



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 586**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

C09B 23/02 (2006.01)

C09B 23/00 (2006.01)

C09B 23/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02090268 .0**

96 Fecha de presentación : **28.03.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1281405**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.02.2003**

54 Título: **Conjugados de colorantes y péptidos de cadena corta como medios de contraste para el diagnóstico óptico.**

30 Prioridad: **09.04.1999 DE 199 17 713**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.06.2009

73 Titular/es: **Bayer Schering Pharma AG.**
Müllerstrasse 170-178
13353 Berlin, DE

72 Inventor/es: **Licha, Kai;**
Becker, Andreas;
Semmler, Wolfhard;
Wiedemann, Bertram;
Hessenius, Carsten;
Volkmer-Engert, Rudolf;
Schneider-Mergener, Jens y
Bhargava, Sarah

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Conjugados de colorantes y péptidos de cadena corta como medios de contraste para el diagnóstico óptico.

La invención trata de compuestos para el diagnóstico de tumores, compuestos por conjugados de colorantes con péptidos de cadena corta que se derivan del péptido intestinal vasoactivo, de la somatostatina o de la neurotensina, del uso de estos compuestos como agentes de diagnóstico óptico, y de agentes de diagnóstico que contienen estos compuestos.

Las alteraciones condicionadas por enfermedad con frecuencia se reflejan a nivel celular en una distribución o en una expresión alterada de receptores, en comparación con el estado normal. Estas diferencias pueden ser de índole cuantitativa (por ejemplo, la cantidad de receptores de transferrina en células proliferantes) o de índole cualitativa (por ejemplo, la expresión de factores de crecimiento del endotelio vascular, VEGF). Hasta ahora los ensayos para representar una expresión o distribución patológica de receptores, por la sensibilidad necesaria del procedimiento de detección, principalmente se realizan mediante el radiodiagnóstico.

Los receptores heptahelicoidales son moléculas meta de muchos principios activos farmacológicos (por ejemplo, β -bloqueantes, bloqueantes de ácidos H₂, antihistamínicos). Además de las preparaciones terapéuticas principalmente se usan ligandos agonistas de estos receptores, marcados de forma radioactiva para el diagnóstico mediante la llamada escintilografía de receptores para la detección *in vivo* y la localización de tumores. Aquí se aprovecha el mecanismo de la endocitosis, mediado por los receptores, por ejemplo, mediante el receptor de somatostatina, que es expresado de forma aumentada en tumores neuroendócrinos. El análogo de somatostatina ¹¹¹In-DTPA-pentetreótido (Octreoscan®) está autorizado clínicamente para el diagnóstico escintilográfico de rutina;

Bibliografía: J. **Steroid Biochem. Mol. Biol.** 37, 1079-82, 1990. *J. Nucl. Med.* 32, 1184-9, 1991; *J. Nucl. Med.* 33, 652-8, 1992; *Digestion* 3, 54-9, 1994, *J. Clin. Invest.* 93, 1321-5, 1994. *Metabolism* 45, 21-3, 1996.

Otro ensayo consiste en el aprovechamiento del VIP (péptido intestinal vasoactivo) y análogos del VIP que se enlazan al receptor del VIP, marcados de forma radioactiva. El receptor del VIP se expresa de forma aumentada en un amplio espectro de tumores (entre otros, adenocarcinomas).

El documento WO 96/30055 describe reactivos de radiodiagnóstico y radioterapéuticos, especialmente péptidos que se enlazan a receptores del VIP, que están marcados radioactivamente y pueden usarse para el radiodiagnóstico y la radioterapia. Los péptidos marcables con Tc-99m que se enlazan al receptor del VIP están descritos con especial ventaja para la escintilografía.

Otra bibliografía: *Cancer Research* 54, 690-700, 1994; *Endocrinology* 136, 2662-80, 1994, *J. Nucl. Med.* 40, 353-361, 1999.

Todos los ensayos para diagnóstico basados en el receptor de somatostatina y el receptor del VIP descritos son ensayos de radiodiagnóstico (escintilografía con péptidos marcados con ¹²³I, ¹²⁵I, ¹¹¹In o ^{99m}Tc).

Bibliografía: documentos EP 588754, US 5650134; US 5620675; US 5225180; WO 96/23527; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37, 1083-87, 1990; *Lancet* 242-4, 1989, *J. Nucl. Med.* 39, 1913-17, 1998.

Sin embargo, hasta ahora no se conocen péptidos marcados con fluorescencia que están conjugados con colorantes, que posibiliten una detección *in vivo* de tumores mediante fluorescencia (Photochem. Photobiol. 68, 603-632, 1998).

La invención se basa en el objetivo de proporcionar nuevos compuestos que posibiliten un diagnóstico sensible de tumores mediante la detección de fluorescencia, aprovechando un enlace específico de los compuestos a un receptor del tejido meta. Aquí moléculas especiales de colorante que están acoplados a biomoléculas deben proporcionar una señal fluorescente detectable con alta sensibilidad.

Se alcanza el objetivo por la provisión de compuestos que contienen colorantes fluorescentes que están acoplados de manera covalente a péptidos de cadena corta. Estos conjugados poseen una alta afinidad de enlace hacia receptores heptahelicoidales, en particular, el receptor de somatostatina, el receptor del VIP (péptido intestinal vasoactivo) y el receptor de neurotensina y son absorbidos de forma intracelular, dado el caso, por endocitosis mediada por receptores. Por ello, los compuestos conforme a la invención son aptos para el diagnóstico óptico técnicamente sencillo, inocuo de células tumorales y tejidos tumorales que expresan receptores de somatostatina, receptores del VIP o receptores de neurotensina de forma aumentada, en comparación con células sanas. Los compuestos son particularmente apropiados para el diagnóstico por fluorescencia y se pueden usar con especial ventaja para el diagnóstico endoscópico por fluorescencia en órganos huecos, como el esófago, el cuello del útero, el colon y los bronquios, de diferentes tipos de tumores como, por ejemplo, adenocarcinomas, tumores neuroendócrinos o tumores pancreáticos conductuales.

Los colorantes especialmente preferidos se destacan porque cumplen con determinadas exigencias foto-físicas y químicas. Desde el punto de vista foto-físico, los colorantes deben poseer altos coeficientes de absorción y altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, para producir una señal efectiva aún a las más bajas concentraciones de

tejido. Los máximos de absorción deben ser libremente seleccionables, cubriendo un amplio intervalo del espectro. Así, para la detección en capas más profundas de los tejidos (varios centímetros debajo de la superficie) es esencial el intervalo espectral de entre 600 y 900 nm, mientras que para detecciones superficiales alcanzan las longitudes de onda de absorción de 400 a 600 nm. Desde el punto de vista químico, los colorantes deben tener una alta fotoestabilidad y no deben presentar fenómenos de degradación (foto-decoloración) durante el estímulo. Los colorantes deben poder usarse como elemento de construcción en la síntesis en la preparación sintética en fase sólida de los péptidos y, por lo tanto, en condiciones normales de síntesis deben ser estables para garantizar una producción sencilla, ventajosa de conjugados colorante-péptido de estructura definida, con una relación estequiométrica fija entre el colorante y el péptido. Los colorantes de polimetino, en particular, colorantes de cianina, merocianina, oxonol y escuarilio, cumplen mejor con las exigencias.

Son objeto del invento por lo tanto

Conjugados de péptidos y colorantes de polimetina de la fórmula general (I)



en la que

X representa un α -, β - o γ -aminoácido con una configuración D o L, y

m representa un número de 5 a 30,

pudiendo la resultante secuencia de aminoácidos $(X)_m$ ser de naturaleza lineal o estar ciclizada a través de un puente de disulfuro entre dos cisteínas u homocisteínas o por enlaces amídicos entre los extremos terminales de N y C, y representando la secuencia de aminoácidos de la somatostatina o fragmentos, secuencias parciales, derivados o compuestos análogos de la somatostatina,

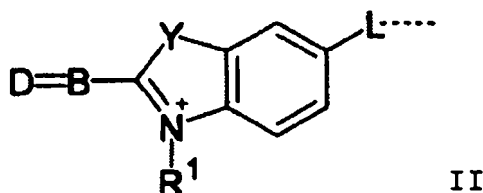
A^1 representa un átomo de hidrógeno, un radical acetilo o un radical alquilo con hasta 10 átomos de C, que eventualmente puede estar sustituido con 1 a 3 grupos carboxi y/o con 1 a 6 grupos hidroxilo, o representa un radical poli(oxi-etileno) con 2 a 30 unidades de $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ o una molécula de colorante tomada de la clase de los colorantes de polimetina, que tiene por lo menos un máximo de absorción situado en el intervalo de 380 a 1.200 nm,

A^2 representa un grupo hidroxilo, un grupo amino o una molécula de colorante tomada de la clase de los colorantes de polimetina, que tiene por lo menos un máximo de absorción situado en el intervalo de 380 a 1.200 nm,

con la condición de que por lo menos uno de los radicales A^1 o A^2 ha de representar una molécula de colorante tomada de la clase de los colorantes de polimetina, que tiene por lo menos un máximo de absorción situado en el intervalo de 380 a 1.200 nm,

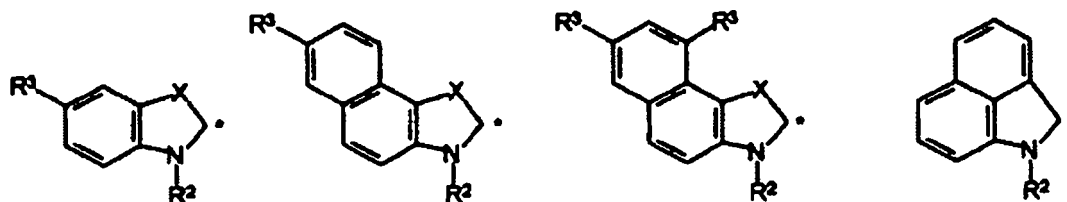
realizándose, en el caso de que A^1 y/o A^2 representen una molécula de colorante tomada de la clase de los colorantes de polimetina, que tiene por lo menos un máximo de absorción situado en el intervalo de 380 a 1.200 nm, que A^1 está unido al grupo amino terminal de N y A^2 está unido a un grupo amino del aminoácido lisina o a un grupo hidroxilo del aminoácido serina en una posición arbitraria dentro de la secuencia de aminoácidos $(X)_m$,

representando la molécula de colorante tomada de la clase de los colorantes de polimetina un colorante de cianina de la fórmula general II



en la que

D representa un fragmento correspondiente a las fórmulas generales III hasta VI, significando la posición caracterizada con un asterisco la unión con B,



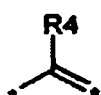
III

IV

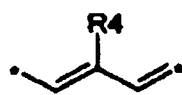
V

VI

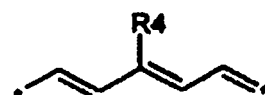
B representa un fragmento correspondiente a las fórmulas generales VII hasta XII



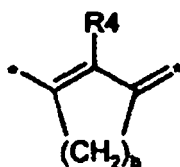
VII



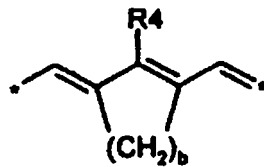
VIII



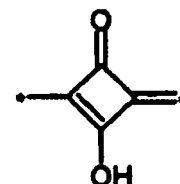
IX



X



XI



XII

R^1 y R^2 representan E^1 , R^3 representa un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo, o un grupo nitro, o representan un radical $-\text{COOE}^1$, $-\text{CONE}^1E^2$, $-\text{NHCOE}^1$, $-\text{NHCONHE}^1$, $-\text{NE}^1E^2$, $-\text{OE}^1$, $-\text{OSO}_3E^1$, $-\text{SO}_3E^1$, $-\text{SO}_2\text{NHE}^1$, $-E^1$,

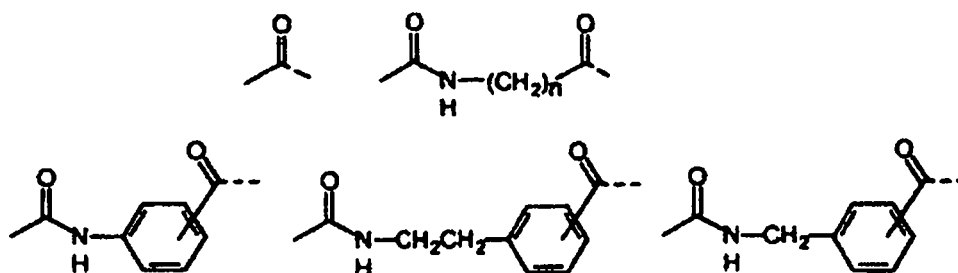
representando E^1 y E^2 independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno, una cadena de sulfoalquilo de C_1 - C_4 , una cadena de alquilo de C_1 - C_{50} saturado o insaturado, ramificado o lineal, pudiendo la cadena, o partes de esta cadena, formar una o varias unidades de C_5 - C_6 cíclicas, o unidades de C_{10} bicíclicas, aromáticas o saturadas, y estando la cadena de alquilo de C_1 - C_{50} interrumpida por 0 a 15 átomos de oxígeno y/o por 0 a 3 grupos carbonilo y/o sustituida con 0 a 5 grupos hidroxilo,

R^4 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo, o una cadena de alquilo de C_1 - C_{10} ramificada o lineal,

b significa un número 2 o 3,

X e Y independientemente uno de otro, significan O, S, Se, $-\text{CH}=\text{CH}-$ o $\text{C}(\text{CH}_3)_2$,

L representa un grupo correspondiente a las siguientes fórmulas



en las que n significa un número de 1 a 10,

y sus sales fisiológicamente compatibles.

Los fragmentos, las secuencias parciales, los derivados o los compuestos análogos de los péptidos mencionados representan, entre otras cosas, secuencias acortadas de aminoácidos, intercambios de aminoácidos individuales o de todos ellos por los correspondientes D-aminoácidos, intercambios de aminoácidos individuales por otros aminoácidos, secuencias invertidas y combinaciones de las mencionadas características.

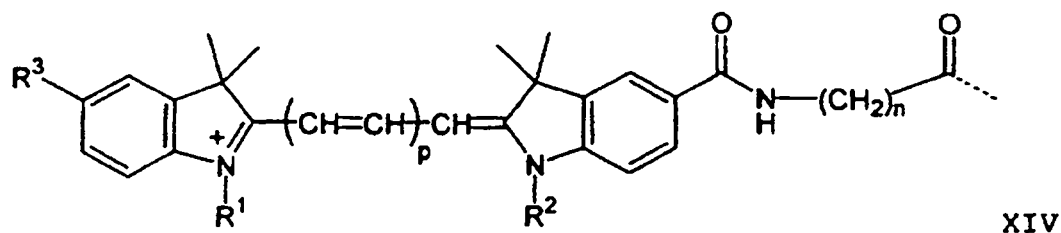
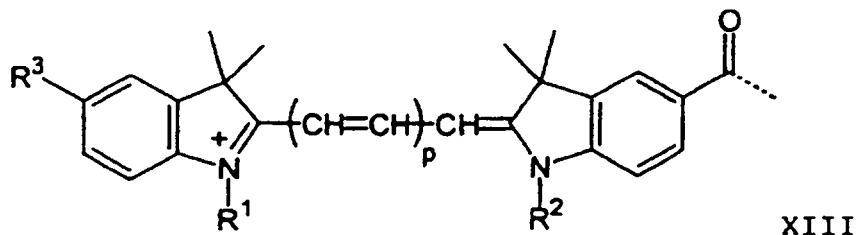
Los fragmentos, las secuencias parciales, los derivados o los compuestos análogos de los péptidos mencionados pueden contener también aminoácidos no naturales, tales como p.ej. naftalanina, ciclohexilalanina, norleucina, norvalina, ácido α -aminoadípico, ácido α -aminobutírico, β -alanina, β -ciclohexilalanina, ornitina, sarcosina o δ -hidroxilisina.

(En las fórmulas arriba mencionadas, la línea continua dibujada a la izquierda en la parte de la molécula representa la unión con el entramado de colorante y la línea interrumpida dibujada a la derecha en la parte de la molécula representa la unión con el péptido).

De la clase de los colorantes de polimetino, los colorantes de cianina, por ejemplo, indocarbo-, indodicarbo- e indotricarbo-cianina, basados en la estructura indólica, son especialmente favorables. Estas estructuras se destacan por una alta estabilidad química y fotoquímica. Mediante síntesis conveniente se pueden obtener derivados que absorben y son fluorescentes en cualquier longitud de onda de entre 400 y 1000 nm, que por sustitución por conectores apropiados y grupos funcionales, preferentemente grupos carboxílicos, pueden acoplarse con péptidos, y que poseen una alta hidrosolubilidad, preferentemente por grupos sulfonato. En contraste con los colorantes de cianina conocidos por la bibliografía, los compuestos usados conforme a la invención poseen sólo un grupo reactivo que posibilita un acoplamiento estequiométrico definido al péptido, en el transcurso de la síntesis del conjugado en la resina.

Por lo tanto, las formas de realización especialmente preferidas de los compuestos conforme a la invención, de fórmula general I, se destacan porque

- la molécula de colorante A¹ y/o A² representa un colorante de indocarbocianina, indodicarbocianina o de indotricarbocianina,
- la molécula de colorante A¹ y/o A² representa un colorante de indocarbocianina, indodicarbocianina o indotricarbocianina de fórmulas generales XIII o XIV



en las que

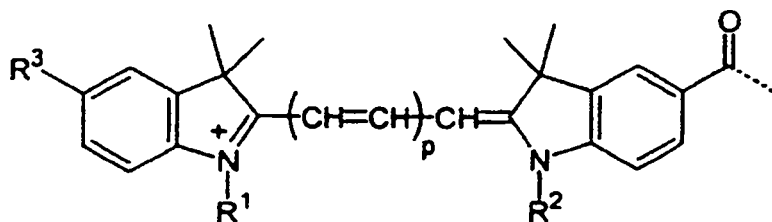
p representa 1, 2 ó 3,

n representa un número de entre 1, 2, 3, 4 ó 10,

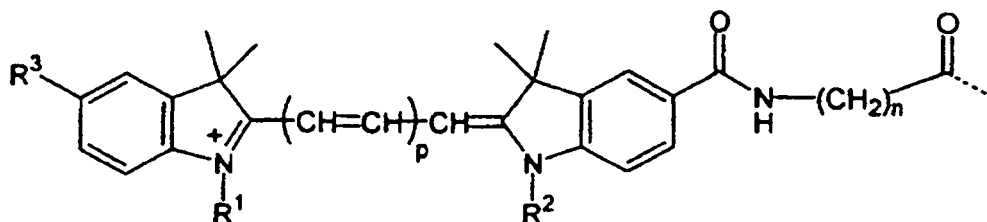
R¹ y R², independientemente entre sí, representan un resto 4-sulfobutilo, 3-sulfopropilo, 2-sulfoetilo, 3-metil-3-sulfopropilo, metilo, etilo o propilo, y

R³ representa hidrógeno, un átomo de cloro, bromo o yodo o un grupo nitro o un resto -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹, representando E¹ y E², independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno, o un resto metilo, etilo, o alquilo C₃-C₆ que está interrumpido por 0 a 2 átomos de oxígeno y/o por 0 a 1 grupo carbonilo y/o está sustituido por 0 a 5 grupos hidroxilo; o un resto poli(oxietilenglicol) con 2 a 30 unidades -CH₂CH₂O-

- la molécula de colorante A¹ y/o A² representa un colorante de indocarbocianina, de indodicarbocianina o de indotricarbocianina de fórmulas generales XIII o XIV



XIII



XIV

en las que

p representa 1, 2 ó 3,

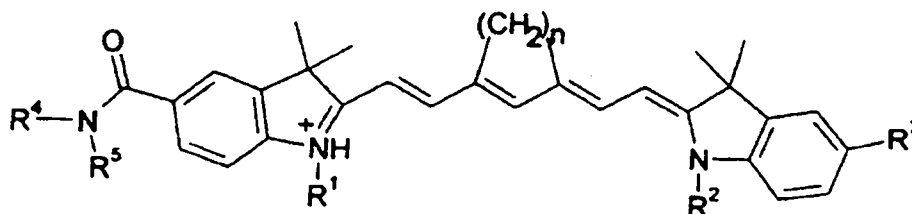
n representa 1, 2 ó 4,

R¹ y R², independientemente entre sí, representan un resto 4-sulfobutilo ó 3-sulfopropilo,

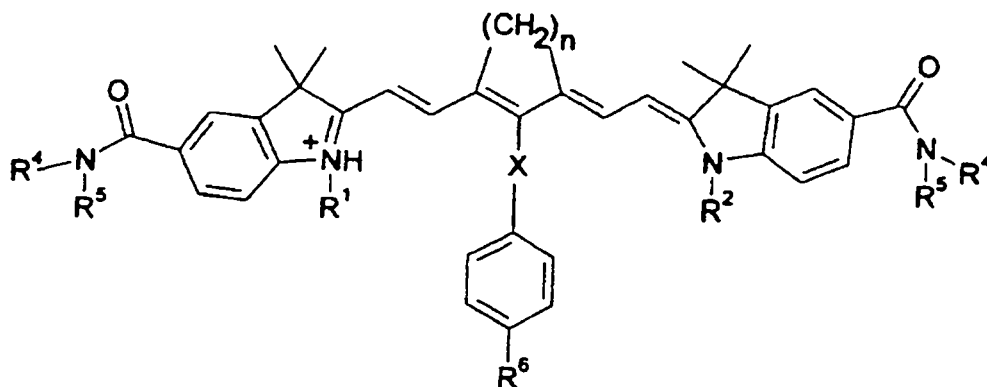
R³ representa hidrógeno o un resto -COOE¹ o -CONHE¹,

significando E¹ un átomo de hidrógeno o un resto metilo, etilo, o alquilo C₃-C₆, que está interrumpido por 0 a 2 átomos de oxígeno y/o por 0 a 1 grupo carbonilo y/o está sustituido por 0 a 5 grupos hidroxilo,

- la molécula de colorante A¹ y/o A² representa un colorante de indotricarbocianina de fórmulas generales XV o XVI:



XV



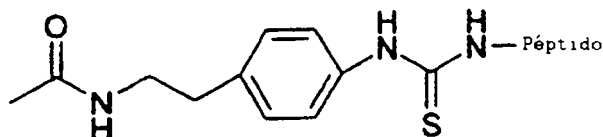
XVI

en las que

n representa 2 ó 3,

R¹ y R², independientemente entre sí, representan un resto 4-sulfobutilo, 3-sulfopropilo o 2-sulfoetilo,

R³ representa un resto -CONH-péptido, -CONH-(CH₂)_m-CONH péptido, -CONH-(CH₂)_n-NH-CS-NH-péptido o -CONH-(CH₂)_n-NHCOCH₂-péptido con m = 1 a 10 y n = 2 ó 3, o el siguiente grupo:



R⁴ y R⁵, independientemente entre sí, representan un átomo de hidrógeno, un resto metilo o un resto alquilo hidroxilado como, por ejemplo, 2-hidroxietilo, 3-hidroxipropilo, 2,3-dihidroxipropilo, 1,3-dihidroxi-2-propilo, 2,3,4-trihidroxibutilo, 1,3,4-trihidroxi-2-butilo, 2,3,4,5,6-pentahidroxihexilo,

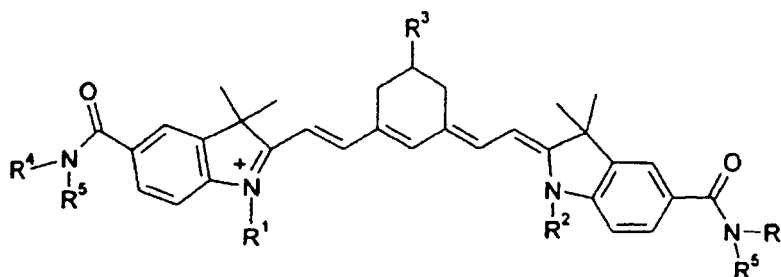
R⁶ representa uno de los siguientes grupos:

-(CH₂)_m-CONH-péptido con m = 0 a 2,

-(CH₂)_m-NH-CS-NH-péptido con m = 0 a 2,

y X representa un átomo de oxígeno o un átomo de azufre;

- la molécula de colorante A¹ y/o A² representa un colorante de indotricarbocianina de fórmula general XVII:

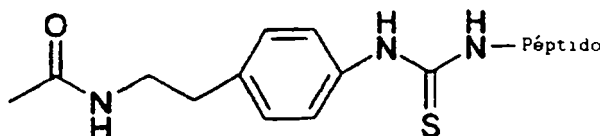


XVII

en la que

R¹ y R², independientemente entre sí, representan un resto 4-sulfobutilo o 3-sulfopropilo,

R³ representa un resto -CONH-péptido, -CONH-(CH₂)_m-CONH-péptido, -CONH-(CH₂)_n-NH-CS-NH-péptido o -CONH-(CH₂)_n-NHCO-CH₂-péptido con m = 1 a 10 y n = 2 ó 3, o representa el siguiente grupo:



y R⁴ y R⁵, independientemente entre sí, representan un átomo de hidrógeno, un resto metilo o un resto alquilo hidroxilado como, por ejemplo, 2-hidroxietilo, 3-hidroxipropilo, 2,3-dihidroxipropilo, 1,3-dihidroxi-2-propilo, 2,3,4-trihidroxibutilo, 1,3,4-trihidroxi-2-butilo, 2,3,4,5,6-pentahidroxihexilo.

La utilización de anticuerpos marcados con colorantes para la detección de tumores es conocida a partir de la bibliografía (J. Cell. Pharmacol. 3, 141-145, 1992; Cancer Immunol. Immunother. 41, 257-63, 1995; Cancer Research 54, 2643-9, 1994, Biotechnol. Prog. 13, 649-658, 1997).

Al contrario de esto, los compuestos conformes al invento contienen como biomoléculas unos péptidos y derivados de péptidos de bajo peso molecular, que tienen las ventajas de los anticuerpos, tales como una alta fijación a estructuras dianas, sin que se restrinja el potencial de diagnóstico por causa de una farmacocinética desfavorable (largos períodos de tiempo de semidescomposición en sangre, efectos secundarios alérgicos (inmunogenicidad)).

Los requisitos biológicos y farmacológicos para las secuencias de péptidos son correspondientemente una suficiente estabilidad en plasma junto con un rápido enriquecimiento y una simultánea eliminación rápida a partir del resto del cuerpo, de manera preferida a través de la segregación renal.

Otro compuestos de la fórmula general I, conformes al invento, especialmente preferidos, se distinguen por los hechos

- de que $(X)_m$ representa la secuencia de aminoácidos de la somatostatina correspondiente a



o representa fragmentos, secuencias parciales, derivados o compuestos análogos de la somatostatina, que se componen de 5 a 20 aminoácidos,

- de que de 2 hasta m aminoácidos, independientemente unos de otros, pueden estar intercambiados por su respectivo D-aminoácido o por otros L- o D-aminoácidos, teniendo m el significado arriba indicado,

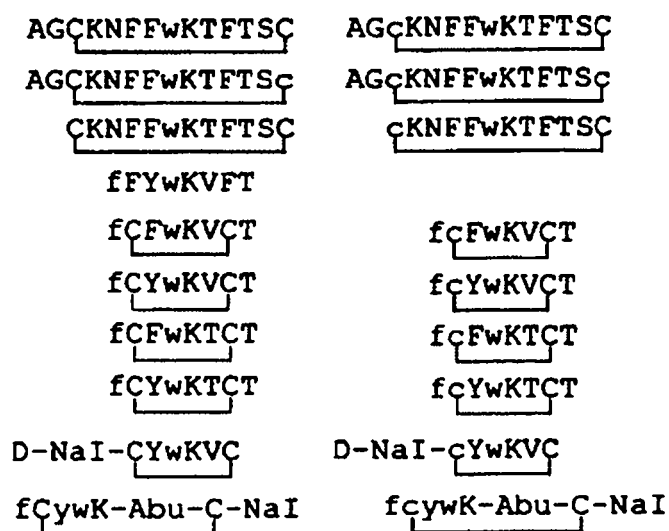
- de que por lo menos uno de los aminoácidos $(X)_m$, independientemente unos de otros, puede estar intercambiado por otros aminoácidos o derivados de aminoácidos no naturales,

- de que por lo menos uno de los aminoácidos $(X)_m$, independientemente unos de otros, puede estar intercambiado por otros aminoácidos o derivados de aminoácidos no naturales,

tales como p.ej. naftalanina, ciclohexilalanina, norleucina, norvalina, ácido α -aminoadípico, ácido α -aminobutírico, β -alanina, β -ciclohexilalanina, ornitina, sarcosina o δ -hidroxilisina,

- de que todos los aminoácidos $(X)_m$ están intercambiados por sus respectivos D-aminoácidos,

- de que como fragmentos, secuencias parciales, derivados o compuestos análogos de la somatostatina, se seleccionan las siguientes secuencias de aminoácidos:



La terminología de la fórmula general I implica la notación usual de las secuencias de aminoácidos. El extremo terminal de N está situado siempre a la izquierda y el extremo terminal de C a la derecha (sin sustituir correspondiendo a $\text{H-(X)}_m\text{-OH}$ o, en el caso de una amida, $\text{H-(X)}_m\text{-NH}_2$). Las abreviaturas de una sola letra de los aminoácidos, que se utilizan, se pueden consultar en la obra de M. Bodanszky, Peptide chemistry - A practical textbook, 2ª edición, editorial Springer Heidelberg 1993, página 3. Las letras mayúsculas significan aminoácidos con una configuración L (aminoácidos naturales), las letras minúsculas significan D-aminoácidos, los puentes de disulfuro (péptidos cíclicos) son caracterizados por guiones de unión entre las correspondientes letras (C = cisteína u homocisteína). Como

retrosintéticas se designa a unas secuencias, en las cuales, en la síntesis, está invertido el orden de sucesión de los aminoácidos en comparación con una secuencia natural dada, es decir que se comienza la síntesis con el aminoácido originalmente N-terminal y se produce la secuencia hasta el aminoácido originalmente C-terminal.

5 Las sustancias conforme a la invención tienen diversas ventajas frente a sustancias marcadas de forma radioactiva. Los colorantes fluorescentes pueden ser estimulados para emitir fluorescencia con la frecuencia que se desee. No existe una señal continua que fundamente una desintegración con un período de semidesintegración correspondiente. Por lo tanto, se puede elegir el momento del diagnóstico cuando se desee y se puede repetir tantas veces como sea necesario y no está limitado por el período de semidesintegración de un isótopo. El paciente no está expuesto a ninguna
10 radiación ionizante, la radiación de luz usada es inocua en las dosis aplicadas. La técnica de detección óptica permite una detección altamente sensible de pocos fotones y por ello en cuanto a la sensibilidad es comparable con el radio-diagnóstico.

Se ha descrito un procedimiento para el diagnóstico mediante radiación infrarroja cercana (radiación NIR) usando
15 conjugados de biomoléculas de colorante (documento WO 96/17628). Demostró ser especialmente ventajoso, en el caso de la presente invención, que se puedan preparar los conjugados de péptidos con buen rendimiento y alta pureza mediante el procedimiento de la síntesis automatizada en fase sólida. Sorprendentemente se halló que se pueden usar diversos compuestos de indocianina que portan grupos carboxilo, como análogos de aminoácidos y se pueden acoplar tanto en forma N-terminal, como también a un grupo amino de la lisina en la fase sólida (resina). Después de separar
20 de la resina y de la purificación cromatográfica se obtuvieron conjugados de colorante-péptido con purezas > 95%.

El problema esencial del uso de la luz para el estímulo que produce fluorescencia es la profundidad limitada de penetración de la luz, que en el visible se encuentra en el intervalo submilimétrico pero en el NIR puede ascender a centímetros. En cuanto a la profundidad de penetración carecen de problemas los procedimientos de detección en las
25 enfermedades superficiales de los tejidos, así como de los tejidos blandos. Por lo tanto, son objeto de la invención procedimientos mamográficos, procedimientos endoscópicos, e intraoperativos en los que con el uso de los compuestos conforme a la invención se pueden diagnosticar ámbitos de tejidos enfermos por detección de la fluorescencia o la radiación no absorbida. Un objeto especial de la invención es el uso de los compuestos conforme a la invención, en procedimientos endoscópicos, por ejemplo, coloscopia, broncoscopia, endoscopia del esófago, con las que se
30 diagnostican alteraciones de tejidos cercanos a la superficie. El uso de luz blanca con evaluación visual directa está ampliamente difundido en el diagnóstico endoscópico. Los compuestos conforme a la invención contribuyen a una decisiva mejora del procedimiento por la emisión de una señal específica del tejido, especialmente en el diagnóstico temprano de alteraciones de tejidos, no detectables de forma visual (por ejemplo, displasias del colon).

35 Se halló que después de pulverizar compuestos conforme a la invención acoplados con colorantes en el intestino de ratas con displasias y carcinomas de colon químicamente inducidos, y subsiguiente enjuague y la realización de un diagnóstico endoscópico por fluorescencia (estímulo a 740 nm, detección por encima de los 760 nm) se pudieron detectar ámbitos de tejidos con fluorescencia aumentada en el colon.

40 Por ello, también es objeto de la invención un procedimiento para el diagnóstico endoscópico por fluorescencia, especialmente del tracto gastrointestinal, usando los compuestos conforme a la invención. Aquí se hace llegar al tejido una o varias sustancias, preferentemente por vía endovenosa, o tópica por pulverización y se irradia con luz del intervalo espectral correspondiente para el estímulo electrónico del colorante usado. Se registra la radiación fluorescente reflejada o emitida por el colorante. Son de preferencia los procedimientos en los que se radian superficies amplias
45 del tejido y la radiación fluorescente generada de forma local se representa mediante la fotografía con una cámara CCD o se reticulan las áreas de tejido que se han de representar, mediante un conductor de luz y se convierten las señales obtenidas en una imagen sintética mediante cálculo. La fluorescencia puede ser detectada y evaluada de forma espectral y/o de forma selectiva de fases, así como estacionaria y/o resuelta en tiempo. Las imágenes fluorescentes obtenidas pueden producirse simultáneamente con imágenes de luz blanca y para la evaluación de datos se pueden
50 representar superpuestas con una figura.

La síntesis de los compuestos conforme a la invención se efectúa según procedimientos conocidos de la bibliografía. Los péptidos se preparan por síntesis en fase sólida, en resinas poliméricas. Los detalles son conocidos para el experto.

55 Bibliografía: Peptide chemistry - A practical textbook (M. Bodanszky), 2ª edición, Editorial Springer Heidelberg 1993; *Anti-Cancer Drug Design* 12, 145-167, 1997; *J. Am. Chem. Soc.* 117, 11821-2, 1995.

Los colorantes se preparan de forma separada y en el transcurso de la preparación por síntesis en fase sólida de
60 los péptidos son acoplados a éstos y se obtienen los compuestos conforme a la invención de alta pureza, después del desprendimiento de la resina y purificación. Se prefieren aquellos colorantes que contienen grupos carboxilo, que después de la activación con reactivos usuales, son acoplados a grupos amino del péptido, especialmente el grupo ϵ -amino de la lisina o el grupo amino N-terminal del péptido. Además, se prefieren colorantes con restos halogenoalquilo o halogenoacetilo que se acoplan con grupos tiol del péptido, especialmente del aminoácido cisteína u homocisteína.

65 Bibliografía para la síntesis de colorantes de polimetino: *Bioconjugate Chem.* 4, 105-111, 1993; *Bioconjugate Chem.* 7, 356-62, 1996; *Bioconjugate Chem.* 8, 751-56, 1997; *Cytometry* 10, 11-19, 1989 y 11, 418-30, 1990; *J. Heterocycl. Chem.* 33, 1871-6, 1996; *J. Org. Chem.* 60, 2391-5, 1995; *Dyes and Pigments* 17, 19-27, 1991, *Dyes*

and Pigments 21, 227-34, 1993; J. Fluoresc. 3, 153-155, 1993; Anal. Biochem. 217, 197-204, 1994; documentos US 4981977; US 5688966; US 5808044; WO 97/42976; WO 97/42978; WO 98/22146; WO 98/26077; EP 0800831.

La ventaja de un solo grupo activable como, por ejemplo, un grupo carboxilo o un grupo ya activado como, por ejemplo, un isotiocianato, un grupo halogenoalquilo o un grupo halogenoacetilo, consiste en que puede realizarse un acoplamiento químicamente unitario. El grupo halogenoacetilo además tiene la especial ventaja de que se realiza un acoplamiento químicamente unitario al grupo mercapto de la cisteína o de la homocisteína. Este acoplamiento puede efectuarse en solución con el péptido no ligado y exento de grupos protectores. Por los grupos activados es posible un acoplamiento a péptidos sin que se produzcan reacciones secundarias. Para aumentar la hidrosolubilidad, los conjugados de péptido-colorante presentan un número aumentado de grupos hidroxilo en el colorante. Por la posición del conector en el sistema indólico del colorante adicionalmente se puede generar una hidrofilia suficiente mediante restos que contienen sulfonato, en los átomos de nitrógeno de sistema indólico. De esta manera puede efectuarse una reacción de acoplamiento estructuralmente unitaria con los péptidos (véanse los ejemplos 4 a 12, 28 a 32 y 44 a 49).

Un objeto adicional del invento es un agente de diagnóstico óptico para el diagnóstico *in vivo* de zonas enfermas de tejidos, el cual se distingue por el hecho de que contiene por lo menos un compuesto de la fórmula general I en común con las sustancias auxiliares y/o de vehículo, así como los agentes diluyentes, que son usuales.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención:

Ejemplos 1 a 3

Síntesis de los colorantes de indocianina 1-3 para el acoplamiento en síntesis de fase sólida a grupos amino (N-terminal o ϵ -lisina) de los péptidos

La síntesis generalmente se efectúa a partir de 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indolenina y 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-5-carboxi-3*H*-indolenina (Cytometry 10, 11-19, 1989; Talanta 39, 505-510, 1992).

Ejemplo 1

Síntesis de sal sódica de ácido 1,1'-bis(4-sulfobutil)indocarbocianin-5-carboxílico (1)

Se coloca 0,8 g (4,0 mmol) de N,N-difenilformamidina en 15 ml de anhídrido acético y a temperatura ambiente se adiciona 1,4 g (4,2 mmol) de 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-5-carboxi-3*H*-indolenina en porciones, se agita durante 30 min a 120°C y luego se enfría en un baño de agua hasta temperatura ambiente. A continuación, se adicionan 1,2 g (4,1 mmol) de 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indolenina, 3,2 g (14,6 mmol) de acetato de sodio anhidro, 15 ml de anhídrido acético y 6 ml de ácido acético. Se calienta la mezcla de reacción durante 1 h a 120°C, se enfría la solución de color rojo profundo y se adicionan 100 ml de éter. Se separa por filtración la sustancia sólida precipitada. Se efectúa una purificación cromatográfica en gel de sílice RP EUROPREP 60-30 C18, 60A, 20-45 m (Eluyente; agua/MeOH, gradiente en etapas de 0% hasta 70% de MeOH). Se libran del metanol las fracciones que contienen producto, en el evaporador rotativo, y a continuación se liofiliza. Rendimiento: 1,5 g (58%) de liofilizado rojo.

Ejemplo 2

Síntesis de la sal sódica de ácido 1,1'-bis(4-sulfobutil)indodicarbocianin-5-carboxílico (2)

Se agitan 1,2 g (4,1 mmol) de 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indolenina y 1,0 g (3,9 mmol) de clorhidrato de malonaldehído-bis-fenilimina en 15 ml de anhídrido acético durante 30 min a 120°C y luego se enfría hasta temperatura ambiente en un baño de agua. A continuación, se adicionan uno tras otro 1,4 g (4,2 mmol) de 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-5-carboxi-3*H*-indolenina, 1,2 g (14,6 mmol) de acetato de sodio anhidro, 15 ml de anhídrido acético y 6 ml de ácido acético. Se calienta la mezcla de reacción durante 1 h a 120°C, se enfría la solución, que ahora es azul, y se adicionan 100 ml de éter. El tratamiento y la purificación se efectúan como está descrito en el ejemplo 1. Rendimiento: 1,8 g (66%) de liofilizado azul.

Ejemplo 3

Síntesis de la sal sódica de ácido 1,1'-bis(4-sulfobutil)indotricarbocianin-5-carboxílico (3)

Se agitan 1,2 g (4,1 mmol) de 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-3*H*-indolenina y 1,1 g (3,9 mmol) de clorhidrato de glutaconaldehídidoanilo durante 30 min a 120°C en 15 ml de anhídrido acético y luego se enfría hasta temperatura ambiente en un baño de agua. A continuación, se adicionan 1,4 g (4,2 mmol) de 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil-5-carboxi-3*H*-indolenina, 1,2 g (14,6 mmol) de acetato de sodio anhidro, 15 ml de anhídrido acético y 6 ml de ácido acético. Se calienta la mezcla de reacción durante 1 h a 120°C, se enfría la solución, que ahora es azul, y se adicionan 100 ml de éter. El tratamiento y la purificación se efectúan como está descrito en el ejemplo 1. Rendimiento: 1,8 g (60%) de liofilizado azul.

ES 2 321 586 T3

Ejemplos 4 a 6

Síntesis de los colorantes de indocianina 4-6 a partir de 1-3, para el acoplamiento por síntesis en fase sólida a grupos amino (N-terminal o ϵ -lisina) de los péptidos

La síntesis se efectúa por amidación de los colorantes 1-3 con éster terbutílico de β -alanina y separación por ácidos, del grupo éster terbutílico.

A una solución de 0,5 mmol del colorante 1-3 y 0,1 g (1,0 mmol) de trietilamina en 20 ml de dimetilformamida se adiciona a 0°C 0,5 mmol de TBTU (tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) en 10 ml de dimetilformamida y se agita durante 15 min a 0°C. A continuación, se adiciona por goteo una solución de 0,11 g (0,6 mmol) de clorhidrato de éster terbutílico de β -alanina y 0,6 mmol de trietilamina en 5 ml de dimetilformamida y se agita la mezcla de reacción durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la adición de 100 ml de éter dietílico se separa mediante filtración la sustancia sólida precipitada, se disuelve en 20 ml de diclorometano, se adicionan 10 ml de ácido trifluoroacético y se agita durante 24 h a temperatura ambiente. Se concentra la mezcla al vacío y se purifica el residuo por cromatografía y se liofiliza, como está descrito en el ejemplo 1. Rendimientos: 0,21 g (58%) de 4, 0,29 g (76%) de 5, 0,28 g (72%) de 6.

Ejemplos 7 a 9

Síntesis de los colorantes de indocianina 7-9 a partir de 1-3, para el acoplamiento por síntesis en fase sólida, a grupos amino (N-terminal o ϵ -lisina) de los péptidos

Se efectúa la preparación de manera análoga a los ejemplos 4-6, usando 0,1 g (0,6 mmol) de clorhidrato de éster terbutílico de glicina. Rendimientos: 0,25 g (68%) de 4, 0,30 g (80%) de 5, 0,32 g (83%) de 6.

Ejemplos 10 a 12

Síntesis de los colorantes de indocianina 10-12 a partir de 1-3, para el acoplamiento por síntesis en fase sólida a péptidos por acoplamiento a grupos tiol de cisteína

Se efectúa la síntesis por amidación de los colorantes 1-3 con 3-aminopropanol y subsiguiente transformación del grupo alcohólico en un bromuro.

A una solución de 0,5 mmol del colorante 1-3 y 0,1 g (1,0 mmol) de trietilamina en 20 ml de dimetilformamida se adiciona 0,5 mmol de TBTU en 10 ml de dimetilformamida a 0°C y se agita durante 15 min a 0°C. A continuación, se adiciona por goteo una solución de 850 mg (1,2 mmol) de 3-aminopropanol y 1,2 mmol de trietilamina en 5 ml de dimetilformamida y se agita la mezcla de reacción durante 6 h a temperatura ambiente. Después de adicionar 100 ml de éter dietílico se separa por filtración la sustancia sólida precipitada y se purifica cromatográficamente y se liofiliza, como está descrito en el ejemplo 1.

La reacción para formar los bromuros 10-12 se efectúa por agitación con 0,3 mmol de los productos intermedios con 55 mg (0,5 mmol) de N-bromosuccinimida y 130 mg (0,5 mmol) de trifenilfosfina en una mezcla de 4 ml de diclorometano y 4 ml de dimetilformamida, durante 48 h a 4°C. Por adición de 3 ml de éter se precipitan los productos, se separan por filtración y se usan como productos brutos en el acoplamiento con péptidos.

Ejemplos 28 a 32

Síntesis en resina de conjugados de péptidos que están compuestos por péptidos que se enlazan al receptor de somatostatina y los colorantes 1-9 y 13

Instrucción general

Las síntesis fueron llevadas a cabo en 500 mg de resina TCP-Thr(But)-fmoc (Empresa Pepchem Tübingen) con una carga de 0,49 mmol/g. Se sintetiza el péptido paso por paso usando los siguientes grupos protectores temporarios: terbutilo para Thr y Ser, tritilo para Cys y Asp, Boc para Trp y Lys. Como reactivo de condensación se usa HBTU.

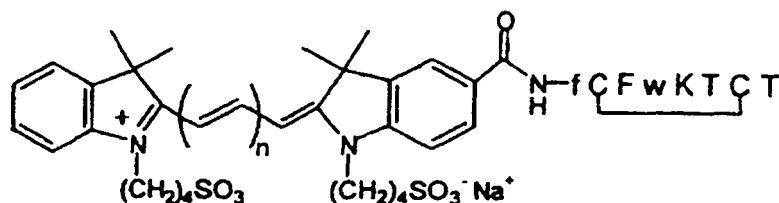
Después de desprender el grupo protector N-terminal Fmoc se condensa el colorante 1-9, 13 en un paso de síntesis separado. Para esto se suspenden 255 mg de resina en aproximadamente 2 ml de DMF y se adicionan 0,5 mmol de colorante, 0,5 mmol de HBTU y 0,17 ml de DIEA. Se agita durante 18 h a temperatura ambiente, se separa la resina filtrando por succión, se lava con diclorometano y se seca. Se efectuó el desprendimiento del conjugado colorante-péptido de la resina con ácido trifluoroacético al 95% con la adición de triisopropilsilano con liofilización subsiguiente a partir de ácido acético al 10%. Se cicla el producto bruto mediante carbón activado y se purifica cromatográficamente (50x300 mm VYDAC RP-18, gradiente: agua/acetonitrilo).

Las estructuras de los conjugados de colorante-péptido sintetizados están resumidas en la siguiente sinopsis:

Conjugados de colorantes con péptidos que se enlazan con receptores de somatostatina

Ejemplos 28 a 30

Conjugado de colorante 1-3 con pentetreótido



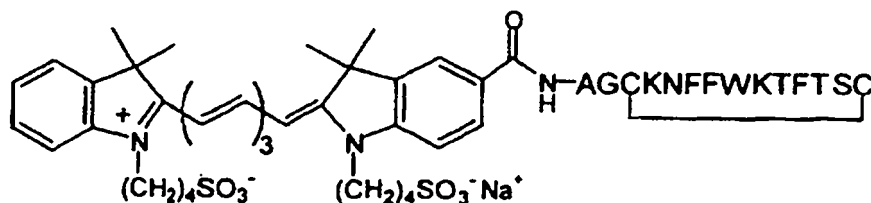
n = 1: indocarbocianina-pentetreótido 28

n = 2: indodicarbocianina-pentetreótido 29

n = 3: indotricarbocianina-pentetreótido 30

Ejemplo 31

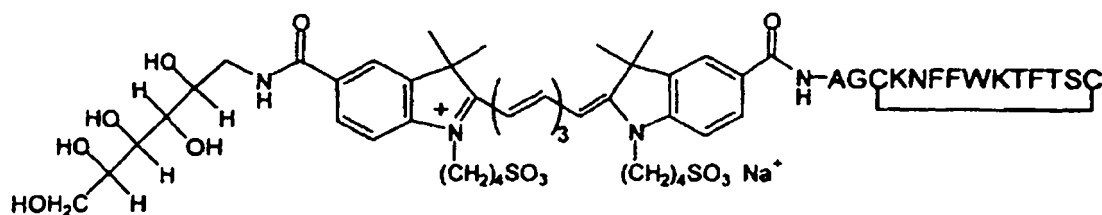
Conjugado del colorante 3 con somatostatina-14



Conjugado indotricarbocianina-somatostatina-14 31

Ejemplo 32

Conjugado del colorante 13 con somatostatina-14



Conjugado ácido indotricarbocianina-5-carboxílico-glucamida-somatostatina-14 32

Ejemplo 39

Propiedades de absorción y fluorescencia de los conjugados colorante-péptido sintetizados

Se determinaron máximos de absorción y coeficientes de extinción en PBS (solución salina tamponada por fosfatos) y en plasma bovino (Perkin Elmer Lambda 2). Se obtuvieron espectros de emisión de fluorescencia en PBS por estímulo en el lado de onda corta (aproximadamente a 40 nm del máximo de absorción) (SPEX Fluorolog, R928 PMT).

Ejemplo 40

Determinación de la absorción celular mediante microscopía fluorescente

Se examinaron el enlace y la absorción *in vitro* de compuestos conforme a la invención en células tumorales humanas, que expresan receptores para el péptido vasoactivo intestinal y/o somatostatina y/o neurotensina. Para ello se incubaron 5×10^5 células tumorales en 1,5 ml de medio que contenía la sustancia en ensayo. Se usaron diversas concentraciones de las sustancias (10 nM-10 μ M) y se varió la duración de la incubación (1 min-24 h). Después de la incubación se fijaron las células y se hicieron preparados microscópicos. Se efectuó la evaluación mediante un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 135 que estaba provisto de un juego de filtros Cy7 (Exciter (estimulante) HQ 710/70 nm, Emitter (emisor) 810/90 nm, Beamsplitter (divisor de haz) 750 nm LP) Cy5 (Exciter 575-625 nm, Emitter 660-710 nm BP, Beamsplitter 645 nm) y Cy3 (Exciter 546/12 nm, Emitter 590 nm LP, Beamsplitter 580 nm). De todos los preparados se hicieron fotografías con luz blanca y con fluorescencia, con una cámara CCD (Visitron RTE/CCD-576) y se guardaron de forma digital.

Ejemplo 42

Examen de la estabilidad de conjugados colorante-péptido en plasma bovino

Se examinó *in vitro* la estabilidad química de los compuestos conforme a la invención en plasma dependiendo del tiempo, mediante HPLC. Para ello se pipetearon soluciones 1 mmolares (1 mM) de los péptidos en PBS al plasma sanguíneo bovino (empresa Graeber, congelado, para análisis de heparina), obteniéndose una concentración 30 μ M y se incubaron las soluciones a 37°C.

Se efectuó el tratamiento de las muestras en distintos momentos (0,5; 1; 2; 4; 6; 24 h), adicionando 1 ml de MeOH a 1 ml de la solución en plasma y se separan por centrifugación las proteínas precipitadas.

El análisis del sobrenadante fue efectuado mediante HPLC por determinación del contenido a 750 nm, respecto al contenido después de 1 min de incubación a 0°C (control).

HPLC: Beckmann, Diodenarraydetektor TIDAS (empresa J&M) 350-1000 nm;

Columna: Chromasil 5 μ , 250 mm x 4,5 mm

Eluyente: A: H₂O al 90%(+ 0,5% de TFA)/MeOH al 10%

B: H₂O al 10% (+ 0,5% de TFA)/MeOH al 90%

Gradiente: de B al 10% hasta B al 100% en el transcurso de 20 min

Bibliografía para la síntesis puntual:

1. **Frank, R.**, (1992) Spot synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48, 9217-9232

2. **Kramer, A., Schneider-Mergener, J.** (1998) Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. *Methods in Molecular Biology* 87, 25-39

3. **Volkmer-Engert, R., Hoffmann, B., Schneider-Mergener, J.** (1997) *Tetrahedron Lett.* 38, 1029-1032

4. **Licha, K., Bhargava, S., Rheinländer, C., Becker, A., Schneider-Mergener, J., Volkmer-Engert, R.** (en prensa) Highly parallel Nano-synthesis of cleavable peptide-dye conjugates on cellulose membranes, *Tetrahedron Lett.*

Ejemplo 44

a) 5-N-(2,3-dihidroxipropil)aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina

Se colocan 0,9 g (2,6 mmol) de 5-carboxi-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina (Anal. Biochem. 217.197, 1994) en 30 ml de N,N-dimetilformamida absoluta y 3 ml de piridina y se adiciona 1,35 g (5,3 mmol) de carbonato de disuccinimido. Después de tres horas, se adiciona 0,965 g (10,6 mmol) de 2,3-dihidroxipropilamina. Se agita durante la noche a temperatura ambiente, se evapora la preparación hasta sequedad y se agita el residuo con éter dietílico. Se separa la sustancia sólida filtrando por succión y para purificar se cromatografía en material RP.

Rendimiento: 0,82 g (76% del teórico).

ES 2 321 586 T3

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

Calculado:	C 55,32	H 6,84	N 6,79	S 7,77	O 23,27
Hallado:	C 55,39	H 6,95	N 6,57	S 7,58	

b) 4-{2-[4-cloro-7-[5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]}-5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

Se hierve a reflujo una solución de 360 mg (1 mmol) de cloruro de N-[5-anilino-3-cloro-2,4-(propano-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-iliden]anilinio, 825 mg (2 mmol) de 5-H-(2,3-dihidroxiopropil)aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina (ejemplo 44a) y 330 mg (4 mmol) de acetato de sodio anhidro en 30 ml de etanol durante dos horas bajo argón. A continuación se elimina el etanol por destilación y se purifica el residuo mediante cromatografía.

Rendimiento: 0,58 g (59% del teórico)

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

Calculado:	C 56,27	H 6,15	Cl 3,60	N 6,79	S 7,77	O 23,27	Na 2,34
Hallado:	C 55,99	H 6,30	Cl 3,41	N 6,87	S 7,64		Na 2,17

c) Éster N-hidroxisuccinimídico de 4-[2-[4-[4-(2-carboxietil)feniloxi]-7-[5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

Se disuelven 225 mg (1,4 mmol) de ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónico en 10 ml de N,N-dimetilformamida seca bajo gas protector y se adicionan 65 mg (2,7 mmol) de hidruro de sodio (al 60% en aceite). Después de 30 minutos se adicionan 138 mg (0,14 mmol) de 4-[2-[4-cloro-7-[5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio (ejemplo 44b) y se agita durante otros 30 minutos. A continuación se inactiva la mezcla de reacción con hielo seco y se evapora hasta sequedad. Se purifica el residuo mediante una HPLC preparativa. Para la preparación del éster activo se disuelven 14 mg (120 μ mol) de N-hidroxisuccinimida y 2 mg (2,4 μ mol) de ácido carboxílico en 200 μ l de N,N-dimetilformamida. Después de diez minutos se adicionan 24 mg (120 μ mol) de dicitclohexilcarbodiimida y se agita durante la noche a temperatura ambiente. El éster activo se usa sin otra purificación en la próxima etapa.

d) 4-[2-[4-(4-(2-isotiocianatoetil)feniloxi)-7-(5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden)-3,5-(propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

A una suspensión de 28 mg (0,6 mmol) de hidruro de sodio (al 60% en aceite) en 4 ml de N,N-dimetilformamida exenta de agua a 0°C se adicionan 116 mg (0,6 mmol) de 2-(4-hidroxifenil)etilisotiocianato en 2 ml de N,N-dimetilformamida. Después de 30 minutos se adiciona la solución así preparada a 138 mg (0,14 mmol) de 4-[2-[4-cloro-7-[5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio (ejemplo 44b). Se agita durante la noche a temperatura ambiente y a continuación se inactiva con hielo seco. Se evapora hasta sequedad en el evaporador rotativo y se purifica el residuo mediante HPLC preparativa.

Rendimiento: 85 mg (54% del teórico)

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

Calculado:	C 58,65	H 6,09	N 6,22	S 8,54	O 18,47	Na 2,04
Hallado:	C 58,53	H 6,17	N 6,11	S 8,63		Na 1,83

De manera análoga se pueden sintetizar otros colorante hidrófilos simétricos a partir de los siguientes elementos de construcción:

Derivados hidrófilos de indolenina con sustituyentes hidroxialquilo: (preparados según el ejemplo 44 a)

a) 5-N-(2,3-dihidroxiopropil)-N-metilaminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina

ES 2 321 586 T3

- b) 5-N-(hidroxietil)-aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- c) 5-N-(2,3-dihidroxiopropil)-N-(hidroxietil)-aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- d) 5-N,N-(bis-hidroxietil)-aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- e) 5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)-aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- f) 5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)-N-metilaminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina

Ejemplo 45

a) 5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina

Se coloca 0,6 g (1,8 mmol) de 5-carboxi-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina (Anal. Biochem. 217.197, 1994) en 20 ml de N,N-dimetilformamida absoluta y 2 ml de piridina y se adiciona 0,95 g (3,6 mmol) de carbonato de disuccinimido. Después de dos horas se adiciona 1,4 ml (10 mmol) de trietilamina y 322 mg (1,8 mmol) de glucamina. Se agita durante la noche a temperatura ambiente, se evapora la preparación hasta sequedad y se agita el residuo con éter dietílico. Se separa la sustancia sólida filtrando por succión y para purificar se cromatografía en material RP.

Rendimiento: 0,67 g (74% del teórico)

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

Calculado:	C 52,58	H 6,82	N 5,57	S 6,38	O 28,65
Hallado:	C 52,47	H 6,91	N 5,39	S 6,44	

b) 4-[2-[4-cloro-7-[5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)-aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-(N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)aminocarbonil)(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

Se hierve a reflujo una solución de 180 mg (0,5 mmol) de cloruro de N-(5-anilino-3-cloro-2,4-(propano-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-iliden)anilino, 503 mg (1 mmol) de 5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina (ejemplo 45 a) y 165 mg (2 mmol) de acetato de sodio anhidro en 10 ml de etanol, durante dos horas bajo argón. A continuación, se elimina el etanol mediante destilación y se purifica el residuo mediante cromatografía.

Rendimiento: 0,31 g (53% del teórico)

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente).

Calculado:	C 54,05	H 6,33	Cl 3,01	N 4,76	S 5,44	O 24,45	Na 1,95
Hallado:	C 53,89	H 6,20	Cl 2,87	N 4,83	S 5,29		Na 1,72

c) 4-[2-[4-(4-isotiocianatofenilo)-7-(5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-(N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)aminocarbonil)(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

Se disuelven 54 mg (0,4 mmol) de 4-aminotiofenol en 10 ml de N,N-dimetilformamida absoluta en atmósfera de argón y a temperatura ambiente se adicionan 165 mg (0,4 mmol) de 4-(2-[4-cloro-7-[5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-[N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)aminocarbonil](3H)indolio]butanosulfonato de sodio (ejemplo 45b). Después de 10 minutos se inactiva la mezcla de reacción con hielo seco y se adicionan 210 mg (1 mmol) de tiocarbonildiimidazol. Después de 45 minutos se precipita el colorante con éter dietílico y se aísla la sustancia sólida mediante centrifugación. Para purificar se puede cromatografiar en material RP.

Rendimiento: 78 mg (43% del teórico)

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

Calculado:	C 55,07	H 6,01	N 5,35	S 9,80	O 22,01	Na 1,76
Hallado:	C 54,89	H 6,20	N 5,24	S 9,58		Na 1,54

ES 2 321 586 T3

De manera análoga se pueden sintetizar otros colorantes hidrófilos simétricos a partir de los siguientes elementos de construcción:

Derivados hidrófilos de indolenina con sustituyentes hidroxialquilo: (preparados según el ejemplo 44 a)

- a) 5-N-(2,3-dihidroxiopropil)-N-metilaminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- b) 5-N-(hidroxietil)aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- c) 5-N-(2,3-dihidroxiopropil)-N-(hidroxietil)-aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- d) 5-N,N-(bis-hidroxietil)-aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- e) 5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)-aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- f) 5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)-N-metilaminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina

Ejemplo 46

7-[5-N-(2,3-dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-carboxi(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

Se agita una solución de 2,35 g (5,71 mmol) de 5-N-(2,3-dihidroxiopropil)aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina (ejemplo 44 a) y 1,57 g (5,5 mmol) de clorhidrato de glutacetaldehidodanilida en 25 ml de anhídrido acético durante 30 minutos a 120°C. A continuación, se adicionan 2,4 g (7,1 mmol) de 5-carboxi-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina, 1,71 g de acetato de sodio, 22 ml de anhídrido acético y 8,6 ml de ácido acético. Se hace agitar la mezcla de reacción durante una hora a 120°C, se enfría hasta temperatura ambiente y se precipita el producto con éter dietílico. Se cromatografía el producto bruto en material RP.

Rendimiento: 1,9 g (40% del teórico)

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

Calculado:	C 54,47	H 6,03	N 5,03	S 7,67	O 21,05	Na 2,75
Hallado:	C 54,26	H 6,12	N 5,00	S 7,49		Na 2,48

Análogamente a la síntesis según los ejemplos 14-16 y 18-27 a (síntesis de péptidos en fase sólida) se sintetiza el análogo del VIP HSDAVFTDNY TRLRKKMAVK KYLNSILN en fase sólida. Se acopla el colorante 7-[5-N-(2,3-dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-carboxi(3H)indolio]butanosulfonato de sodio al péptido en forma N-terminal, según los ejemplos 14-16 y 18-27b (acoplamiento de colorante) y se aísla y se purifica mediante HPLC, según los ejemplos 14-16 y 18-27c (separación de los grupos protectores y desprendimiento de los conjugados colorante-péptido).

De manera análoga se pueden sintetizar otros colorantes hidrófilos asimétricos a partir de los siguientes elementos de construcción:

Derivados hidrófilos de indolenina con sustituyentes de hidroxialquilo: (preparados según el ejemplo 44 a)

- a) 5-N-(2,3-dihidroxiopropil)-N-metilaminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- b) 5-N-(hidroxietil)-aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- c) 5-N-(2,3-dihidroxiopropil)-N-(hidroxietil)-aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- d) 5-N,N-(bis-hidroxietil)-aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- e) 5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)-aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- f) 5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)-N-metilaminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina

Derivados de indolenina con grupo carboxilo:

- a) 5-carboxi-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina

- b) 5-carboximetil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- c) 5-carboxi-1-(3-sulfopropil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- d) 5-carboximetil-1-(3-sulfopropil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- e) 5-carboxi-1-(2-sulfoetil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina
- f) 5-carboximetil-1-(2-sulfoetil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina

Dianilderivados para la reacción con las indoleninas anteriormente mencionadas formando mono-, di- o tricarbocianinas:

- a) Clorhidrato de Glutaconaldehidodianilida
- b) Clorhidrato de malonaldehído-bis-fenilimina
- c) N, N-difenilformamidina
- d) Cloruro de N-[5-anilino-2,4-(propano-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-iliden]anilinio
- e) Cloruro de N-[5-anilino-2,4-(etano-1,2-diil)-2,4-pentadien-1-iliden]anilinio
- f) Cloruro de N-[5-anilino-3-cloro-2,4-(propano-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-iliden]anilinio
- g) Cloruro de N-[5-anilino-3-cloro-2,4-(etano-1,2-diil)-2,4-pentadien-1-iliden]anilinio

Ejemplo 47

Éster N-hidroxisuccinimídico de 7-[5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)-aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(2-carboxipropan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)-aminocarbonil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

a) 4-[2-[4-cloro-7-[5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(2-(metoxycarbonil)propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)aminocarbonil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

A una solución de 0,8 g (5 mmol) de 4-(metoxycarbonil)-ciclohexanona en 5 ml de diclorometano se adicionan 5,5 ml (10 mmol) de oxícloruro de fósforo y 6 ml de N,N-dimetilformamida a 0°C. A continuación, se calienta a reflujo durante una hora. Se elimina el diclorometano mediante destilación y se adicionan 4 ml de anilina en 10 ml de metanol a un máximo de 5°C. Se vierte la mezcla de reacción sobre hielo, se adicionan 5 ml de ácido clorhídrico concentrado y se deja cristalizar el producto intermedio durante cinco horas a 0°C. Se separan los cristales filtrando por succión y se usan éstos sin mayor purificación en la próxima reacción. Para ello se disuelven los cristales en etanol exento de agua y se adicionan 4,4 g (10 mmol) de 5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)-N-metilaminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina (véase el ejemplo 45) y 0,8 g de acetato de sodio anhidro. Se calienta a reflujo durante una hora, se separa por filtración la sustancia sólida y se evapora el filtrado hasta sequedad. Se cromatografía el residuo para purificarlo.

Rendimiento: 3,25 g (58% del teórico)

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

Calculado:	C 54,90	H 6,14	Cl 3,18	N 5,02	S 5,75	O 22,94	Na 2,06
Hallado:	C 54,76	H 6,03	Cl 2,99	N 4,91	S 5,60		Na 1,83

b) 7-[5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(2-carboxipropan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)aminocarbonil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

Se agita una mezcla de 10 mg (0,4 mmol) de hidruro de sodio y 80 mg (1,3 mmol) de etanotiol en 10 ml de N,N-dimetilformamida exenta de agua, durante 30 minutos bajo argón, a temperatura ambiente. A continuación, se adicionan 112 mg (0,1 mmol) de 4-[2-[4-cloro-7-(5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-[2-(metoxycarbonil)propano-1,3-diil]-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-(2,3,4,5,6-pentahidroxihexil)-aminocarbonil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio (ejemplo 47 a) en 3 ml de N,N-

ES 2 321 586 T3

dimetilformamida. Se calienta la mezcla de reacción durante dos horas a 100°C y después de enfriar hasta temperatura ambiente se inactiva con dióxido de carbono. Se evapora hasta sequedad en el evaporador rotativo y se extrae el residuo con etanol caliente. Se evapora el extracto y se cromatografía el producto bruto.

5 Rendimiento: 75 mg (67% del teórico)

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

10 Calculado: C 56,27 H 6,33 N 5,25 S 6,01 O 23,99 Na 2,15
 Hallado: C 56,13 H 6,46 N 5,12 S 5,87 Na 1,88

15 c) *Éster N-hidroxisuccinimídico de 7-[5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)-aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(2-carboxipropan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)-aminocarbonil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio*

20 Para la preparación del éster activo se disuelven 14 mg (0,12 mmol) de N-hidroxisuccinimida y 64 mg (0,06 mmol) del ácido carboxílico en 2 ml de N,N-dimetilformamida. Después de 15 minutos se adicionan 25 mg (0,12 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida y se agita durante la noche a temperatura ambiente. Se purifica el éster activo mediante HPLC preparativa.

Rendimiento: 60 mg (86% del teórico)

25 Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

 Calculado: C 55,71 H 6,06 N 6,02 S 5,51 O 24,73 Na 1,97
 Hallado: C 55,59 H 6,21 N 5,93 S 5,37 Na 1,75

30 Ejemplo 48

35 7-[5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)-aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(2-carboxipropan-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)-aminocarbonil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

a) 5-N-(11-aminoundecil)aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina

40 Se colocan 340 mg (1 mmol) de 5-carboxi-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina (Anal. Biochem. 217.197, 1994) en 5 ml de N,N-dimetilformamida absoluta y 1 ml de piridina y se adiciona 0,5 g (2 mmol) de carbonato de disuccinimidilo. Después de tres horas de adiciona 0,805 g (4 mmol) de ácido 11-aminoundecanoico. Se agita durante la noche a temperatura ambiente, se evapora la preparación hasta sequedad y se agita el residuo con éter dietílico. Se separa la sustancia sólida filtrando por succión y se cromatografía en material de RP para purificar.

45 Rendimiento: 0,37 g (71% del teórico)

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

50 Calculado: C 62,04 H 8,10 N 5,36 S 6,13 O 18,37
 Hallado: C 61,88 H 8,23 N 5,17 S 6,02

55 b) 7-[5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)-aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(2-carboxipropano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-3,3-dimetil-5-N-(1,3,4-trihidroxibut-2-il)-aminocarbonil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

60 Se agitan una solución de 0,35 g (0,67 mmol) de 5-N-(11-aminoundecil)aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina (ejemplo 48 a) y 0,18 g (0,645 mmol) de glutaconaldehidodiano en 3 ml de anhídrido acético durante 20 minutos a 110°C. A continuación, se adicionan 344 mg (0,83 mmol) de 5-N-(2,3-dihidroxipropil)-aminocarbonil-1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetil(3H)indolenina (ejemplo 44 a), 0,2 g de acetato de sodio, 3 ml de anhídrido acético y 1 ml de ácido acético. Se deja agitando la mezcla de reacción durante dos horas a 110°C, se enfría hasta temperatura ambiente y se precipita el producto con éter dietílico. Se cromatografía el producto bruto en material de RP.

65 Rendimiento: 0,41 g (60% del teórico)

ES 2 321 586 T3

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

Calculado:	C 60,10	H 7,02	N 5,50	S 6,29	O 18,84	Na 2,26
Hallado:	C 59,96	H 7,14	N 5,33	S 6,15		Na 2,11

Otros colorantes conforme a la invención pueden prepararse según el ejemplo 44 a y b, usando en lugar de ácido 11-aminoundecanoico en el ejemplo 48 a, los siguientes aminoácidos y los derivados de indolenina con sustituyentes hidroxialquilo a)-f), citados en el ejemplo 46:

- i. Glicina
- ii. Alanina
- iii. β -alanina
- iv. Ácido 4-aminobutanoico
- v. Ácido 6-aminohexanoico
- vi. $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3\text{CH}_2\text{COOH}$ (TH 53, 29, 6977)
- vii. $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{CH}_2\text{COOH}$ (JOC 63, 5, 1728, 1998)
- viii. $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4-\text{CO}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ (Lett. Pept. Sci. 6, 135, 1999)
- ix. $\text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{N}-\text{PEG}-\text{COOH}$ (PM 3400 g/mol; Shearwater Polymers Inc. USA).

Ejemplo 49

4-[2-[4-(4-(N-[4-aza-6-bromo-5-oxohexil]aminocarbonil-etil)feniloxi)-7-(5-N-(dihidroxipropil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden)-3,5-(propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il)-5-N-(dihidroxipropil)aminocarbonil-3,3-dimetil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

a) *[3-[N-(terbutoxicarbonil)amino]propil]-N'-(bromoacetil)-amida*

Se disuelven 2,5 g (14,4 mmol) de [3-[N-(terbutoxicarbonil)amino]-propil]amina en 15 ml de dioxano y después de adicionar 4,4 ml de trietilamina a 0°C se adicionan 3,2 g (16 mmol) de bromuro de bromoacetilo. Se agita durante la noche a temperatura ambiente y a continuación se adicionan otros 320 mg de bromuro de bromoacetilo. Después de estar durante dos horas a temperatura ambiente, se separa el precipitado filtrando por succión, se concentra la solución y se incorpora el residuo a acetato de etilo. Se lava con agua y se seca la fase orgánica sobre sulfato de sodio.

Rendimiento: 3,2 g (75% del teórico)

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

Calculado:	C 40,69	H 6,49	Br 27,07	N 9,49	O 16,26
Hallado:	C 40,50	H 6,37	Br 26,89	N 9,58	

b) *Clorhidrato de [3-[N-(bromoacetil)amino]propil]amina*

Se agitan 3,1 g (10,5 mmol) de [3-[N-(terbutoxicarbonil)amino]propil]-N'-(bromoacetil)amida (ejemplo 49 a) durante cinco horas a temperatura ambiente con 50 mmol de ácido clorhídrico 1 M en acetato de etilo. Se separa el producto filtrando por succión y se lava la sustancia sólida con acetato de etilo.

Rendimiento: 2,3 g (95% del teórico)

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

Calculado:	C 25,94	H 5,22	Cl 15,31	Br 34,51	N 12,10	O 6,91
Hallado:	C 25,76	H 5,41	Cl 15,55	Br 34,34	N 11,97	

ES 2 321 586 T3

c) 4-[2-[4-(4-(N-(4-aza-6-bromo-5-oxo-hexil)aminocarboniletil)feniloxi)-7-[5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio

Se disuelven 121 mg (0,1 mmol) de éster N-hidroxisuccinimídico de 4[2-[4-(4-(2-carboxietil)feniloxi)-7-[5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil-1-(4-sulfonatobutil)indolin-2-iliden]-3,5-(propano-1,3-diil)-1,3,5-heptatrien-1-il]-5-N-(dihidroxiopropil)aminocarbonil-3,3-dimetil(3H)indolio]butanosulfonato de sodio (ejemplo 44c) en 0,5 ml de N,N-dimetilformamida, se adicionan 0,06 ml de trietilamina y 70 mg (0,3 mmol) de clorhidrato de [3-(N-(bromoacetil)amino)propil]amina (ejemplo 49b).

Se agita durante 4 horas a 60°C, a continuación se enfría hasta temperatura ambiente y se precipita el producto con éter dietílico. Se separa la sustancia sólida filtrando por succión y se lava con exceso de éter dietílico.

Rendimiento: 0,11 mg (80% del teórico)

Análisis elemental (respecto a la sustancia exenta de disolvente):

Calculado:	C 56,17	H 6,18	Br 6,13	N 6,44	S 4,92	Na 1,76	O 18,40
Hallado:	C 55,96	H 6,26	Br 6,01	N 6,27	S 4,81	Na 1,53	

REIVINDICACIONES

1. Conjugados de péptidos y colorantes de polimetina de la fórmula general (I)



en la que

X representa un α -, β - o γ -aminoácido con una configuración D o L, y

m representa un número de 5 a 30,

pudiendo la resultante secuencia de aminoácidos $(X)_m$ ser de naturaleza lineal o estar ciclizada a través de un puente de disulfuro entre dos cisteínas u homocisteínas o por enlaces amídicos entre los extremos terminales de N y C, y representando la secuencia de aminoácidos de la somatostatina o fragmentos, secuencias parciales, derivados o compuestos análogos de la somatostatina,

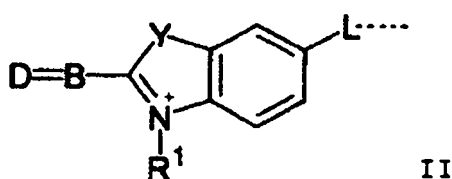
A^1 representa un átomo de hidrógeno, un radical acetilo o un radical alquilo con hasta 10 átomos de C, que eventualmente puede estar sustituido con 1 a 3 grupos carboxi y/o con 1 a 6 grupos hidroxilo, o representa un radical poli(oxietileno) con 2 a 30 unidades de $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ o una molécula de colorante tomada de la clase de los colorantes de polimetina, que tiene por lo menos un máximo de absorción situado en el intervalo de 380 a 1.200 nm,

A^2 representa un grupo hidroxilo, un grupo amino o una molécula de colorante tomada de la clase de los colorantes de polimetina, que tiene por lo menos un máximo de absorción situado en el intervalo de 380 a 1.200 nm,

con la condición de que por lo menos uno de los radicales A^1 o A^2 ha de representar una molécula de colorante tomada de la clase de los colorantes de polimetina, que tiene por lo menos un máximo de absorción situado en el intervalo de 380 a 1.200 nm,

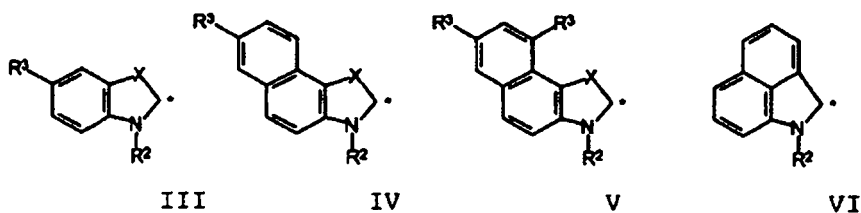
realizándose, en el caso de que A^1 y/o A^2 representen una molécula de colorante tomada de la clase de los colorantes de polimetina, que tiene por lo menos un máximo de absorción situado en el intervalo de 380 a 1.200 nm, que A^1 está unido al grupo amino terminal de N y A^2 está unido a un grupo amino del aminoácido lisina o a un grupo hidroxilo del aminoácido serina en una posición arbitraria dentro de la secuencia de aminoácidos $(X)_m$,

representando la molécula de colorante tomada de la clase de los colorantes de polimetina un colorante de cianina de las fórmulas generales II



en las que

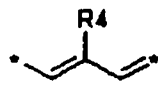
D representa un fragmento correspondiente a las fórmulas generales III hasta VI, significando la posición **caracterizada** con un asterisco la unión con B,



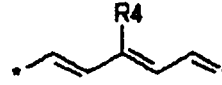
B representa un fragmento correspondiente a las fórmulas generales VII hasta XII



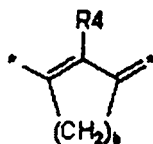
VII



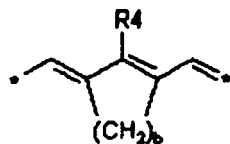
VIII



IX



X



XI

R^1 y R^2 representan E^1 , R^3 representa un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo, o un grupo nitro, o representan un radical $-COO^1E^1$, $-CON^1E^2$, $-NHCO^1E^1$, $-NHCON^1E^1$, $-NE^1E^2$, $-OE^1$, $-OSO_3E^1$, $-SO_3E^1$, $-SO_2N^1E^1$, $-E^1$,

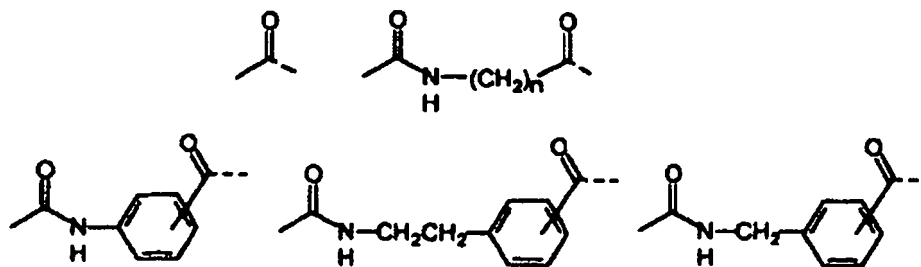
representando E^1 y E^2 independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno, una cadena de sulfoalquilo de C_1 - C_4 , una cadena de alquilo de C_1 - C_{50} saturado o insaturado, ramificado o lineal, pudiendo la cadena, o partes de esta cadena, formar una o varias unidades de C_5 - C_6 cíclicas, o unidades de C_{10} bicíclicas, aromáticas o saturadas, y estando la cadena de alquilo de C_1 - C_{50} interrumpida por 0 a 15 átomos de oxígeno y/o por 0 a 3 grupos carbonilo y/o sustituida con 0 a 5 grupos hidroxilo,

R^4 representa un átomo de hidrógeno, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo, o una cadena de alquilo de C_1 - C_{10} ramificada o lineal,

b significa un número 2 o 3,

X e Y independientemente uno de otro, significan O, S, Se, $-\text{CH}=\text{CH}-$ o $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$,

L representa un grupo correspondiente a las siguientes fórmulas



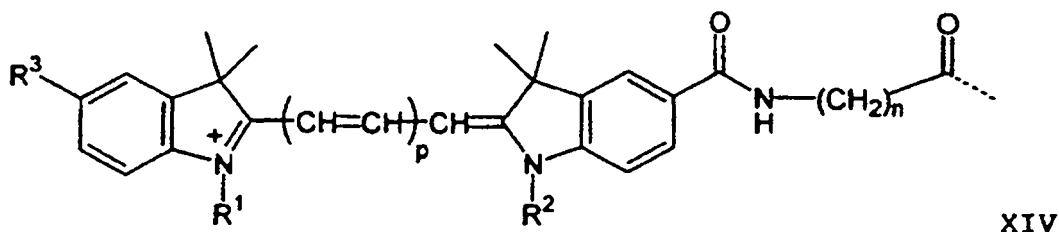
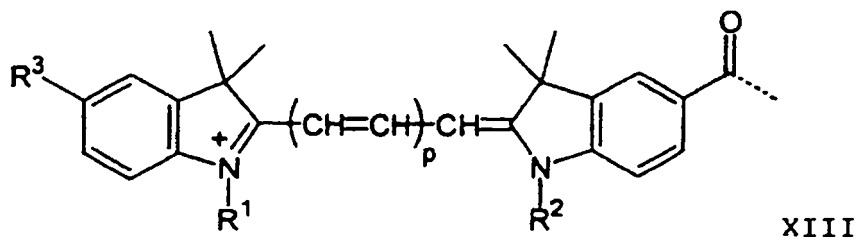
en las que n significa un número de 1 a 10,

y sus sales fisiológicamente compatibles.

2. Compuesto según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la molécula de colorante A^1 y/o A^2 representa un colorante de indocarbocianina, indodicarbocianina o indotricarbocianina.

3. Compuesto según la reivindicación 2, **caracterizado** porque

la molécula de colorante A^1 y/o A^2 representa un colorante de indocarbocianina, indodicarbocianina o indotricarbocianina de fórmulas generales XIII o XIV



en las que

p representa 1, 2 ó 3,

n representa 1, 2, 3, 4 ó 10,

R¹ y R², independientemente entre sí,

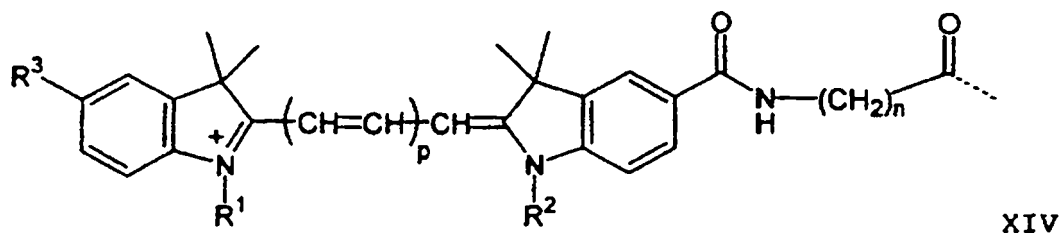
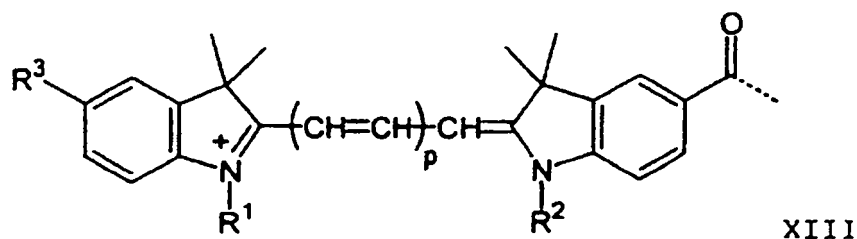
representan un resto 4-sulfobutilo, 3-sulfopropilo, 2-sulfoetilo, 3-metil-3-sulfopropilo, metilo, etilo o propilo, y

R³ representa hidrógeno, un átomo de cloro, bromo o yodo o un grupo nitro o un resto -COOE¹, -CONE¹E², -NHCOE¹, -NHCONHE¹, -NE¹E², -OE¹, -OSO₃E¹, -SO₃E¹, -SO₂NHE¹,

representando E¹ y E², independientemente entre sí, un átomo de hidrógeno, o un resto metilo, etilo, o alquilo C₃-C₆ que está interrumpido por 0 a 2 átomos de oxígeno y/o por 0 a 1 grupo carbonilo y/o está sustituido por 0 a 5 grupos hidroxilo; o un resto poli(oxietilén)glicol con 2 a 30 unidades -CH₂CH₂O-.

4. Compuesto según la reivindicación 2, **caracterizado** porque

la molécula de colorante A¹ y/o A² representa un colorante de indocarbocianina, de indodicarbocianina o de indotricarbocianina de fórmulas generales XIII o XIV



en las que

p representa 1, 2 ó 3,

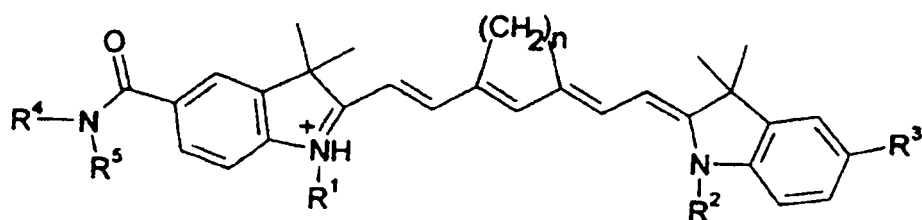
n representa 1, 2 ó 4,

R¹ y R², independientemente entre sí, representan un resto 4-sulfobutilo ó 3-sulfopropilo,

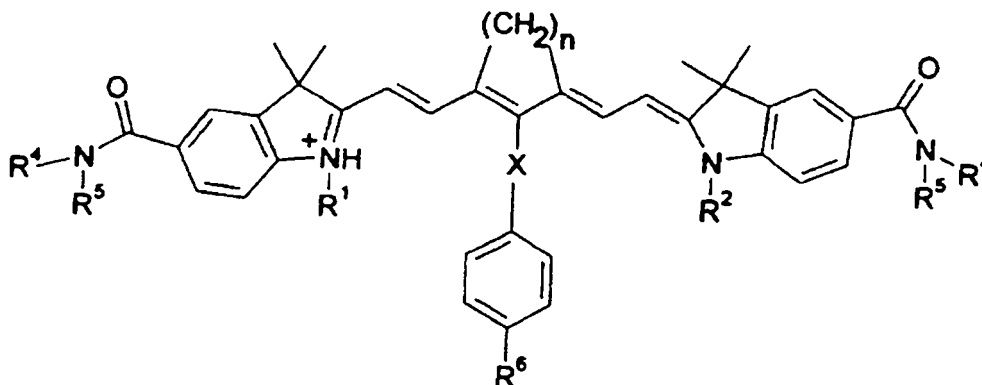
R³ representa hidrógeno o un resto -COOE¹ o -CONHE¹, significando E¹ un átomo de hidrógeno o un resto metilo, etilo, o alquilo C₃-C₆, que está interrumpido por 0 a 2 átomos de oxígeno y/o por 0 a 1 grupo carbonilo y/o está sustituido por 0 a 5 grupos hidroxilo.

5. Compuesto según la reivindicación 2, **caracterizado** porque

la molécula de colorante A¹ y/o A² representa un colorante de indotricarbocianina de fórmulas generales XV o XVI:



XV



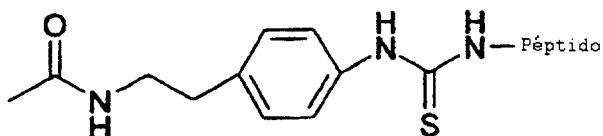
XVI

en las que

n representa 2 ó 3,

R¹ y R², independientemente entre sí, representan un resto 4-sulfobutilo, 3-sulfopropilo o 2-sulfoetilo,

R³ representa un resto -CONH-péptido, -CONH-(CH₂)_m-CONH péptido, -CONH-(CH₂)_n-NH-CS-NH-péptido o -CONH-(CH₂)_n-NHCOCH₂-péptido con m = 1 a 10 y n = 2 ó 3, o el siguiente grupo:



R⁴ y R⁵, independientemente entre sí, representan un átomo de hidrógeno, un resto metilo o un resto alquilo hidroxilado,

R⁶ representa uno de los siguientes grupos:

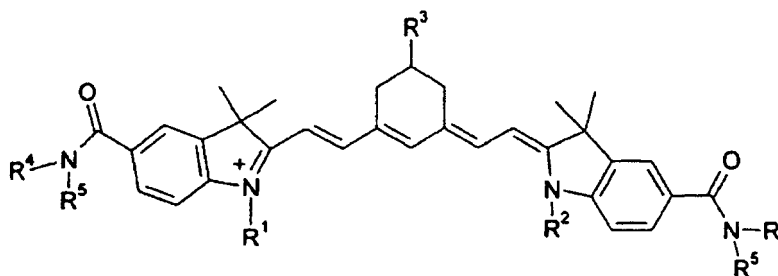
-(CH₂)_m-CONH-péptido con m = 0 a 2,

-(CH₂)_m-NH-CS-NH-péptido con m = 0 a 2,

y X representa un átomo de oxígeno o un átomo de azufre.

6. Compuesto según la reivindicación 2, **caracterizado** porque

la molécula de colorante A¹ y/o A² representa un colorante de indotricarbocianina de fórmula general XVII:

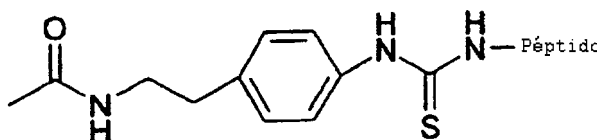


XVIII

en la que

R¹ y R², independientemente entre sí, representan un resto 4-sulfobutilo, 3-sulfopropilo o 2-sulfoetilo,

R³ representa un resto -CONH-péptido, -NH-CS-NH-péptido o -CONH-(CH₂)_n-NHCO-CH₂-péptido con n = 2 ó 3, o representa el siguiente grupo:



y R⁴ y R⁵, independientemente entre sí, representan un átomo de hidrógeno, un resto metilo o un resto alquilo hidroxilado.

7. Compuesto según la reivindicación 5 ó 6, **caracterizado** porque los restos alquilo hidroxilados representan 2-hidroxietilo, 3-hidroxipropilo, 2,3-dihidroxipropilo, 1,3-dihidroxi-2-propilo, 2,3,4-trihidroxibutilo, 1,3,4-trihidroxi-2-butilo, 2,3,4,5,6-pentahidroxihexilo.

8. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizados** porque (X)_m representa la secuencia de aminoácidos de la somatostatina correspondientemente a

AGCKNFFWKTFSTC

o representa fragmentos, secuencias parciales, derivados o compuestos análogos de la somatostatina, que se componen de 5 a 20 aminoácidos.

9. Compuestos de acuerdo con por lo menos una de las precedentes reivindicaciones, **caracterizados** porque de 2 hasta m aminoácidos, independientemente unos de otros, pueden estar intercambiados por su respectivo D-aminoácido o por otros L- o D-aminoácidos, teniendo m el significado arriba indicado.

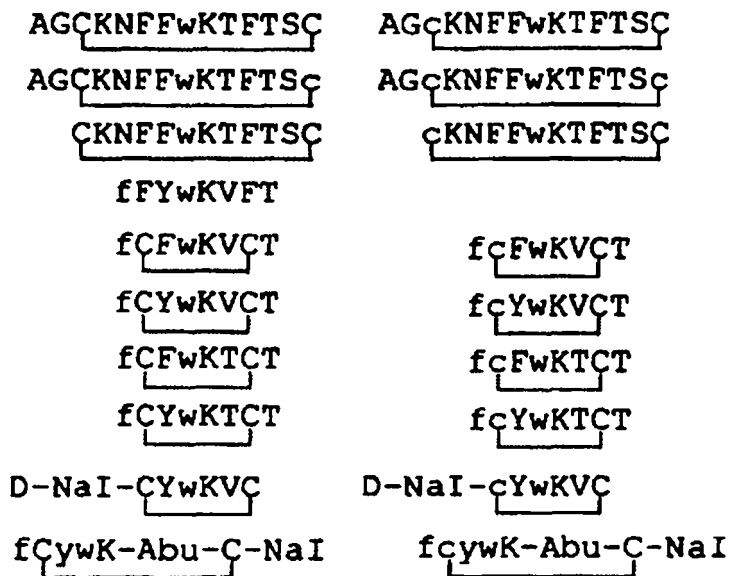
10. Compuestos de acuerdo con por lo menos una de las precedentes reivindicaciones, **caracterizados** porque por lo menos uno de los aminoácidos (X)_m independientemente unos de otros, puede estar intercambiado por otros aminoácidos o derivados de aminoácidos no naturales.

11. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizados** porque como aminoácidos o derivados de aminoácidos no naturales se ha seleccionado uno de los siguientes compuestos:

naftalanina, ciclohexilalanina, norleucina, norvalina, ácido α -aminoadípico, ácido α -aminobutírico, β -ciclohexilalanina, ornitina, sarcosina o δ -hidroxilisina.

12. Compuestos de acuerdo con por lo menos una de las precedentes reivindicaciones, **caracterizados** porque todos los aminoácidos (X)_m están intercambiados por sus respectivos D-aminoácidos.

13. Compuestos de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizados** porque como fragmentos, secuencias parciales, derivados o compuestos análogos de la somatostatina, se seleccionan las siguientes secuencias de aminoácidos:



14. Utilización de los compuestos de acuerdo con por lo menos una de las precedentes reivindicaciones para la preparación de un agente de diagnóstico para el diagnóstico *in vivo* de tumores, otras zonas enfermas de tejidos o adenomas mediante procedimientos ópticos de detección, o para el diagnóstico por fluorescencia *in vivo* de tumores, células de tumores y/o tejidos inflamados mediante procedimientos endoscópicos en el tracto gastrointestinal, el esófago, el tracto bronquial, la vejiga urinaria o la cerviz, o para el diagnóstico por fluorescencia *in vivo* y/o para el diagnóstico por absorción de tumores de las mamas mediante la mamografía óptica (transiluminación o tomografía óptica de las mamas).

15. Utilización de los compuestos de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un agente de diagnóstico para el diagnóstico por fluorescencia *in vivo* endoscópico.

16. Agente de diagnóstico óptico para el diagnóstico *in vivo* de zonas enfermas de tejidos, **caracterizado** porque contiene por lo menos un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en común con las sustancias auxiliares y/o de vehículo, así como los agentes diluyentes, que son usuales.