



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 309 609**

51 Int. Cl.:  
**A61B 10/00** (2006.01)  
**A61K 41/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05005127 .5**  
96 Fecha de presentación : **17.01.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1559374**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.08.2005**

54 Título: **Tintes de cianina.**

30 Prioridad: **18.01.2000 US 484318**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2008**

73 Titular/es: **MALLINCKRODT Inc.**  
**675 McDonnell Boulevard, P.O. Box 5840**  
**St. Louis, Missouri 63134, US**

72 Inventor/es: **Achilefu, Samuel, I.;**  
**Rajagopalan, Raghavan;**  
**Dorshow, Richard, B. y**  
**Bugaj, Joseph, E.**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 309 609 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

Tintes de cianina.

5 **Campo de la invención**

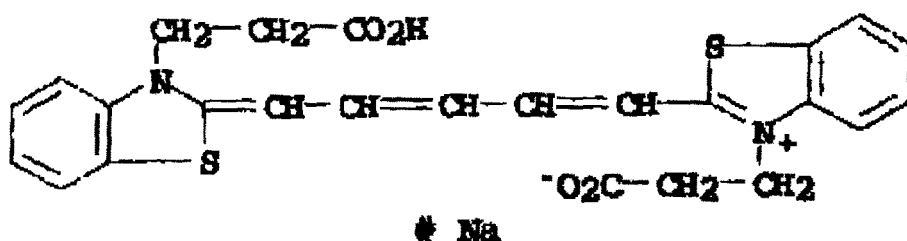
Esta invención se relaciona en general con tintes de cianina e indocianina para uso en imagen, diagnóstico y terapia.

**Antecedentes de la invención**

10 Actualmente se están utilizando diversos tintes que absorben y emiten luz en la región visible y del infrarrojo próximo del espectro electromagnético para diversas aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad, alta absorcibilidad molar o altos rendimientos cuánticos de fluorescencia. La alta sensibilidad de la modalidad óptica junto con tintes como agentes de contraste va pareja a la de la medicina nuclear y permite la visualización de órganos y tejidos sin el efecto no deseado de la radiación ionizante. Los tintes de cianina con intensa absorción y emisión en la región del infrarrojo próximo (RIP) son particularmente útiles, ya que los tejidos biológicos son ópticamente transparentes en esta región (B. C. Wilson, Optical properties of tissues, *Encyclopedia of Human Biology*, 1991, 5, 587-597). Por ejemplo, el verde de indocianina, que absorbe y en la región RIP, ha sido utilizado para monitorizar el gasto cardíaco, las funciones hepáticas y el flujo sanguíneo hepático (Y-L. He, H. Tanigami, H. Ueyama, T. Mashimo e I. Yoshiya, Measurement of blood volume using indocyanine green measured with pulse-spectrometry: Its reproducibility and reliability, *Critical Care Medicine*, 1998, 26(8), 1446-1451; J. Caesar, S. Shaldon, L. Chiandussi y col., The use of Indo-cyanine green in the measurement of hepatic blood flow and as a test of hepatic function, *Clin. Sci.* 1961, 21, 43-57) y sus derivados funcionalizados han sido utilizados para conjugar biomoléculas con fines diagnósticos (R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar y col., Cyanine dye labeling reagents: Sulfoindocyanine succinimidyl esters, *Bioconjugate Chemistry*, 1993, 4(2), 105-111; Linda G. Lee y Sam L. Woo, "N-Heteroaromatic ion and iminium ion substituted cyanine dyes for use as fluorescent labels", EE.UU. 5.453.505; Eric Hohenschuh y col. "Light imaging contrast agents", WO 98/48846; Jonathan Turner y col. "Optical diagnostic agents for the diagnosis of neurodegenerative diseases by means of near infra-red radiation", WO 98/22146; Kai Licha y col. "In-vivo diagnostic process by near infrared radiation", WO 96/17628; Robert A. Snow y col., Compounds, WO 98/48838).

30 Un inconveniente serio en el uso de derivados de tintes de cianina es el potencial de toxicidad hepatobiliar que resulta del rápido aclaramiento de estos tintes por el hígado (G. R. Cherrick, S. W. Stein, C. M. Leevy y col., Indocyanine green: Observations on its physical properties, plasma decay, and hepatic extraction. *J. Clinical Investigation*, 1960, 39, 592-600). Esto se asocia a la tendencia de los tintes de cianina a formar agregados en solución que podrían ser captados por las células de Kupffer en el hígado. Diversos intentos para obviar este problema no han resultado muy efectivos. Se han empleado péptidos hidrófilos, polietilenglicol o conjugados de oligosacáridos, pero circulan perjudicialmente durante duraciones de tiempo significativas antes de aclararse eventualmente por el hígado. Otra dificultad sería con los sistemas actuales de tintes de cianina e indocianina es que ofrecen un grado limitado en la capacidad para inducir grandes cambios en las propiedades de absorción y emisión de estos tintes. Se han hecho intentos de incorporar diversos heteroátomos y restos cíclicos a la cadena poliénica de estos tintes (L. Strekowski, M. Lipowska y G. Patonay, Substitution reactions of a nucleofugal group in hetamethine cyanine dyes, *J. Org. Chem.*, 1992, 57, 4578-4580; N. Narayanan y G. Patonay, A new method for the synthesis of heptamethine cyanine dyes: Synthesis of new near infrared fluorescent labels, *J. Org. Chem.*, 1995, 60, 2391-2395; E. Fung y R. Rajagopalan, Monocyclic functional dyes for contrast enhancement in optical imaging, EE.UU. 5.732.104; R. Rajagopalan y E. Fung, Delta<sup>1,6</sup> bicyclo[4,4,0] functional dyes for contrast enhancement in optical imaging, EE.UU. 5.672.333; R. Rajagopalan y E. Fung, Tricyclic functional dyes for contrast enhancement in optical imaging, EE.UU. 5.709.845), pero los sistemas de tintes resultantes no muestran grandes diferencias en los máximos de absorción y de emisión, especialmente más allá de 830 nm, donde las aplicaciones diagnósticas fotoacústicas son muy sensibles. También poseen núcleos hidrofóbicos prominentes que aumentan la captación hepática. Además, la mayoría de los tintes de cianina no tienen capacidad para formar dendrímeros que sean útiles en aplicaciones biomédicas.

JP7035749 describe (Chemical Abstracts CA 122:237762) un compuesto de fórmula

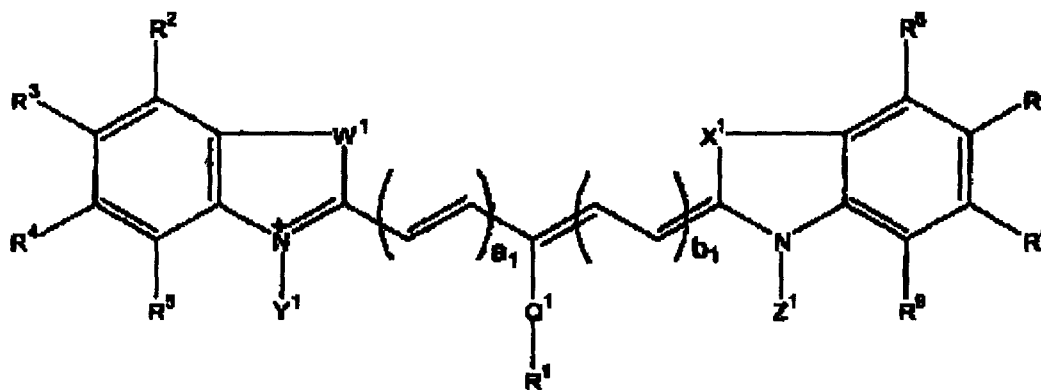


para inmunoensayo.

65 Por lo tanto, existe una necesidad de diseñar tintes que podrían prevenir la agregación de los tintes en solución, pre-dispuestos a formar dendrímeros, capaces de absorber o emitir más allá de 800 nm, que posean propiedades fotofísicas deseables y dotados de capacidad de abordaje específico de tejidos.

## Resumen de la invención

La presente invención se relaciona, en particular, con composiciones para uso en un procedimiento diagnóstico o terapéutico, cuyas composiciones contienen tintes de cianina de fórmula general 1



**Fórmula 1**

donde  $a_1$  y  $b_1$  varían de 0 a 5;  $W^1$  y  $X^1$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en  $-CR^{10}R^{11}$ ,  $-O-$ ,  $-NR^{12}$ ,  $-S-$  y  $-Se$ ;  $Q^1$  es un enlace sencillo o es seleccionado entre el grupo consistente en  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-Se-$  y  $-NR^{13}$ ;  $Y^1$  y  $Z^1$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en  $-(CH_2)_c-CO_2H$ ,  $-(CH_2)_c-(CH_2-O-CH_2)_d-CH_2-CO_2H$ ,  $-(CH_2)_e-NH_2$ ,  $-(CH_2)_e-(CH_2-O-CH_2)_f-CH_2-NH_2$ ,  $-(CH_2)_g-N(R^{14})-(CH_2)_h-CO_2H$  y  $-(CH_2)_i-N(R^{15})-(CH_2)_j-(CH_2-O-CH_2)_k-CH_2-CO_2H$ ;  $R^1$  y  $R^{10}$  a  $R^{15}$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_{10}$ , arilo  $C_1-C_{10}$ , alcoxilo  $C_1-C_{10}$ , polialcoxialquilo  $C_1-C_{10}$ ,  $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_e-CH_2-OH$ , polihidroxiarilo  $C_1-C_{20}$ , polihidroxiarilo  $C_1-C_{10}$ ,  $-(CH_2)_d-CO_2H$ ,  $-(CH_2)_e-(CH_2-O-CH_2)_f-CH_2-CO_2H$ ,  $-(CH_2)_f-NH_2$  y  $-(CH_2)_g-(CH_2-O-CH_2)_h-CH_2-NH_2$ ;  $c$ ,  $e$ ,  $g$ ,  $h$  e  $i$  varían de 1 a 10;  $d$ ,  $f$  y  $j$  varían de 1 a 100; y  $R^2$  a  $R^9$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_{10}$ , arilo  $C_1-C_{10}$ , hidroxilo, polihidroxiarilo  $C_1-C_{10}$ , alcoxilo  $C_1-C_{10}$ , amino, aminoalquilo  $C_1-C_{10}$ , ciano, nitro y halógeno.

Esta invención se relaciona también con el método de conjugación de los tintes de esta invención a péptidos o biomoléculas por síntesis en fase sólida.

## Descripción detallada

Las composiciones de la presente invención que contienen tintes de fórmula 1 ofrecen ventajas significativas sobre los actualmente descritos en la técnica. Tal como se ilustra en los Esquemas 1-6, estos tintes están diseñados para prevenir la agregación en solución evitando las interacciones hidrofóbicas ordenadas intramoleculares e intermoleculares. También tienen múltiples sitios de unión proximales al cromóforo colorante para facilidad de formación de dendrímeros. La presencia de un esqueleto cromóforo rígido y extendido aumenta el rendimiento cuántico de fluorescencia y prolonga la absorción máxima más allá de 800 nm. Se puede conseguir fácilmente la conjugación de biomoléculas a estos tintes. Son útiles en diversas aplicaciones biomédicas, incluyendo, aunque sin limitación, la imagen tomográfica de órganos, la monitorización de las funciones orgánicas, la angiografía coronaria, la endoscopia de fluorescencia, la detección, imagen y terapia de tumores, la cirugía guiada por láser, métodos fotoacústicos y de sonofluorescencia y similares. A continuación, se dan realizaciones específicas para conseguir algunas de las aplicaciones biomédicas antes mencionadas.

En una realización de la invención, los tintes de la invención son útiles para aplicaciones tomográficas ópticas, endoscópicas, fotoacústicas y de sonofluorescencia para la detección y el tratamiento de tumores y otras anomalías.

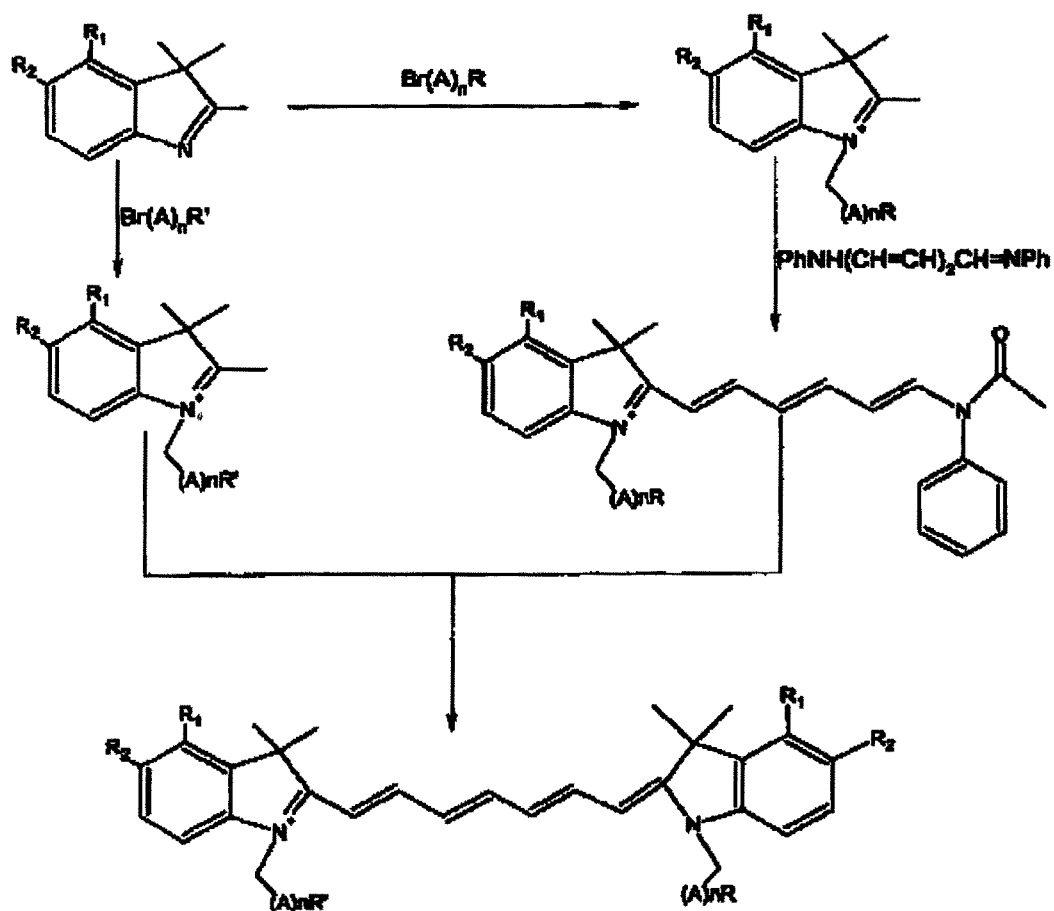
En otro objeto de la invención, los tintes de la invención son útiles para la terapia localizada.

En aún otro aspecto de la invención, los tintes de la invención son útiles para la detección de la presencia de tumores y otras anomalías por monitorización del perfil de aclaramiento sanguíneo de los tintes.

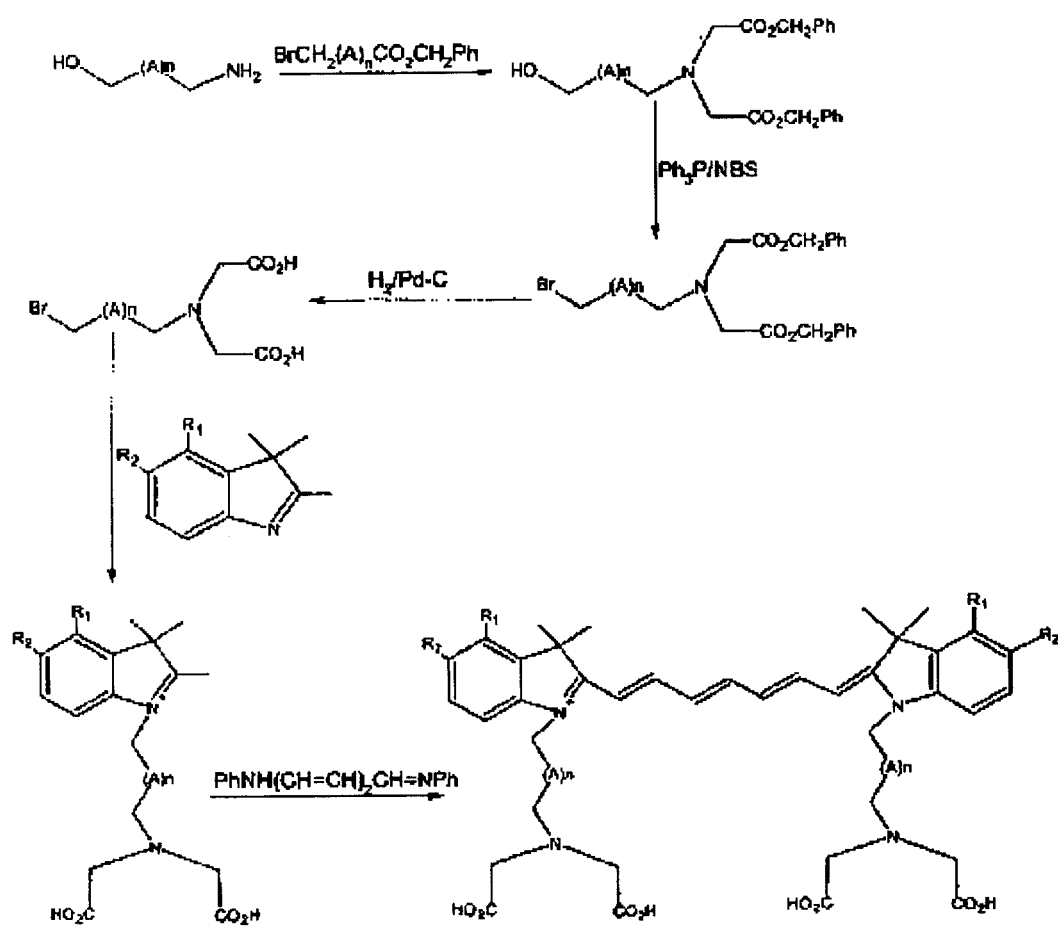
En otra realización más de la invención, los tintes son útiles para la cirugía guiada asistida por láser para la detección de micrometástasis de tumores en laparoscopia.

En aún otro aspecto de la invención, los bioconjugados de tintes de los tintes de esta invención son un diagnóstico útil de placas ateroscleróticas y coágulos sanguíneos.

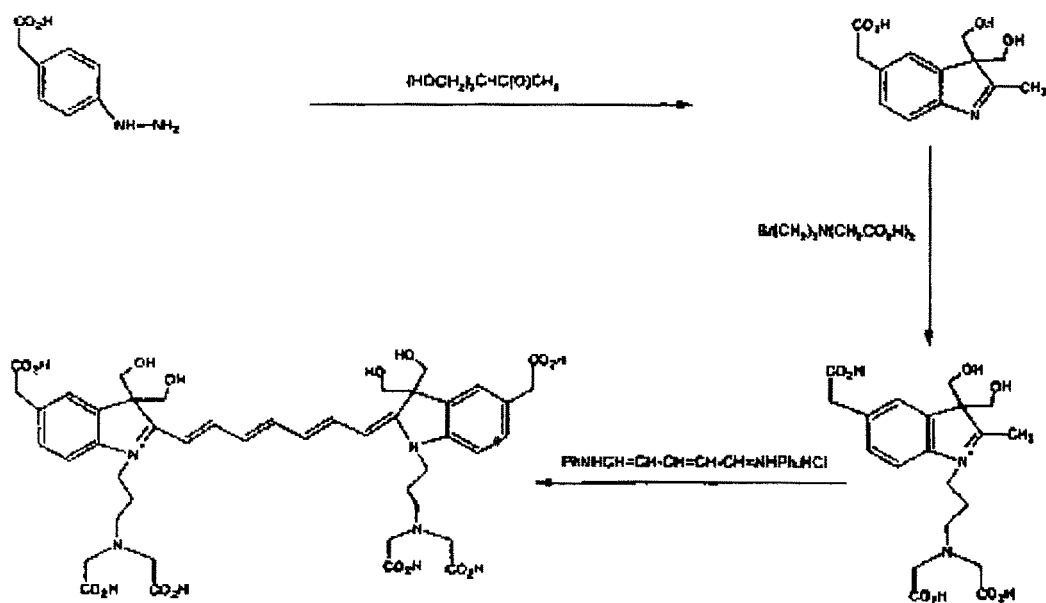
Los tintes de la presente invención son preparados según los métodos bien conocidos en la técnica y se muestran en los Esquemas 1-3 y se muestra su uso en la síntesis de bioconjugados en el Esquema 6.



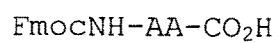
**Esquema 1:** Preparación de biscalboxilatos; A =  $\text{CH}_3$  o  $\text{CH}_2\text{OCH}_2$ ; R =  $\text{COOH}$ ; R' =  $\text{COOH}$ ,  $\text{NHFMoc}$ ,  $\text{CO}_2\text{t-Bu}$ ,  $\text{SO}_3^-$ ;  $R_1 = R_2 = \text{H}$  (Fórmula 1)



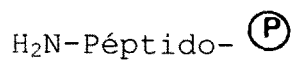
**Esquema 2:** Preparación de tetracarboxilatos; A = CH<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H (Fórmula 1) o R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = fenilo fusionado (Fórmula 2)



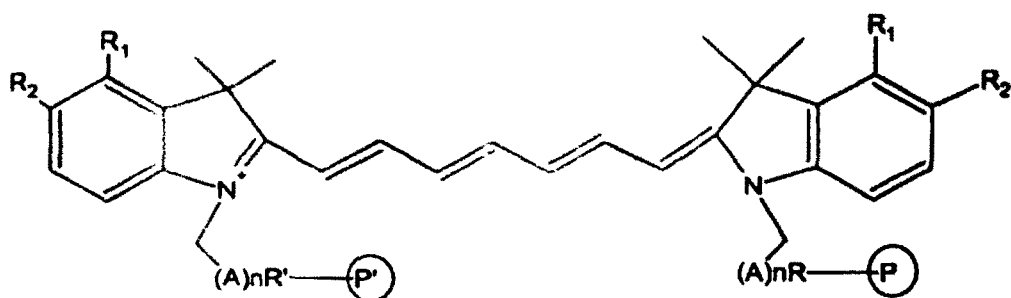
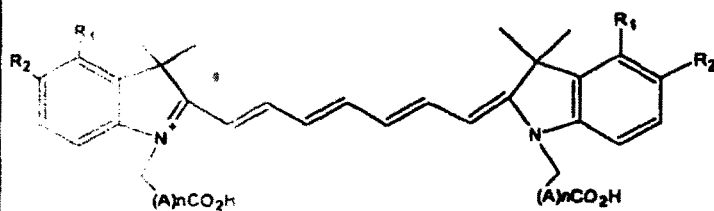
**Esquema 3:** Preparación de tintes de cianina de ácidos polihidroxicarboxílicos



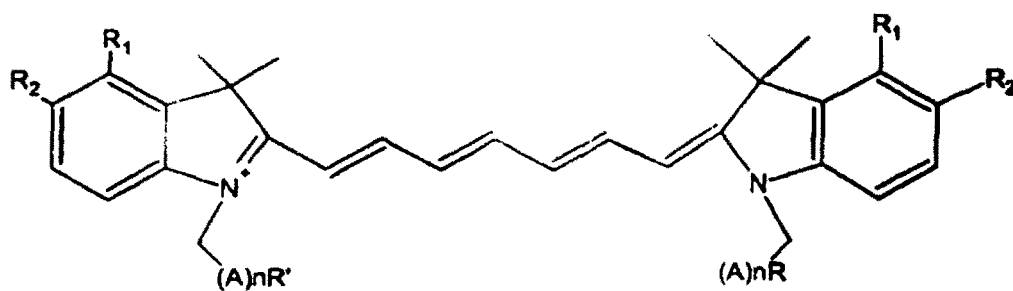
Síntesis peptídica  
automatizada en soporte  
sólido



HOBT/HBTU



TFA/H<sub>2</sub>O/Fenol/Tioanisol



**Esquema 6:** Esquema representativo para la preparación de bioconjugados; A = CH<sub>2</sub> o CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>; R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H (Fórmula 1) o R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> = fenilo fusionado (Fórmula 2); AA = Aminoácidos; R = CONH péptido; R' = R (Bisconjugado) o COOH (Monoconjugado)

(P) = Soporte sólido; (P') = La presencia o ausencia depende de la definición de R'.

En una realización preferida, los tintes según la presente invención tienen la Fórmula general 1, donde a<sub>1</sub> y b<sub>1</sub> varían de 0 a 3; Q<sup>1</sup> es un enlace sencillo; R<sup>1</sup> a R<sup>9</sup> son hidrógeno; W<sup>1</sup> y X<sup>1</sup> pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C((CH<sub>2</sub>)<sub>zz</sub>OH)CH<sub>3</sub>, C((CH<sub>2</sub>)<sub>zz</sub>OH)<sub>2</sub>, ((CH<sub>2</sub>)<sub>zz</sub>CO<sub>2</sub>H)CH<sub>3</sub>, C((CH<sub>2</sub>)<sub>zz</sub>CO<sub>2</sub>H)<sub>2</sub>, C((CH<sub>2</sub>)<sub>zz</sub>NH<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>, C((CH<sub>2</sub>)<sub>zz</sub>NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, C((CH<sub>2</sub>)<sub>zz</sub>NR<sub>pp</sub>R<sub>pz</sub>)CH<sub>3</sub> y C((CH<sub>2</sub>)<sub>zz</sub>NR<sub>pp</sub>R<sub>pz</sub>)<sub>2</sub>; Y' y Z' pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en -(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-CO<sub>2</sub>H, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-OCH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>-N(R<sup>14</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>h</sub>-CO<sub>2</sub>H y -(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>-N(R<sup>15</sup>)-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H; R<sub>pp</sub> y R<sub>pz</sub> pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en -(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-CO<sub>2</sub>H, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>-N(R<sup>14</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>h</sub>-CO<sub>2</sub>H y -(CH<sub>2</sub>)<sub>i</sub>-N(R<sup>15</sup>)-CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>j</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H; R<sup>14</sup> y R<sup>15</sup> pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, arilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, polialcoxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, -CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-CH<sub>2</sub>-OH, polihidroxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, polihidroxiarilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>-CO<sub>2</sub>H, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-OCH<sub>2</sub>)<sub>e</sub>-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>H, -(CH<sub>2</sub>)<sub>f</sub>-NH<sub>2</sub> y -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>)<sub>g</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>; c, e, g, h, i y zz varían de 1 a 5; y d, f y j varían de 1 a 100.

Las composiciones de la invención pueden ser formuladas en composiciones diagnósticas para administración enteral o parenteral. Estas composiciones contienen una cantidad efectiva del tinte junto con soportes y excipientes farmacéuticos convencionales apropiados para el tipo de administración contemplada. Por ejemplo, las formulaciones parenterales contienen ventajosamente una solución o suspensión estéril del tinte según esta invención. Las composiciones parenterales pueden ser inyectadas directamente o mezcladas con un gran volumen de composición parenteral para administración sistémica. Dichas soluciones pueden contener también tampones farmacéuticamente aceptables y eventualmente electrolitos, tales como cloruro de sodio.

Las formulaciones para administración enteral pueden variar ampliamente, como es bien sabido en la técnica. En general, dichas formulaciones son líquidas que incluyen una cantidad efectiva del tinte en solución o suspensión acuosa. Dichas composiciones enterales pueden incluir eventualmente tampones, surfactantes, agentes tixotrópicos y similares. Las composiciones para administración oral pueden también contener agentes saborizantes y otros ingredientes para aumentar sus cualidades organolépticas.

Las composiciones diagnósticas son administradas en dosis efectivas para alcanzar el aumento deseado. Dichas dosis pueden variar ampliamente, dependiendo del tinte particular empleado, de los órganos o tejidos objeto del procedimiento de imagen, del equipo de imagen usado y similares.

Las composiciones diagnósticas de la invención son usadas del modo convencional. Las composiciones pueden ser administradas a un paciente, típicamente un animal de sangre caliente, ya sea sistémica o localmente al órgano o tejido cuya imagen se ha de obtener, y se somete entonces al paciente al procedimiento de imagen.

Una combinación de lo anterior representa una importante aproximación a la síntesis y el uso de tintes de cianina e indocianina con una variedad de propiedades fotofísicas y químicas. Los tintes de esta invención son nuevos y son útiles para aplicaciones biomédicas. La presente invención es además detallada en los siguientes Ejemplos, que se ofrecen a modo de ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención en modo alguno. También se establecieron métodos fiables de cálculo para la predicción de los máximos de absorción de algunos de los tintes. Se utilizan técnicas estándar bien conocidas en este campo o las técnicas específicamente descritas a continuación.



## Ejemplo 1

(Ejemplo de referencia fuera del alcance de las reivindicaciones)

- 5 *Síntesis de tinte de bis(etilcarboximetil)indocianina (Esquema 1,  $R_1, R_2 = \text{fenilo fusionado}$ ;  $A = \text{CH}_2$ ,  $n = 1$  y  $R = R' = \text{CO}_2\text{H}$ )*

Se calentó una mezcla de 1,1,2-trimetil-[1H]-benz[e]indol (9,1 g, 43,58 mmoles) y ácido 3-bromopropanoico (10,0 g, 65,37 mmoles) en 1,2-diclorobenceno (40 mL) a 110°C durante 12 horas. Se enfrió la solución a temperatura ambiente y se filtró el residuo obtenido y se lavó con una mezcla de acetonitrilo:éter dietílico (1:1). Se secó el sólido obtenido a vacío para obtener 10 g (64%) de polvo marrón claro. Se sometieron a reflujo una porción de este sólido (6,0 g; 16,56 mmoles), dianilmonoclorhidrato de glutacetaldehído (2,36 g, 8,28 mmoles) y acetato de sodio trihidrato (2,93 g, 21,53 mmoles) en etanol (150 mL) durante 90 minutos. Tras evaporar el solvente, se añadieron 40 mL de HCl acuoso 2 N al residuo y se centrifugó la mezcla y se decantó el sobrenadante. Se repitió este procedimiento hasta que el sobrenadante se volvió prácticamente incoloro. Se añadieron aproximadamente 5 mL de una mezcla de agua:acetonitrilo (3:2) al residuo sólido y se liofilizó para obtener 2 g de escamas de color verde oscuro. Se estableció la pureza del compuesto con  $^1\text{H}$ -RMN y espectrometría de Masas-LC.

## Ejemplo 3

- 20 *Síntesis de tinte de bisetilcarboximetilindocianina (Esquema 1,  $R_1 = R_2 = \text{H}$ ;  $A = \text{CH}_2$ ,  $n = 1$  y  $R = R' = \text{CO}_2\text{H}$ )*

Se preparó este compuesto como se describe en el Ejemplo 1, excepto por usar 1,1,2-trimetilindol como material de partida.

Se disolvió el material bruto anterior en 100 ml de cloruro de metileno a temperatura ambiente. Se añadió trifenilfosfina (8,91 g, 34 mmol) y se disolvió con agitación. Se inició una purga de argón y se enfrió la mezcla a 0°C con un baño de hielo. Se añadió la N-bromosuccinimida (6,05 g, 34 mmol) por porciones a lo largo de 2 minutos. Se agitó la mezcla durante 1,5 horas a 0°C. Se eliminó el cloruro de metileno a vacío y se obtuvo un aceite púrpura. Se trituró este aceite con 200 ml de éter con agitación manual constante. Durante este tiempo, el aceite se hizo muy espeso. Se decantó la solución etérica y se trituró el aceite con 100 ml de éter. Se decantó la solución etérica y se volvió a triturar el aceite con una porción de 100 ml de éter. Se decantó el éter y se dejó que las soluciones etéricas combinadas reposaran durante aproximadamente 2 horas para permitir que el óxido de trifenilfosfina cristalizara. Se decantó la solución etérica de los cristales y se lavó el sólido con 100 ml de éter. Se redujo el volumen de los extractos etéricos combinados a vacío hasta obtener un volumen de aproximadamente 25 ml. Se dejó que éste reposara a lo largo de la noche a 0°C. Se añadió éter (10 ml) a la mezcla fría, que fue mezclada para suspender el sólido. Se percoló la mezcla a través de una columna de 45 g de gel de sílice y se eluyó con éter y se recogieron fracciones de 75 ml. Se juntaron las fracciones que contenían producto por TLC y se eliminó el éter a vacío. Esto dio 10,1 g de producto bruto. Se sometió el material a cromatografía instantánea en gel de sílice con hexano, cambiando a hexano:éter 9:1. Se juntaron las fracciones que contenían producto y se eliminaron los solventes a vacío. Esto dio 7,4 g (rendimiento del 57%) de producto puro.

Se sometieron una mezcla de paladio al 10% sobre carbono (1 g) y una solución del éster bencílico (10 g) en 150 ml de metanol a hidrogenólisis a 25 psi durante 2 horas. Se filtró la mezcla sobre celita y se lavó el residuo con metanol. Se evaporó el solvente para obtener un aceite viscoso en un rendimiento cuantitativo.

Se llevó a cabo la reacción del bromuro con 1,1,2-trimetil-[1H]-benz[e]indol como se describe en el Ejemplo 1.

## Ejemplo 6

- 50 *Tinte de bis(etilcarboximetildihidroxil)indocianina (Esquema 3)*

Se prepara fácilmente el compuesto hidroxiindólico por un método de la literatura (P. L. Southwick, J. G. Cairns, L. A. Ernst y A. S. Waggoner, One pot Fischer synthesis of (2,3,3-trimethyl-3-H-indol-5-yl)-acetic acid derivatives as intermediates for fluorescent biolabels, *Org. Prep. Proced. Int. Briefs*, 1988, 20(3), 279-284). La reacción de clorhidrato de p-carboximetilfenil-hidrazina (30 mmol, 1 equiv.) y 1,1-bis(hidroximetil)propanona (45 mmol, 1,5 equiv.) en ácido acético (50 mL) a temperatura ambiente durante 30 minutos y a reflujo durante 1 da ácido (3,3-dihidroximetil-2-metil-3-H-indol-5-il)acético como un residuo sólido. La reacción de 3-bromopropil-N,N-bis(carboximetil)amina, que fue preparada como se describe en el Ejemplo 5, con el intermediario indol y la posterior reacción del intermediario indol con dianilmonoclorhidrato de glutacetaldehído (véase el Ejemplo 1) da el producto deseado.

## Ejemplo 9

*Síntesis de péptidos*

65 El procedimiento que se describe a continuación es para la síntesis de Octreotato. Se prepararon otros péptidos por un procedimiento similar con modificaciones menores en algunos casos. Se usaron estos péptidos para ilustrar la facilidad del uso de los tintes de esta invención para preparar bioconjugados.

Se preparó el octapéptido mediante una síntesis peptídica en fase sólida automatizada con fluorenilmetoxicarbonylo (Fmoc) usando un sintetizador peptídico comercial de Applied Biosystems (Modelo 432A SYNERGY Peptide Synthesizer). El primer cartucho peptídico contenía resina de Wang precargada con Fmoc-Thr a una escala 25  $\mu$ molar. Los cartuchos siguientes contenían aminoácidos protegidos con Fmoc con grupos protectores de cadena lateral para los siguientes aminoácidos: Cys(Acm), Thr(t-Bu), Lys(Boc), Trp(Boc) y Tyr(t-Bu). Se pusieron los cartuchos de aminoácidos en el sintetizador peptídico y se sintetizó el producto desde la posición C hasta la posición N-terminal. Se llevó a cabo la reacción de copulación con 75  $\mu$ moles de los aminoácidos protegidos en presencia de hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU)/N-hidroxibenzotriazol (HOBt). Se eliminó el grupo protector Fmoc con piperidina al 20% en dimetilformamida. Tras completarse la síntesis, se cicló el grupo tiol con trifluoroacetato de talio y se escindió el producto del soporte sólido con una mezcla de escisión que contenía ácido trifluoroacético (85%):agua (5%):fenol (5%):tioanisol (5%) durante 6 horas. Se precipitó el péptido con t-butil metil éter y se liofilizó con una mezcla de agua:acetonitrilo (2:3). Se purificó el péptido por HPLC y se analizó con LC/MS. La secuencia de aminoácidos del Octreotato es: D-Phe-Cys'-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys'-Thr, donde Cys' indica la presencia de un puente disulfuro intramolecular entre dos aminoácidos de cisteína.

Se preparó el Octreótido por el mismo procedimiento: D-Phe-Cys'-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys'-Thr-OH, donde Cys' indica la presencia de un puente disulfuro intramolecular entre dos aminoácidos de cisteína.

Se prepararon análogos de bombesina por el mismo procedimiento, excepto por no ser necesaria la ciclación con trifluoroacetato de talio. Se realizaron la desprotección de la cadena lateral y la escisión de la resina con 50  $\mu$ L de cada de etanoditio, tioanisol y agua y 850  $\mu$ L de ácido trifluoroacético. Se prepararon dos análogos: Gly-Ser-Gly-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub> y Gly-Asp-Gly-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH<sub>2</sub>.

Se prepararon análogos del octapéptido de colecistokinina como se ha descrito para el Octreotato sin la etapa de ciclación. Se prepararon tres análogos: Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>; Asp-Tyr-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>; y D-Asp-Tyr-Nle-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>.

Se preparó un análogo de neurotensina como se ha descrito para el Octreotato sin la etapa de ciclación: D-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu.

#### Ejemplo 10

#### *Síntesis de conjugados péptido-tinte*

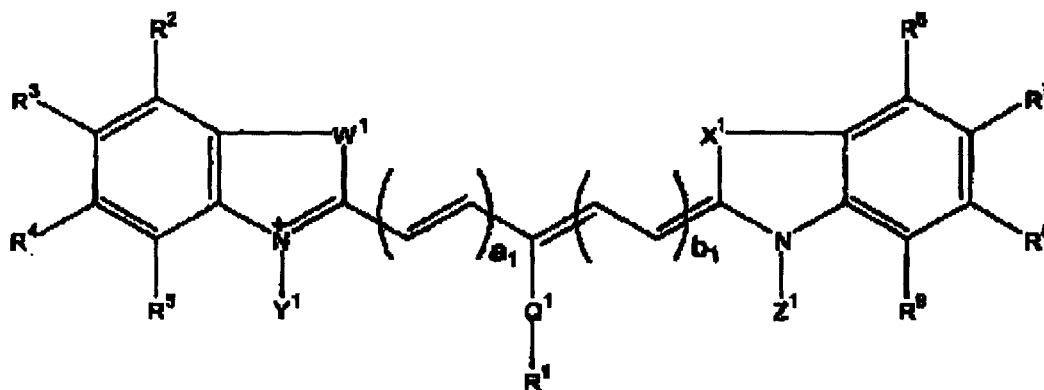
El método que se describe a continuación es para la síntesis de conjugados de Octreotato, pero se usa un procedimiento similar para la síntesis de otros conjugados péptido-tinte.

Se preparó el Octreotato como se ha descrito en el Ejemplo 6, pero no se escindió el péptido del soporte sólido y se conservó el grupo Fmoc N-terminal de la Phe. Se cicló el grupo tiol con trifluoroacetato de talio y se desprotegió la Phe para liberar la amina libre. Se añadió tinte de bisetilcarboximetilindocianina (53 mg, 75  $\mu$ moles) a un reactivo de activación consistente en una solución 0,2 M de HBTU/HOBt en DMSO (375  $\mu$ L) y una solución 0,2 M de diisopropiletilamina en DMSO (375  $\mu$ L). La activación se completó en aproximadamente 30 minutos y se añadió el péptido unido a resina (25  $\mu$ moles) al tinte. Se llevó a cabo la reacción de copulación a temperatura ambiente durante 3 horas. Se filtró la mezcla y se lavó el residuo sólido con DMF, acetonitrilo y THF. Después de secar el residuo verde, se escindió el péptido de la resina y se eliminaron los grupos protectores de cadena lateral con una mezcla de ácido trifluoroacético al 85%, agua al 2,5%, tioanisol al 2,5% y fenol al 2,5%. Se filtró la resina y se usó t-butil metil éter (MTBE) frío para precipitar el conjugado tinte-péptido, que fue disuelto en una mezcla de acetonitrilo:agua (2:3) y liofilizado. Se purificó el producto por HPLC para obtener el tinte de monoOctreotato-bisetilcarboximetilindocianina (Citato 1, 80%) y el tinte de bisOctreotato-Bisetilcarboxi-metilindocianina (Citato 2, 20%). Se puede obtener el conjugado de monoOctreotato casi exclusivamente (>95%) sobre el bisconjugado reduciendo el tiempo de reacción a 2 horas. Sin embargo, esto también conduce a una reacción incompleta y se ha de separar cuidadosamente el Octreotato libre del conjugado de tinte para evitar la saturación de los receptores por el péptido no conjugado a tinte.

Se preparó tinte de Octreotato-bispenitilcarboximetilindocianina como se ha descrito antes con algunas modificaciones. Se añadió tinte de bispenitilcarboximetilindocianina (60 mg, 75  $\mu$ moles) a un reactivo de activación consistente en una solución 0,2 M de HBTU/HOBt en DMSO (400  $\mu$ L) y una solución 0,2 M de diisopropiletilamina en DMSO (400  $\mu$ L). La activación se completó en aproximadamente 30 minutos y se añadió el péptido unido a resina (25  $\mu$ moles) al tinte. Se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. Se filtró la mezcla y se lavó el residuo sólido con DMF, acetonitrilo y THF. Después de secar el residuo verde, se escindió el péptido de la resina y se eliminaron los grupos protectores de cadena lateral con una mezcla de ácido trifluoroacético al 85%, agua al 2,5%, tioanisol 2,5% y fenol al 2,5%. Se filtró la resina y se usó t-butil metil éter (MTBE) frío para precipitar el conjugado tinte-péptido, que fue disuelto en una mezcla de acetonitrilo:agua (2:3) y liofilizado. Se purificó el producto por HPLC para obtener conjugado de Octreotato-ácido 1,1,2-trimetil-[1H]benz[e]indolpropanoico (10%), tinte de monoOctreotato-bispenitilcarboximetilindocianina (Citato 3, 60%) y tinte de bisOctreotato-bispenitilcarboximetilindocianina (Citato 4, 30%).

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para uso en un procedimiento diagnóstico o terapéutico, cuya composición contiene un tinte de cianina de la fórmula general



donde  $a_1$  y  $b_1$  varían de 0 a 5;  $W^1$  y  $X^1$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en  $-CR^{10}R^{11}$ ,  $-O-$ ,  $-NR^{12}$ ,  $-S-$  o  $-Se$ ;  $Q^1$  es un enlace sencillo o es seleccionado entre el grupo consistente en  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-Se-$  y  $-NR^{13}$ ;  $Y^1$  y  $Z^1$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en  $-(CH_2)_c-CO_2H$ ,  $-CH_2-(CH_2-OCH_2)_d-CH_2-CO_2H$ ,  $-(CH_2)_e-NH_2$ ,  $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_f-CH_2-NH_2$ ,  $-(CH_2)_g-N(R^{14})-(CH_2)_h-CO_2H$  o  $-(CH_2)_i-N(R^{15})-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_j-CH_2-CO_2H$ ;  $c, e, g, h$  e  $i$  varían de 1 a 10;  $d, f$  y  $j$  varían de 1 a 100;  $R^1$  y  $R^{10}$  a  $R^{15}$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_{10}$ , arilo  $C_1-C_{10}$ , alcoxi-  
lo  $C_1-C_{10}$ , polialcoxialquilo  $C_1-C_{10}$ ,  $-CH_2(CH_2-OCH_2)_c-CH_2-OH$ , polihidroxi-  
alquilo  $C_1-C_{20}$ , polihidroxiarilo  $C_1-C_{10}$ ,  $-(CH_2)_d-CO_2H$ ,  $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_e-CH_2-CO_2H$ ,  $-(CH_2)_f-NH_2$  o  $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_g-CH_2-NH_2$ ; y  $R^2$  a  $R^9$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_{10}$ , arilo  $C_1-C_{10}$ , hidroxilo, polihidroxi-  
alquilo  $C_1-C_{10}$ , alcoxi-  
lo  $C_1-C_{10}$ , amino, aminoalquilo  $C_1-C_{10}$ , ciano, nitro o halógeno.

2. La composición de la reivindicación 1 para uso en tomografía óptica.

3. La composición de la reivindicación 1 para uso en la monitorización de un perfil de aclaramiento sanguíneo del tinte de cianina por fluorescencia, absorbancia o dispersión de la luz.

4. La composición de la reivindicación 1, donde el procedimiento terapéutico utiliza luz de longitud de onda en la región de 350-1300 nm.

5. La composición de la reivindicación 1 ó 4, donde el procedimiento terapéutico incluye una técnica de absorción de la luz, dispersión de la luz, fotoacústica o de sonofluorescencia.

6. La composición de la reivindicación 1 ó 4 para uso en terapia localizada.

7. La composición de la reivindicación 1 ó 4 para uso en terapia fotodinámica.

8. La composición de la reivindicación 1 ó 4, donde dicho procedimiento terapéutico incluye la cirugía guiada asistida por láser (CGAL).

9. La composición de la reivindicación 8, donde la cirugía guiada asistida por láser (CGAL) es para la detección de micrometástasis de tumores.

10. Una composición según la reivindicación 1 para administración parenteral o enteral a un paciente.

11. La composición de la reivindicación 10, donde la composición es para administración parenteral e incluye además un soporte y/o excipiente farmacéutico.

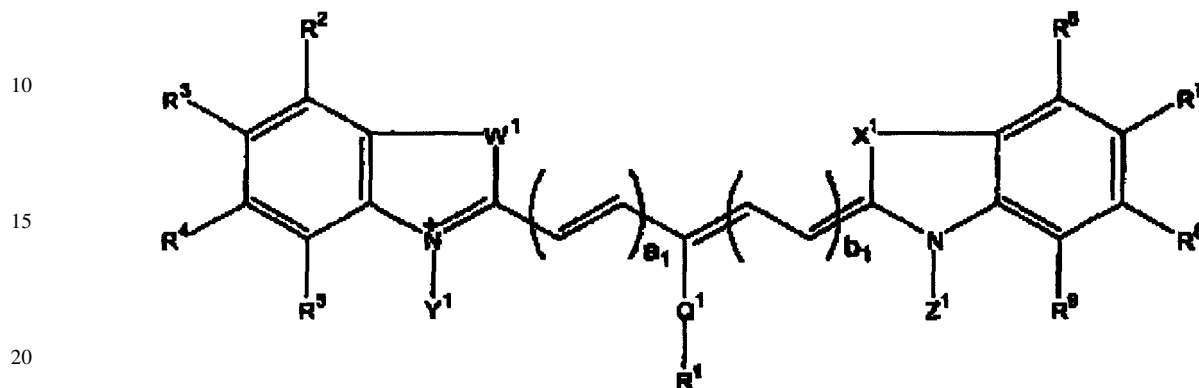
12. La composición de la reivindicación 10, donde la composición es para administración parenteral y se mezcla con otra composición parenteral para administración sistémica.

13. La composición de la reivindicación 10, donde la composición es para administración enteral y eventualmente incluye tampones, surfactantes, agentes tixotrópicos y similares.

14. La composición de la reivindicación 10 ó 13, donde la composición es para administración oral e incluye agentes saborizantes.

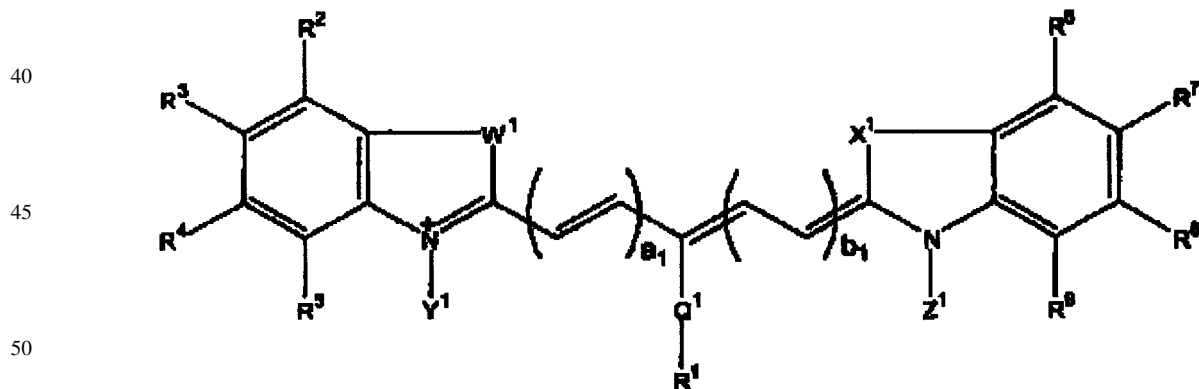
15. La composición de la reivindicación 10, 13 o 14, donde la composición es para administración oral e incluye ingredientes para aumentar las cualidades organolépticas.

5 16. Un bioconjugado de tinte para uso en el diagnóstico de placas ateroscleróticas y coágulos sanguíneos, derivando el bioconjugado de tinte de un tinte de la fórmula general



donde  $a_1$  y  $b_1$  varían de 0 a 5;  $W^1$  y  $X^1$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en  $-CR^{10}R^{11}$ ,  $-O-$ ,  $-NR^{12}$ ,  $-S-$  o  $-Se$ ;  $Q^1$  es un enlace sencillo o es seleccionado entre el grupo consistente en  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-Se-$  y  $-NR^{13}$ ;  $Y^1$  y  $Z^1$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en  $-(CH_2)_c-CO_2H$ ,  $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_d-CH_2-CO_2H$ ,  $-(CH_2)_e-NH_2$ ,  $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_f-CH_2-NH_2$ ,  $-(CH_2)_g-N(R^{14})-(CH_2)_h-CO_2H$  o  $-(CH_2)_i-N(R^{15})-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_j-CH_2-CO_2H$ ;  $c, e, g, h$  e  $i$  varían de 1 a 10;  $d, f$  y  $j$  varían de 1 a 100;  $R^1$  y  $R^{10}$  a  $R^{15}$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_{10}$ , arilo  $C_1-C_{10}$ , alcoxi-  
lo  $C_1-C_{10}$ , polialcoxiarilo  $C_1-C_{10}$ ,  $-CH_2(CH_2-O-CH_2)_c-CH_2-OH$ , polihidroxiarilo  $C_1-C_{10}$ ,  $-(CH_2)_d-CO_2H$ ,  $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_e-CH_2-CO_2H$ ,  $-(CH_2)_f-NH_2$  o  $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_g-CH_2-NH_2$ ; y  $R^2$  a  $R^9$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_{10}$ , arilo  $C_1-C_{10}$ , hidroxilo, polihidroxiarilo  $C_1-C_{10}$ , alcoxi-  
lo  $C_1-C_{10}$ , amino, aminoalquilo  $C_1-C_{10}$ , ciano, nitro o halógeno.

17. Un método de preparación de un bioconjugado de tinte según la reivindicación 16, cuyo método consiste en  
conjugar un tinte de cianina de la siguiente fórmula general a un péptido o una biomolécula por síntesis en fase sólida:



donde  $a_1$  y  $b_1$  varían de 0 a 5;  $W^1$  y  $X^1$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en  $-CR^{10}R^{11}$ ,  $-O-$ ,  $-NR^{12}$ ,  $-S-$  o  $-Se$ ;  $Q^1$  es un enlace sencillo o es seleccionado entre el grupo consistente en  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-Se-$  y  $-NR^{13}$ ;  $Y^1$  y  $Z^1$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en  $-(CH_2)_c-CO_2H$ ,  $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_d-CH_2-CO_2H$ ,  $-(CH_2)_e-NH_2$ ,  $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_f-CH_2-NH_2$ ,  $-(CH_2)_g-N(R^{14})-(CH_2)_h-CO_2H$  o  $-(CH_2)_i-N(R^{15})-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_j-CH_2-CO_2H$ ;  $c, e, g, h$  e  $i$  varían de 1 a 10;  $d, f$  y  $j$  varían de 1 a 100;  $R^1$  y  $R^{10}$  a  $R^{15}$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_{10}$ , arilo  $C_1-C_{10}$ , alcoxi-  
lo  $C_1-C_{10}$ , polialcoxiarilo  $C_1-C_{10}$ ,  $-CH_2(CH_2-O-CH_2)_c-CH_2-OH$ , polihidroxiarilo  $C_1-C_{10}$ ,  $-(CH_2)_d-CO_2H$ ,  $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_e-CH_2-CO_2H$ ,  $-(CH_2)_f-NH_2$  o  $-CH_2-(CH_2-O-CH_2)_g-CH_2-NH_2$ ; y  $R^2$  a  $R^9$  pueden ser iguales o diferentes y son seleccionados entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo  $C_1-C_{10}$ , arilo  $C_1-C_{10}$ , hidroxilo, polihidroxiarilo  $C_1-C_{10}$ , alcoxi-  
lo  $C_1-C_{10}$ , amino, aminoalquilo  $C_1-C_{10}$ , ciano, nitro o halógeno.

18. El método de la reivindicación 17, donde el bioconjugado de tinte es un monoconjugado.

19. El método de la reivindicación 17, donde el bioconjugado de tinte es un bisconjugado.

## ES 2 309 609 T3

20. El método de la reivindicación 17, donde el tinte de cianina es conjugado a colecistokinina.

21. El método de la reivindicación 17, donde el tinte de cianina es conjugado a bombesina.

5 22. El método de la reivindicación 17, donde el tinte de cianina es conjugado a octreoato.

23. El método de la reivindicación 17, donde el tinte de cianina es conjugado a neurotensina.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65