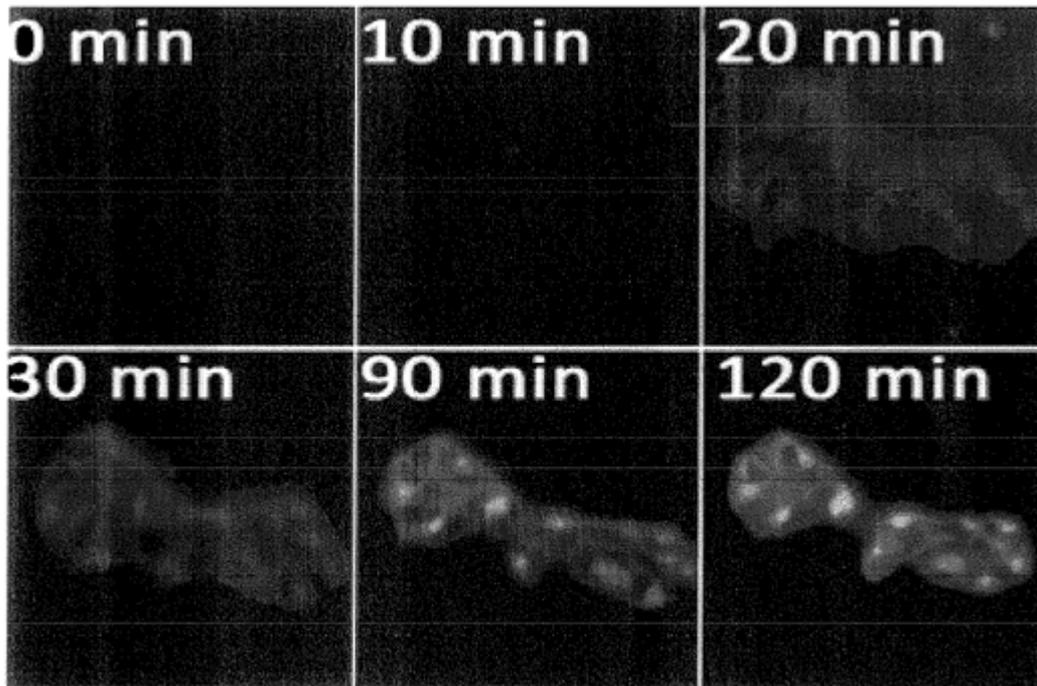


Figura 37

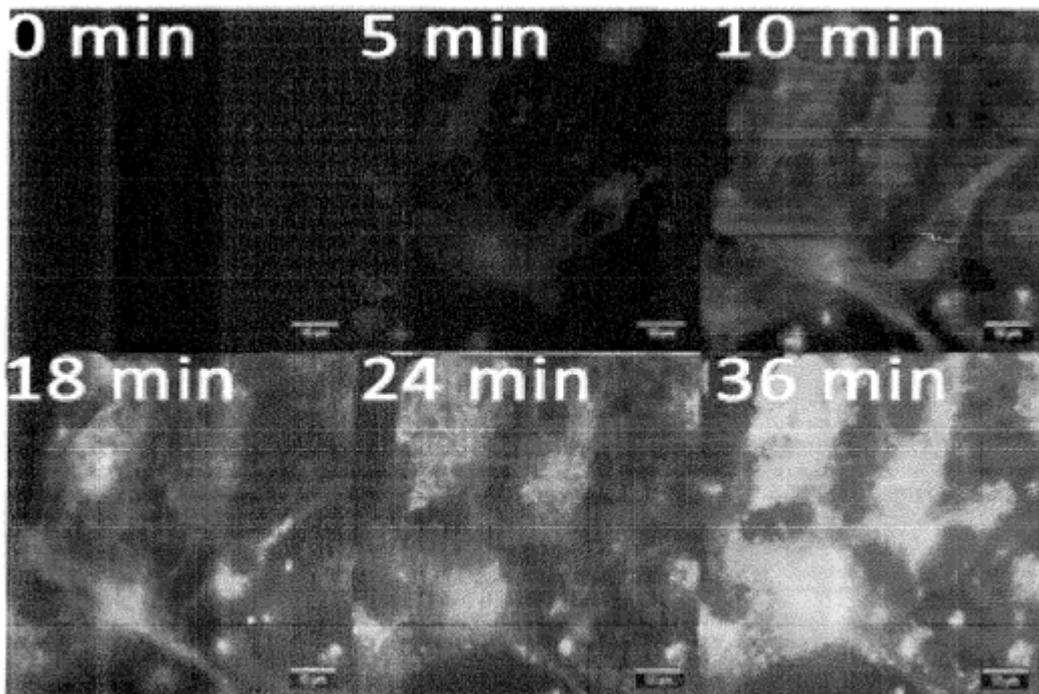


Figura 38

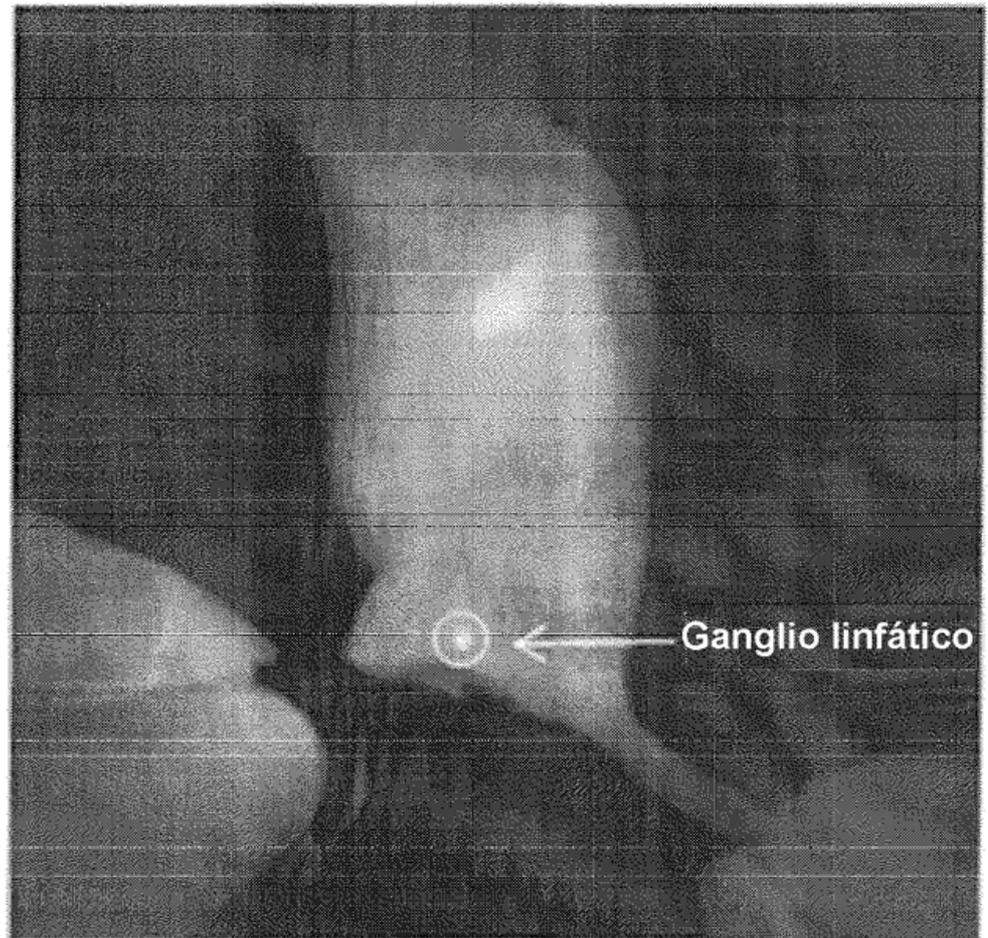


Figura 39