

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 091**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/704 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/51 (2006.01)
A61K 9/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2016 PCT/CZ2016/050048**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017 WO17108015**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2016 E 16840310 (3)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3393527**

54 Título: **Conjugado fluorescente de cypate y de ácido hialurónico o sal del mismo, conjugado hidrofobizado, métodos de preparación y uso del mismo**

30 Prioridad:

23.12.2015 CZ 20150936

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

30.03.2020

73 Titular/es:

**CONTIPRO A.S. (100.0%)
 Dolni Dobrouc 401
 56102 Dolni Dobrouc, CZ**

72 Inventor/es:

**ACHBERGEROVA, EVA;
 SMEJKALOVA, DANIELA;
 HUERTA-ANGELES, GLORIA;
 SOUCEK, KAREL;
 HERMANNOVA, MARTINA y
 VELEBNY, VLADIMIR**

74 Agente/Representante:

JIMENEZ URIZAR, Maria

ES 2 751 091 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

Conjugado fluorescente de cypate y de ácido hialurónico o sal del mismo, conjugado hidrofobizado, métodos de preparación y uso del mismo

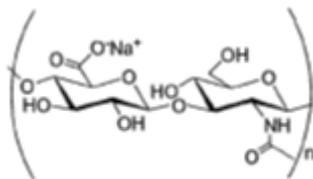
[0001] Conjugado fluorescente de ácido hialurónico o sal del mismo, conjugado hidrofobizado, métodos de preparación y uso del mismo.

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a un conjugado de éster fluorescente de ácido hialurónico o una sal del mismo que contiene colorante de heptametina indocianina (Cypate) diagnosticable *in vivo* de la fórmula III o 1- [3- (2-carboxietil) -1,1-dimetil -5,9b-dihidrobenzo [e] indol-3-ium-2-il (cloruro)] - octa-1,3,5,7-tetraenil] -1,1-dimetil-2H-benzo [e] indol-3-il] ácido propanoico. Además, se describe un conjugado hidrofobizado, métodos de preparación del mismo y un uso para aplicaciones de imágenes *in vivo* y un tratamiento de neoplasias.

Antecedentes de la invenciónÁcido hialurónico

[0003] El ácido hialurónico o una sal del mismo (AH) es un polisacárido lineal que pertenece al grupo de glucosaminoglicanos importantes. En términos de estructura, es un biopolímero formado con unidades repetidas de disacárido (enlace glucosídico β - (1 \rightarrow 4)), que consiste en ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidos mutuamente con un enlace glucosídico (β - (1 \rightarrow 3) (ver fórmula 1 a continuación).



Formula 1.Ácido hialurónico

[0004] El ácido hialurónico se produce en el entorno fisiológico en forma de sal de sodio como un biopolímero muy hidrofílico y altamente hidratado (Schanté C. E; et al., Carbohydr. Polym. 2011, 85 (3), 469-489). AH juega un papel importante en la estructura y organización de la matriz extracelular y también forma un entorno adecuado para células, su proliferación, diferenciación y movilidad (D'Este M.; et al., Carbohydr. Polym. 2014, 108, 239-246; Schanté, CE; et al., F. Carbohydr. Polym.2011, 85 (3), 469-489). El AH está además contenido en vertebrados en todos los órganos del cuerpo y en la matriz extracelular de los tejidos conectivos blandos (Eenschooten, C.; et al., Carbohydr. Polym. 2010, 79 (3), 597-605).

[0005] Este, en el polisacárido soluble en agua, se somete relativamente fácilmente a la modificación química y aparece como una biomolécula muy adecuada para una conjugación con otros compuestos, incluidos agentes fluorescentes. Una ventaja de AH es también la existencia de varios receptores celulares de los mismos, que se pueden usar para el objetivo específico de derivados, por ejemplo, en tejidos tumorales (Garg HG; et al., Chemistry and biology of hyaluronan, 1st ed.; Elsevier: Países Bajos, 2004).

Diagnóstico *in vivo*

[0006] Recientemente, uno de los métodos adecuados para diagnóstico no invasivo, además de técnicas de imagen nuclear, la radiografía roentgen y la tomografía computarizada, es el tratamiento de imagen óptica mediante fluorescencia. La fluorescencia aparece como un método prometedor para diagnóstico *in vivo*, especialmente gracias a su sensibilidad, especificidad y ganancia de imagen relativamente altas en tiempo real (Ye, Y.; et al., Bioconjugate Chem. 2008, 19 (1), 225-234) Entre las ventajas del tratamiento de imagen fluorescente también se encuentran el costo relativamente bajo, la viabilidad, la no invasividad y la seguridad en comparación con la radiación ionizante. Esta técnica es muy perspectiva para la detección, diagnóstico y prevención en la terapia tumoral, pero también como un método complementario para obtener información compleja en aplicaciones clínicas en el tratamiento de imagen usando la tomografía por emisión de positrones (PET), SPECT ("tomografía computarizada de fotonemisión única" ") o IRM. ("Imagen por resonancia magnética"), (Ye, Y.; et al., Theranostics 2011, 1, 102-106).

[0007] En la aplicación de los métodos no invasivos de diagnóstico, la penetración de la radiación a través de los tejidos depende en gran medida de las propiedades de absorción y del índice de refracción (Frangioni, JV Curr. Opin. Chem. Biol. 2003, 7 (5), 626- 634). La longitud de onda de absorción y emisión en el área de 650 a 900 nm, es decir, radiación en el área del infrarrojo cercano (NIR), se consideran óptimas. En comparación con longitudes de onda más cortas de

los espectros visibles, la radiación de estas longitudes de onda penetra más profundamente y al mismo tiempo no se produce absorción por los fluoróforos endógenos y aumento de la autofluorescencia no deseada (Kobayashi, H.; et al., Chem. Rev. 2010, 110, 2620-2640, Luo, S. et al.; Biomaterials 2011, 32 (29), 7127-7138).

5 *Agentes fluorescentes NIR*

[0008] Recientemente, colorantes fluorescentes de cianina, derivados de la escuarina, ftalocianinas, porfirinas y también algunos agentes derivados del boro-dipirometeno (BODIPY) (Luo, S.; et al., Biomaterials 2011, 32 (29), 7127-7138) se encuentran entre importantes agentes exógenos de contraste.

[0009] Entre los agentes muy frecuentes utilizados para métodos de imagen óptica se encuentran los tintes de cianina. Estructuralmente, se relacionan más con dos estructuras heterocíclicas, donde uno de estos heterociclos lleva un átomo de nitrógeno cargado positivamente y se conectan además a través del puente de polimetina, que se muestra en la fórmula general del agente fluorescente de cianina, donde



X e Y son estructuras heterocíclicas de nitrógeno y $n = 1 - 3$. Si $n = 1$, los colorantes se cuentan entre compuestos de triciana, $n = 2$ pentaciana y $n = 3$ heptaciana.

[0010] En general, la longitud del puente de polimetina determina las propiedades fluorescentes del derivado dado y con cada n resultante se produce el aumento de las longitudes de onda de absorción y emisión de los compuestos en unos 100 nm. Las longitudes de onda típicas para los tintes de trimetina son unos 500 nm, para la pentametina de unos 600 nm y los derivados de heptametina finalmente alcanzan longitudes de onda en el área del infrarrojo cercano. El desplazamiento batocrómico e hipsocrómico de las longitudes de onda está además influenciado en parte por el tipo de estructura heterocíclica que también determina la absorción y la radiancia del tinte fluorescente (Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques, 2. ed.; Elsevier: Estados Unidos de América, 2008).

30 *Conjugados de agentes fluorescentes NIR con diversas moléculas*

[0011] En el pasado, era posible usar agentes fluorescentes NIR solos únicamente para tratamiento de imagen no específica, p.ej. circuito sanguíneo y su purificación (Frangioni, J. V. Curr. Opin. Chem. Biol. 2003, 7 (5), 626-634). Los tintes de cianina polimetina tienden a un agregado en el entorno acuoso, lo que resulta en la pérdida de su fluorescencia y, por lo tanto, es desventajoso en diagnóstico *in vivo* (US6641798 B2). Dichos agentes fluorescentes se caracterizan además por la muy corta semivida de la degradación en el sistema de circuito (150-180 s), que limita la acumulación del colorante en el objetivo examinado, por ejemplo, en el tejido tumoral y por eso disminuye también el contraste *in vivo* (Hill TK et. al., Bioconjug Chem. 2015; 26 (2): 294-303). Un enfoque simple y general sobre cómo aumentar la acumulación de los agentes de contraste en lugares y tejidos objetivo, o cómo garantizar una mejor solubilidad en el medio acuoso, es su conjugación con el ligando adecuado del grupo de péptidos, proteínas, sacáridos, etc. (Frangioni, JV Curr. Opin. Chem. Biol. 2003, 7 (5), 626-634). La conjugación de los agentes de contraste con el polímero portador o la nanopartícula se realiza principalmente a través de un enlazador. El enlazador debe usarse para garantizar condiciones fluorescentes (para evitar el apagado) y/o degradables del sistema (Frangioni, J. V. Curr. Opin. Chem. Biol. 2003, 7 (5), 626-634). La desventaja de esta solución es que la reacción tiene más etapas y es muy difícil, y a menudo se usa la derivatización de los agentes entrantes, lo cual es desventajoso en términos de purificación de los productos y/o el aislamiento de los intermedios de reacción es necesario, lo cual es de nuevo desventajoso. En el caso de sistemas de nanopartículas, la longitud del enlazador debe elegirse de modo que no se produzca un apagado de fluorescencia del agente de contraste y el agente de contraste sea detectable *in vivo* (es decir, el enlazador no debe ser demasiado corto) (US20110104070).

[0012] El documento de patente US6641798 publica las exigencias a la estructura general de los conjugados de bajo peso molecular de las moléculas bioactivas (por ejemplo, péptidos, proteínas, anticuerpos, sacáridos) con los agentes fluorescentes de cianina, preparados para aumentar la detección y la terapia del tumor. Una desventaja grave de los derivados usados en la aplicación *in vivo* es la corta estabilidad de la fluorescencia (c. 45 min) en la imagen.

[0013] En la literatura también se describieron conjugados del agente fluorescente NIR Cypate con los diferentes ligandos (aminosacáridos, péptidos, polisacáridos) en términos de los agentes de contraste para diagnóstico *in vivo*. La preparación del propio agente fluorescente NIR Cypate se describe en el documento WO2002032285, la síntesis mejorada se publicó adicionalmente en la publicación Ye, Y.; et al., Bioconjugate Chem. 2005, 16, 51-61. Para estudios *in vivo* prepararon Yunpeng Ye.; et al. (Ye, Y.; et al., J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 7740-7741), sondas polivalentes, donde una o más unidades de monosacáridos de D - (+) - glucosamina estaban unidos en el grupo carboxilo a través del enlace amida. Dado que el agente fluorescente NIR formó el núcleo de la formación dendrímica y al mismo tiempo sirvió como cromóforo para nanopartículas, la biodistribución de las mismas se investigó utilizando métodos ópticos no invasivos *in vivo* y luego *ex vivo*. Una desventaja de esta solución, donde no se usó polímero para la conjugación, es la insolubilidad del sistema en las soluciones acuosas en ausencia de disolvente orgánico.

[0014] Otro tipo de nanopartículas conocidas para la formación de imágenes tumorales es una micela polimérica de doble orientación en base a succinil quitosano con un Cypate enlazado de forma covalente usando el enlace amida, además con metionina y ácido fólico (Chen, H.; et al., Polym Chem. 2014, 5, 4734-4746). Una desventaja de esta solución es el uso de quitosano como polisacárido portador, ya que el quitosano es un agente extraño para el cuerpo. Otra desventaja es la solubilidad muy limitada del quitosano nativo en las condiciones fisiológicas, por lo tanto, la naturaleza del quitosano siempre debe modificarse, porque de lo contrario no sería posible usar el quitosano en la aplicación intravenosa. Además, el quitosano modificado suele ser muy poco soluble en las condiciones fisiológicas. La modificación puede causar cambios en la biodegradabilidad y biocompatibilidad del quitosano dependiendo de la aplicación deseada (Balan, V.; et al., European Polymer Journal 2014, 53, 171-188; Dumitriu, S. Polymeric Biomaterials, 2^a ed.; Marcel Dekker, Inc.: Estados Unidos de América, 2002). Se usó quitosano conjugado con Pluronic F68 y con el tinte de cianina (Cy5.5) para rastrear la acumulación en el modelo de tumor de ratón (W. Il Choi.; et al., Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 2015, 11, 359- 368). Sin la focalización del sistema portador con hereceptina era posible el tratamiento de imagen de seguimiento del tumor *in vivo*, sin embargo, después de 12 horas, la intensidad de fluorescencia NIR no continuó aumentando y, por lo tanto, se puede suponer que este sistema no permite el seguimiento a largo plazo de la enfermedad tumoral *in vivo* sin necesidad de una mayor adición de portadores. La desventaja similar del corto tiempo de imagen (máximo 1-2 días después de la aplicación) también se conoce en otros conjugados poliméricos y no poliméricos con colorantes NIR (D. Kokuryo; et al., Journal of Controlled Release 2013, 178, 125, Tan X.; et al., Biomaterials 2012, 33, 2230-2239).

[0015] En la literatura, se describió además Cypate como parte de una sonda de imagen multifuncional, cuando en un grupo carboxilo de dicho agente fluorescente se unía un componente quelante de metales catiónicos a través del enlace amida con el fin de formar el sistema de imagen óptica-nuclear. Cypate se conjugó adicionalmente con el péptido RGD cíclico con el objetivo de apuntar a células específicas (Ye, Y.; et al., Bioconjugate Chem. 2008, 19, 225-234). La desventaja de este sistema es que sus condiciones fluorescentes cambian en presencia de cationes metálicos y en algunos casos (presencia de Fe³⁺ + o Cu²⁺) puede conducir a la extinción completa de la fluorescencia (Ye, Y.; et al., Bioconjugate Chem. 2008, 19, 225-234).

Conjugados de agentes fluorescentes NIR con ácido hialurónico.

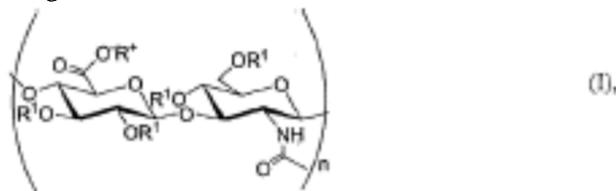
[0016] En publicaciones Choi K. (Choi, KY; et al., J. Mater. Chem. 2009, 19 (24), 4102-4107 y Choi, KY; et al., Biomaterials 2010, 31 (1), 106-114), se describió un derivado hidrofobizado de ácido hialurónico con ácido 5 β -cólico. Sin embargo, se descubrió que la acción del ácido 5 β -cólico conduce a apoyar la carcinogénesis de los tumores intestinales en sus primeras etapas. (Bajjal, K. P.; et al., Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1998, 76 (12), 1095-1102). Además, el agente fluorescente NIR Cy5.5 se conjugó sobre el grupo carboxilo del ácido hialurónico, usando etil-3 (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida/hidroxibenzotriazol (EDC/HOBt) y enlazador dihidrazida de ácido adípico. Una desventaja es no solo la síntesis de varias etapas, sino que también se usa el activador EDC/HOBt, que puede causar una red intramolecular indeseable de hialuronano y con eso la correspondiente disminución de la solubilidad del producto final (Huerta-Angeles, G.; et al., Carbohydr. Polym 2014, 111 (13), 883-891). El derivado de ácido hialurónico conjugado con Cy5.5 a través del enlace amida se usó adicionalmente para el tratamiento superficial de nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro (SPION) con el propósito de formar sondas multimodales para la combinación de IRM *in vivo*/detección óptica de la actividad de la hialuronidasa (Lee, D.; et al., Macromol. Res. 2011, 19 (8), 861-867). Con respecto al diagnóstico *in vivo* mediante el método óptico, el agente fluorescente Cy5.5 del grupo de derivados de pentametina no es la opción ideal. A diferencia de los derivados de heptametina, no alcanzan tan altas longitudes de onda de absorción y emisión, que son recomendadas para diagnósticos no invasivos *in vivo*, es decir, el uso de longitudes de onda típicas para derivados de pentametina puede crear la indeseable autofluorescencia de fluoróforos endógenos.

[0017] En el caso de los derivados de heptametina de cianina se conoce el conjugado de ácido hialurónico con el fluorescente NIR IR-783 comercialmente disponible, la síntesis modificada de cuatro etapas dando como resultado IR-783-S-Ph-COOH, donde este derivado se unía después a través del enlace amida al ácido hialurónico. El derivado se preparó para estudiar una comprensión más profunda de la farmacocinética de AH *in vivo*, su degradación y su papel en los estados fisiológicos y patológicos (Wang, W.; Cameron, A. G.; Shi, K. Molecules 2012, 17, 1520-1534). Desgraciadamente, la muy complicada síntesis no es transformable a escala industrial, ya sea en términos económicos o en términos de muy bajo rendimiento (Wang, W.; Cameron, A. G.; Shi, K. Molecules 2012, 17, 1520-1534).

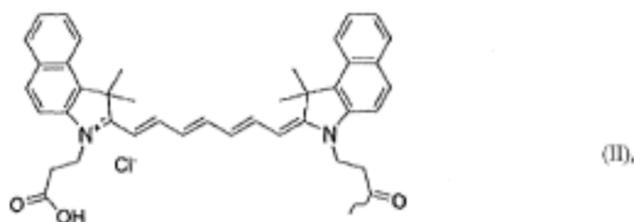
[0018] Entre otros representantes de este tipo de agentes fluorescentes se encuentra el verde de indocianina (ICG). El AH conjugado con verde de indocianina y polietilenglicol (PEG) produce partículas agregadas en el entorno acuoso, con la posibilidad de obtener imágenes duales *in vivo* del tumor mediante métodos ópticos y la detección fotoacústica (Mild, K.; et al., Biomacromolecules 2015, 16, 219-227). La gran desventaja de usar indocianina verde *in vivo* es la toxicidad hepatobiliar y la rápida eliminación de este colorante por el hígado (G. R. Cherrick, y col. J. Clinical Investigation, 1960, 39, 592-600). La desventaja de los derivados de AH con agentes fluorescentes NIR, cuando se trata de su conjugación sobre el grupo carboxilo del ácido hialurónico y en la modificación de la función carboxilo del AH, da como resultado la neutralización de la carga negativa natural del biopolímero, puede influenciar aún más la solubilidad de AH en el entorno fisiológico y, no por último, también perturba el reconocimiento de AH por los receptores celulares (Mero, A.; et al., Carbohydr. Polym. 2010, 79 (3), 597-605).

Resumen de la invención

5 [0019] Las desventajas de la técnica anterior se superan mediante un conjugado fluorescente de ácido hialurónico o una sal del mismo de la fórmula general I



10 en donde R⁺ es H⁺ o una sal fisiológicamente aceptable seleccionada del grupo que contiene Na⁺, K⁺, Mg²⁺ o Ca²⁺, R¹ es -H o el residuo de cypate de la fórmula II, donde ~ es un lugar de enlace covalente de un residuo de cypate de fórmula



15 siendo un R¹ el residuo de cypate de la fórmula II en al menos una unidad repetida, siempre que si hay un residuo de cypate R¹ de la fórmula II en la unidad, los otros R¹ en la unidad son H, y donde n es un número entero en el rango de 2 a 625.

20 [0020] Según una realización preferida de la invención, el residuo de cypate de fórmula II se sustituye en la posición 6 de la parte de glucosamina del conjugado fluorescente de ácido hialurónico o la sal del mismo de la fórmula general I.

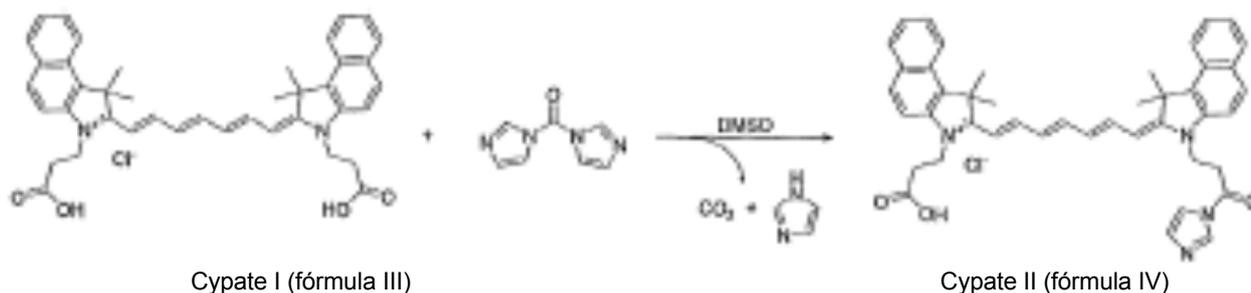
25 [0021] Cypate I se une a un grupo hidroxilo de ácido hialurónico (véanse los Esquemas 1 y 2, más adelante) después de la activación, lo que es ventajoso especialmente en términos de mantener las propiedades biológicas del ácido hialurónico y también de su solubilidad en el entorno fisiológico. La solubilidad del conjugado de la presente invención es de 1 a 3 mg por 100 µl de solución fisiológica. El conjugado fluorescente de la invención se excita y absorbe la luz en el área de 570 nm a 790 nm y emite la luz en el área de 680 a 850 nm, preferiblemente a 850 nm.

30 [0022] El grado de sustitución del residuo de cypate de la fórmula II unida en el conjugado de ácido hialurónico o la sal del mismo de la fórmula general I es de 0,1 a 2%, preferiblemente 1,0%. Se prefiere el grado bajo de sustitución del residuo de cypate en el conjugado de la presente invención, ya que permite la distribución de la imagen del conjugado *in vivo*, sin que la estructura de AH se modifique significativamente.

[0023] La preparación del propio conjugado reside en la síntesis del agente fluorescente: Cypate, además en la activación del grupo carboxilo del agente fluorescente y después de la esterificación del ácido hialurónico.

35 [0024] La activación del grupo carboxilo de Cypate I de la fórmula III se lleva a cabo usando *N,N'*-carbonil diimidazol en el disolvente polar aprótico (véase el Esquema 1, a continuación) preferiblemente seleccionado del grupo que contiene dimetil sulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), formamida o acetonitrilo, más preferiblemente DMSO. Esta activación es muy efectiva incluso en condiciones de reacción suaves, en las que la reacción del grupo carboxilo con *N,N'*-carbonil diimidazol (CDI) da como resultado el intermedio reactivo monoimidazolido (Cypate II de fórmula IV), donde la reacción es conducida por la liberación de dióxido de carbono e imidazol (ver Esquema 1, más abajo). La reacción de activación dura de 10 minutos a 24 horas, preferiblemente de 0,5 a 2 horas. La temperatura de reacción puede estar en el rango de 20°C a 60°C, preferiblemente en el rango de 22°C a 25°C.

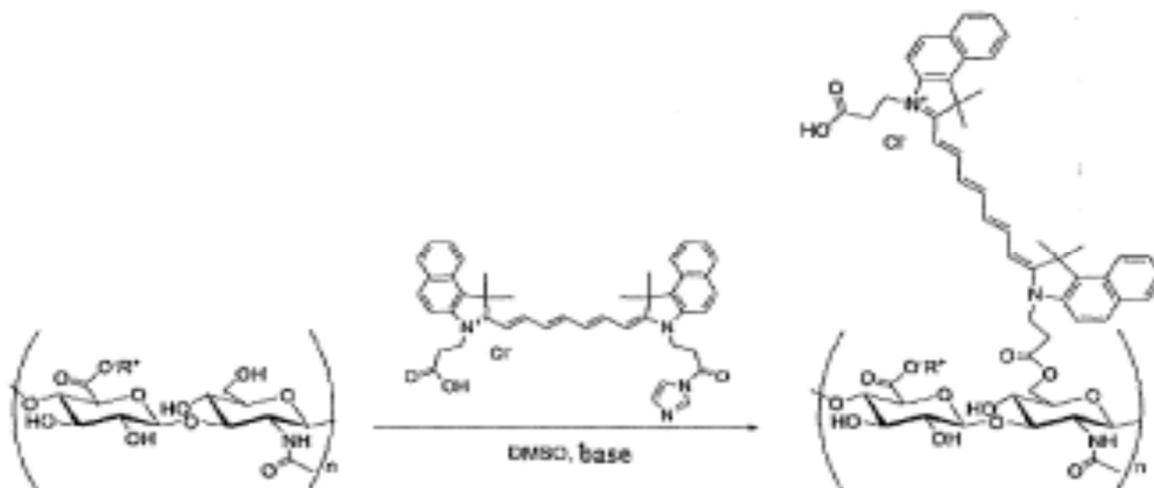
40



5 **Esquema 1:** La activación del grupo carboxilo de Cypate usando CDI

[0025] En la esterificación del ácido hialurónico en sí, que se muestra en el Esquema 2 (R^+ es como se definió anteriormente), se elimina luego el imidazol del Cypate II del Esquema 1, y se forma el enlace éster entre al menos un grupo hidroxilo del ácido hialurónico y Cypate de fórmula IV.

10



15 **Esquema 2:** La reacción del Cypate activado con ácido hialurónico

15

20

25

30

35

[0026] Para la preparación del conjugado, se usa preferiblemente una forma ácida de ácido hialurónico u otra sal orgánica, por ejemplo tetrabutilamonio (TBA) (**Esquema 2**), que se usa para la solubilización de ácido hialurónico en disolvente orgánico (DMSO) La masa molecular adecuada de la forma ácida o la otra sal orgánica de ácido hialurónico para la reacción dada está en el intervalo de 5.000 – 250.000 g/mol, preferiblemente (10.000 – 32.000 g/mol). La diferente masa molecular de AH de sal de AH no es un obstáculo para la reacción. La esterificación de grupos hidroxilo de AH en el disolvente polar aprótico se lleva a cabo adicionalmente mediante la adición del agente fluorescente con el grupo carboxilo activado mediante CDI (N,N'-carbonil diimidazol). La reacción se desarrolla en presencia de una base orgánica generada in situ en una forma de imidazol o una base orgánica agregada seleccionada, por ejemplo, del grupo que contiene DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano), N,N,N',N'-tetrametil-1,6-hexanodiamina, N-metilmorfolina, imidazol, trietilamina (TEA) o N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA), preferiblemente imidazol generado in situ y el disolvente aprótico polar, como antes se ha definido. La reacción de formación del conjugado se realiza a la temperatura de 40°C a 80°C, preferiblemente de 40°C a 60°C, más preferiblemente 60°C durante 12 a 48 horas, preferiblemente 24 horas. Un estudio más detallado reveló que el grado de sustitución de AH con el agente fluorescente depende de una cantidad equivalente de Cypate I y también está positivamente influenciado por la presencia de un equivalente de la base orgánica, la combinación preferida es 0,5 equivalentes molares de Cypate I:1 equivalente molar de AH:0,5 equivalentes molares de N,N'-carbonil diimidazol:0,5 a 3,5 equivalentes molares de la base orgánica, más preferiblemente 1 equivalente molar de la base orgánica. Por lo tanto, aplica que la relación molar de Cypate I: ácido hialurónico o una sal del mismo: N, N'-carbonil diimidazol: base orgánica es 0,5: 1: 0,5: 0,5 a 3,5 en la mezcla de reacción, preferiblemente la relación molar es 0,5: 1: 0,5: 1. En el caso de que la base orgánica se genere in situ, la relación molar de cypate: ácido hialurónico o una sal del mismo: N,N'-carbonil diimidazol es 0,1: 1: 0,15 a 0,7: 1: 0,8, preferiblemente 0,5: 1: 0,5.

El conjugado de hialuronano con el agente fluorescente de heptametina indocianina (o Cypate) de la fórmula general I, puede modificarse preferiblemente adicionalmente para formar el conjugado fluorescente hidrofobizado de la fórmula general I de la invención, donde R^+ , R^1 y n , como se define antes, aplican a la vez, que al menos en una unidad repetida al menos un R^1 es $-C(=O)R^2$, en donde R^2 es un sustituyente C_xH_y , donde x es un número entero en el rango de 5 a

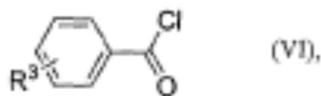
17 e y es un número entero en el rango de 11 a 35, donde es una cadena alifática C₆-C₁₈ lineal o ramificada, saturada o insaturada.

5 **[0027]** El grado de sustitución de -C(=O)R² en el conjugado de ácido hialurónico o la sal del mismo de la fórmula general I es de 1 a 70%, preferiblemente de 5 a 12%. El conjugado fluorescente hidrofobizado de la invención se excita y absorbe la luz en el intervalo de longitudes de onda de 570 nm a 790 nm y emite la luz en el área de 680 a 850 nm, preferiblemente a 850 nm.

10 **[0028]** La cadena de acilo C₆ - C₁₈ es la cadena de ácidos grasos que está unida a través del enlace éster a al menos un grupo hidroxilo de AH. Se une preferiblemente al grupo hidroxilo primario (ver Esquema 3), que generalmente es adecuado para la esterificación. El ácido graso puede tener la cadena alifática corta (SCFA), media (MCFA) o larga (LCFA) y puede ser esencial o no esencial. La activación del ácido graso de la fórmula general V

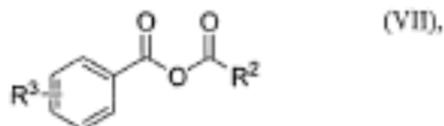
15 R^2COOH (V),

en donde R² se define arriba, se realiza por ejemplo a través del cloruro de benzoilo sustituido o no sustituido de la fórmula general VI

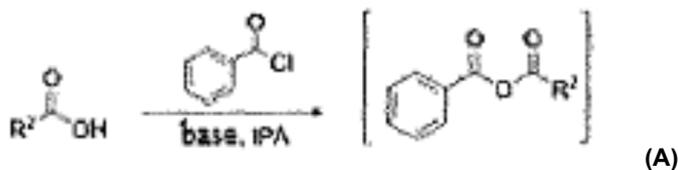


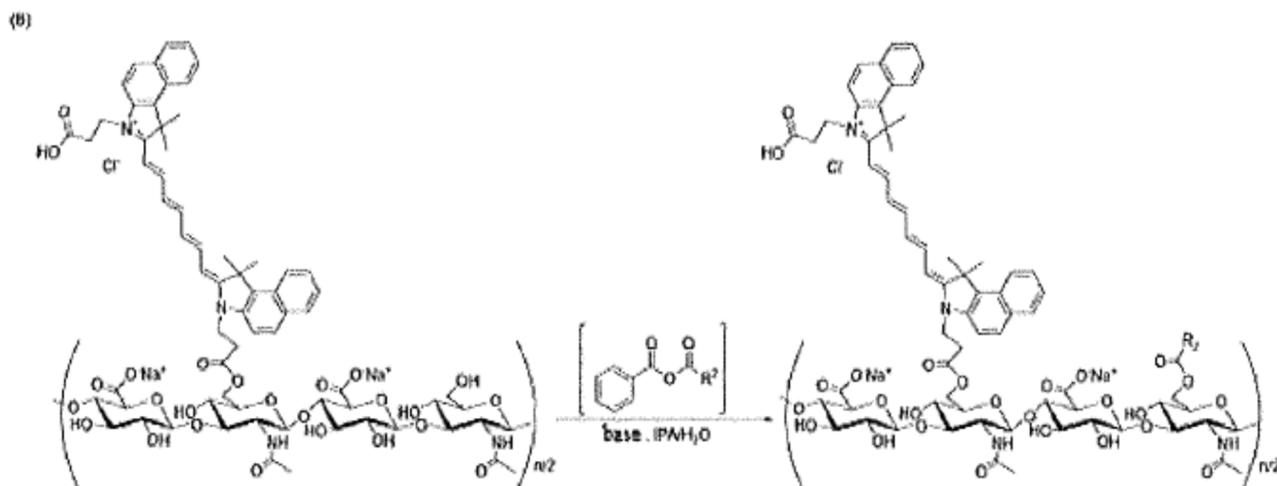
en donde R³ es uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que contiene H, -NO₂, -COOH, halogenuros, alquil-alcoxi C₁-C₆, preferiblemente H;

25 en presencia de la base orgánica seleccionada del grupo que contiene p.ej. DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano), N,N,N',N'-tetrametil-1,6-hexanodiamina, N-metilmorfolina, trietilamina (TEA) o N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA), preferiblemente TEA. El ejemplo de la activación se muestra en el Esquema 3A. El entorno de reacción se realiza con el disolvente polar seleccionado del grupo que contiene alcohol isopropílico (IPA), tetrahidrofurano (THF), preferiblemente alcohol isopropílico, para formar el anhídrido reactivo de la fórmula general VII



35 donde R² y R³ son, como se definió anteriormente, que esterifica el conjugado fluorescente de ácido hialurónico o una sal del mismo de la fórmula general I de la presente invención (por ejemplo, mostrada en el Esquema 3B).





Esquema 3. (A) La activación del grupo carboxilo del ácido graso. **(B)** La hidrofobización del conjugado fluorescente de hialuronano con el ácido graso saturado o insaturado. Las definiciones de n y R^2 están descritas antes

5

10 **[0029]** La esterificación se realiza con el grupo carboxilo del ácido graso activado en una mezcla de agua y el disolvente orgánico polar miscible con agua, p.ej. alcohol isopropílico (IPA), dimetilsulfóxido (DMSO) o tetrahydrofurano (THF), preferiblemente alcohol isopropílico. La esterificación se realiza en la mezcla de agua y el disolvente polar miscible con agua, en donde la cantidad de agua está en el rango de 50 a 80% v/v, preferiblemente 50% v/v.

15 **[0030]** La reacción también se realiza en presencia de la base orgánica, preferiblemente de amina seleccionada del grupo que contiene p.ej. DABCO (1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano), N,N,N',N'-tetrametil-1,6-hexanodiamina, N-metilmorfolina, imidazol, trietilamina (TEA) o N,N'-diisopropilo etilamina (DIPEA), más preferiblemente trietilamina. En el método de preparación del conjugado hidrofobizado de la presente invención, la activación del ácido graso de la fórmula general V se realiza durante 0,5 a 24 horas, a la temperatura en el intervalo de 0°C a 60°C, preferiblemente 0,5 horas a la temperatura de 0°C a 25°C y la esterificación del conjugado fluorescente de ácido hialurónico o la sal del mismo se realiza durante 0,5 a 2 horas, preferiblemente 2 horas, a temperatura ambiente, es decir, a la temperatura en el rango de 22°C a 25°C.

25 **[0031]** Según una realización preferida del método de preparación del conjugado hidrofobizado de la presente invención, la cantidad de base orgánica corresponde a 2 a 6 equivalentes molares, preferiblemente a 4 equivalentes molares por dímero de ácido hialurónico o la sal del mismo. La cantidad de cloruro de benzoilo sustituido o no sustituido corresponde a 0,2 a 2,0 equivalentes molares, preferiblemente 0,6 equivalentes molares por dímero de ácido hialurónico o la sal del mismo. La cantidad de ácido graso corresponde a 0,2 a 2,0 equivalentes molares, preferiblemente 0,6 equivalentes molares por el dímero de ácido hialurónico o la sal del mismo. El estudio más detallado descubrió que el grado de sustitución del conjugado hidrofobizado del ácido hialurónico o la sal del mismo de la invención con el ácido graso depende de la cantidad equivalente del ácido graso activado y también está influenciado positivamente por la presencia de base orgánica

35 **[0032]** El conjugado hidrofobizado de hialuronano con el agente fluorescente de indocianina heptametina (Cypate) de la fórmula general I de la presente invención se puede usar preferiblemente para la encapsulación (enlace no covalente) de agentes no polares, preferiblemente fármacos o nanopartículas con superficie hidrófoba. El conjugado hidrofobizado es capaz de concentrarse y formar sistemas similares a las micelas de polímeros con su comportamiento. De este modo, se forma una composición en base al conjugado fluorescente hidrofobizado concentrado de la presente invención que contiene agregados de los conjugados fluorescentes hidrofobizados y al menos uno o más agentes no polares, preferiblemente fármacos, más preferiblemente citostáticos, lo más preferiblemente doxorubicina o paclitaxel, y/o nanopartículas, preferiblemente nanopartículas superparamagnéticas (es decir, spions). Las spions se basan preferiblemente en óxidos de hierro (Fe_2O_3 , Fe_3O_4), donde la cantidad de hierro en la composición es 0,3 a 3% en peso, preferiblemente 1 a 1,5% en peso. El tamaño de las nanopartículas superparamagnéticas es 4 a 6 nm, preferiblemente 5 nm. En la realización preferida, la composición contiene el conjugado fluorescente hidrofobizado agregado de la presente invención, en el que $R^1-C(=O)C_{17}H_{33}$ y nanopartículas, que son preferiblemente nanopartículas superparamagnéticas en base a óxidos de hierro (Fe_2O_3 , Fe_3O_4). Dicha composición puede contener además preferiblemente citostático, preferiblemente doxorubicina o paclitaxel.

45

Según otra realización de la presente invención, la composición contiene del 2 al 15% en peso de agentes no polares con respecto al contenido en masa del conjugado fluorescente hidrofobizado de ácido hialurónico o la sal del mismo de la presente invención, preferiblemente del 2 al 6% en peso. .

5 **[0033]** Las composiciones de la presente invención pueden usarse en aplicaciones medicinales para la formación de imágenes *in vivo* de tumores o para tratar tumores.

10 **[0034]** En comparación con los procesos descritos hasta ahora de preparación de los conjugados de ácido hialurónico con los agentes fluorescentes de cianina, el método declarado de preparación del conjugado de la presente invención presenta varias ventajas. A diferencia de las técnicas descritas en las publicaciones, se refiere a la síntesis directa sin utilizar ningún enlazador o modificación previa del ácido hialurónico o agente fluorescente. Durante la activación se produce la liberación de imidazol y CO₂ que no son tóxicos, y se pueden eliminar fácilmente de la mezcla de reacción. La liberación de imidazol puede usarse adicionalmente en la preparación del conjugado como base orgánica generada *in situ* y, por lo tanto, no necesita añadirse como otra base orgánica necesaria para el procedimiento de reacción. La esterificación del ácido hialurónico se realiza en el disolvente orgánico, p.ej. en DMSO El activador de cypate es CDI. CDI puede usarse para la conjugación de Cypate a AH sin la necesidad de aislar el intermedio. La ventaja en este caso es que la modificación selectiva del hidroxilo primario de AH se produce incluso en el caso de grupos secundarios hidroxilo no protegidos de AH y no se produce una reacción secundaria indeseada como oxidación de AH en DMSO (reacción Pfizner-Moffatt).

20 **[0035]** Aunque la estructura de Cypate contiene dos grupos carboxilo funcionales, sorprendentemente no se produce una red del conjugado fluorescente de AH (ver Fig. 3-5), que conduciría a una disminución de la solubilidad del producto final.

25 **[0036]** Derivados éster similares de AH no son fáciles de obtener usando otros procesos o activadores como son cloruro de benzoilo (BC) y cloruro de 2,4,6-triclorobenzoilo (TBC) (documento WO2014082609). Tampoco se puede usar cloroformiato de etilo que pueda activar el grupo carboxilo (WO 2012034544), ya que conduce a la degradación del cromóforo (cypate) y la pérdida de propiedades fluorescentes. Como otro activador de los grupos carboxilo de hialuronano en disolvente orgánico se usa a menudo dicitclohexil carbodiimida (DCC), su gran desventaja es, sin embargo, que está indicado como un alérgeno fuerte (Derm_Beruf. Umwelt. 1986; 34 (4): 110-1.) y es altamente tóxico (Macrom. Rapid Commun. 2004, 25, 916-920).

35 **[0037]** El conjugado de ácido hialurónico con Cypate de fórmula general I y su conjugado hidrofobizado de la presente invención puede ser excitado preferiblemente en el área de 570 nm a 790 nm y emitir a 680 hasta 850 nm, y por lo tanto ser adecuado para el uso en las aplicaciones medicinales para la obtención de imágenes *in vivo* de la distribución conjugada de la invención, preferiblemente para la obtención de imágenes *in vivo* de órganos seleccionados del grupo que contengan, por ejemplo, hígado, piel; o imágenes de tumores después de la administración intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

40 **[0038]** Estos conjugados pueden penetrar después de la administración intravenosa o intraperitoneal en tejidos tumorales (es decir, neoplasias), preferiblemente en tumores palpables y/o en tumores muy pequeños (no palpables), y por lo tanto son adecuados para la obtención de imágenes para diagnosticar la enfermedad, especialmente enfermedad tumoral. En comparación con los compuestos de pentametina, el conjugado de heptametina y cianina de hialuronano es ventajoso respecto a propiedades fluorescentes, especialmente de mayor profundidad de penetración de radiación y una mayor limitación de la autofluorescencia indeseada. El diagnóstico de la enfermedad tumoral se aplica preferiblemente para los tejidos tumorales que absorben selectivamente hialuronano de bajo peso molecular (por ejemplo, tejidos con mayor expresión de CD44). La solubilidad del conjugado hidrofobizado de la presente invención es de 1 a 3 mg por 100 µl de la solución salina.

50 **[0039]** El conjugado hidrofobizado de la presente invención es muy estable en términos de propiedades fluorescentes y después de la administración intravenosa se puede aplicar para procesado de imágenes preferiblemente al menos durante 15 días sin necesidad de administración repetida del conjugado. El conjugado de la presente invención se concentra muy fácilmente incluso en tumores pequeños (palpablemente no detectables). Otra ventaja del conjugado hidrofobizado de la presente invención es la posibilidad de la unión no covalente del agente anticancerígeno (citostático) y, por lo tanto, su uso para una construcción de teranósticos, es decir, portadores con función diagnóstica y terapéutica al mismo tiempo. La principal ventaja del conjugado hidrofobizado de la presente invención como teranóstico es el uso de su capacidad para acumularse en los tejidos tumorales (especialmente en los tumores de mama), la obtención de imágenes a largo plazo y la aplicación al tratamiento del propio tumor.

60 *Definición de términos:*

[0040] Cypate incluye la estructura de la fórmula general III (cypate I) colorante indocianina heptametina o 1- [3- (2-carboxietil) -1,1-dimetil-5,9bdihidrobenzo [e] indol-3-ium-2-ilo (cloruro)]-ácido octa-1,3,5,7-tetraenil]-1,1-dimetil-2H-benzo[e]indol-3-il] propanoico.

65

[0041] SS = grado de sustitución = cantidad porcentual de unidades de disacárido modificadas de hialuronano por 100 unidades de disacárido de hialuronano (100% indica que por 100 de unidades de disacárido de hialuronano se detectaron 100 unidades modificadoras)

5 **[0042]** El término "temperatura ambiente" se refiere al rango de temperaturas en la habitación de 22°C a 25°C.

[0043] El equivalente (eqv.) se refiere al dímero de ácido hialurónico, se refiere al equivalente molar si no se indica lo contrario.

10 **[0044]** La capacidad de unión es la cantidad de agente de unión expresada en porcentaje en peso, si no se indica lo contrario.

[0045] El término "agente no polar" se refiere a un compuesto con distribución simétrica de cargas. Se refiere a un agente que es soluble en disolventes orgánicos, especialmente en alcoholes e insoluble en agua.

15

Descripción de figuras en dibujos

[0046]

20

Fig. 1: conjugado ¹H NMR (D₂O) AH-Cypate.

Fig. 2: conjugado del espectro DOSY NMR (D₂O) AH-Cypate.

Fig. 3: Registro de cromatograma de conjugado SEC-MALLS (AH-Cypate 14,000g/mol) AH-Cypate (Ejemplo 3).

25

Fig. 4: Registro de cromatograma de conjugado SEC-MALLS (AH -Cypate 14,000g/mol) AH -Cypate (Ejemplo 7).

Fig. 5: Registro de cromatograma de conjugado SEC-MALLS (AH -Cypate 58,000g/mol) AH -Cypate (Ejemplo 8).

Fig. 6: Registro de cromatograma de conjugado SEC-MALLS (AH -Cypate 72,000g/mol) AH -Cypate (Ejemplo 9).

30

Fig. 7: El espectro de emisión de la fluorescencia del conjugado HA-Cypate en la solución acuosa a la excitación 650, 660, 665 y 670 nm.

Fig. 8: La emisión de fluorescencia del conjugado en la solución acuosa en la excitación con láser $\lambda = 632,8$ nm sin (panel izquierdo) y en combinación con el filtro que transmite longitudes de onda sobre $\lambda = 635$ nm (panel derecho).

35

Fig. 9: Imagen fluorescente *in vivo*: AH-Cypate aplicado por vía subcutánea. El lugar de aplicación se indica con la letra S. Las figuras muestran la detección de emisión utilizando los diferentes filtros de excitación y emisión.

Fig. 10: Imagen fluorescente *in vivo* en momento después de la aplicación intraperitoneal de AH-Cypate.

Fig. 11: Imagen fluorescente *in vivo* en momento después de la aplicación intravenosa de AH -Cypate-C18: 1.

40

Fig. 12: Imagen fluorescente *in vivo* en momento después de la aplicación intravenosa de AH -Cypate-C18: 1 (ratón con tumor, células tumorales indicadas con luciferasa quimioluminiscente).

Fig. 13: La evaluación de la luminiscencia *in vivo* del tumor después de la administración de (i) AH-Cypate-C18: 1 (=AH cyp), (ii) AH -Cypate-C18: 1 + doxorubicina (=AH cyp dox), (iii) AH -Cypate-C18: 1 + doxorubicina + spion (=AH cyp dox + spiones).

45

Fig. 14: Comparación del peso del bazo y del hígado después de la administración de (i) AH -Cypate-C18: 1 (=AH cyp), (ii) AH -Cypate-C18: 1 + doxorubicina (=AH cyp dox), (iii) AH -Cypate-C18: 1 + doxorubicina + spion (=AH cyp dox + spiones).

Fig. 15: Imagen fluorescente *in vivo* tiempo después de la aplicación intraperitoneal de AH -Cypate-C18: 1 (ratón con tumor, células tumorales indicadas con luciferasa luminiscente).

50

Fig. 16: El espectro de masa del dímero AH -Cypate obtenido de la degradación enzimática del conjugado AH -Cypate con la hialuronano liasa.

Ejemplos de las realizaciones de la presente invención

55

Descripción de la instrumentación.

[0047] Los espectros de RMN se registraron en BRUKER AVANCE 500 a una frecuencia de 500,13 MHz (¹H). Para el procesamiento de datos experimentales se utilizó el software de Bruker TOPSPIN 1.2 o el software SpinWorks 3.1. Para la interpretación de los espectros de los análisis de RMN se utilizaron abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), m (multiplete). Para la medición de espectros UV/Vis en el rango de longitud de onda 190 - 800 nm se usó un espectrofotómetro UV/Vis Varian Cary 100. Los espectros fluorescentes se registraron en el aparato PTI Quantmaster 400. Los análisis ESI-MS de Cypate se realizaron en el espectrofotómetro de masas con trampa iónica amaZon X (BrukerDaltonics) equipado con la fuente de ionización por electropulverización y el analizador de masas cuadrupolo. Las mediciones se realizaron en modo positivo y negativo. La estructura del conjugado de AH-cypate se confirmó utilizando análisis LC-MS del conjugado después de su escisión enzimática con hialuronano liasa. La mezcla de

65

oligosacáridos se separó en columna Kinetex 1.7 μ m F5 100A (Phenomenex) usando gradiente 0.1% de HCOOH en H₂O y acetonitrilo. La detección se realizó en Synapt G2-Si en modo de resolución negativa con ionización con electropulverización. El análisis de muestras y la masa de la molécula de hialuronano inicial se determinó utilizando el método SEC-MALLS (HPLC Alliance) con UV/VIS 2489 y el detector de refractometría RID 2414 y el detector de dispersión de luz mini DAWN TREOS. Los datos se procesaron con el software Astra Versión 5.3.4.20 (Wyatt Technology Europe GmbH). Todos los análisis de imágenes *in vivo* se llevaron a cabo en el aparato IVIS Luminia XR Serie III) en ratones de laboratorio de la cepa Balb/c.

Ejemplo 1. Síntesis de 3- (2-carboxietil)-1,2,2-trimetil-1H-benzo [e] bromuro de indolio

[0048] Se disolvieron 2,0 g (9,6 mmol) de 1,1,2-trimetil-1H-benzindol y 2,2 g (14,3 mmoles) de ácido 3-bromopropanoico en 10 ml de 1,2-diclorobenceno y se calentaron bajo agitación constante a 115°C durante 16 horas. La mezcla cruda de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el precipitado resultante se lavó con 1,2-diclorometano (10 x 50 ml). El producto final se separó usando la filtración, se secó al vacío en el evaporador rotatorio (RE) y se obtuvo en forma de polvo de cristal gris claro (rendimiento 2,2 g (64%)).

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 8.38 (d, *J* = 8.35, 1Harom), 8.29 (d, *J* = 9.00, 1Harom), 8.23 (d, *J* = 8.35, 1Harom), 8.18 (d, *J* = 9.00, 1Harom), 7.80 - 7.71 (m, 2Harom), 4.79 (t, *J* = 6.95, 2H, -CH₂), 3.05 (t, *J* = 6.95, 2H, -CH₂), 2.98 (s, 3H, -CH₃), 1.76 (s, 6H, -CH₃) ppm

ESI-MS: ⁺MS [M]⁺ = 282

Ejemplo 2. Preparación de Cypate.

[0049] Se disolvieron 0,8 g (2,8 mmol) de hidrocloreto de dialdehído dianilina glutacónico en 8 ml de 1,2-diclorometano y se templaron a 0-5°C. Se añadieron gota a gota a la solución 521 μ l (5,5 mmol) del anhídrido de ácido acético, 481 μ l (2,8 mmol) y DIPEA en el pequeño volumen de 1,2-diclorometano (0,5 ml) y la mezcla de reacción se dejó enfriar y agitando para reaccionar durante 3 horas. Mientras tanto, 2 g de (5,5 mmol) 3- (2-carboxietil) -1,2,2-trimetil-1H-benzo [e] bromuro de indolio preparado en el Ejemplo 1 y 0,9 g (11,0 mmol) de acetato de sodio en la mezcla de disolventes acetonitrilo / agua 95/5 de volumen 15 ml se llevaron a reflujo y la primera mezcla de reacción se añadió gota a gota. La reacción continuó durante 18 horas con agitación a reflujo en oscuridad. La mezcla de reacción cruda se enfrió a temperatura ambiente, se lavó con 400 ml de acetato de etilo y 400 ml de HCl 1M, el producto se filtró y se secó a baja presión. El producto resultante se obtuvo en forma de polvo de cristal verde oscuro con 1,62 g (88%).

¹H RMN (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 8.25 (d, *J* = 8.75, 2H), 8.07 - 7.97 (m, 6H), 7.82 (t, *J* = 12.65, 1H), 7.73 (d, *J* = 8.75, 2H), 7.69 - 7.62 (m, 2H), 7.54 - 7.48 (m, 2H), 6.60 (t, *J* = 12.65, 2H), 6.47 (d, *J* = 13.75, 2H), 4.43 (bt, 4H -CH₂), 2.77 (t, *J* = 6.9, 4H -CH₂), 1.92 (s, 12H -CH₃) ppm

ESI-MS: ⁺MS [M]⁺ = 625; ⁻MS [M-2H]⁻ = 623 m / z

UV/Vis: $\lambda_{\text{abs,max}}$ = 782 nm (MeOH)

Ejemplo 3: Preparación de conjugado AH-Cypate

[0050] Se disolvieron 87 mg (0,13 mmol, 0,5 eq.) de Cypate del Ejemplo 2 en 2 ml de DMSO, se añadieron 22 mg (0,13 mmol, 0,5 eq.) de N,N'-carbonil diimidazol y se dejó activar 2 horas bajo agitación constante a temperatura ambiente. Mientras tanto, se disolvieron 100 mg (0,27 mmol, 1 eqv.) de ácido hialurónico en forma de ácido M_w 14,000 g/mol en DMSO a 60°C. Luego se añadieron a la solución 15 μ l (0,13 mmol, 0,5 eqv.) de N-metil morfolina y la primera mezcla de reacción sin el aislamiento previo. La reacción continuó bajo agitación constante en oscuridad a 60°C durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de diez veces de alcohol isopropílico al 100% (AIPA) respecto al volumen inicial de la mezcla de reacción y la solución saturada de NaCl, cuando se produjo la precipitación del producto deseado. El producto bruto se purificó con 5 x 100 ml de AIPA, se disolvió en 50 ml de agua desmineralizada y se transfirió a un tubo de diálisis. La forma protonizada de AH se neutralizó el primer día en una solución de NaCl al 0,5% y NaHCO₃ al 0,5%, se dializó adicionalmente el segundo y tercer día en el agua desmineralizada. El contenido del tubo se congeló y liofilizó. El producto resultante en forma de hialuronano se obtuvo como liofilizado verde de masa 89 mg (87%).

¹H RMN (D₂O) (Fig. 1): cypate: δ 8.80 (s, 2H), 8.50- 8.47 (m, 2H), 8.46 - 8.43 (m, 2H), 8.29 - 8.19 (m, 2H), 8.16 - 8.10 (m, 2H), 8.08 - 7.89 (m, 2H), 7.88 - 7.81 (m, 2H), 7.79 - 7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51 - 7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14 - 3.09 (m, 4H), 2.02 (12H, CH₃, recubierto con señales de AH), AH: δ 4.62 - 4.39 (m, 2H anómero), 4.01 - 3.28 (m, 10H esquelético), 2.02 (s, 3H, -CH₃) ppm

DOSY (D₂O): (Fig. 2)

SS = 1.5% (determinado a partir de ¹H RMN)

SEC-MALLS-LS-UV/Vis-RI: (Fig. 3)

Fluorímetro: $\lambda_{\text{em,max}}$ = 695 nm (a $\lambda_{\text{exc.}}$ = 665 nm; H₂O); (Fig. 7)

Fluorescencia del conjugado excitado con la longitud de onda del láser λ = 632.8 nm (Fig. 8)

ESI-MS: [M-H]⁻ = 984 m / z (Fig. 16, dímero detectado después de la degradación enzimática del conjugado con liasa)

Ejemplo 4: Preparación de conjugado AH-Cypate

5 **[0051]** Se disolvieron 87 mg (0,13 mmol, 0,5 eq.) de Cypate del Ejemplo 2 en 2 ml de DMSO, se añadieron 22 mg (0,13 mmol, 0,5 eq.) de N,N'-carbonil diimidazol y bajo agitación constante se dejó activar 30 min a temperatura ambiente. Se añadieron 100 mg (0,27 mmol, 1 eqv.) de la forma ácida de ácido hialurónico de M_w 14,000 g/mol en DMSO a 60°C. La reacción continuó bajo agitación constante en oscuridad a 60°C durante 24 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de un volumen de diez veces de alcohol isopropílico al 100% (AIPA) con respecto al volumen inicial de la mezcla de reacción y la solución saturada de NaCl, luego se produjo la precipitación del producto deseado. El producto bruto se purificó con 5 x 100 ml de AIPA, se disolvió en 50 ml de agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La forma protonizada de AH se neutralizó el primer día en solución de NaCl al 0,5% y NaHCO₃ al 0,5%, se dializó adicionalmente el segundo y tercer día en agua desmineralizada. El contenido del tubo se congeló y liofilizó. El producto resultante en forma de hialuronano se obtuvo como liofilizado verde de masa 89 mg (87%).

10 ¹H RMN (D₂O) (Fig. 1): cypate: δ 8.80 (s, 2H), 8.50- 8.47 (m, 2H), 8.46 - 8.43 (m, 2H), 8.29 - 8.19 (m, 2H), 8.16 - 8.10 (m, 2H), 8.08 - 7.89 (m, 2H), 7.88 - 7.81 (m, 2H), 7.79 - 7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51 - 7.46 (m, 2H), 5.16 , - 5.14 (m, 4H), 3.14 - 3.09 (m, 4H), 2.02 (12H, CH₃, recubierto con señales de AH), AH: δ 4.62 - 4.39 (m, 2H anómero), 4.01 - 3.28 (m, 10H esquelético), 2.02 (s, 3H, -CH₃) ppm

15 SS = 1% (determinado a partir de ¹H RMN)
Fluorímetro: λ_{em.max} = 695 nm (a λ_{exc.} = 665 nm; H₂O)

Ejemplo 5: Preparación de conjugado AH-Cypate

20 **[0052]** Se disolvieron 17 mg (0,03 mmol, 0,1 eqv.) de Cypate del Ejemplo 2 en 1 ml de DMSO, se añadieron 6 mg (0,04 mmol, 0,15 eq.) de N,N'-carbonil diimidazol y se dejó activar bajo agitación constante durante 30 min a temperatura ambiente. Se disolvieron 100 mg (0,27 mmol, 1 eqv.) de la forma ácida de ácido hialurónico de M_w 14,000 g/mol en DMSO a 60°C. La reacción continuó bajo agitación constante en oscuridad a 60°C durante 24 horas. La reacción se detuvo con la adición de un volumen de diez veces de alcohol isopropílico al 100% (AIPA) con respecto al volumen de la mezcla de reacción inicial y la solución saturada de NaCl, luego se produjo la precipitación del producto deseado. El producto bruto se purificó con 5 x 100 ml de AIPA, se disolvió en 50 ml de agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La forma protonizada de AH se neutralizó el primer día en una solución de NaCl al 0,5% y NaHCO₃ al 0,5%, se dializó adicionalmente el segundo y tercer día en el agua desmineralizada. El contenido del tubo se congeló y liofilizó. El producto resultante en forma de hialuronano se obtuvo como liofilizado verde de 92 mg en masa (90%).

25 ¹H RMN (D₂O): citrato: δ 8.80 (s, 2H), 8.50- 8.47 (m, 2H), 8.46 - 8.43 (m, 2H), 8.29 - 8.19 (m, 2H), 8.16 - 8.10 (m, 2H), 8.08 - 7.89 (m, 2H), 7.88 - 7.81 (m, 2H), 7.79 - 7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51 - 7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14 - 3.09 (m, 4H), 2.02 (12H, CH₃, recubierto con señales de AH), AH: δ 4.62 - 4.39 (m, 2H anómero), 4.01 - 3.28 (m, 10H esquelético), 2.02 (s, 3H, -CH₃) ppm

30 SS = 0.7% (determinado a partir de ¹H RMN)
Fluorímetro: λ_{em.max} = 695 nm (a λ_{exc.} = 665 nm; H₂O)

Ejemplo 6: Preparación de conjugado AH-Cypate

40 **[0053]** Se disolvieron 122 mg (0,19 mmol, 0,7 eq.) de Cypate del Ejemplo 2 en 1 ml de DMSO, se añadieron 34 mg (0,21 mmol, 0,8 eq.) de N,N'-carbonil diimidazol y se dejó activar bajo agitación constante 30 min a temperatura ambiente. Se disolvieron 100 mg (0,27 mmol, 1 eqv.) de la forma ácida de ácido hialurónico de M_w 14,000 g/mol en DMSO a 60°C. La reacción continuó bajo agitación constante en oscuridad a 60°C durante 24 horas. La reacción se detuvo con la adición de un volumen de diez veces de alcohol isopropílico al 100% (AIPA) con respecto al volumen de la mezcla de reacción inicial y la solución saturada de NaCl, luego se produjo la precipitación del producto deseado. El producto bruto se purificó con 5 x 100 ml de AIPA, se disolvió en 50 ml de agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La forma protonizada de AH se neutralizó el primer día en una solución de NaCl al 0,5% y NaHCO₃ al 0,5%, se dializó adicionalmente el segundo y tercer día en el agua desmineralizada. El contenido del tubo se congeló y luego se liofilizó. El producto resultante se obtuvo en forma de hialuronano como liofilizado verde de masa 85 mg (88%).

45 ¹H RMN (D₂O): cypate: δ 8.80 (s, 2H), 8.50- 8.47 (m, 2H), 8.46 - 8.43 (m, 2H), 8.29 - 8.19 (m, 2H), 8.16 - 8.10 (m, 2H), 8.08 - 7.89 (m, 2H), 7.88 - 7.81 (m, 2H), 7.79 - 7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51 - 7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14 - 3.09 (m, 4H), 2.02 (12H, CH₃, recubierto con señales de AH), AH: δ 4.62 - 4.39 (m, 2H anómero), 4.01 - 3.28 (m, 10H esquelético), 2.02 (s, 3H, -CH₃) ppm

50 SS = 1.3% (determinado a partir de ¹H RMN)
Fluorímetro: λ_{em.max} = 695 nm (a λ_{exc.} = 665 nm; H₂O)

Ejemplo 7: Preparación de conjugado AH-Cypate

55 **[0054]** Se disolvieron 87 mg (0,13 mmoles, 0,5 eqv.) de Cypate del Ejemplo 2 en 2 ml de DMSO, se añadieron 22 mg (0,13 mmoles, 0,5 eqv.) de CDI y bajo agitación constante se dejó activar 2 h a temperatura ambiente. Se disolvieron 100 mg (0,27 mmol, 1 eqv.) de la forma ácida del ácido hialurónico de M_w (14,000 g/mol) en DMSO a 60°C. Luego se agregaron 138 μl (0,79 mmol, 3 eqv.) de DIPEA y la primera mezcla de reacción a esta solución. La reacción continuó bajo agitación constante en oscuridad a 60°C durante 24 horas.

60 **[0055]** La reacción se detuvo mediante la adición de un volumen de diez veces de AIPA con respecto al volumen inicial de la mezcla de reacción y la solución saturada de NaCl, luego se produjo la precipitación del producto deseado. El

producto se purificó con 5 x 100 ml de AIPA, se disolvió en 50 ml de agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La forma protonizada de AH se neutralizó el primer día en una solución de NaCl al 0,5% y NaHCO₃ al 0,5%, se dializó adicionalmente el segundo y tercer día en agua desmineralizada. El contenido del tubo se congeló y liofilizó. El producto resultante en forma de hialuronano se obtuvo como liofilizado de masa 86 mg (84%).

- 5 ¹H RMN (D₂O): cypate: δ 8.81 (s, 2H), 8.50- 8.47 (m, 2H), 8.46 - 8.43 (m, 2H), 8.29 - 8.19 (m, 2H), 8.16 - 8.10 (m, 2H), 8.08 - 7.89 (m, 2H), 7.88 - 7.81 (m, 2H), 7.79 - 7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51 - 7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14 - 3.09 (m, 4H), 2.03 (12H, CH₃, recubierto con señales de AH), AH: δ 4.62 - 4.38 (m, 2H anómero), 4.01 - 3.26 (m, 10H esquelético), 2,03 (s, 3H, -CH₃) ppm
 SS = 1.5% (determinado a partir de ¹H RMN)
 10 SEC-MALLS-LS-UV/Vis-RI: (Figura 4)
 Fluorímetro: λ_{em.max} = 695 nm (a λ_{exc.max} = 665 nm; H₂O)

Ejemplo 8: Preparación de conjugado AH-Cypate

- 15 **[0056]** Se disolvieron 87 mg (0,13 mmoles, 0,5 eqv.) de Cypate del Ejemplo 2 en 2 ml de DMSO, se añadieron 22 mg (0,13 mmoles, 0,5 eqv.) de CDI y bajo agitación constante se dejó activar 2 h a temperatura ambiente. Se disolvieron 100 mg (0,27 mmol, 1 eqv.) de la forma ácida del ácido hialurónico de Mw (58,000 g/mol) en DMSO a 60°C. Luego, en esta solución se añadieron 15 μl (0,13 mmol, 0,5 eqv.) de N-metil morfolina y la primera mezcla de reacción sin la purificación previa. La reacción continuó bajo agitación constante en oscuridad a 60°C durante 24 horas.

- 20 **[0057]** La reacción se detuvo mediante la adición de un volumen de diez veces de AIPA con respecto al volumen inicial de la mezcla de reacción y la solución saturada de NaCl, luego se produjo la precipitación del producto deseado. El producto crudo se purificó con 5 x 100 ml de AIPA, se disolvió en 50 ml de agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La forma protonizada de AH se neutralizó el primer día en una solución de NaCl al 0,5% y NaHCO₃ al 0,5%, se dializó adicionalmente el segundo y tercer día en agua desmineralizada. El contenido del tubo se congeló y liofilizó. El producto resultante en forma de hialuronano se obtuvo como liofilizado de masa 95 mg (93%).
 25 ¹H RMN (D₂O): cypate: δ 9.2 (m, 2H), 8.82- 8.77 (m, 2H), 8.46 - 8.43 (m, 2H), 8.29 - 8.19 (m, 2H), 8.16 - 8.10 (m, 2H), 8.08 - 7.89 (m, 2H), 7.89 - 7.81 (m, 2H), 7.79 - 7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51 - 7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14 - 3.09 (m, 4H), 2.03 (12H, CH₃, recubierto con señales de AH), AH: δ 4.64 - 4.38 (m, 2H anómero), 4.04 - 3.21 (m, 10H esquelético), 2,03 (s, 3H, -CH₃) ppm
 30 [SS = 1.0% (determinado a partir de ¹H RNM)
 SEC-MALLS-LS-UV/Vis-RI: (Fig.5)
 Fluorímetro: λ_{em.max} = 695 nm (a λ_{exc.} = 665 nm; H₂O))

Ejemplo 9: Preparación de conjugado AH-Cypate

- 35 **[0058]** Se disolvieron 87 mg (0,13 mmol, 0,5 eq.) de Cypate del Ejemplo 2 en 2 ml de DMSO, se añadieron 22 mg (0,13 mmol, 0,5 eq.) de N,N'-carbonil diimidazol y con la agitación constante se dejó activar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se disolvieron 100 mg (0,27 mmol, 1 equiv.) de la forma ácida de ácido hialurónico de Mw (7,2 x 10⁴ g/mol) en DMSO a 60°C. 15 μl (0,13 mmol, 0,5 eqv.) de N-metil morfolina y la primera mezcla de reacción se añadió luego a esta solución. La reacción continuó con la agitación constante en oscuridad a 60°C durante 24 horas.

- 45 **[0059]** La reacción se detuvo mediante la adición de un volumen de diez veces de AIPA con respecto al volumen inicial de la mezcla de reacción y la solución saturada de NaCl, luego se produjo la precipitación del producto deseado. El producto bruto se purificó con 5 x 100 ml de AIPA al 100%, se disolvió en 50 ml de agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La forma protonizada de AH se neutralizó el primer día en solución de NaCl al 0,5% y NaHCO₃ al 0,5%, se dializó adicionalmente el segundo y tercer día en agua desmineralizada. El contenido del tubo se congeló y liofilizó. El producto resultante en forma de hialuronano se obtuvo como liofilizado de 96 mg en masa (94%).
 50 ¹H RMN (D₂O): cypate: δ 9.2 (m, 2H), 8.83- 8.5 (m, 2H), 8.45 - 8.43 (m, 2H), 8.30 - 8.18 (m, 2H), 8.16 - 7.99 (m, 2H), 7.99 - 7.89 (m, 2H), 7.89 - 7.81 (m, 2H), 7.79 - 7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51 - 7.46 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14 - 3.09 (m, 4H), 2.03 (12H, CH₃, recubierto con señales de AH), AH: δ 4.64 - 4.38 (m, 2H anómero), 4.04 - 3.21 (m, 10H esquelético), 2,03 (s, 3H, -CH₃) ppm
 55 SS = 1.0% (determinado a partir de ¹H RMN)
 SEC-MALLS-LS-UV/Vis-RI: (Fig. 6)
 Fluorímetro: λ_{em.max} = 695 nm (a λ_{exc.} = 665 nm; H₂O))

Ejemplo 10: Preparación de conjugado AH-Cypate

- 60 **[0060]** Se disolvieron 87 mg (0,13 mmol, 0,5 eq.) de Cypate del Ejemplo 2 en 2 ml de DMSO, se añadieron 22 mg (0,13 mmol, 0,5 eq.) de N,N'-carbonil diimidazol y bajo agitación constante se dejó activar durante 2 horas a temperatura ambiente. Se disolvieron 100 mg (0,27 mmol, 1 equiv.) de la forma ácida de ácido hialurónico de Mw (2,5 x 10⁵ g/mol) en DMSO a 40°C. 15 μl (0,13 mmol, 0,5 eqv.) de N-metil morfolina y primera mezcla de reacción se añadió luego a esta solución. La reacción continuó con la agitación constante en oscuridad a 40°C durante 24 horas.

[0061] La reacción se detuvo mediante la adición de un volumen de diez veces de AIPA con respecto al volumen inicial de la mezcla de reacción y la solución saturada de NaCl, luego se produjo la precipitación del producto deseado. El producto bruto se purificó con 5 x 100 ml de AIPA, se disolvió en 50 ml de agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La forma protonizada de AH se neutralizó el primer día en solución de NaCl al 0,5% y NaHCO₃ al 0,5%, se dializó adicionalmente el segundo y tercer día en agua desmineralizada. El contenido del tubo se congeló y liofilizó. El producto resultante en forma de hialuronano se obtuvo como liofilizado de masa 93 mg (92%).

¹H RMN (D₂O): citrato: δ 9.2 (m, 2H), 8.83- 8.5 (m, 2H), 8.45 - 8.43 (m, 2H), 8.30 - 8.17 (m, 2H), 8.16 - 7.99 (m, 2H), 7.99 - 7.89 (m, 2H), 7.89 - 7.81 (m, 2H), 7.79 - 7.73 (m, 2H), 7.58 (s, 2H), 7.51 - 7.42 (m, 2H), 5.16, - 5.14 (m, 4H), 3.14 - 3.09 (m, 4H), 2.03 (12H, CH₃, recubierto con señales de AH), AH: δ 4.62 - 4.38 (m, 2H anómero), 4.01 - 3.26 (m, 10H esquelético), 2.03 (s, 3H, -CH₃) ppm

SS = 0.5% (determinado a partir de ¹H RMN)

Fluorímetro: λ_{em.max} = 695 nm (a λ_{exc.} = 665 nm; H₂O)

Ejemplo 11: Esterificación de AH-Cypate con ácido hexanoico

[0062] Se disolvieron 300 mg (0,73 mmol, 1 eqv.) del conjugado AH-Cypate preparado según el Ejemplo 3 en 15 ml de agua desmineralizada y 13 ml de AIPA, se agregaron luego 382 μl (2,20 mmol, 3 eqv.) de DIPEA y 4,5 mg. (0.04 mmol, 0.05 eqv) de DMAP. Se disolvieron 165 μl (1.32 mmol, 1.8 eq.) de ácido hexanoico en 2 ml de AIPA, se agregaron 255 μl (1.46 mmol, 2 eq.) de DIPEA, 153 μl (1.32 mmol, 1.8 equivalentes) de cloruro de benzoilo y se dejó reaccionar bajo constante agitación durante 30 minutos a 0°C. Después del período de tiempo se transfirió todo cuantitativamente a la primera mezcla de reacción, luego la esterificación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente.

[0063] La reacción se interrumpió por adición del alto exceso de AIPA y la solución saturada de NaCl, mientras se producía la precipitación del producto. El producto bruto se lavó con 4 x 200 ml de AIPA, se disolvió adicionalmente en agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La diálisis se realizó durante 24 horas contra NaHCO₃ al 0,5%, NaCl al 0,5% y otras 8 horas en agua desmineralizada. El producto se obtuvo en forma de liofilizado verde dejando 230 mg (73%).

Señales adicionales de ¹H RMN en comparación con el ejemplo 3 (D₂O, 500 MHz): δ 2.4 (m, 2H, αCH₂), 1.6 (m, 2H, βCH₂), 1.31 (m, 4H, γCH₂), 0.8 (m, 3H, -CH₂-CH₃) ppm

SS (acilación) = 70% (determinado a partir de ¹H RMN)

Fluorímetro: λ_{em.max} = 700 nm (a λ_{exc.} = 665 nm; H₂O)

Ejemplo 12: Esterificación de AH-Cypate con ácido palmítico

[0064] Se disolvieron 300 mg (0,73 mmol, 1 eqv.) del conjugado de AH-Cypate preparado según el Ejemplo 3 en 15 ml de agua desmineralizada, y luego se añadieron 306 μl (2,20 mmol, 3 eqv.) de TEA y 4,5 mg (0,04 mmol, 0,05 eqv.) de DMAP. Mientras tanto, se añadieron 94 mg (0.37 mmol, 0.5 eqv.) de ácido hexadecanoico disuelto en 3 ml de THF, 153 μl (1.10 mmol, 1.5 eqv.) de TEA, 43 μl (0.37 mmol, 0.5 eqv.) de cloruro de benzoilo y se dejó reaccionar bajo agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del período de tiempo se transfirió todo cuantitativamente a la primera mezcla de reacción, la esterificación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente.

[0065] La reacción se interrumpió por adición del alto exceso de AIPA y solución saturada de NaCl, mientras se producía la precipitación del producto. El producto bruto se lavó con 4 x 200 ml de AIPA, se disolvió adicionalmente en agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La diálisis continuó durante 24 horas contra NaHCO₃ al 0,5% y NaCl al 0,5% y luego durante 48 horas en agua desmineralizada. El producto se obtuvo en forma de liofilizado verde dejando 189 mg (61%).

Señales adicionales de ¹H RMN al ejemplo 3 (D₂O, 500 MHz): δ 2.76 - 2.66 (m, 2H, αCH₂), 1.64 - 1.48 (m, 2H, βCH₂), 1.31 - 1.08 (m, 24H, CH₂), 0.98 - 0,78 (m, 3H, -CH₂-CH₃) ppm

SS acilación = 7% (determinado a partir de ¹H RMN)

Fluorímetro: λ_{em.max} = 710 nm (a λ_{exc.} = 685 nm; H₂O)

Ejemplo 13: Esterificación de AH-Cypate con ácido palmítico

[0066] Se disolvieron 200 mg (0,49 mmol, 1 eqv.) del conjugado de AH-Cypate preparado según el Ejemplo 3 en 10 ml de agua desmineralizada, y luego se agregaron 136 μl (0,98 mmol, 2 eqv.) de TEA y 3 mg (0.02 mmol, 0.04 eqv.) de DMAP. Se añadieron 38 mg (0.16 mmol, 0.3 eqv.) de ácido palmítico disuelto en 3 ml de THF, 68 μl (0.48 mmol, 1 eqv.) de TEA, 17 μl (0.16 mmol, 0.3 eqv.) de cloruro de benzoilo y se dejó reaccionar con agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del período de tiempo se transfirió todo cuantitativamente a la primera mezcla de reacción, la esterificación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente.

[0067] La reacción se interrumpió por adición del alto exceso de AIPA y solución saturada de NaCl, mientras se producía la precipitación del producto. El producto bruto se lavó con 4 x 200 ml de AIPA, se disolvió adicionalmente en agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La diálisis continuó durante 24 horas contra NaHCO₃ al 0,5% y NaCl al 0,5% y luego durante 48 horas en agua desmineralizada. El producto se obtuvo en forma de liofilizado verde dejando 76 mg (37%).

Señales adicionales de ^1H RMN al ejemplo 3 (D_2O , 500 MHz): δ 2.76 - 2.66 (m, 2H, αCH_2), 1.64 - 1.48 (m, 2H, βCH_2), 1.31 - 1.08 (m, 24H, CH_2), 0.98 - 0.78 (m, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ppm
 SS acilación = 5% (determinado a partir de ^1H RMN)
 Fluorímetro: $\lambda_{\text{em.max}}$ = 710 nm (a $\lambda_{\text{exc.}}$ = 685 nm; H_2O)

5

Ejemplo 14: Esterificación de AH-Cypate con ácido palmítico

10 **[0068]** Se disolvieron 200 mg (0,49 mmol, 1 eqv.) del conjugado de AH-Cypate preparado según el Ejemplo 3 en 10 ml de agua desmineralizada, y luego se agregaron 255 μl (1,47 mmol, 3 eqv.) de DIPEA y 3 mg (0.02 mmol, 0.04 eqv.) de DMAP. Se añadieron 38 mg (0.15 mmol, 0.3 eqv.) de ácido palmítico disuelto en 3 ml de THF, 85 μl (0,49 mmol, 1 eqv.) de DIPEA, 17 μl (0.15 mmol, 0.3 eqv.) de cloruro de benzoilo y se dejó reaccionar con agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del período de tiempo se transfirió todo cuantitativamente a la primera mezcla de reacción, la esterificación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente.

15 **[0069]** La reacción se interrumpió mediante la adición de un alto exceso de AIPA y la solución saturada de NaCl, mientras se producía la precipitación del producto. El producto bruto se lavó con 4 x 200 ml de AIPA, se disolvió después en agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La diálisis continuó durante 24 h contra NaHCO_3 al 0,5% y NaCl al 0,5% y luego durante 48 horas en agua desmineralizada. El producto se obtuvo en forma de liofilizado verde dando 93 mg (45%).

20 Señales adicionales de ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) al Ejemplo 3: δ 2.76 - 2.66 (m, 2H, αCH_2), 1.64 - 1.48 (m, 2H, βCH_2), 1.31 - 1.08 (m, 24H, CH_2), 0.98 - 0.78 (m, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ppm
 SS (acilación) = 5% (determinado a partir de ^1H RMN)
 Fluorímetro: $\lambda_{\text{em.max}}$ = 710 nm (a $\lambda_{\text{exc.}}$ = 685 nm; H_2O)

Ejemplo 15: Esterificación de AH-Cypate con ácido oleico

30 **[0070]** Se disolvieron 300 mg de AH-Cypate (0.73 mmol, 1 eqv.) del Ejemplo 3 en 15 ml de agua desmineralizada y luego se agregaron 13 ml de AIPA, 306 μl (2.20 mmol, 3 eqv.) de TEA y 4.5 mg (0.04 mmol, 0.05 eqv.) de DMAP. Se agregaron 186 μl (0.59 mmol, 0.8 eqv.) de ácido cis-octadec-9-enoico disuelto en 2 ml de AIPA, 306 μl (2.20 mmol, 3 eqv.) de TEA, 68 μl (0.59 mmol, 0.8 eqv.) de cloruro de benzoilo, y todo se dejó reaccionar bajo agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del período de tiempo se transfirió todo cuantitativamente a la primera mezcla de reacción, la esterificación se realizó entonces durante 2 horas a temperatura ambiente.

35 **[0071]** La reacción se interrumpió mediante la adición del alto exceso de AIPA y solución saturada de NaCl, mientras se producía la precipitación del producto. El producto bruto se lavó con 4 x 200 ml de AIPA, se disolvió adicionalmente en el agua desmineralizada y se transfirió a un tubo de diálisis. La diálisis continuó durante 24 horas contra NaHCO_3 al 0,5% y NaCl al 0,5% y luego durante 48 horas en agua desmineralizada. El producto se obtuvo en forma de liofilizado verde dando 210 mg (66%).

40 Señales adicionales de ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) al Ejemplo 3: δ 5.41 - 5.34 (m, 2H, $\text{CH} = \text{CH}$), 2.48 - 2.40 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.68 - 1.54 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CO}-$), 1.40 - 1.23 (m, 24 H, $(-\text{CH}_2)_{12}$), 0.91 - 0.68 (m, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ppm
 SS (acilación) = 10% (determinado a partir de ^1H RMN)
 Fluorímetro: $\lambda_{\text{em.max}}$ = 710 nm (a $\lambda_{\text{exc.}}$ = 685 nm; H_2O)

Ejemplo 16: Esterificación de AH-Cypate con ácido oleico

45

50 **[0072]** Se disolvieron 300 mg (0,73 mmol, 1 eqv.) del conjugado de AH-Cypate preparado según el Ejemplo 3 en 15 ml de agua desmineralizada y 13 ml de AIPA, luego se añadieron 306 μl (2,20 mmol, 3 eqv.) de TEA y 4,5 mg (0,04 mmol, 0,05 eqv.) de DMAP. Se agregaron 116 μl (0,36 mmol, 0,5 eq.) de ácido cis-octadec-9-enoico disuelto en 2 ml de AIPA, 153 μl (1,08 mmol, 1,5 eq.) de TEA, 43 μl (0,36 mmol, 0,5 eq.) de cloruro de benzoilo fue y se dejó reaccionar bajo agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del período de tiempo, todo se transfirió cuantitativamente a la primera mezcla de reacción, luego la esterificación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente.

55 **[0073]** La reacción se interrumpió mediante la adición del alto exceso de AIPA y solución saturada de NaCl, mientras se producía la precipitación del producto. El producto bruto se lavó con 4 x 200 ml de AIPA, se disolvió adicionalmente en el agua desmineralizada y se transfirió a un tubo de diálisis. La diálisis continuó durante 24 horas contra NaHCO_3 al 0,5% y NaCl al 0,5% y luego durante 48 horas en agua desmineralizada. El producto se obtuvo en forma de liofilizado verde dando 205 mg (73%).

60 Señales adicionales de ^1H RMN (D_2O , 500 MHz) al Ejemplo 3: δ 5.41 - 5.34 (m, 2H, $\text{CH} = \text{CH}$), 2.48 - 2.40 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$), 1.68 - 1.54 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, $-\text{CO}-$), 1.40 - 1.23 (m, 24 H, $(-\text{CH}_2)_{12}$), 0.91 - 0.68 (m, 3H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) ppm
 SS (acilación) = 8% (determinado a partir de ^1H RMN)
 Fluorímetro: $\lambda_{\text{em.max}}$ = 710 nm (a $\lambda_{\text{exc.}}$ = 685 nm; H_2O)

Ejemplo 17: Esterificación de AH-Cypate con ácido oleico

65

5 **[0074]** Se disolvieron 300 mg (0,73 mmol, 1 eqv.) del conjugado de AH-Cypate preparado de acuerdo con el Ejemplo 3 en 15 ml de agua desmineralizada y se añadieron 13 ml de AIPA, 382 μ l (2,20 mmol, 3 eqv.) de DIPEA y 4,5 mg (0,04 mmol, 0,05 eqv.) de DMAP. Se añadió 139 μ l (0,45 mmol, 0,6 eq.) de ácido cis-octadec-9-enoico disuelto en 2 ml de AIPA, 229 μ l (1,32 mmol, 1,8 eq.) de DIPEA, 51 μ l (0,44 mmol, 0,6 eq.) de cloruro de benzoilo y se dejó reaccionar bajo agitación constante 30 minutos a 0°C. Después del período dado, todo se transfirió cuantitativamente a la primera mezcla de reacción, y la esterificación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente.

10 **[0075]** La reacción se interrumpió mediante la adición del alto exceso de AIPA y solución saturada de NaCl, mientras se producía la precipitación del producto. El producto bruto se lavó con 4 x 200 ml de AIPA, se disolvió adicionalmente en el agua desmineralizada y se transfirió a un tubo de diálisis. La diálisis continuó durante 24 horas contra NaHCO₃ al 0,5% y NaCl al 0,5% y luego durante 48 horas en agua desmineralizada. El producto se obtuvo en forma de liofilizado verde dando 204 mg (65%).

15 Señales adicionales de ¹H RMN (D₂O, 500 MHz) al Ejemplo 3: δ 5.41 - 5.34 (m, 2H, CH = CH), 2.48 - 2.40 (m, 2H, -CH₂-CO-), 1.68 - 1.54 (m, 2H, -CH₂-CH₂, -CO-), 1.40 - 1.23 (m, 24 H, (-CH₂)₁₂), 0.91 - 0.68 (m, 3H, -CH₂-CH₃) ppm
SS (acilación) = 12% (determinado a partir de ¹H RMN)
Fluorímetro: $\lambda_{em,max}$ = 710 nm (a λ_{exc} = 685 nm; H₂O)

Ejemplo 18: Esterificación de AH-Cypate con ácido oleico

20 **[0076]** Se disolvieron 300 mg (0,73 mmol, 1 eqv.) del conjugado AH-Cypate preparado de acuerdo con el Ejemplo 3 en 15 ml de agua desmineralizada y 11 ml de AIPA, luego se agregó 306 ml (2,20 mmol, 3 eqv.) de TEA y 4.5 mg (0.04 mmol, 0.05 eqv.) de DMAP. Se añadieron 231 ml (0.73 mmol, 1 eq.) de ácido cis-octadec-9-enoico disuelto en 2 ml de AIPA, 204 ml (1.46 mmol, 2 eq.) de TEA, 85 ml (0.73 mmol, 1 eq.) de cloruro de benzoilo y se dejó reaccionar con agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del período de tiempo dado, todo se transfirió cuantitativamente a la primera mezcla de reacción, y la esterificación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente.

30 **[0077]** La reacción se interrumpió mediante la adición del alto exceso de AIPA y solución saturada de NaCl, mientras se producía la precipitación del producto. El producto bruto se lavó con 4 x 200 ml de AIPA, se disolvió adicionalmente en el agua desmineralizada y se transfirió a un tubo de diálisis. La diálisis continuó durante 24 horas contra NaHCO₃ al 0,5% y NaCl al 0,5% y luego durante 48 horas en agua desmineralizada. El producto se obtuvo en forma de liofilizado verde dando 226 mg (70%).

35 Señales adicionales de ¹H RMN (D₂O, 500 MHz) para el Ejemplo 3: δ 5.41 - 5.34 (m, 2H, CH = CH), 2.48 - 2.40 (m, 2H, -CH₂-CO-), 1.68 - 1.54 (m, 2H, -CH₂-CH₂, -CO-), 1.40 - 1.23 (m, 24 H, (-CH₂)₁₂), 0.91 - 0.68 (m, 3H, -CH₂-CH₃) ppm
SS (acilación) = 12% (determinado a partir de ¹H RMN)
Fluorímetro: $\lambda_{em,max}$ = 710 nm (a λ_{exc} = 685 nm; H₂O)

Ejemplo 19: Esterificación de AH-Cypate con ácido oleico

40 **[0078]** Se disolvieron 300 mg (0,73 mmol, 1 eqv.) del conjugado AH-Cypate preparado según el Ejemplo 3 en 15 ml de agua desmineralizada y 11 ml de AIPA, luego se añadió 375 μ l (1,76 mmol, 2,4 eqv.) de N,N,N',N'-tetrametil-1,6-hexanodiamina y 4,5 mg (0,04 mmol, 0,05 eqv.) de DMAP. Se agregaron 139 μ l (0,44 mmol, 0,6 eqv.) de ácido cis-octadec-9-enoico disuelto en 2 ml de AIPA, 375 μ l (1,76 mmol, 2,4 eqv.) N,N,N',N'-tetrametil-1,6-hexanodiamina, 51 ml (0,44 mmol, 0,6 eq.) de cloruro de benzoilo y se dejaron reaccionar bajo agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del período dado, todo se transfirió cuantitativamente a la primera mezcla de reacción, y la esterificación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente.

50 **[0079]** La reacción se interrumpió mediante la adición del alto exceso de AIPA y solución saturada de NaCl, mientras se producía la precipitación del producto. El producto bruto se lavó con 4 x 200 ml de AIPA, se disolvió adicionalmente en agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La diálisis se realizó durante 24 horas contra NaHCO₃ al 0,5% y NaCl al 0,5% y luego durante 48 horas en agua desmineralizada. El producto se obtuvo en forma de liofilizado verde dejando 217 mg (70%).

55 Señales adicionales de ¹H RMN (D₂O, 500 MHz) para el Ejemplo 3: δ 5.41 - 5.34 (m, 2H, CH = CH), 2.48 - 2.40 (m, 2H, -CH₂-CO-), 1.68 - 1.54 (m, 2H, -CH₂-CH₂, -CO-), 1.40 - 1.23 (m, 24 H, (-CH₂)₁₂), 0.91 - 0.68 (m, 3H, -CH₂-CH₃) ppm
SS (acilación) = 6% (determinado a partir de ¹H RMN)
Fluorímetro: $\lambda_{em,max}$ = 710 nm (a λ_{exc} = 685 nm; H₂O)

Ejemplo 20: Esterificación de AH-Cypate con ácido oleico

60 **[0080]** Se disolvieron 300 mg (0,73 mmol, 1 eqv.) del conjugado AH-Cypate preparado según el Ejemplo 3 en 15 ml de agua desmineralizada y 11 ml de AIPA, y luego se agregaron 241 μ l (2,20 mmol, 3 eqv.) de N-metil morfolina y 4.5 mg (0.04 mmol, 0.05 eqv.) de DMAP. Se añadieron 139 μ l (0.44 mmol, 0.6 eqv.) de ácido cis-octadec-9-enoico disuelto en 2 ml de AIPA, 193 μ l (1.76 mmol, 2.4 eqv.) de N-metil morfolina, 51 μ l (0.44 mmol, 0.6 eqv.) de cloruro de benzoilo y se dejaron reaccionar bajo agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del período dado, todo se transfirió cuantitativamente a la primera mezcla de reacción, y la esterificación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente.

5 **[0081]** La reacción se interrumpió mediante la adición del alto exceso de AIPA y solución saturada de NaCl, mientras se producía la precipitación del producto. El producto bruto se lavó con 4 x 200 ml de AIPA, se disolvió adicionalmente en agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La diálisis se realizó durante 24 horas contra NaHCO₃ al 0,5% y NaCl al 0,5% y luego durante 48 horas en agua desmineralizada. El producto se obtuvo en forma de liofilizado verde dejando 264 mg (82%).

10 Señales adicionales de ¹H RMN (D₂O, 500 MHz) para el Ejemplo 3: δ 5.41 - 5.34 (m, 2H, CH = CH), 2.48 - 2.40 (m, 2H, -CH₂-CO-), 1.68 - 1.54 (m, 2H, -CH₂-CH₂, -CO-), 1.40 - 1.23 (m, 24 H, (-CH₂)₁₂), 0.91 - 0.68 (m, 3H, -CH₂-CH₃) ppm

SS (acilación) = 12% (determinado a partir de ¹H RMN)

Fluorímetro: λ_{em.max} = 710 nm (a λ_{exc.} = 685 nm; H₂O)

Ejemplo 21: Esterificación de AH-Cypate con ácido oleico

15 **[0082]** Se disolvieron 300 mg (0,73 mmol, 1 eqv.) del conjugado AH-Cypate preparado según el Ejemplo 3 en 15 ml de agua desmineralizada y 11 ml de AIPA, y luego se añadieron 246 mg (2,20 mmol, 3 eqv.) de DABCO y 4,5 mg (0,04 mmol, 0,05 eqv.) de DMAP. Se añadieron 139 μl (0,44 mmol, 0,6 eq.) de ácido cis-octadec-9-enoico disuelto en 2 ml de AIPA, 148 mg (1,32 mmol, 1,8 eq.) de DABCO, 51 μl (0,44 mmol, 0,6 eq.) de cloruro de benzoilo y se dejaron reaccionar con agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del período dado, todo se transfirió

20 cuantitativamente a la primera mezcla de reacción, y la esterificación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición del alto exceso de AIPA y solución saturada de NaCl, mientras se producía la precipitación del producto. El producto bruto se lavó con 4 x 200 ml de AIPA, se disolvió adicionalmente en agua desmineralizada y se transfirió al tubo de diálisis. La diálisis se realizó durante 24 horas contra NaHCO₃ al 0,5% y NaCl al 0,5% y otras 48 horas en agua desmineralizada. El producto se obtuvo en forma de liofilizado verde con 183 mg (60%).

25 Señales adicionales de ¹H RMN (D₂O, 500 MHz) para el Ejemplo 3: δ 5.41 - 5.34 (m, 2H, CH = CH), 2.48 - 2.40 (m, 2H, -CH₂-CO-), 1.68 - 1.54 (m, 2H, -CH₂-CH₂, -CO-), 1.40 - 1.23 (m, 24 H, (-CH₂)₁₂), 0.91 - 0.68 (m, 3H, -CH₂-CH₃) ppm

SS (acilación) = 3% (determinado a partir de ¹H RMN)

30 Fluorímetro: λ_{em.max} = 710 nm (a λ_{exc.} = 685 nm; H₂O)

Ejemplo 22: Carga de AH-Cypate hidrofobizado con compuesto no polar

35 **[0083]** Se disolvieron 150 mg del conjugado acilado de AH-cypate preparado según el Ejemplo 16 durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada bajo agitación constante en el agitador magnético. Luego se añadieron gradualmente 10 mg de paclitaxel en 2 ml de cloroformo y la mezcla resultante se evaporó (RE) para secar y luego se hidrató con agua desmineralizada (15 ml). El paclitaxel no unido se eliminó con la filtración a través de un filtro de vidrio de 1,0 μm y el producto resultante se liofilizó.

40 La cantidad de paclitaxel no unido (determinación por HPLC): 4.2% (peso)

Ejemplo 23: Carga de AH-Cypate hidrofobizado con compuesto no polar

45 **[0084]** Se disolvieron 150 mg del conjugado acilado AH-cypate preparado según el Ejemplo 18 durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en el agitador magnético. Luego se añadieron gradualmente 15 mg de doxorubicina en 2 ml de cloroformo y la mezcla resultante se sonicó primero (sonicación por pulso cca 15 min, 200 W, amplitud 65%, ciclo 0,5 s) hasta alcanzar la mezcla homogénea y luego se evaporó (RE) para secar y luego se hidrató con agua desmineralizada (15 ml). La doxorubicina no unida se eliminó por filtración a través de un filtro de vidrio de 1,0 μm y el producto resultante se liofilizó.

50 **[0085]** La cantidad de doxorubicina no unida (determinación por HPLC): 7,5% (peso)

Ejemplo 24: Carga de AH-Cypate hidrofobizado con compuesto no polar

55 **[0086]** Se disolvieron 150 mg del conjugado acilado AH-cypate preparado según el Ejemplo 18 durante 2 horas en 15 ml de agua desmineralizada con agitación constante en el agitador magnético. Luego se añadieron gradualmente 2 mg de spions a base de hierro (Fe₂O₃, Fe₃O₄) (5 mm) y 20 mg de doxorubicina en 5 ml de cloroformo y la mezcla resultante se sonicó primero (sonicación por pulso, aproximadamente 15 min, 200 W, amplitud 65 %, ciclo 0,5s) hasta alcanzar una mezcla homogénea y luego se evaporó (RE) para secar y luego fue hidratada con agua desmineralizada (15 ml). La doxorubicina no unida se eliminó por filtración a través de un filtro de vidrio de 1,0 μm y el producto resultante se liofilizó.

[0087] La cantidad de doxorubicina no ligada (determinación por HPLC): 6,5% (peso), spions no ligadas: 2% (peso)

Ejemplo 25: Experimento in vivo: fluorescencia del conjugado AH-Cypate

65

[0088] Para los experimentos *in vivo* fue preparado AH-Cypate, de acuerdo con el Ejemplo 3, disuelto en la solución salina ($c = 3,8$ mg de derivado en 100 μ l de solución) y luego esterilizado por filtración (0,22 μ m). Se aplicaron subcutáneamente 50 μ l (Fig. 9) y/o intraperitonealmente 150 μ l (Fig. 10) de solución estéril del derivado dado al ratón de laboratorio del tipo Balb/c en narcosis. Se detectó fluorescencia utilizando la combinación de diferentes longitudes de onda de excitación y filtros de emisión.

[0089] Las figuras 9 a 10 muestran la intensidad suficiente de fluorescencia del derivado después de la aplicación subcutánea e intraperitoneal para la formación de imágenes *in vivo*. El tratamiento de imagen se puede realizar utilizando las diferentes longitudes de onda de excitación (530-745 nm) y filtros para la emisión (ICG, Cy5.5). El filtro DsRed no se puede utilizar. De la Fig. 10, la estabilidad del derivado como fluoróforo después de la administración intraperitoneal es más evidente.

Ejemplo 26: Experimento *in vivo* - fluorescencia del conjugado AH-Cypate-C18: 1

[0090] El AH-Cypate-C18:1 (SS=10%) preparado según el Ejemplo 15 se disolvió en tampón fosfato ($c = 3,6$ mg del conjugado en 100 μ l de solución) y se esterilizó por filtración (0,22 μ m). 100 μ l de dicha solución preparada se aplicó por vía intravenosa a dos ratones modelo Balb/c (en narcosis) y se observó su fluorescencia *in vivo* durante un período de 7 días (Fig. 11).

[0091] La figura 11 muestra que AH-Cypate-C18:1 se distribuye después de administración i.v. en el ratón sano especialmente en el hígado. La fluorescencia del conjugado es suficiente para el tratamiento de imágenes *in vivo*, la fluorescencia del conjugado es además muy estable, después de que una administración se puede visualizar en imágenes durante 2 semanas.

Ejemplo 27: Experimento *in vivo* - fluorescencia del conjugado AH-Cypate-C18: 1

[0092] El AH-Cypate-C18:1 (SS = 10%) preparado según el Ejemplo 15 se disolvió en la solución salina ($c = 1,8$ mg del conjugado en 100 μ l de solución) y se esterilizó por filtración (0,22 μ m). Se aplicaron 100 μ l de dicha solución preparada por vía intravenosa a 3 ratones modelo Balb/c (en narcosis) con tumor de mama no palpable (administración ortotópica de células luc 4T1, visualizable mediante quimioluminiscencia -detección de la actividad de luciferasa después de la inyección i.p. de luciferina) y se observó su fluorescencia *in vivo* durante un período de 72 horas (Fig. 12).

[0093] La figura 12 muestra que AH-Cypate-C18:1 se distribuye después de administración i.v. en el hígado y luego de 24 horas en un tumor muy pequeño (no palpable). En el tumor, existe una acumulación de AH-Cypate-C18:1 que crece con el tiempo y la presencia del conjugado en el tumor es muy significativa incluso después de 15 días después de la administración del conjugado. La fluorescencia del conjugado *in vivo* es, por lo tanto, muy estable y el conjugado se puede usar para obtener imágenes de tumores muy pequeños y, además, para observarlos a tiempo. En el panel izquierdo de la figura se encuentra la imagen de control del tumor con imágenes luminiscentes (la detección de la actividad luciferasa).

Ejemplo 28: Experimento *in vivo* - fluorescencia del conjugado AH-Cypate-C18: 1

[0094] A 9 ratones modelo Balb/c (en narcosis) se les administró ortotópicamente células luc 4T1 (células que se pueden visualizar con quimioluminiscencia, detección de actividad de luciferasa después de la aplicación i.p. de luciferina) y se dejó crecer el tumor de mama durante 14 días. El día 14 se dividieron los ratones en 3 grupos (1 grupo = 3 animales). A cada grupo se le aplicaron intravenosamente los días 14, 21 y 28 1 mg de conjugado seleccionado en 100 μ l de tampón fosfato y luego: al primer grupo se le aplicó AH-Cypate-C18:1 preparado en el Ejemplo 15, al segundo grupo AH-Cypate-C18:1 cargado con doxorubicina, preparado en el Ejemplo 23 y al tercer grupo AH-Cypate-C18:1 cargado con doxorubicina y spions, preparado en el Ejemplo 24. La radiación se evaluó durante 35 días *in vivo* (Fig. 13), luego se sacrificaron los ratones y se comparó el peso del tumor y el bazo en grupos individuales (Fig. 14).

[0095] La figura 13 muestra que el tumor creció más en el grupo, al que solo se administró AH-Cypate. Se detectó un crecimiento más lento en contraste en los grupos a los que se aplicó AH-Cypate-C18:1 + doxorubicina, y/o AH-Cypate-C18:1 + doxorubicina + spion.

[0096] La figura 14 muestra que el primer grupo (no tratado) tenía el mayor peso de bazo y tumor. En un modelo dado, el aumento del bazo indica la progresión de la enfermedad (duPre et al., *Experimental and Molecular Pathology* 2007, 82, 12-24). El segundo grupo (tratado) y el tercero (tratado) tenían bazo significativamente más pequeño y tumor más pequeño en comparación con el primer grupo. El tamaño tumoral más pequeño se encontró en el tercer grupo. El sistema portador puede, por lo tanto, no solo obtener imágenes, sino también curar el tumor y cumplir la función de teranostático.

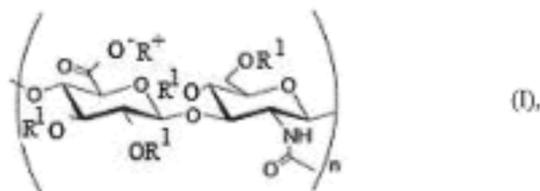
Ejemplo 29: Experimento *in vivo* - fluorescencia del conjugado AH-Cypate-C18: 1

5 **[0097]** El AH-Cypate-C18: 1 (SS = 10%) preparado según el Ejemplo 15 se disolvió en la solución salina (c = 0; 0,625; 1,25; 2,5 mg del conjugado en 100 µl de solución) y se esterilizó por filtración (0,22 µm). Se aplicaron 100 µl de tales soluciones preparadas por vía intraperitoneal a 4 ratones modelo Balb/C (en narcosis) con el tumor de mama (35 días después de la administración ortotópica de células luc 4T1, visualizable con detección de quimioluminiscencia de la actividad luciferasa después de la inyección i.p. de luciferina) y se observó su fluorescencia *in vivo* durante 7 días (Fig. 15).

10 **[0098]** La figura 15 muestra que AH-Cypate-C18: 1 se distribuye después de la administración i.p. en tumor e hígado. El tumor es sin ningún problema visualizable *in vivo* como mínimo durante 7 días después de la administración del conjugado en todas las concentraciones utilizadas. En el panel izquierdo de la figura está la imagen de control del tumor con la imagen luminiscente (detección de luciferasa). El panel derecho de la figura muestra 4 ratones, a los que se administró la solución del derivado; de izquierda a derecha aumenta la concentración: (0; 0,625; 1,25; 2,5 mg del conjugado administrado en 100 µl de solución).

REIVINDICACIONES

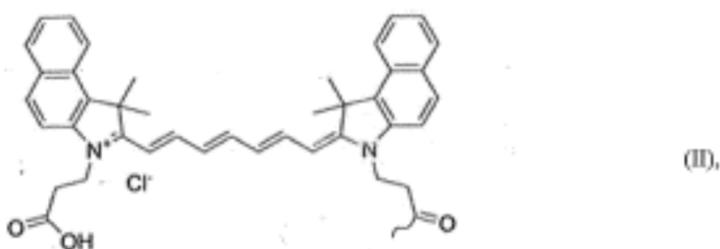
1. Un conjugado fluorescente de ácido hialurónico o una sal del mismo de la fórmula general I,



5

en la que R⁺ es H⁺ o sal fisiológicamente aceptable seleccionada del grupo que contiene Na⁺, K⁺, Mg²⁺ o Ca²⁺, R¹ es -H o un residuo de cypate de la fórmula II, donde ~ está en el lugar del enlace covalente del residuo de cypate de la fórmula II

10



siendo un R¹ un residuo de cypate de fórmula II en al menos una unidad repetida siempre que si hay un residuo de cypate R¹ de fórmula II en la unidad, entonces los otros R¹ en la unidad son H, y en la que n es un número entero en el rango de 2 a 625.

15

2. El conjugado fluorescente de la reivindicación 1, donde el residuo de cypate de la fórmula II está en la posición 6 de la parte glucosamina del conjugado fluorescente del ácido hialurónico o la sal del mismo de la fórmula general I.

20

3. El conjugado fluorescente de la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2, donde el grado de sustitución del residuo de cypate de la fórmula II en el conjugado de ácido hialurónico o la sal del mismo de la fórmula general I es de 0,1 a 2%, preferiblemente 1,0 %

25

4. El conjugado fluorescente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que absorbe la luz en el área de 570 nm a 790 nm y emite la luz en el área de 680 nm a 850 nm, preferiblemente a 850 nm.

30

5. Un derivado hidrofobizado de conjugado fluorescente de ácido hialurónico o la sal del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R⁺, R¹ y n están, como se define en la reivindicación 1, aplicando al mismo tiempo, que en al menos una unidad repetida al menos un R¹ es -C(=O)R², donde R² es un sustituyente C_xH_y, donde x es un número entero en el rango de 5 a 17 e y es un número entero de 11 a 35, en donde se trata de una cadena alifática C₆-C₁₈ lineal o ramificada, saturada o insaturada.

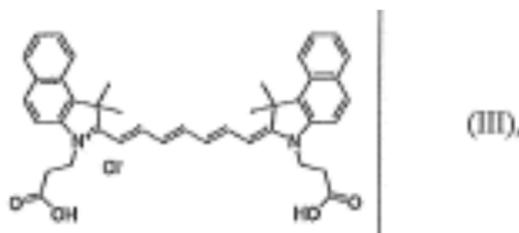
35

6. El derivado hidrofobizado de la reivindicación 5, en el que el grado de sustitución de -C(=O)R² en el conjugado de ácido hialurónico o la sal del mismo de la fórmula general I es de 3 a 70%, preferiblemente de 5 a 12%.

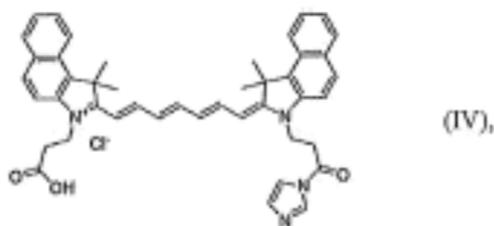
40

7. El derivado hidrofobizado de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, que absorbe la luz en el rango de longitudes de onda de 570 nm a 790 nm y emite la luz a 680 a 850 nm, preferiblemente 850 nm.

8. Un método de preparación del conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el cypate I de la fórmula III



está activado con N,N'-carbonil diimidazol (CDI) en el disolvente polar aprótico seleccionado del grupo que contiene dimetilsulfóxido, dimetilformamida, formamida o acetonitrilo, preferiblemente dimetilsulfóxido; dando como resultado un intermedio reactivo monoimidazolido de la fórmula IV



5

que reacciona con ácido hialurónico o la sal del mismo en presencia de la base orgánica, que bien se genera in situ en forma de imidazol, o se agrega a la mezcla de reacción, seleccionándose la base orgánica agregada del grupo que contiene 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano, N,N,N',N'-tetrametil-1,6-hexanodiamina, N-metilmorfolina, imidazol, trietilamina o N,N'-diisopropil etilamina, preferiblemente imidazol generado *in situ*; y disolvente aprótico polar, como se ha definido anteriormente.

9. El método de la reivindicación 8, **caracterizado porque** la activación del cypate se realiza a la temperatura en el intervalo de 20°C a 60°C, preferiblemente de 22°C a 25°C; durante 10 minutos a 20 horas, preferiblemente de 0,5 a 2 horas.

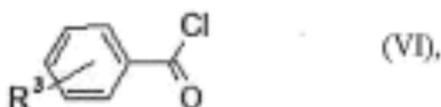
10. El método de la reivindicación 8, **caracterizado porque** la formación del conjugado de ácido hialurónico o la sal del mismo se realiza a una temperatura de 40°C a 80°C, preferiblemente de 40°C a 60°C, más preferiblemente 60°C; durante 12 a 48 horas, preferiblemente 24 horas.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, **caracterizado porque** la relación molar de cypate I : ácido hialurónico o su sal : N,N'-carbonil diimidazol : base orgánica es 0,5 : 1 : 0,5 : 0,5 a 3,5 en la mezcla de reacción, preferiblemente la relación molar es 0,5 : 1 : 0,5 : 1.

12. Un método de preparación del derivado hidrofobizado del conjugado fluorescente de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizado porque** se realiza la activación del ácido graso de la fórmula general V



en donde R² es C_xH_y, considerando que x es un número entero en el rango de 5 a 17 e y es un número entero de 11 a 35 y C_xH_y es una cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada; utilizando el cloruro de benzoilo sustituido o no sustituido de la fórmula general VI

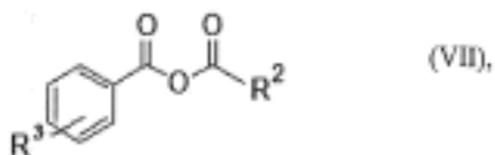


35

en donde R³ es uno o más sustituyentes seleccionados del grupo que contiene H, -NO₂, -COOH, halogenuros, alquil-alcoxi C1-C₆, preferiblemente H;

en presencia de la base orgánica seleccionada del grupo que contiene 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano, N,N,N',N'-tetrametil-1,6-hexanodiamina, N-metilmorfolina, trietilamina o N,N'-diisopropil etilamina, preferiblemente trietilamina; y el disolvente polar seleccionado del grupo que contiene alcohol isopropílico, tetrahidrofurano, preferiblemente alcohol isopropílico

para formar el anhídrido reactivo de la fórmula general VII



45

en la que R² y R³ son, como se definió anteriormente, que esterifica el conjugado fluorescente de ácido hialurónico o la sal del mismo de la fórmula general (I), como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en presencia de la base orgánica, preferiblemente

amina seleccionada del grupo que contiene 1,4-diazabi-ciclo[2.2.2]octano, *N,N,N',N'*-tetrametil-1,6-hexanodiamina, *N*-metilmorfolina, imidazol, trietilamina o *N,N'*-diisopropil etilamina, más preferiblemente trietilamina; la mezcla de agua y el disolvente polar miscible con agua seleccionada del grupo que contiene alcohol isopropílico, dimetilsulfóxido o tetrahidrofurano, preferiblemente alcohol isopropílico.

5

13. El método de la reivindicación 12, **caracterizado porque** la activación del ácido graso de la fórmula general V se realiza durante 0,5 a 24 horas, a la temperatura en el intervalo de 0°C a 60°C, preferiblemente 0,5 horas a temperatura de 0°C a 25°C, y la esterificación del conjugado fluorescente de ácido hialurónico o la sal del mismo se realiza durante 0,5 a 2 horas, preferiblemente 2 horas, a la temperatura en el rango de 22°C a 25°C .

10

14. El método de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, **caracterizado porque** la cantidad de la base orgánica corresponde a 2 a 6 equivalentes molares, preferiblemente 4 equivalentes molares por dímero de ácido hialurónico o de su sal; la cantidad del cloruro de benzoilo sustituido o no sustituido corresponde a 0,2 a 2,0 equivalentes molares, preferiblemente 0,6 equivalentes molares por dímero de ácido hialurónico o de su sal; la cantidad de ácido graso corresponde a 0,2 a 2,0 equivalentes molares, preferiblemente 0,6 equivalentes molares de ácido hialurónico o de su sal.

15

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, **caracterizado porque** la cantidad de agua en la mezcla de agua y el disolvente polar miscible con agua es de 50 a 80% v/v, preferiblemente 50% v/v.

20

16. El conjugado fluorescente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el derivado hidrofobizado del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para uso en aplicaciones medicinales para la obtención de imágenes *in vivo* de la distribución del conjugado, preferiblemente para la obtención de imágenes *in vivo* de órganos o tumores.

25

17. El conjugado fluorescente o el derivado hidrofobizado del mismo de la reivindicación 16 para uso en la aplicación intravenosa, intraperitoneal o subcutánea.

18. El conjugado fluorescente o el derivado hidrofobizado del mismo de la reivindicación 16 para uso en administración para la obtención de imágenes *in vivo* de tumores no palpables y/o palpables.

30

19. El conjugado fluorescente o el derivado hidrofobizado del mismo de la reivindicación 18 para uso en la administración intravenosa, intraperitoneal.

20. Una composición basada en el agregado del derivado hidrofobizado de conjugado fluorescente de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizada porque** contiene un agregado de los derivados hidrofobizados de conjugados fluorescentes y al menos uno o más agentes no polares, preferiblemente fármacos y/o nanopartículas

35

21. La composición de la reivindicación 20 **caracterizada porque** el fármaco es un citostático, preferiblemente doxorubicina o paclitaxel.

40

22. La composición de la reivindicación 20, **caracterizada porque** el derivado hidrofobizado del conjugado fluorescente tiene $R^1-C(=O)C_{17}H_{33}$ y las nanopartículas son nanopartículas superparamagnéticas.

23. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, **caracterizada porque** contiene de 2 a 15% en peso, preferiblemente contiene de 2 a 6% en peso de compuestos no polares con respecto al contenido en peso del derivado hidrofobizado del conjugado fluorescente de ácido hialurónico o la sal del mismo.

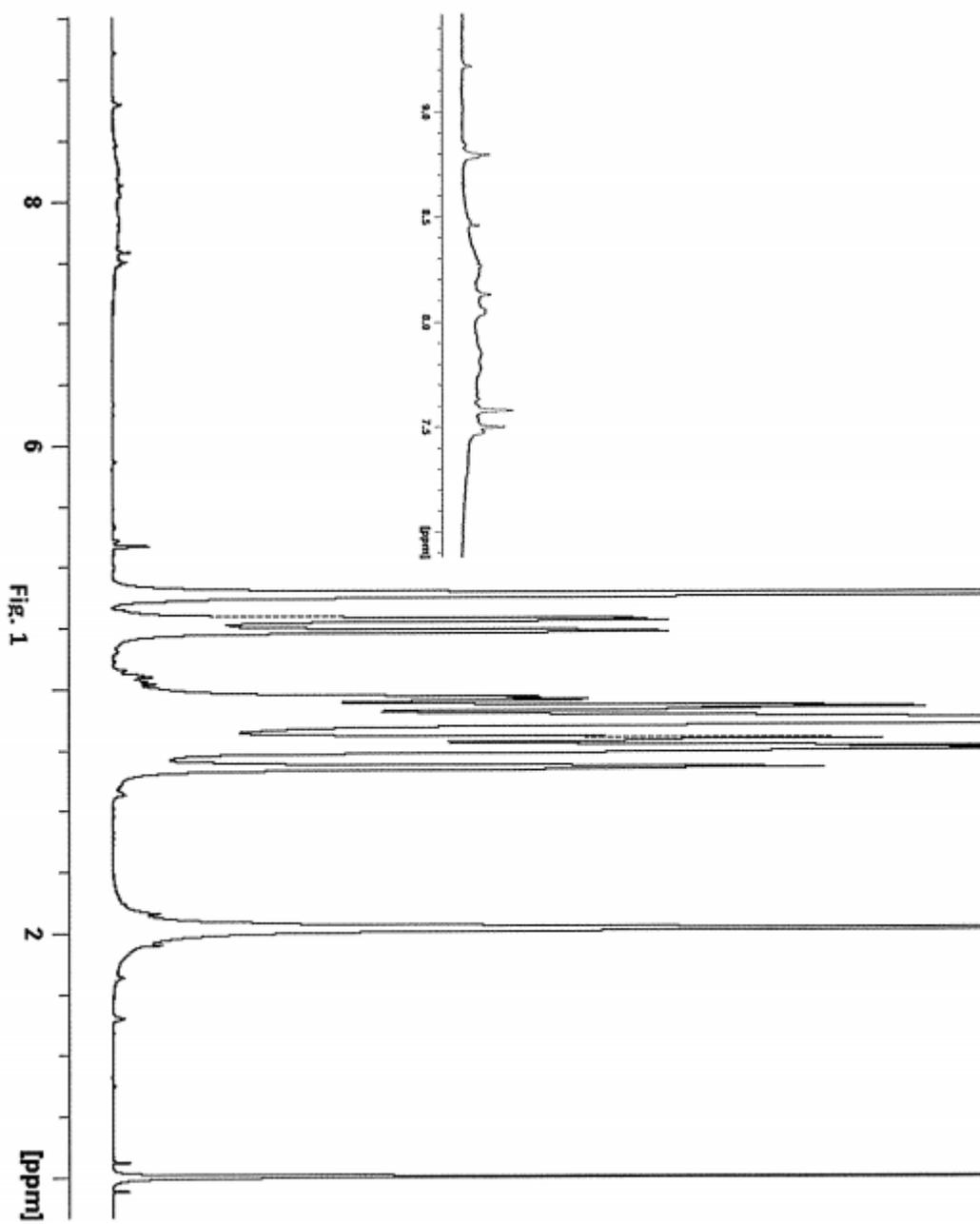
45

24. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23 para su uso en aplicaciones medicinales para la obtención de imágenes *in vivo* de tumores.

50

25. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23 para uso en el tratamiento de tumores.

55



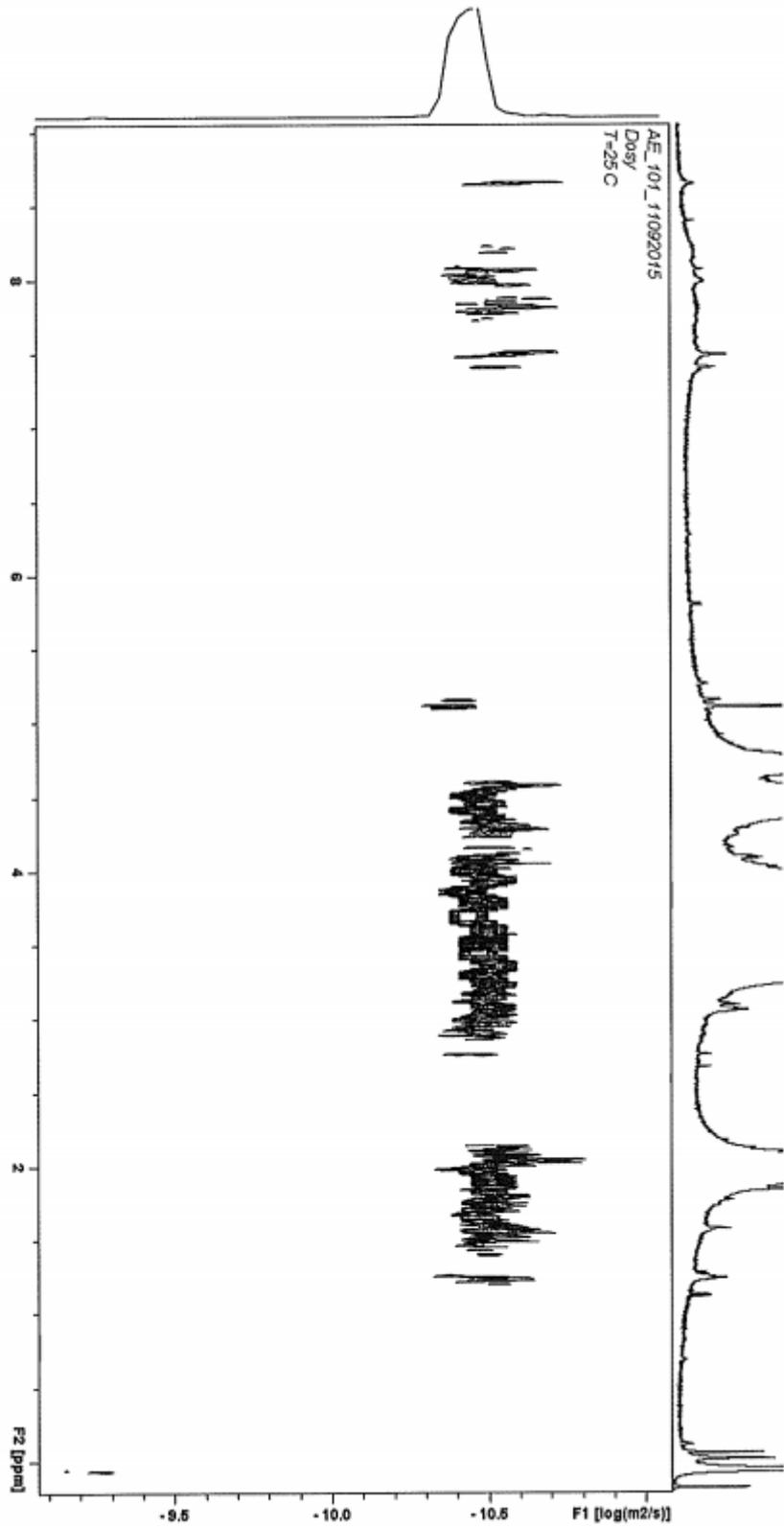


Fig. 2

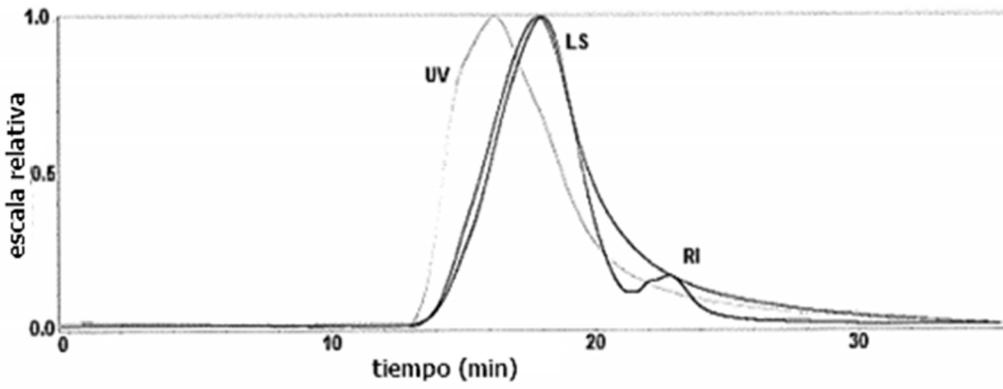


Fig. 3

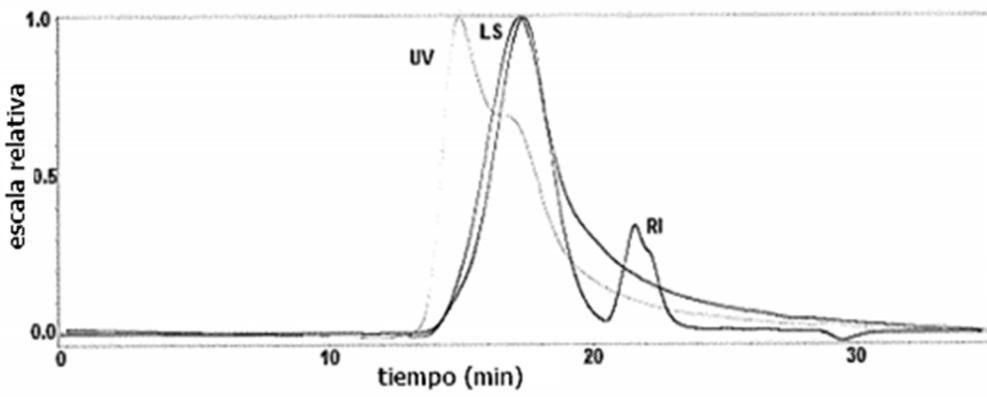


Fig. 4

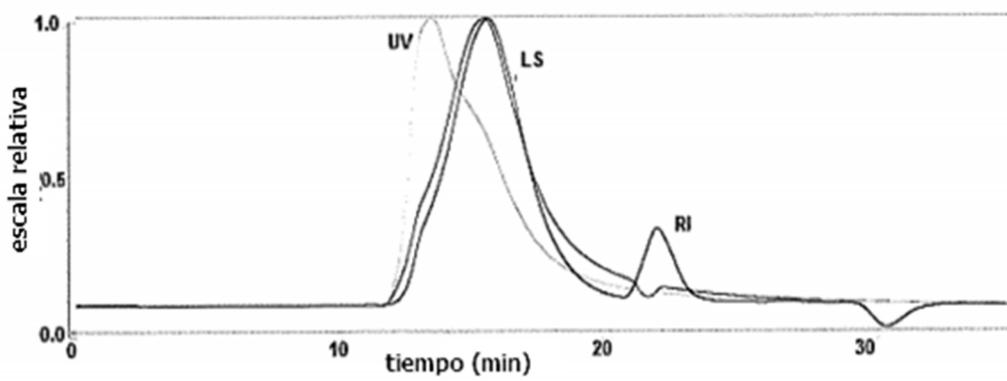


Fig. 5

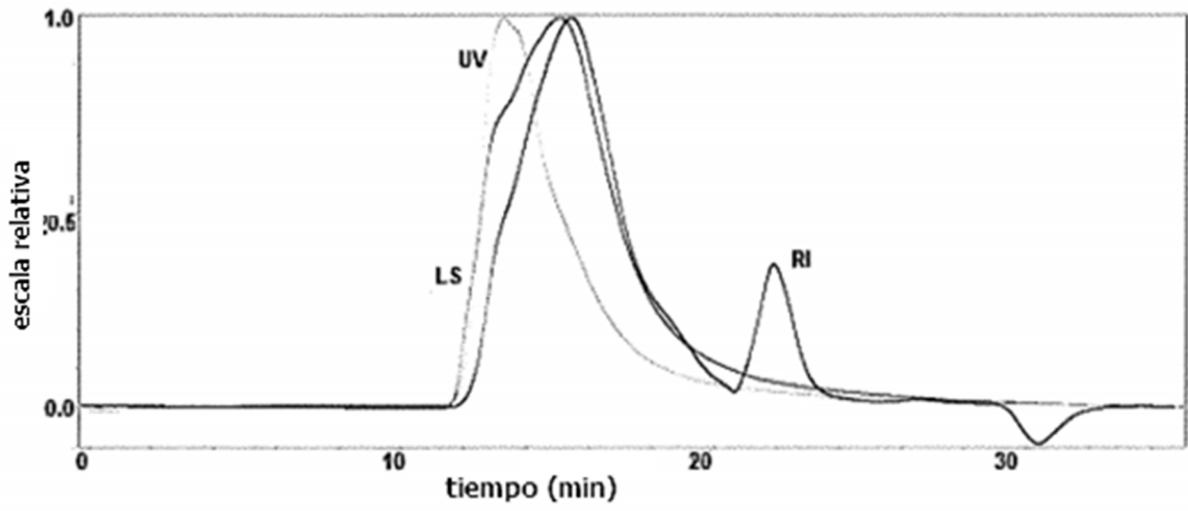


Fig. 6

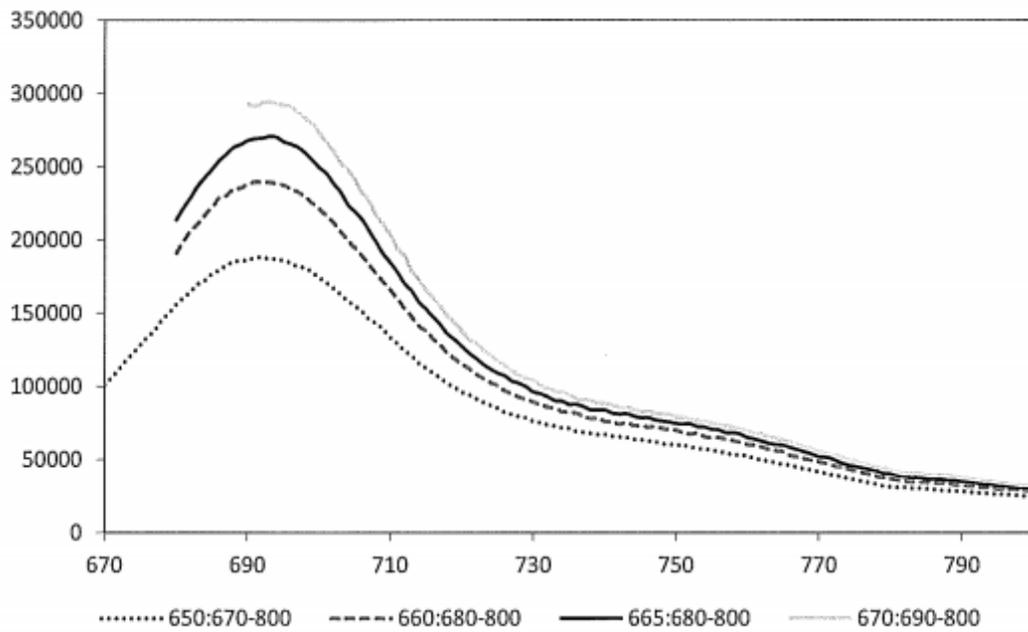


Fig. 7

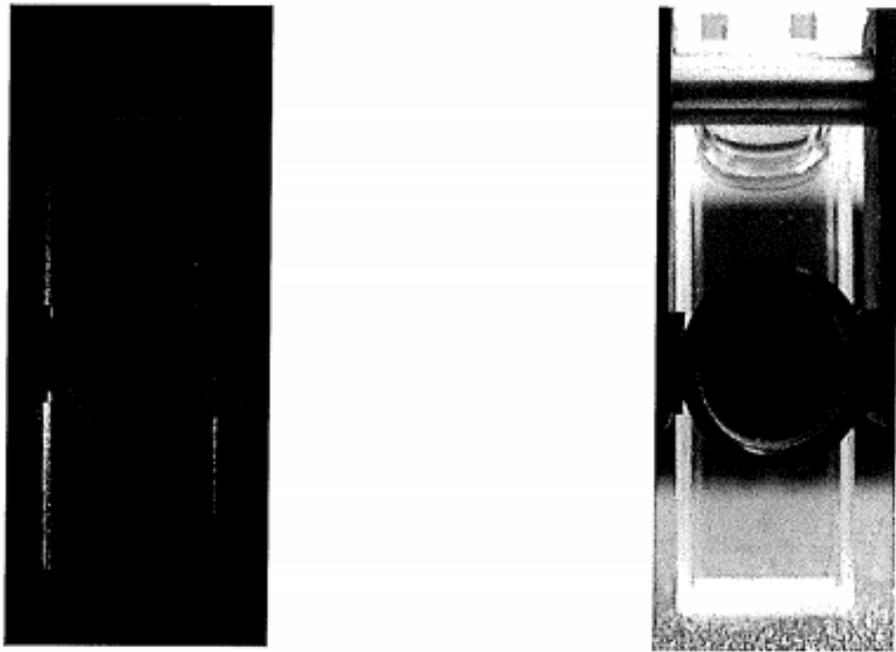


Fig. 8

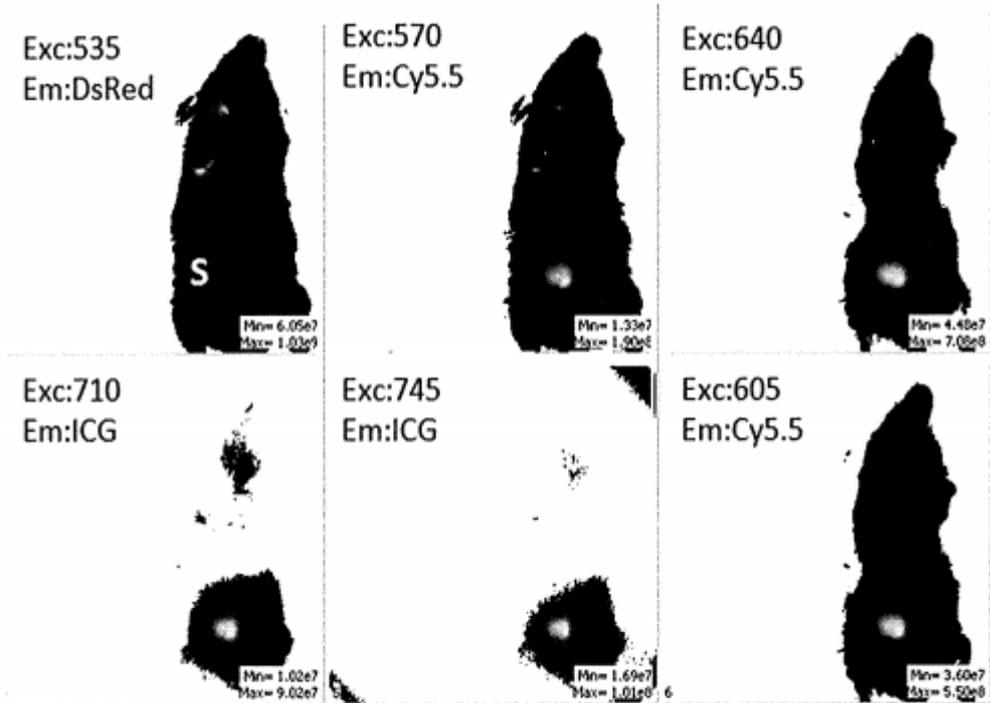


Fig. 9

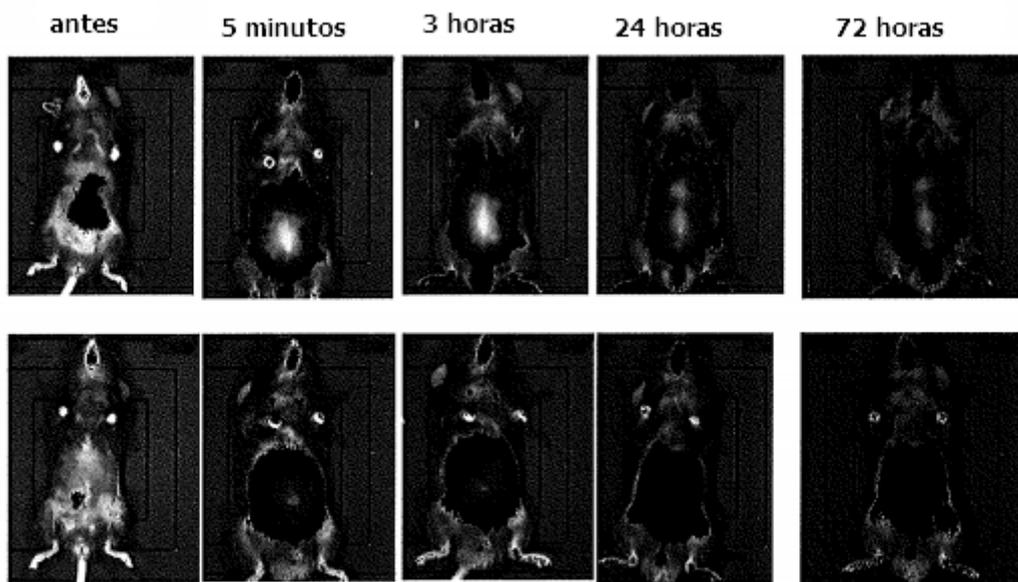


Fig. 10

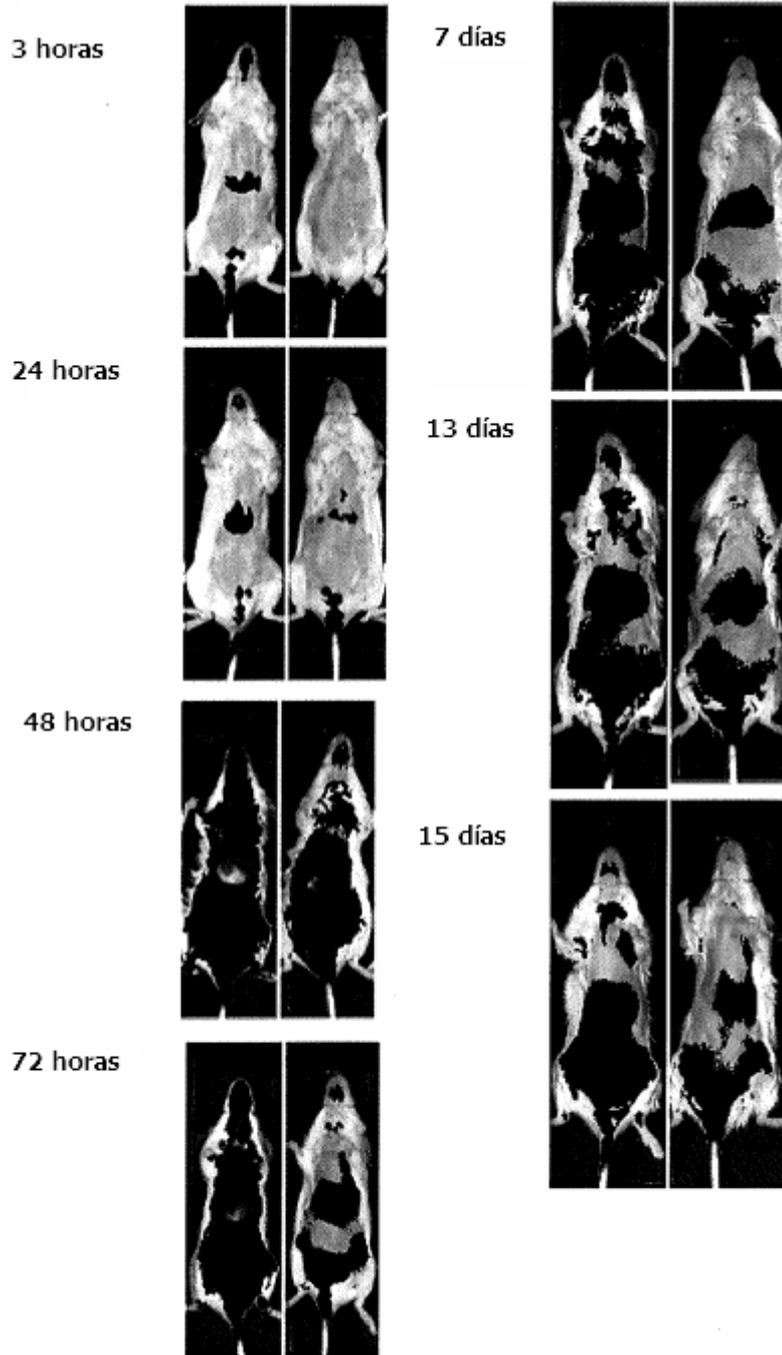


Fig. 11

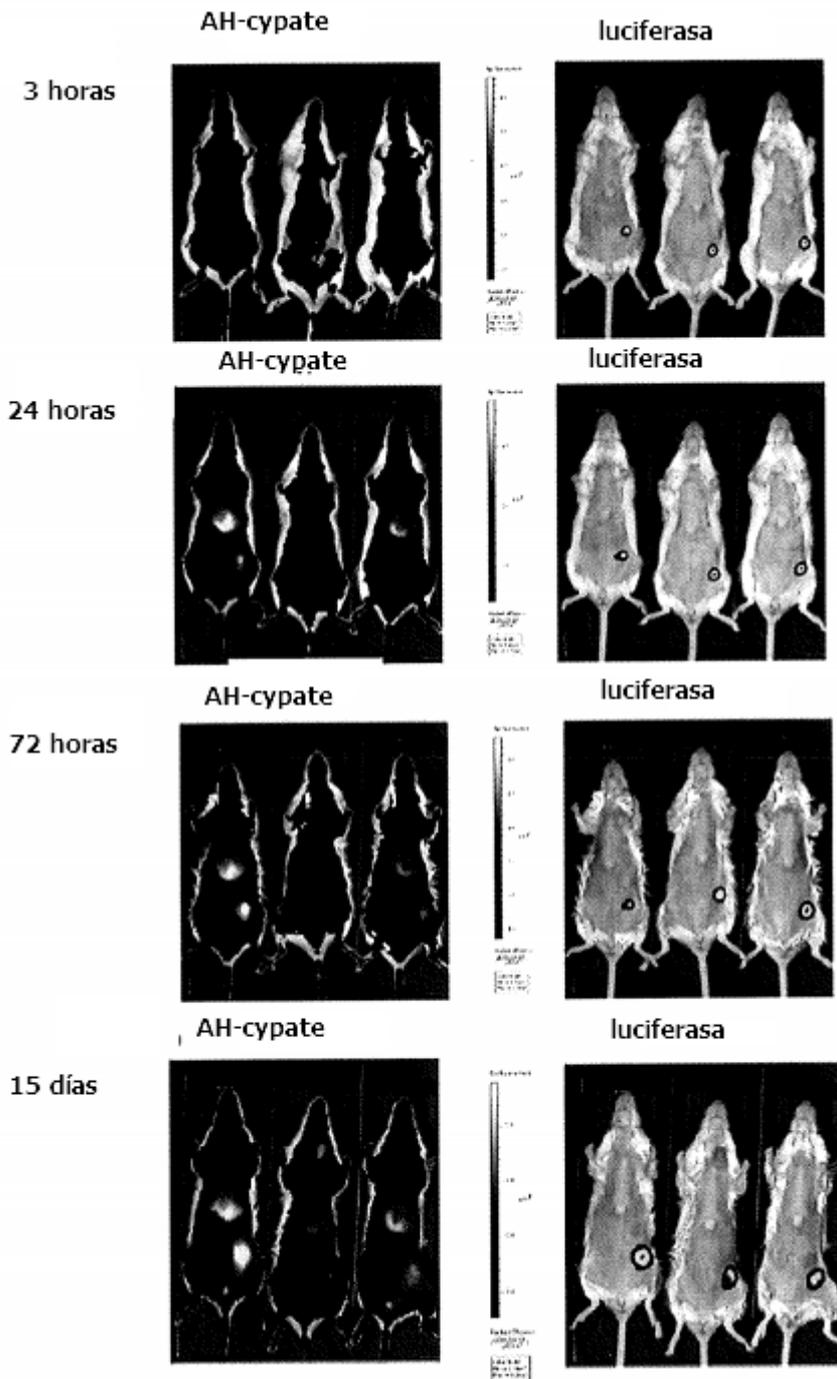


Fig. 12

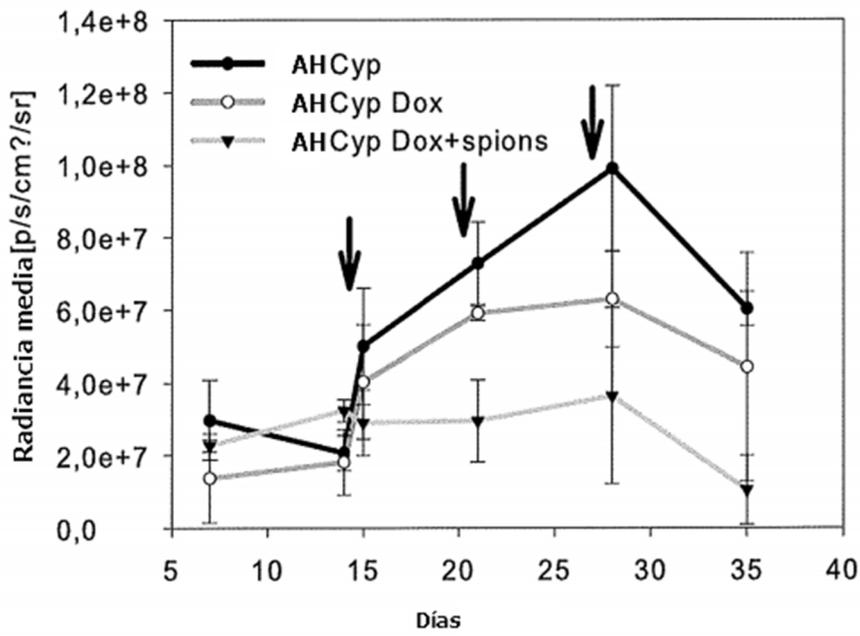


Fig.13

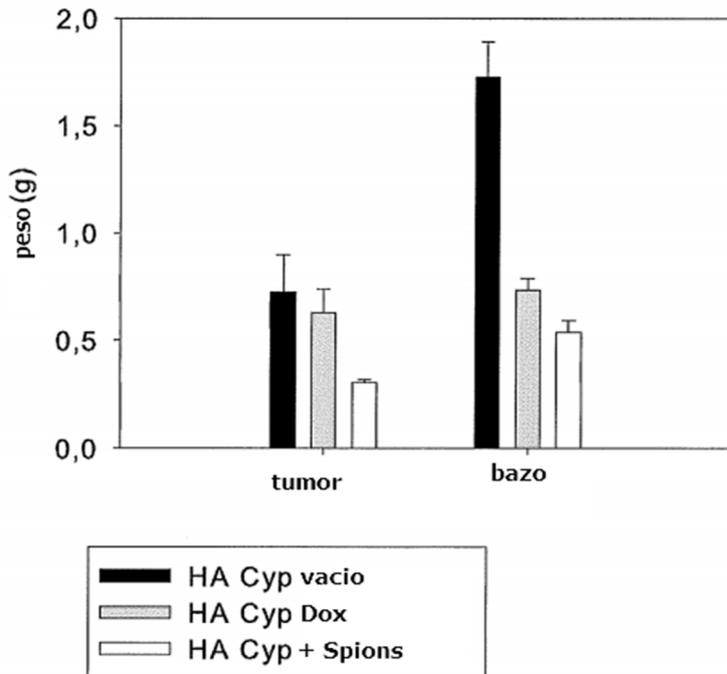


Fig.14

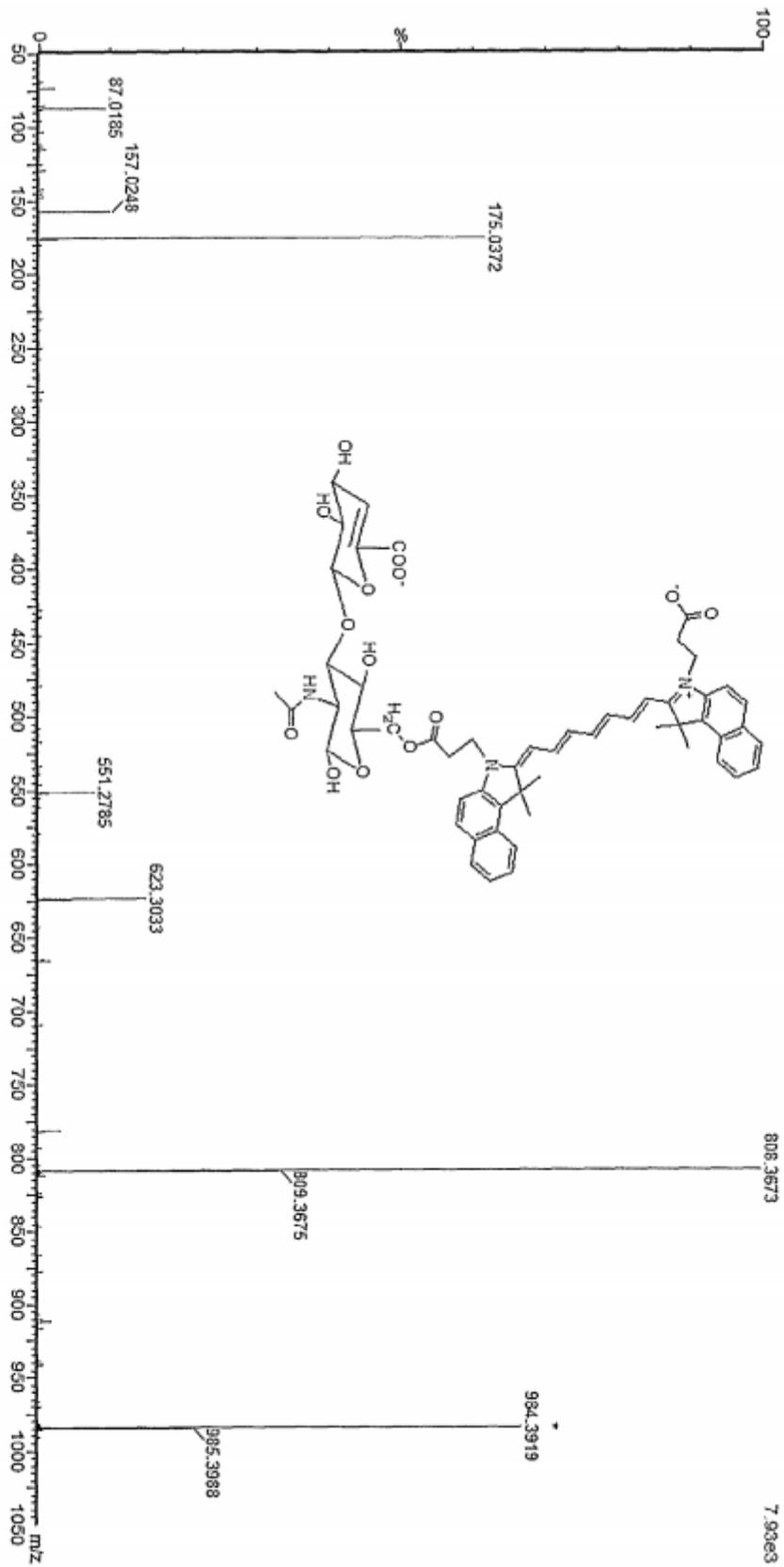


Fig. 16