



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 444**

51 Int. Cl.:  
**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03706606 .5**

86 Fecha de presentación : **07.03.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1480683**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

54 Título: **Agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano y método para la formación de imágenes por fluorescencia.**

30 Prioridad: **07.03.2002 JP 2002-109794**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

73 Titular/es: **FUJIFILM Corporation**  
**26-30, Nishiazabu 2-chome**  
**Minato-ku, Tokyo, JP**  
**Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft**

72 Inventor/es: **Kawakami, Masayuki;**  
**Kitaguchi, Hiroshi;**  
**Licha, Kai;**  
**Perlitz, Christin;**  
**Eguchi, Hiroaki;**  
**Tsuda, Natsuko y**  
**Aikawa, Kazuhiro**

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

ES 2 305 444 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

Agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano y método para la formación de imágenes por fluorescencia.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano, y a un método de formación de imágenes por fluorescencia que usa dicho agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano.

10 **Antecedentes de la técnica**

Al tratar una enfermedad, es importante detectar cambios morfológicos y funcionales provocados por la enfermedad en el organismo vivo en una etapa temprana de la enfermedad. Especialmente para el tratamiento de un cáncer, saber de antemano el sitio y tamaño del tumor es un medio extremadamente importante para determinar estrategias y protocolos para un tratamiento futuro. Los métodos aplicados hasta ahora incluyen biopsia mediante punción, así como diagnóstico mediante formación de imágenes, tal como formación de imágenes mediante rayos X, MRI y formación de imágenes por ultrasonidos. La biopsia es un medio eficaz para el diagnóstico definitivo; sin embargo, coloca una gran carga sobre el paciente a diagnosticar, y tampoco es adecuada para hacer un seguimiento de los cambios con el tiempo en las lesiones. La formación de imágenes mediante rayos X y la MRI provocan la exposición del paciente a diagnosticar a una irradiación o a una onda electromagnética. Además, los diagnósticos mediante formación de imágenes convencionales, como se menciona anteriormente, requieren una operación complicada y un tiempo prolongado para la medida y el diagnóstico. Un tamaño grande del aparato también hace difícil aplicar estos métodos durante la operación quirúrgica.

Uno de los diagnósticos mediante imágenes dados a conocer incluye la formación de imágenes por fluorescencia (Lipsprn R. L. *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 26, 1-11 (1961)). Este método emplea una sustancia como agente de contraste que emite fluorescencia al exponerla a una luz de excitación que tiene una longitud de onda específica. El método comprende la etapa de exponer un cuerpo a una luz de excitación desde fuera del cuerpo, y después detectar la fluorescencia emitida *in vivo* por el agente de contraste fluorescente.

Un ejemplo del agente de contraste fluorescente incluye, por ejemplo, un compuesto de porfirina, que se acumula en el tumor y se usa para terapia fotodinámica (PDT), por ejemplo hematoporfirina. Otros ejemplos incluyen fotofirina y benzoporfirina (véase, Lipsprn R. L. *et al.*, más arriba, Meng T. S. *et al.*, SPIE, 1641, 90-98 (1992), documento WO 84/04665).

Sin embargo, estos compuestos tienen fototoxicidad puesto que originalmente se usan para PDT (la PDT requiere tal propiedad), y en consecuencia estos compuestos no son deseables como agentes de diagnóstico.

Se conoce (patente U.S. n° 4945239) la microangiografía circulatoria retiniana, que usa un colorante fluorescente conocido, tal como fluoresceína, fluorescamina y riboflavina. Sin embargo, estos colorantes fluorescentes emiten fluorescencia en una región de la luz visible de 400-600 nm, que sólo logra una baja transmisión a través de tejido vivo, y en consecuencia la detección de una lesión en una parte más profunda de un cuerpo es casi imposible.

También se ha dado a conocer que los compuestos de cianina, incluyendo el verde de indocianina (en lo sucesivo abreviado como "ICG"), que se usan para determinar la función hepática y el gasto cardíaco, son útiles como agentes de contraste fluorescentes (Haglund M. M. *et al.*, Neurosurgery, 35, 930 (1994), Li, X. *et al.*, SPIE, 2389, 789-797 (1995)). Los compuestos de cianina tienen una absorbancia en la región de la luz infrarroja cercana (700 a 1300 nm).

La luz infrarroja cercana tiene una elevada propiedad de transmisión a través de tejidos vivos, y puede pasar a través del cráneo alrededor de 10 cm, y por estas razones dicha luz se ha focalizado recientemente en el campo de la medicina clínica. Por ejemplo, la técnica de CT óptica (una técnica de CT que usa la transmisión óptica de un medio) ha centrado la atención como una nueva tecnología en el campo clínico, debido a que la luz infrarroja cercana puede pasar a través de un organismo vivo y, usando una luz dentro de esta región, se puede detectar la concentración y circulación de oxígeno *in vivo*.

Los compuestos de cianina emiten fluorescencia en la región del infrarrojo cercano, una luz de esa región tiene excelente permeabilidad en tejidos vivos como se ha explicado anteriormente, y en consecuencia se ha propuesto un uso como agente de contraste fluorescente. En años recientes se han desarrollado diversos compuestos de cianina, y se han realizado enfoques para usarlos como agentes de contraste fluorescentes (documentos WO 96/17628, WO 97/13490). Sin embargo, aún no hay disponible ningún agente que tenga una capacidad satisfactoria para distinguir una lesión de tejidos normales, es decir, un agente que tenga una selectividad satisfactoria por un sitio diana del que se va a formar su imagen.

Los documentos EP-A 1308480 y WO-A-0212398 describen colorantes para uso en la fabricación de materiales fotográficos de haluros de plata sensibles a la luz. En esos documentos no se indica que los colorantes pueden ser adecuados para aplicaciones médicas o de diagnóstico.

El documento WO 97/13490 describe agentes de contraste para el diagnóstico mediante los rayos infrarrojos cercanos, que comprenden colorantes de polimetina. Los colorantes del documento WO 97/13490 son estructuralmente diferentes de los colorantes de la presente Solicitud.

5 El documento EP-A-1152008 describe nucleótidos fluorescentes que contienen un colorante fluorescente. El colorante fluorescente es estructuralmente diferente del colorante de la presente Solicitud.

El documento WO 01/53292 describe colorantes de cianina e indocianina para uso en la formación de imágenes, diagnóstico y terapia. Estos colorantes son estructuralmente diferentes de los colorantes de la presente Solicitud.

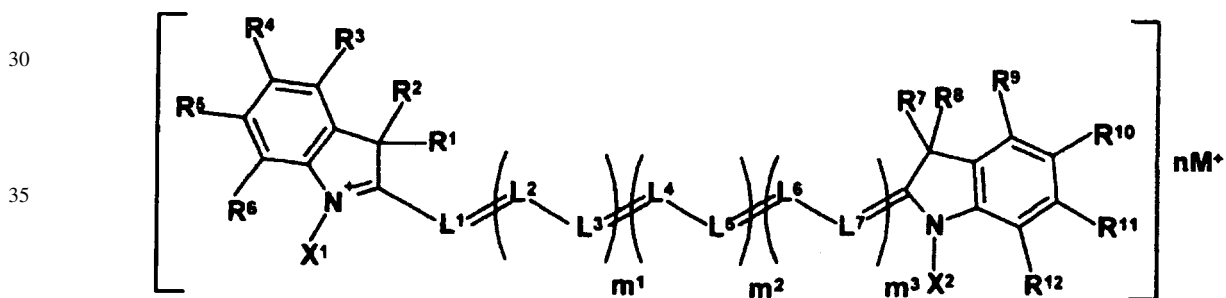
10

### Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un agente de contraste fluorescente que emite fluorescencia en la región del infrarrojo cercano, que es excelente en cuanto a la permeabilidad en un tejido vivo, y permite la formación de imágenes específicas de tumores y/o vasos sanguíneos. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de formación de imágenes mediante fluorescencia usando dicho agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano.

Se han realizado diversos estudios para lograr los objetos anteriores. Como resultado, introduciendo un grupo ácido carboxílico o un grupo arílico en los colorantes de cianina, se ha tenido éxito proporcionando un agente de contraste fluorescente que tiene una gran selectividad con los tumores. También se ha tenido éxito estableciendo un método para la formación de imágenes mediante fluorescencia usando dicho agente de contraste. Basándose en los hallazgos anteriores, se ha logrado la presente invención.

25 La presente invención proporciona de este modo un compuesto representado mediante la siguiente fórmula [I], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



en la que

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^7$  y  $R^8$  representan independientemente un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_{10}$  sustituido o no sustituido, o un grupo arilo sustituido o no sustituido, y  $R^1$  y  $R^2$ , y/o  $R^7$  y  $R^8$ , se pueden unir entre sí para formar un anillo;

45

$R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$  y  $R^{12}$  representan independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_6$  sustituido o no sustituido, un grupo arilo sustituido o no sustituido, un átomo de halógeno, un grupo ciano, un grupo carboxilo, un grupo sulfo, o un grupo heteroarilo sustituido o no sustituido, en el que el grupo heteroarilo se selecciona de un grupo tienilo, un grupo benzotienilo, un grupo furilo, un grupo benzofurilo, un grupo pirrolilo, un grupo imidazolilo, y un grupo quinolilo, y sus sustituyentes se seleccionan de un grupo hidroxilo, un átomo de halógeno, un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_6$ , un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_6$  halogenado, un grupo alcoxi de  $C_1$ - $C_6$ , un grupo alquilen  $C_1$ - $C_6$ -dioxi, un grupo carboxilo, un grupo alcoxi  $C_1$ - $C_6$ -carbonilo, un grupo amino no sustituido, un grupo amino sustituido con alquilo de  $C_1$ - $C_6$ , un grupo sulfo, y un grupo ciano, y  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$  y  $R^{12}$  se pueden unir entre sí para formar un anillo;

55

$m^1$  representa 0 ó 1;

$m^2$  representa 0 ó 1;

60

$m^3$  representa 0 ó 1;

$L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^5$ ,  $L^6$ , y  $L^7$  representan independientemente un grupo metino sustituido o no sustituido, con la condición de que cuando dos o más de los grupos metino tengan sustituyentes, los sustituyentes se puedan unir entre sí para formar un anillo;

65

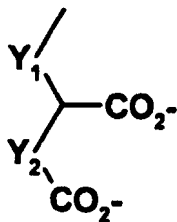
M representa un átomo de hidrógeno, un metal, o una sal de amonio cuaternario;

n representa un número entero de 1 a 7, necesario para neutralizar la carga,

## ES 2 305 444 T3

X<sup>2</sup> representa un grupo alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>15</sub> sustituido o no sustituido, o un grupo arilo sustituido o no sustituido, y X<sup>1</sup> es un grupo representado por la siguiente fórmula (i):

5



10

15 en la que Y<sup>1</sup> y Y<sup>2</sup> representan independientemente un grupo enlazante divalente, sustituido o no sustituido, X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> en total tienen 2 a 4 grupos carboxilo, para uso en un método de formación *in vivo* de imágenes mediante fluorescencia.

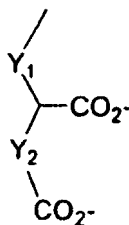
15

Según una realización preferida de la invención anterior, cada uno de m<sup>1</sup>, m<sup>2</sup> y m<sup>3</sup> es simultáneamente 1.

20

Según una realización más preferida, X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan independientemente un grupo representado por la siguiente fórmula (i):

25



30

en la que Y<sup>1</sup> y Y<sup>2</sup> representan independientemente un enlace divalente sustituido o no sustituido.

35

Según otra realización preferida, al menos uno de R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup>, R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> es un grupo arilo sustituido o no sustituido, o un grupo heteroarilo sustituido o no sustituido, y según todavía otra realización preferida, al menos uno de R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> es un grupo arilo sustituido o no sustituido, o un grupo heteroarilo sustituido o no sustituido; y cada uno de X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> es independientemente un grupo carboxialquilo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o un grupo sulfoalquilo.

40

Preferiblemente, el número de grupos sulfo en una molécula es dos o menos.

Según otra realización preferida, Y<sub>1</sub> representa -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>CONH-, en el que p representa un número entero de 1 a 4, e Y<sub>2</sub> representa -(CH<sub>2</sub>)- o (CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-.

45

El compuesto mencionado anteriormente se puede usar preferiblemente para la formación de imágenes de tumores o para angiografía.

50

Desde otro aspecto, se proporciona un agente de contraste fluorescente del infrarrojo que comprende un compuesto según se define anteriormente. Un método de formación de imágenes mediante fluorescencia comprende las etapas de introducir el agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano mencionado anteriormente en un cuerpo vivo, exponer dicho cuerpo a una luz de excitación, y detectar la fluorescencia del infrarrojo cercano procedente del agente de contraste.

55

### Breve explicación de los dibujos

La Fig. 1 es una fotografía que muestra los resultados de la formación de imágenes mediante fluorescencia a unos tiempos dados después de la administración del Compuesto 2 de la presente invención.

60

La Fig. 2 es una fotografía que muestra los resultados de la formación de imágenes mediante fluorescencia a unos tiempos dados después de la administración de ICG como referencia.

La Fig. 3 es una fotografía que muestra los resultados de la formación de imágenes mediante fluorescencia a unos tiempos dados después de la administración del Compuesto A como referencia.

65

La Fig. 4 es una vista esquemática de un montaje experimental para la formación de imágenes mediante fluorescencia en el Ejemplo 2 de Ensayo. En la figura, SHG representa la generación del segundo armónico; THG representa la generación del tercer armónico; y OPO representa el oscilador paramétrico óptico.

## ES 2 305 444 T3

La Fig. 5 es una fotografía que muestra los resultados de la formación de imágenes mediante fluorescencia a unos tiempos dados después de la administración del Compuesto 5 de la presente invención.

La Fig. 6 es una fotografía que muestra los resultados de la formación de imágenes mediante fluorescencia a unos tiempos dados después de la administración del Compuesto 7 de la presente invención.

La Fig. 7 es una fotografía que muestra los resultados de la formación de imágenes mediante fluorescencia a unos tiempos dados después de la administración del Compuesto 10 de la presente invención.

La Fig. 8 es una fotografía que muestra los resultados de la formación de imágenes mediante fluorescencia a unos tiempos dados después de la administración del Compuesto B como referencia.

### Mejor modo para llevar a cabo la invención

El grupo alquilo de  $C_1$ - $C_{10}$ , representado por  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^7$  y  $R^8$ , puede ser lineal, ramificado, cíclico, o una combinación de los mismos (un grupo alquilo y un resto alquilo de un grupo funcional que contiene el resto alquilo tienen el mismo significado en la memoria descriptiva, excepto que se mencione específicamente de otro modo). Como el grupo alquilo no sustituido, se puede usar, por ejemplo, el grupo metilo, el grupo etilo, el grupo propilo, el grupo butilo, y el grupo hexilo. El número, tipo o posición de sustituyentes en el grupo alquilo sustituido no está particularmente limitado. Como el alquilo sustituido, se puede usar, por ejemplo, un grupo sulfoalquilo, un grupo carboxilalquilo, un grupo hidroxialquilo, un grupo alcoxilalquilo, un grupo aminoalquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo cianoalquilo, un grupo alquilo sustituido con arilo, o un grupo alquilo sustituido con heteroarilo.

El grupo arilo representado por  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^7$  y  $R^8$  puede ser un anillo monocíclico o un anillo condensado, por ejemplo se puede usar un grupo arilo de  $C_6$ - $C_{14}$ , preferiblemente un grupo arilo de  $C_6$ - $C_{10}$  (un grupo arilo y un resto arilo de un grupo funcional que contiene el resto arilo tienen el mismo significado, excepto que se mencione específicamente de otro modo). Como el grupo arilo, se puede usar preferiblemente el grupo fenilo o el grupo naftilo, más preferiblemente el grupo fenilo. Como el grupo arilo sustituido, se puede usar el grupo sulfofenilo, el grupo hidroxifenilo, el grupo aminofenilo.

Además,  $R^1$  y  $R^2$ ,  $R^7$  y  $R^8$  se pueden unir entre sí para formar un anillo. Los ejemplos del anillo formado incluyen, por ejemplo, un anillo de ciclopentilo o un anillo de ciclohexilo.

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^7$  y  $R^8$  son preferiblemente un grupo metilo o un grupo etilo, más preferiblemente un grupo metilo.

$R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$  y  $R^{12}$  representan independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_6$  sustituido o no sustituido, un grupo arilo sustituido o no sustituido, un grupo heteroarilo sustituido o no sustituido, un átomo de halógeno, un grupo ciano, un grupo carboxilo, o un grupo sulfo; y dos grupos adyacentes, seleccionados del grupo que consiste en  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  y  $R^6$ , o aquellos seleccionados del grupo que consiste en  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$  y  $R^{12}$ , se pueden unir independientemente entre sí para formar un anillo. El anillo formado puede estar saturado o insaturado, y puede ser un anillo hidrocarbonado o un anillo heterocíclico. Por ejemplo,  $R^3$  y  $R^4$ ,  $R^4$  y  $R^5$ ,  $R^5$  y  $R^6$ ,  $R^9$  y  $R^{10}$ ,  $R^{10}$  y  $R^{11}$ , o  $R^{11}$  y  $R^{12}$  se pueden unir entre sí para formar un anillo bencénico o un anillo heterocíclico aromático, tal como un anillo de piridina. Los ejemplos preferidos incluyen un anillo bencénico formado mediante la unión de  $R^3$  y  $R^4$ , o  $R^9$  y  $R^{10}$ .

Como grupo arilo representado por  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$  y  $R^{12}$ , se puede usar, por ejemplo, un grupo fenilo o un grupo naftilo; como el grupo heteroarilo, se puede usar, por ejemplo, un grupo tienilo, un grupo benzotienilo, un grupo furilo, un grupo benzofurilo, un grupo pirrolilo, un grupo imidazolilo, o un grupo quinolilo. En el grupo arilo y en el grupo heteroarilo puede haber uno a cuatro sustituyentes opcionales. La posición de los sustituyentes no está limitada, y cuando hay dos o más sustituyentes, estos pueden ser iguales o diferentes. Como tales sustituyentes, se puede usar, por ejemplo, un grupo hidroxilo, un átomo de halógeno tal como un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo, y un átomo de yodo; un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_6$ , tal como un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo n-propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo; un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_6$  halogenado, tal como un grupo trifluorometilo; un grupo alcoxilo de  $C_1$ - $C_6$ , tal como un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo n-propoxi, un grupo isopropoxi, un grupo n-butoxi, un grupo sec-butoxi, un grupo terc-butoxi; un grupo alquilendioxi de  $C_1$ - $C_6$ , tal como un grupo metilendioxi, un grupo etilendioxi; un grupo carboxilo; un grupo alcoxicarbonilo de  $C_1$ - $C_6$ ; un grupo amino no sustituido; un grupo amino sustituido con alquilo de  $C_1$ - $C_6$ , tal como un grupo metilamino, un grupo dimetilamino, un grupo etilamino; un grupo sulfo, o un grupo ciano.

$X^1$  y  $X^2$  representan independientemente un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_{15}$  sustituido o no sustituido, o un grupo arilo sustituido o no sustituido, y  $X^1$  y  $X^2$  tienen uno a cuatro grupos carboxilo en total de  $X^1$  y  $X^2$ . Como el alquilo no sustituido representado por  $X^1$  y  $X^2$ , se puede usar, por ejemplo, un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo pentilo, un grupo isopentilo, un grupo neopentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo 2-metilpropilo, o un grupo 1,1-dimetilpropilo. El grupo alquilo puede ser lineal, ramificado, cíclico, o una combinación de los mismos, y se prefiere un grupo alquilo lineal o ramificado.

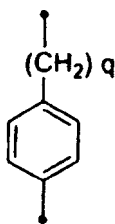
Como grupo alquilo sustituido representado por  $X^1$  y  $X^2$ , se puede usar, por ejemplo, un grupo sulfoalquilo (tal como un grupo 2-sulfoetilo, un grupo 3-sulfopropilo, un grupo 3-metil-3-sulfopropilo o un grupo 4-sulfobutilo), un

## ES 2 305 444 T3

grupo carboxialquilo (tal como un grupo 1-carboximetilo, un grupo 2-carboxietilo, un grupo 3-carboxipropilo, un grupo 4-carboxibutilo, y similar), un grupo hidroxialquilo, un grupo alcoxialquilo, un grupo aminoalquilo, un grupo alquilo halogenado, un grupo cianoalquilo, un grupo alquilo sustituido con heteroarilo, un grupo arilo, o un grupo heteroarilo. El resto alquílico de estos grupos es el mismo que los definidos en el grupo alquilo no sustituido mencionado anteriormente. Como el grupo arilo sustituido o no sustituido representado por R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>7</sup> y R<sup>8</sup>, se puede usar un grupo fenilo, un grupo sulfofenilo, un grupo hidroxifenilo, o un grupo aminofenilo.

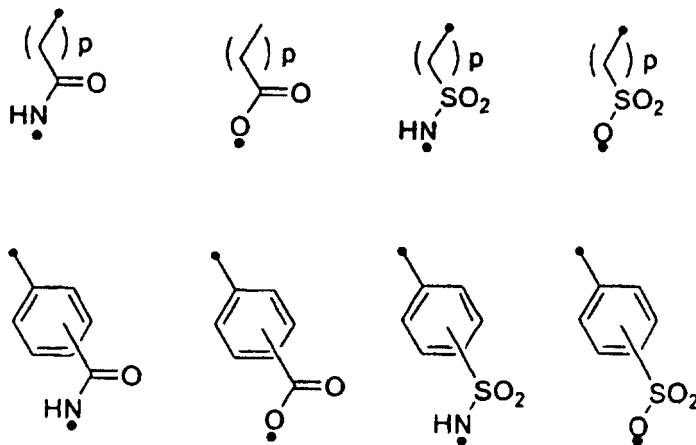
Cuando el número de grupos carboxilo de X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> es 0 ó 1, se puede usar, como X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup>, un grupo carboxialquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> o un grupo sulfoalquilo.

Como el grupo enlazante divalente representado por Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup>, se puede usar, por ejemplo, un grupo alquilenos de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido o no sustituido, tal como un grupo metileno, un grupo etileno, un grupo n-butileno, un grupo metilpropileno, o un grupo fenileno. Como otro ejemplo, se puede usar un grupo enlazante representado mediante la siguiente fórmula:

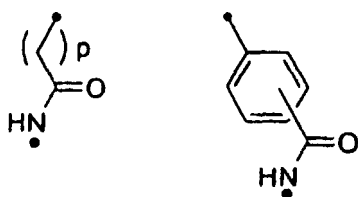


en la que q representa un número entero de 1 a 4, y el símbolo “.” representa una posición enlazante. Estos grupos hidrocarbonados pueden tener sustituyentes, y pueden contener uno o más heteroátomos. Por ejemplo, pueden contener un enlace de tipo éter, un enlace de tipo tioéter, un enlace de disulfuro, un enlace de amida, un enlace de éster, un enlace de sulfonamida, o un enlace de sulfoéster.

Como el grupo enlazante divalente representado por Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup>, también se puede usar, por ejemplo, un enlace representado mediante la siguiente fórmula:



en la que p representa un número entero de 1 a 4, y el símbolo “.” representa una posición enlazante. Un ejemplo preferido de Y<sup>1</sup> incluye un grupo enlazante representado mediante la siguiente fórmula:

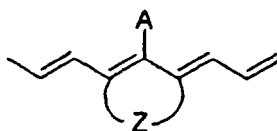


en las que p representa un número entero de 1 a 4. Lo más preferible, Y<sup>1</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-CO-NH- (en el que p representa un número entero de 1 a 4). Los ejemplos preferidos de Y<sup>2</sup> incluyen un grupo metileno o un grupo etileno.

## ES 2 305 444 T3

$L^1, L^2, L^3, L^4, L^5, L^6$  y  $L^7$  representan independientemente un grupo metino sustituido o no sustituido, en la que  $m^1, m^2$  y  $m^3$  representan independientemente 0 ó 1. Se prefiere que cada uno de  $m^1, m^2$  y  $m^3$  sea simultáneamente 1. Los ejemplos del sustituyente en el grupo metino incluyen un grupo alquilo sustituido o no sustituido, un átomo de halógeno, un grupo arilo sustituido o no sustituido, o un grupo alcoxi inferior, y similar. Un ejemplo específico del grupo arilo sustituido incluye el grupo 4-clorofenilo, y similar. El grupo alcoxi inferior puede ser preferiblemente un grupo alcoxi de  $C_1-C_6$ , que puede ser lineal o ramificado. Los ejemplos específicos incluyen un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo propoxi, un grupo butoxi, un grupo terc-butoxi, un grupo pentiloxi, y similar, y se prefiere un grupo metoxi o un grupo etoxi. Como el sustituyente del grupo metino, se puede usar preferiblemente un grupo metilo o un grupo fenilo.

Cuando los grupos metino seleccionados de  $L^1, L^2, L^3, L^4, L^5, L^6$  y  $L^7$  están sustituidos, los sustituyentes en los grupos metino se pueden unir entre sí para formar un anillo. Preferiblemente, los sustituyentes en los grupos metino se pueden unir para formar un anillo que contiene tres grupos metino sucesivos, seleccionados del grupo que consiste en  $L^1, L^2, L^3, L^4, L^5, L^6$  y  $L^7$ . Como ejemplo en el que los sustituyentes en los grupos metino se unen entre sí para formar un anillo que contiene tres grupos metino sucesivos seleccionados del grupo de  $L^1, L^2, L^3, L^4, L^5, L^6$  y  $L^7$ , se incluye, por ejemplo, un compuesto en el que se forma un anillo de 4,4-dimetilciclohexeno para que contenga  $L^3, L^4$  y  $L^5$ . Un ejemplo particularmente preferido de una estructura parcial en la que una cadena metínica conjugada, formada por grupos metino seleccionados del grupo de  $L^1, L^2, L^3, L^4, L^5, L^6$  y  $L^7$  contiene un anillo, incluye un grupo representado por la siguiente fórmula general (a):



en la que Z representa un grupo atómico no metálico, necesario para formar un anillo de 5 ó 6 miembros, y A representa un átomo de hidrógeno o un grupo monovalente.

Los ejemplos del grupo atómico no metálico necesario para formar un anillo de 5 a 10 miembros representado por Z incluyen, por ejemplo, un átomo de carbono, un átomo de nitrógeno, un átomo de oxígeno, un átomo de hidrógeno, un átomo de azufre y un átomo de halógeno (átomo de flúor, átomo de cloro, átomo de bromo, átomo de yodo). Los ejemplos del anillo de 5 ó 6 miembros en la estructura parcial representada por la fórmula (a) incluyen, por ejemplo, un anillo de ciclopenteno, un anillo de ciclohexeno, y un anillo de 4,4-dimetilhexeno, y se prefiere un anillo de ciclopenteno o un anillo de ciclohexeno.

Ejemplos del grupo monovalente representado por A incluyen, por ejemplo, un grupo alquilo sustituido o no sustituido, un grupo arilo sustituido o no sustituido, un grupo aralquilo sustituido o no sustituido, un grupo alcoxi inferior sustituido o no sustituido, un grupo amino sustituido o no sustituido, un grupo alquilcarboniloxi (tal como acetoxi) sustituido o no sustituido, un grupo alquiltio sustituido o no sustituido, un grupo ariltio sustituido o no sustituido, un grupo ciano, un grupo nitro y un átomo de halógeno.

Los ejemplos específicos del grupo aralquilo representado por A incluyen un grupo bencilo, un grupo 2-feniletilo y 3-fenilpropilo. Los ejemplos del sustituyente del grupo aralquilo incluyen, por ejemplo, un grupo sulfo, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo sustituido o no sustituido, un grupo alcoxi, y un átomo de halógeno.

Los ejemplos específicos del grupo amino sustituido representado por A incluyen, por ejemplo, un grupo alquilamino (tal como un grupo metilamino o un grupo etilamino), un grupo dialquilamino (tal como un grupo dimetilamino o un grupo dietilamino), un grupo fenilamino, un grupo difenilamino, un grupo metilfenilamino, un grupo amino cíclico (tal como un grupo morfolino, un grupo imidazolidino, o un grupo etoxicarbonilpiperidino). Cuando el grupo amino sustituido tiene un sustituyente adicional, como sustituyente se puede usar un grupo sulfo o un grupo carboxilo. Los ejemplos específicos del grupo ariltio representado por A incluyen un grupo feniltio y un grupo naftiltio, y los ejemplos de un sustituyente del grupo ariltio incluyen un grupo sulfo y un grupo carboxilo.

Los ejemplos del grupo monovalente representado por A incluyen un grupo fenilamino, un grupo difenilamino, un grupo etoxicarbonilpiperazino y un grupo ariltio.

Y representa un átomo no metálico necesario para formar un anillo heterocíclico de 5 a 10 miembros, preferiblemente un anillo heterocíclico de 5 ó 6 miembros (el anillo heterocíclico puede ser un anillo condensado). Los ejemplos del anillo heterocíclico de 5 a 10 miembros formado por Y incluyen los siguientes anillos: un anillo de tiazol (tal como tiazol o 4-metiltiazol), un anillo de benzotiazol (tal como benzotiazol o 4-clorobenzotiazol), un anillo de naftotiazol (tal como nafto[2,1-d]-tiazol o nafto[1,2-d]tiazol), un anillo de tiazolina (tal como tiazolina o 4-metiltiazolina), un anillo de oxazol (tal como oxazol o 4-nitrooxazol), benzoxazol (tal como benzoxazol o 4-clorobenzoxazol), naftoxazol (tal como nafto[2,1-d]oxazol o nafto[1,2-d]oxazol), un anillo de selenazol (tal como selenazol o 4-fenilselenazol), un anillo de benzoselenazol (tal como benzoselenazol, 4-clorobenzoselenazol), un anillo de nafto-

## ES 2 305 444 T3

5 selenazol (tal como nafto[2,1-d]selenazol o nafto[1,2-d]selenazol), un anillo de 3,3-dialquilindolenina (tal como 3,3-dinitroindolenina, 3,3-dietilindolenina o 3,3-dimetil-5-nitroindolenina), un anillo imidazol (tal como 1-alkilimidazol o 1-alkil-4-fenilimidazol), un anillo de piridina (tal como 2-piridina o 5-metil-2-piridina), un anillo de quinolina (tal como 2-quinolina o 3-metil-2-quinolina), y un anillo de imidazo[4,5-b]quinoxalina (tal como 1,3-dietilimidazo[4,5-b]quinoxalina). Los ejemplos preferidos del anillo heterocíclico de 5 a 10 miembros formado por Y incluyen un anillo de 3,3-dialquilindolenina.

10 M representa un átomo de hidrógeno, un metal, una sal de amonio cuaternario, u otras sales farmacéuticamente aceptables. Las "sales farmacéuticamente aceptables" pueden ser cualquier sal que pueda formar sales no tóxicas con el compuesto representado por la fórmula general [I]. Los ejemplos incluyen, por ejemplo, una sal de metal alcalino, tal como una sal sódica y una sal potásica, una sal de metal alcalino-térreo, tal como una sal magnésica y una sal cálcica; una sal de amonio orgánica, tal como una sal de amonio, una sal de trietilamonio, una sal de tributilamonio, una sal de piridinio; una sal de aminoácido tal como una sal de lisina o una sal de arginina. Se prefiere particularmente una sal sódica con una toxicidad reducida para un organismo vivo.

15 El compuesto de la presente invención puede tener uno o más átomos de carbono asimétricos, dependiendo del tipo de sustituyentes. Los átomos de azufre pueden actuar como un centro asimétrico. Cualesquiera isómeros ópticos en una forma ópticamente pura basados en uno o más átomos de carbono asimétricos, cualquier mezcla de los isómeros ópticos anteriores, racematos, diastereómeros basados en dos o más átomos de carbono asimétricos, y cualquier mezcla de los diastereómeros anteriores, caen dentro del alcance de la presente invención.

Más abajo se muestran ejemplos específicos del compuesto de la presente invención. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado por los siguientes compuestos.

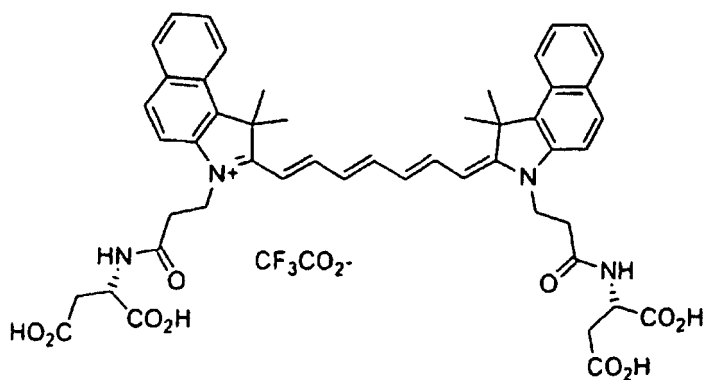
25

**Compuesto 1**

30

35

40



45

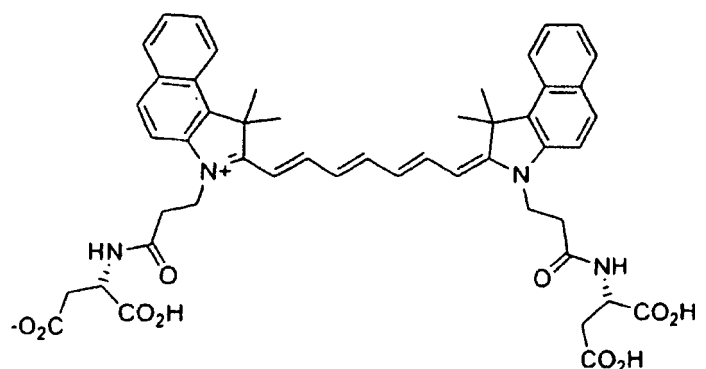
**Compuesto 2**

50

55

60

65

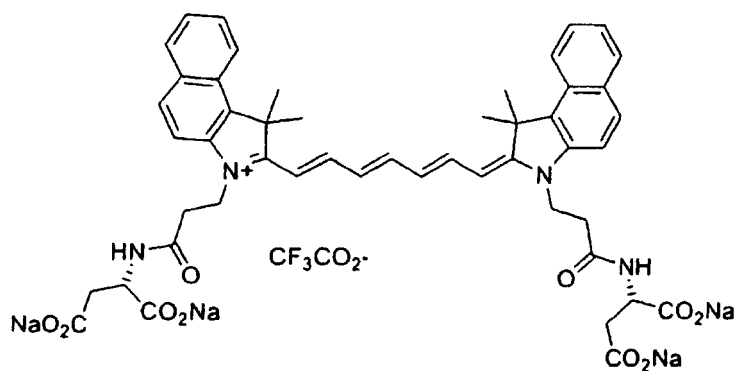


Compuesto 3

5

10

15

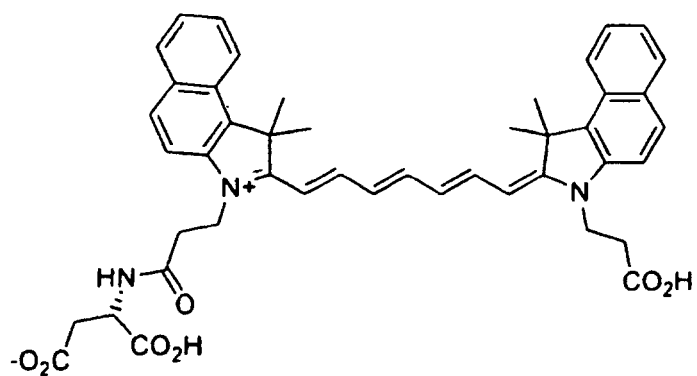


Compuesto 4

25

30

35



40

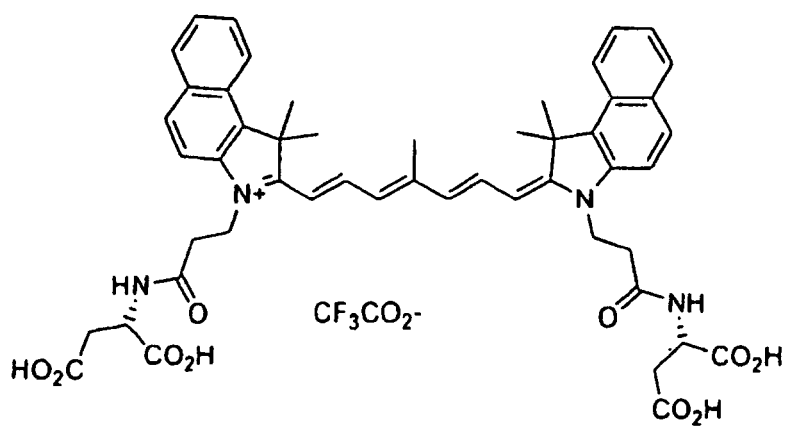
Compuesto 5

45

50

55

60



65

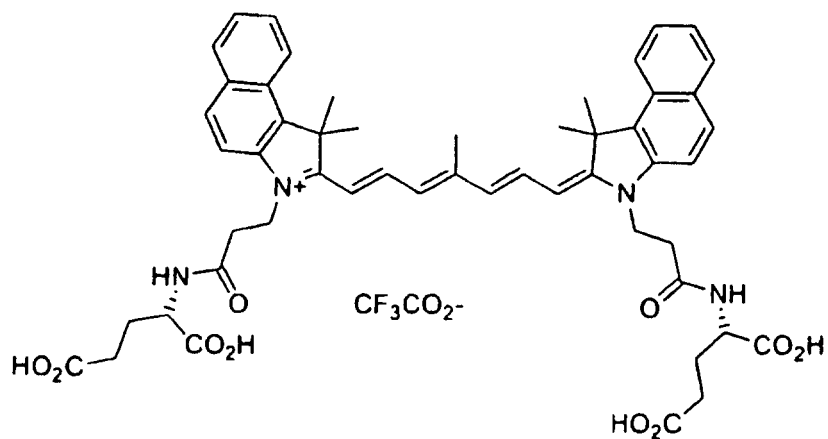
Compuesto 6

5

10

15

20



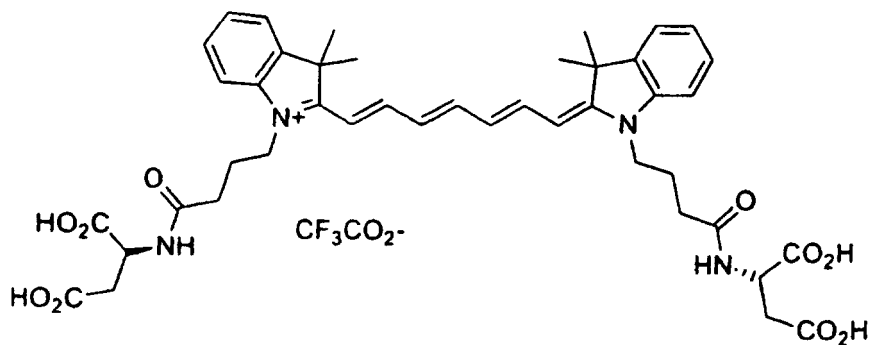
Compuesto 7

25

30

35

40



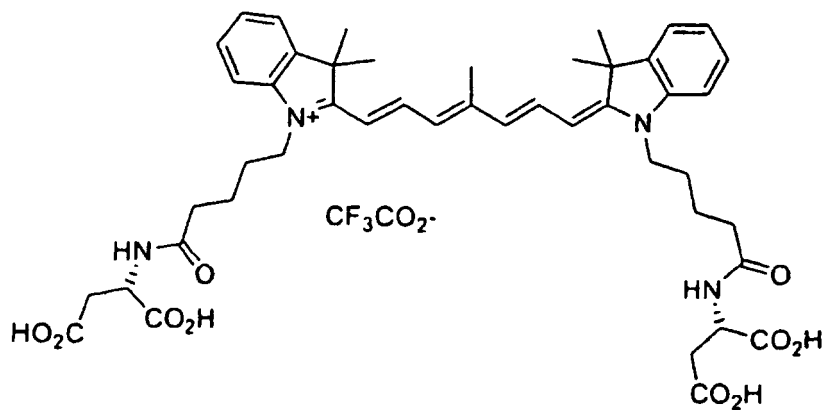
Compuesto 8

50

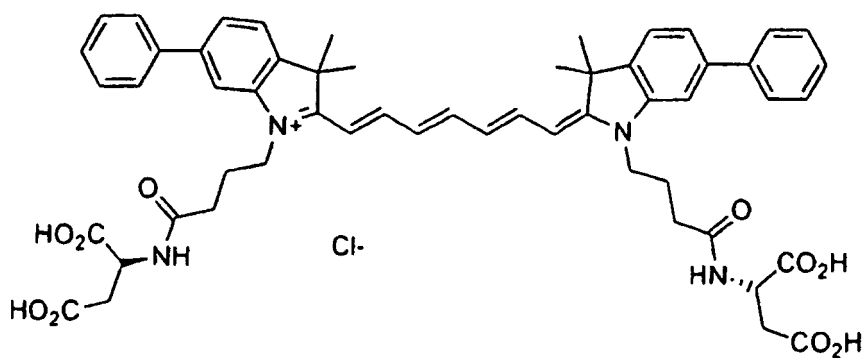
55

60

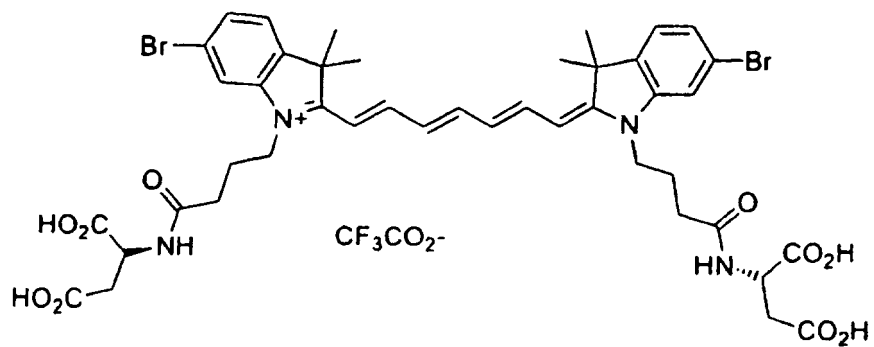
65



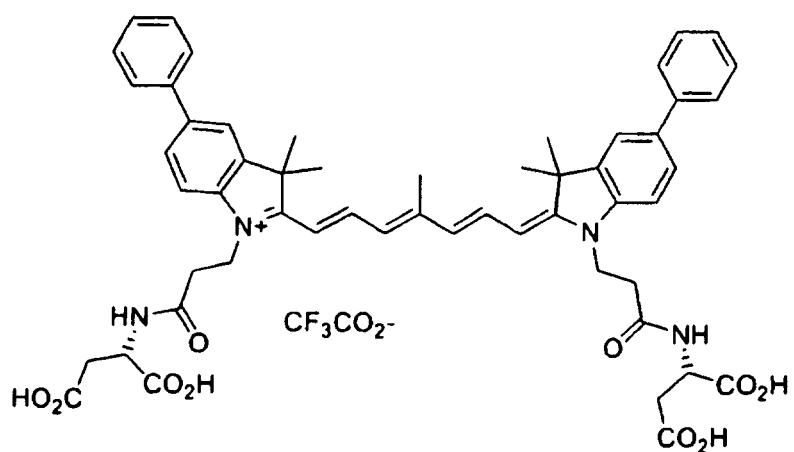
Compuesto 9



Compuesto 10

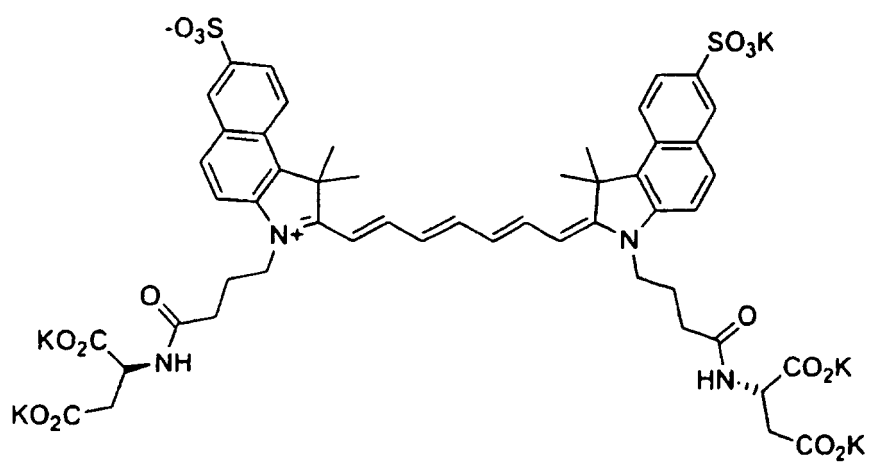


Compuesto 11

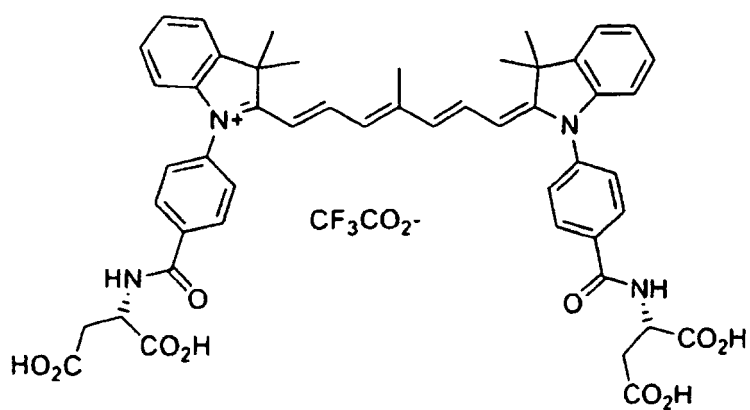




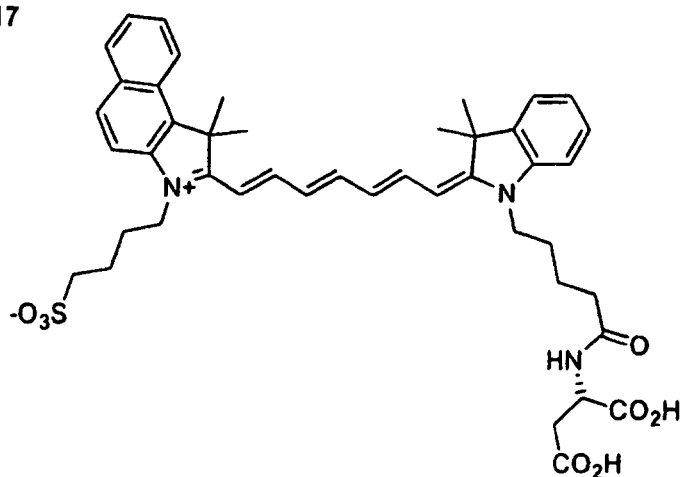
Compuesto 15



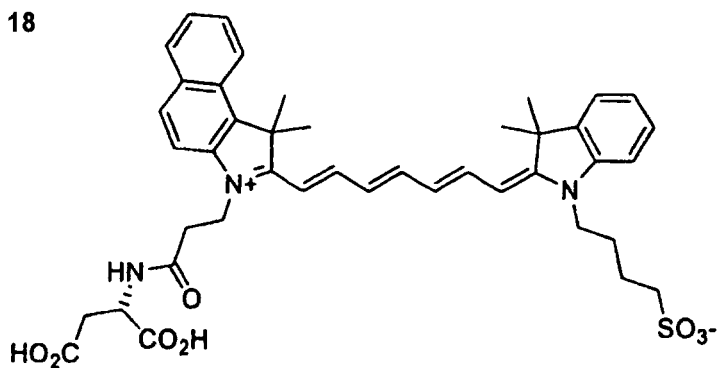
Compuesto 16



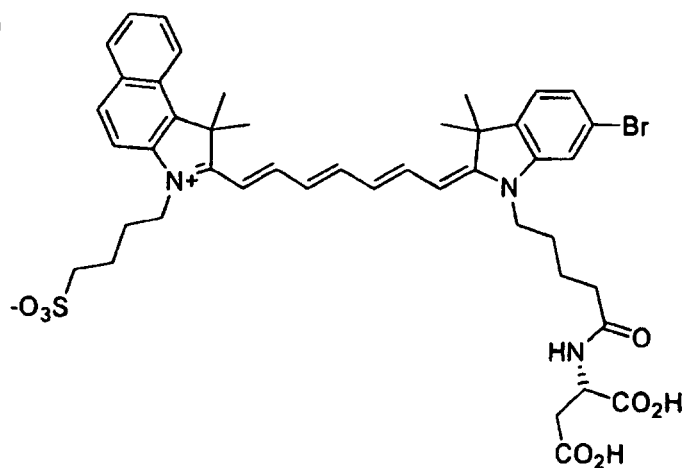
Compuesto 17



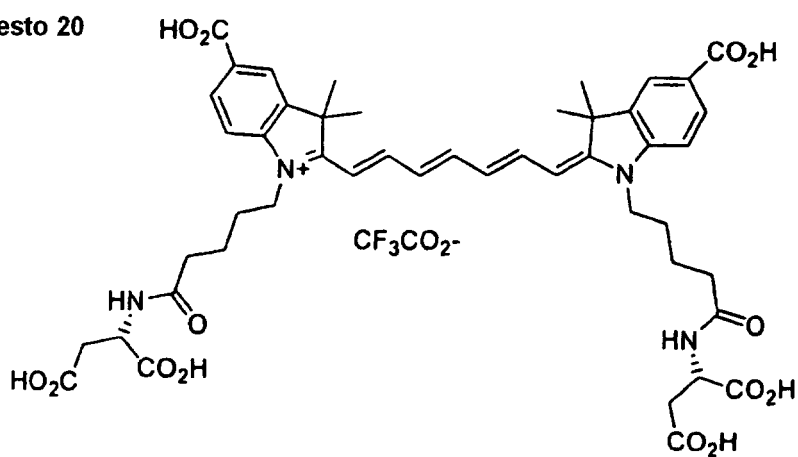
Compuesto 18



Compuesto 19



Compuesto 20



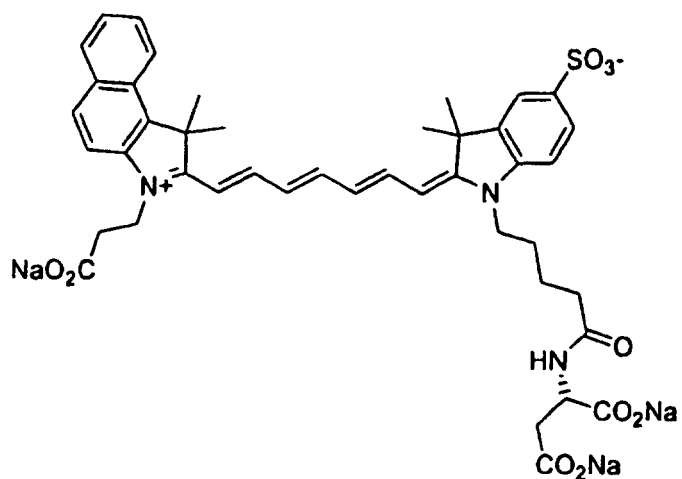
Compuesto 21

5

10

15

20

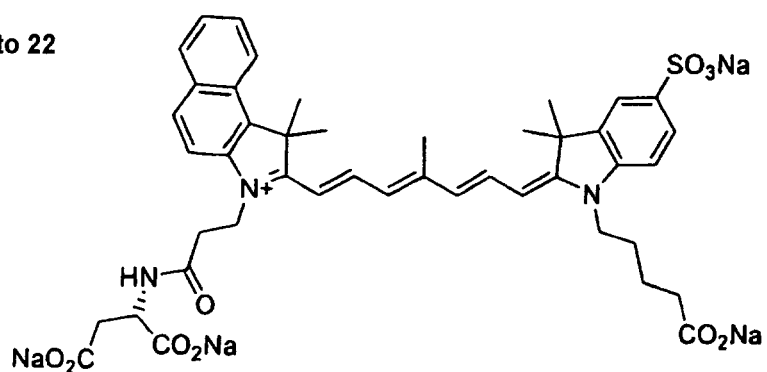


Compuesto 22

25

30

35

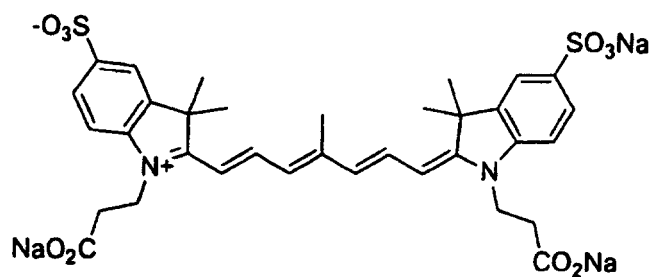


Compuesto 23  
(representativo)

40

45

50

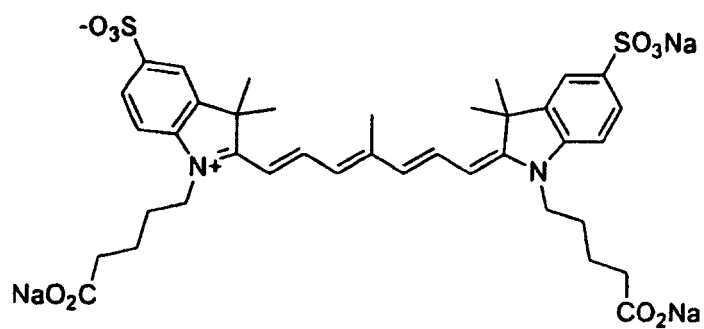


Compuesto 24  
(representativo)

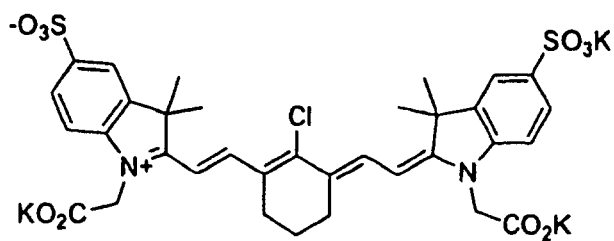
55

60

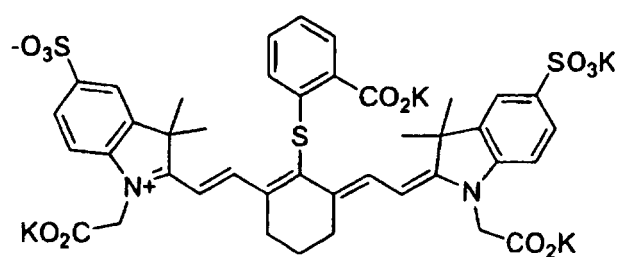
65



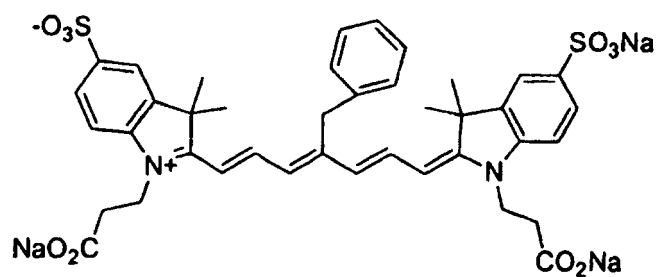
Compuesto 25  
(representativo)



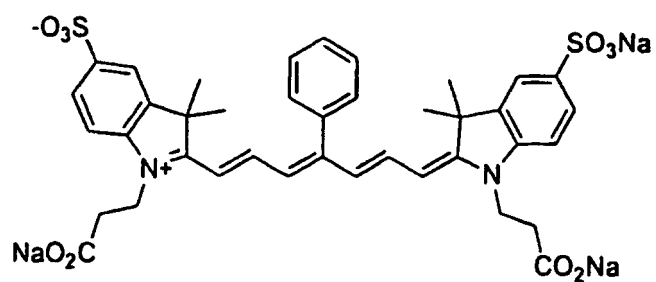
Compuesto 26  
(representativo)



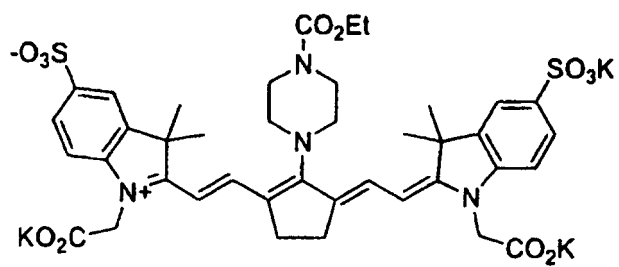
Compuesto 27  
(representativo)



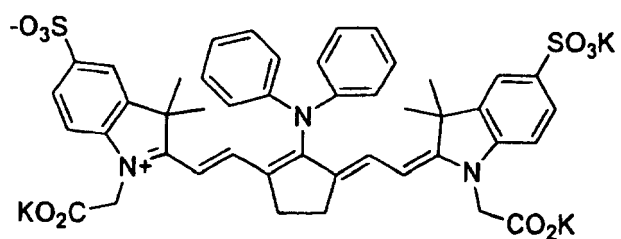
Compuesto 28  
(representativo)



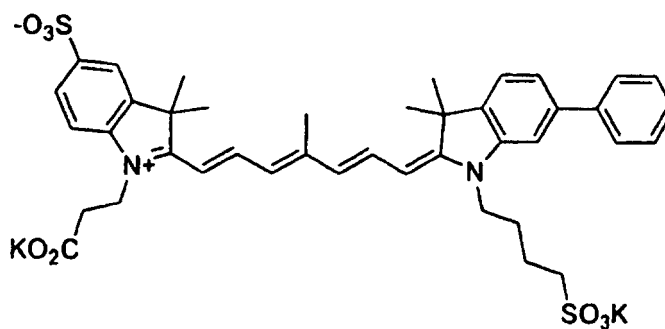
Compuesto 29  
(representativo)



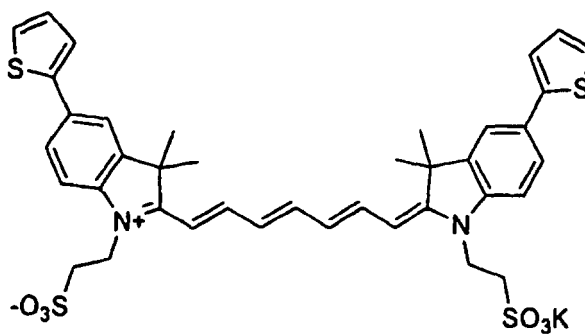
Compuesto 30  
(representativo)



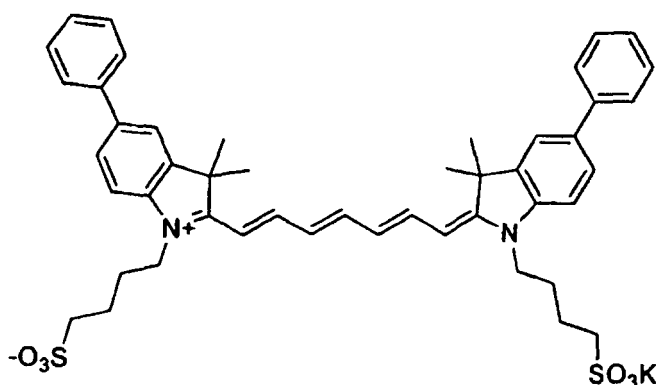
Compuesto 31  
(representativo)



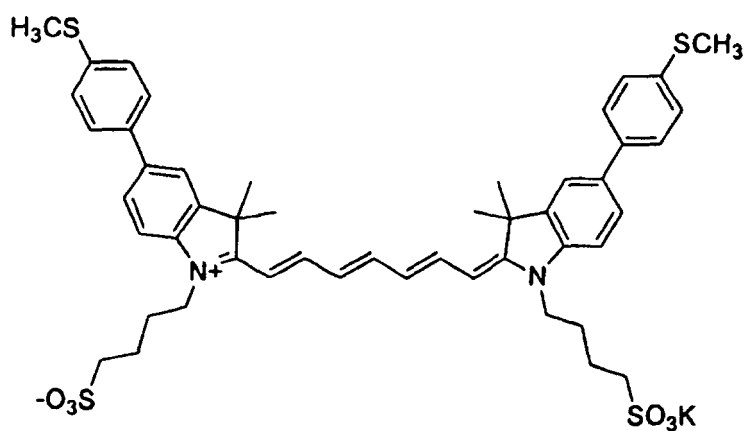
Compuesto 32  
(representativo)



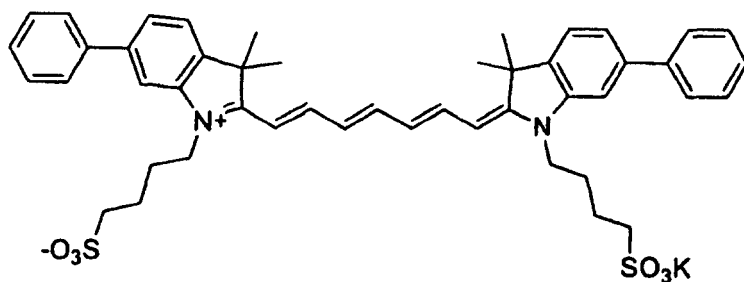
Compuesto 33  
(representativo)



Compuesto 34  
(representativo)



Compuesto 35  
(representativo)



El colorante de cianina representado por la fórmula [I] o [II] se puede sintetizar según métodos de preparación conocidos de compuestos de colorantes de cianina, por ejemplo los descritos en *Cyanine Dyes and Related Compounds*, F. M. Hamer, John Wiley and Sons, New York, 1964, *Cytometry*, 11, 416-430 (1990), *Cytometry*, 12, 723-730 (1990), *Bioconjugate Chem.*, 4, 105-111 (1993), *Anal. Biochem.*, 217, 197-204 (1994), *Tetrahedron*, 45, 4845-4866 (1989), documentos EP-A-0591820A1 y EP-A-0580145A1.

Como alternativa, se pueden semisintetizar a partir de un compuesto de colorante de cianina comercialmente disponible, y mediante métodos conocidos. Más específicamente, se pueden sintetizar haciendo reaccionar un compuesto diarílico con una sal cuaternaria heterocíclica.

Los métodos para preparar los compuestos del colorante de cianina representados por las fórmulas anteriores [I] o [II] no están particularmente limitados, y los compuestos se pueden sintetizar mediante diversas rutas sintéticas. Las preparaciones específicas de compuestos típicos de la presente invención se describen en los Ejemplos de la memoria descriptiva. En consecuencia, la persona experta normal en la técnica puede preparar los compuestos del colorante de cianina que caen dentro del alcance de las fórmulas generales anteriores haciendo referencia a los métodos descritos en los Ejemplos, y, si es necesario, añadiendo una alteración o modificación apropiada a los métodos y escogiendo apropiadamente los materiales de partida y los reactivos. Para la preparación, se puede emplear, sola o en combinación, una reacción seleccionada de diversas reacciones tales como una condensación, una adición, una oxidación o una

reducción. Estas reacciones se explican con detalle en la bibliografía. Por ejemplo, se pueden usar de forma adecuada diversos métodos o compuestos materiales descritos como operaciones sintéticas unitarias en "Jikken Kagaku Kouza" (publicado por Maruzen, Ltd., y está disponible cada volumen separado contenido en la edición global primera a cuarta). Además, la síntesis de los compuestos de la presente invención se describe específicamente en la memoria descriptiva del documento PCT/JP01/06689.

Por ejemplo, cuando los grupos funcionales definidos anteriormente pueden cambiar en una etapa de reacción, o no son adecuados para realizar una etapa de reacción en la preparación, algunas veces se puede llevar a cabo eficazmente una etapa deseable utilizando diversos métodos que se usan convencionalmente en el campo de la química sintética orgánica, por ejemplo medios para la protección o desprotección de grupos funcionales, o tratamientos tales como oxidación, reducción o hidrólisis. Los compuestos intermedios sintéticos y los compuestos diana, en las etapas anteriores, se pueden aislar y purificar mediante métodos de purificación convencionales usados en química orgánica sintética, tales como filtración, extracción, lavado, secado, concentración, recristalización, y diversas cromatografías.

Los productos intermedios sintéticos se pueden usar en la siguiente reacción sin aislamiento.

Como el ingrediente activo del agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano de la presente invención, se puede usar, solo o en combinación, el compuesto representado mediante la fórmula general [I] o [II], o una sal del mismo. Más específicamente, el ingrediente activo puede estar contenido en el agente de contraste en forma de una suspensión o una disolución en un disolvente tal como agua destilada inyectable, disolución salina fisiológica, disolución de Ringer.

Si se desea, también se pueden formular aditivos tales como vehículos farmacéuticamente aceptables, o excipientes. Los ejemplos de estos aditivos incluyen sustancias tales como disoluciones electrolíticas farmacéuticamente aceptables, disoluciones tamponantes, detergentes, y sustancias para ajustar la presión osmótica, sustancias para mejorar la estabilidad o solubilidad, tales como ciclodextrina y liposomas. Se pueden usar cualesquiera aditivos disponibles normalmente en la técnica. El agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano de la presente invención se sintetiza preferiblemente a través de procesos de esterilización cuando se usa como un medicamento para aplicación clínica.

El agente de contraste se puede administrar a un organismo vivo mediante inyección, pulverización, o aplicación tópica, tal como aplicación intravascular (venosa, arterial), aplicación oral, aplicación intraperitoneal, aplicación percutánea, aplicación subcutánea, aplicación intracística, o aplicación intrabronquial. Preferiblemente, el agente de contraste se puede administrar en los vasos sanguíneos en forma de una disolución acuosa, una emulsión o una suspensión.

La dosis del agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano de la presente invención no está particularmente limitada en tanto que la dosis permita la detección del sitio a diagnosticar. La dosis se puede incrementar o disminuir apropiadamente dependiendo del tipo de compuesto a usar que emita fluorescencia en el infrarrojo cercano, dependiendo de la edad, peso corporal y de un órgano diana de dos sujetos a los que se les va a administrar. Típicamente, la dosis como peso del compuesto puede ser 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal, preferiblemente 0,5 a 20 mg/kg de peso corporal.

El agente de contraste de la presente invención también se puede usar apropiadamente para diversos animales distintos del ser humano. La formulación para la administración, la vía de administración, y la dosis, se pueden escoger apropiadamente dependiendo del peso corporal y de las condiciones de los animales diana.

Los compuestos de la presente invención representados por la fórmula anterior [I] y [II] tienen la propiedad de acumularse en gran cantidad en los tejidos tumorales. Utilizando dicha propiedad, la presente invención también proporciona el agente de contraste fluorescente que permite la formación específica de imágenes de un tejido tumoral. Además, la clase de los compuestos de la presente invención tiene una retención a largo plazo en los vasos sanguíneos, y por lo tanto el agente de contraste fluorescente de la presente invención también es útil para angiografía.

El método de formación de imágenes mediante fluorescencia de la presente invención se caracteriza por el uso del agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano de la presente invención. El método para la formación de imágenes se puede llevar a cabo por cualquier persona experta normal en la técnica según métodos conocidos, y cada uno de los parámetros, tales como la longitud de onda de excitación y la longitud de onda de la fluorescencia a detectar, se puede determinar apropiadamente para lograr la formación de imágenes y evaluación óptimas, dependiendo del tipo de agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano a administrar y del sujeto al que se le va a administrar. El período de tiempo para la administración del agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano de la presente invención hasta el comienzo de la formación de imágenes mediante fluorescencia según la presente invención puede variar dependiendo del tipo del agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano a usar, y del sujeto al que se le va a administrar. Por ejemplo, cuando el agente de contraste que comprende un compuesto de la fórmula [I] o fórmula [II] se administra para la formación de imágenes de un tumor, el lapso de tiempo puede ser alrededor de 10 minutos hasta 24 horas después de la administración. Cuando el lapso de tiempo es demasiado corto, la fluorescencia procedente de cada sitio puede ser todavía demasiado intensa y el sitio diana no es distinguible de otros sitios; y cuando el lapso de tiempo es demasiado largo, el agente de contraste se puede excretar del cuerpo. Cuando se desea la formación de imágenes de vasos sanguíneos, el compuesto de la fórmula [I] o de la fórmula [II] se detecta inmediatamente después de la administración, o en alrededor de 30 minutos después de la administración.

Por ejemplo, la formación de imágenes mediante fluorescencia se puede llevar a cabo mediante las siguientes etapas. Se administra un agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano de la presente invención a un sujeto que va a ser diagnosticado, y después el sujeto se expone a una luz de excitación usando un aparato que genera una luz de excitación. Seguidamente, se detecta, usando un detector de fluorescencia, la fluorescencia procedente del agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano, la cual es generada por la luz de excitación. La longitud de onda para la excitación varía dependiendo del tipo del agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano a usar, y no está limitada en tanto que los compuestos emitan eficazmente fluorescencia en la región del infrarrojo cercano. Preferiblemente, se puede usar luz del infrarrojo cercano que tiene una biopermeabilidad superior. La longitud de onda de la fluorescencia del infrarrojo cercano a detectar también varía dependiendo del agente de contraste a usar. En general, se puede usar una luz de excitación que tenga una longitud de onda de 600 a 1000 nm, preferiblemente 700 a 850 nm, y se puede detectar una fluorescencia del infrarrojo cercano que tenga una longitud de onda de 700 a 1000 nm, preferiblemente 750 a 900 nm. Como aparato para generar la luz de excitación, se puede usar una fuente de luz de excitación convencional, tal como diversos láseres (por ejemplo, un láser de iones, un láser de colorante y un láser de semiconductor), una fuente de luz halógena, o una fuente de luz de xenón. Si se desea, para obtener la longitud de onda de excitación óptima se pueden usar diversos filtros ópticos. Para la detección de la fluorescencia, se pueden usar diversos filtros ópticos para la selección de la fluorescencia generada a partir del agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano.

La fluorescencia detectada se procesa en datos como información de fluorescencia, para construir imágenes de fluorescencia que se registran. Los ejemplos del método para la preparación de imágenes mediante fluorescencia incluyen, por ejemplo, un método que comprende la etapa de irradiar el tejido diana en un amplio intervalo, detectar la fluorescencia con una cámara CCD, y después procesar en imágenes la información de la fluorescencia obtenida; un método que usa un dispositivo de CT óptica; un método que usa un endoscopio; o un método que usa una cámara para el fondo de ojos.

Según el método de formación de imágenes mediante fluorescencia de la presente invención, se pueden visualizar enfermedades sistémicas, tumores y vasos sanguíneos sin dañar al organismo vivo.

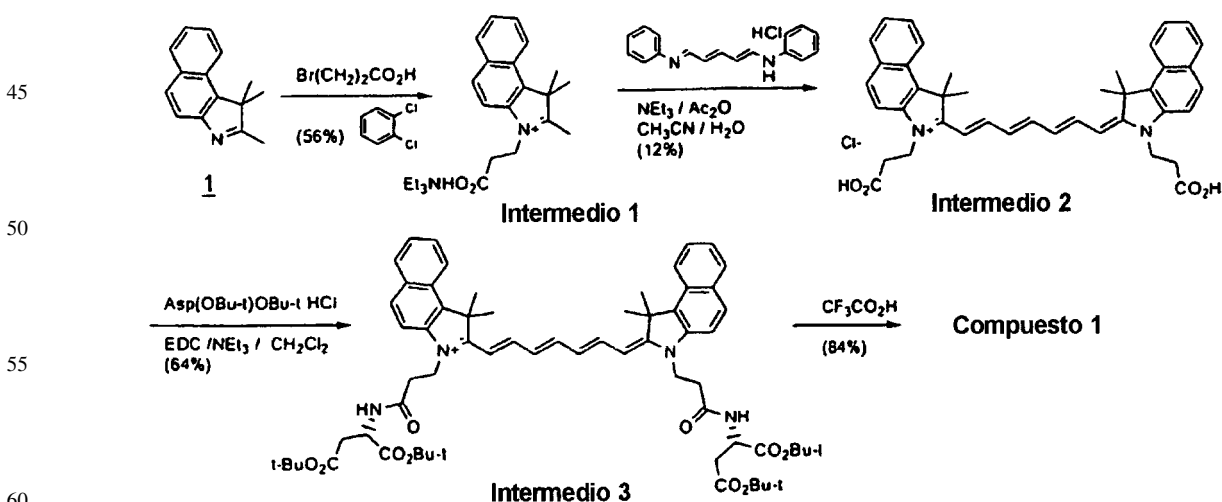
## Ejemplos

La presente invención se explicará de forma más específica haciendo referencia a los ejemplos sintéticos y a un ejemplo de ensayo. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado a los siguientes ejemplos. En los ejemplos, los números de serie de los compuestos corresponden a los de los compuestos enumerados anteriormente con estructuras químicas.

### Ejemplo 1

#### Síntesis del Compuesto 1, Compuesto 2 y Compuesto 3

Más abajo se muestra la ruta sintética del Compuesto 1.



#### Síntesis del Intermedio 1

El material de partida **1** (20,9 g, 0,1 moles), el ácido 2-bromopropínico (23,0 g, 0,15 moles) y *o*-diclorobenceno (20 ml) se calentaron y se agitaron a  $140^\circ\text{C}$  durante 2 horas. Después de que la reacción estuvo terminada, a la mezcla de reacción se le añadió acetona (200 ml) y se enfrió hasta la temperatura ambiente, y después el cristal resultante se filtró para obtener el Intermedio 1 (20,3 g, rendimiento: 56%).

## ES 2 305 444 T3

### *Síntesis del Intermedio 2*

El Intermedio 1 obtenido anteriormente (10,0 g, 28 mmoles) e hidrocloreto de 1,7-diaza-1,7-difenil-1,3,5-heptatrieno (3,9 g, 14 mmoles) se disolvieron en acetonitrilo (70 ml) y agua (11 ml), y la disolución resultante se añadió con trietilamina (8,4 g, 91 mmoles) y anhídrido acético (8,5 g, 91 mmoles), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente toda la noche. A la mezcla de reacción se le añadió gota a gota ácido clorhídrico 0,1 N (900 ml), y se filtraron los cristales precipitados. El cristal se purificó mediante cromatografía en columna (eluyente: cloruro de metileno:metanol = 95:5~90:10) para obtener el Intermedio 2 (2,1 g, rendimiento: 12%).

10

### *Síntesis del Intermedio 3*

El Intermedio 2 obtenido anteriormente (21,0 g, 1,5 mmoles), el éster di-*t*-butílico monohidratado del ácido L-aspártico (1,3 g, 4,5 mmoles), y 4-dimetilaminopiridina (40 mg, 0,3 mmoles) se disolvieron en cloruro de metileno (50 ml), y la disolución se enfrió en hielo. A la disolución resultante se le añadió hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) (700 mg, 4 mmoles) y trietilamina (340 mg, 3 mmoles), y se agitó a 4°C toda la noche. Se añadió cloruro de metileno (200 ml) y ácido clorhídrico 1 N (200 ml) a la mezcla de reacción, y después la capa de cloruro de metileno se extrajo y se lavó con disolución saturada de cloruro de sodio (200 ml) y se secó sobre sulfato de sodio. El disolvente se evaporó a presión reducida, y se purificó mediante cromatografía en columna (eluyente: acetato de etilo:metanol = 95:5 a 80:20) para obtener el Intermedio 3 (1,1 g, rendimiento: 64%).

20

### *Síntesis del Compuesto 1, Compuesto 2 y Compuesto 3*

El Intermedio 3 (500 mg, 0,5 mmoles) se disolvió en ácido trifluoroacético (5 ml), y se hizo reaccionar a 4°C toda la noche, y después el ácido trifluoroacético se evaporó a presión reducida. Al residuo resultante se le añadió agua (50 ml), y después los cristales resultantes se recogieron mediante filtración y se lavaron con agua y acetato de etilo para obtener el Compuesto 1 (390 mg, rendimiento: 90%).

25

El Compuesto 1 se purificó mediante cromatografía en columna usando Sephadex (LH-20, Pharmacia) (eluyente: metanol), para obtener el Compuesto 2.

30

El Compuesto 1 se aplicó a una columna de resina de intercambio iónico CR 11 (Mitsubishi Chemical, Co., Ltd.) para obtener el Compuesto 3.

35

### *Compuesto 1*

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 1,98 (s, 12H), 2,70 (d, J=7,2Hz, 4H), 2,80 (t, J=7,2Hz, 4H), 3,30 (MeOH), 4,50 (t, J=7,2Hz, 4H), 4,60 (t, J=7,2Hz, 2H), 4,80 (H<sub>2</sub>O), 6,40 (d, J=13,2Hz, 2H), 6,63 (dd, J=13,2, 13,2Hz, 2H), 7,40-7,50 (m, 2H), 7,58-7,66 (m, 5H), 7,95-8,07 (m, 6H), 8,20 (d, J=7,2Hz, 2H).

40

### *Compuesto 2*

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 1,99 (s, 12H), 2,72 (d, J=7,2Hz, 4H), 2,80 (t, J=7,2Hz, 4H), 3,30 (MeOH), 4,50 (t, J=7,2Hz, 4H), 4,60 (t, J=7,2Hz, 2H), 4,80 (H<sub>2</sub>O), 6,38 (d, J=13,2Hz, 2H), 6,61 (dd, J=13,2, 13,2Hz, 2H), 7,40-7,50 (m, 2H), 7,58-7,67 (m, 5H), 7,96-8,07 (m, 6H), 8,21 (d, J=7,2Hz, 2H).

45

### *Compuesto 3*

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 1,98 (s, 12H), 2,56-2,65 (m, 4H), 2,75-2,85 (m, 4H), 3,30 (MeOH), 4,45-4,50 (m, 4H), 4,80 (H<sub>2</sub>O), 6,20 (d, J=13,2Hz, 2H), 6,65 (dd, J=13,2, 13,2Hz, 2H), 7,40-7,50 (m, 2H), 7,58-7,70 (m, 5H), 7,95-8,07 (m, 6H), 8,20 (d, J=7,2Hz, 2H).

50

55

### *Ejemplo 2*

### *Síntesis del Compuesto 5*

El compuesto 5 se sintetizó a partir del Intermedio 1 y del monohidrato de 1,7-diaza-5-metil-1,7-difenil-1,3,5-heptatrieno, de manera similar a aquella para el Compuesto 1.

60

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 2,00 (s, 12H), 2,44 (s, 3H), 2,73 (d, J=7,2Hz, 4H), 2,82 (t, J=7,2Hz, 4H), 3,31 (MeOH), 4,50 (t, J=7,2Hz, 4H), 4,69 (t, J=7,2Hz, 2H), 4,88 (H<sub>2</sub>O), 6,41 (d, J=13,2Hz, 2H), 6,65 (d, J=13,2Hz, 2H), 7,43-7,50 (m, 2H), 7,58-7,67 (m, 4H), 7,95-8,05 (m, 4H), 8,10-8,27 (m, 4H).

65

## ES 2 305 444 T3

### Ejemplo 3

#### *Síntesis del Compuesto 6*

5 El compuesto 6 se sintetizó a partir del Intermedio 1 y del monohidrato de 1,7-diaza-5-metil-1,7-difenil-1,3,5-heptatrieno, de manera similar a aquella para el Compuesto 1, excepto que se usó el monohidrato del éster di-t-butílico del ácido L-glutámico en lugar del monohidrato del éster di-t-butílico del ácido L-aspartico.

10 RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 1,80-2,15 (m, 4H), 2,01 (s, 12H), 2,28 (t, J=7,2Hz, 4H), 2,44 (s, 3H), 2,82 (t, J=7,2Hz, 4H), 3,31 (MeOH), 4,40-4,50 (m, 2H), 4,51 (t, J=7,2Hz, 4H), 4,88 (H<sub>2</sub>O), 6,42 (d, J=13,2Hz, 2H), 6,65 (d, J=13,2Hz, 2H), 7,42-7,50 (m, 2H), 7,57-7,67 (m, 4H), 7,95-8,05 (m, 4H), 8,10-8,27 (m, 4H).

### Ejemplo 4

15

#### *Síntesis del Compuesto 7*

El Compuesto 7 se sintetizó a partir de 2,3,3-trimetilindolenina, de manera similar a aquella para el Compuesto 1.

20 RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 1,70 (s, 12H), 2,05-2,13 (m, 4H), 2,55 (t, J=7,2Hz, 4H), 2,78-2,92 (m, 4H), 3,30 (MeOH), 4,10 (t, J=7,2Hz, 4H), 4,89 (H<sub>2</sub>O), 6,45 (d, J=13,2Hz, 2H), 6,50 (J=13,2Hz, 2H), 7,29-7,50 (m, 8H), 7,92 (dd, J=13,2, 13,2 Hz, 2H).

### Ejemplo 5

#### *Síntesis del Compuesto 8*

30 El Compuesto 8 se sintetizó a partir de 2,3,3-trimetilindolenina, de manera similar a aquella para el Compuesto 1, excepto que se usó monohidrocloreto de 1,7-diaza-5-metil-1,7-difenil-1,3,5-heptatrieno en lugar de monohidrato de 1,7-diaza-1,7-difenil-1,3,5-heptatrieno.

35 RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 1,70 (s, 12H), 1,72-1,90 (m, 8H), 2,35-2,39 (m, 7H), 2,73-2,84 (m, 4H), 3,30 (MeOH), 4,08 (t, J=7,2Hz, 4H), 4,66 (t, J=7,2Hz, 2H), 4,89 (H<sub>2</sub>O), 6,33 (d, J=13,2Hz, 2H), 6,63 (d, J=13,2Hz, 2H), 7,18-7,50 (m, 8H), 8,05 (dd, J=13,2, 13,2 Hz, 2H).

### Ejemplo 6

#### *Síntesis del Compuesto 9*

El Compuesto 9 se sintetizó a partir de 6-fenil-2,3,3-trimetilindolenina (sintetizado mediante el método descrito en la memoria descriptiva de la patente U.S. n° 6.004.536), de manera similar a aquella para el Compuesto 1.

45 RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 1,75 (s, 12H), 2,05-2,15 (m, 4H), 2,45-2,55 (m, 4H), 2,75-2,84 (m, 4H), 3,30 (MeOH), 4,20 (t, J=7,2Hz, 4H), 4,80 (H<sub>2</sub>O), 6,38 (J=13,2Hz, 2H), 6,62 (J=13,2Hz, 2H), 7,43-7,70 (m, 17H), 7,95 (dd, J=13,2, 13,2 Hz, 2H).

### Ejemplo 7

#### *Síntesis del Compuesto 10*

55 El Compuesto 10 se sintetizó a partir de 6-bromo-2,3,3-trimetil-indolenina, de manera similar a aquella para el Compuesto 1.

60 RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 1,68 (s, 12H), 2,00-2,15 (m, 4H), 2,40-2,55 (m, 4H), 2,77-2,92 (m, 4H), 3,30 (MeOH), 4,08 (t, J=7,2Hz, 4H), 4,82 (m, 2H), 6,38 (J=13,2Hz, 2H), 6,65 (J=13,2Hz, 2H), 7,30-7,40 (m, 4H), 7,50-7,72 (m, 3H), 7,90-8,02 (m, 2H).

65

## Ejemplo 8

*Síntesis del Compuesto 11*

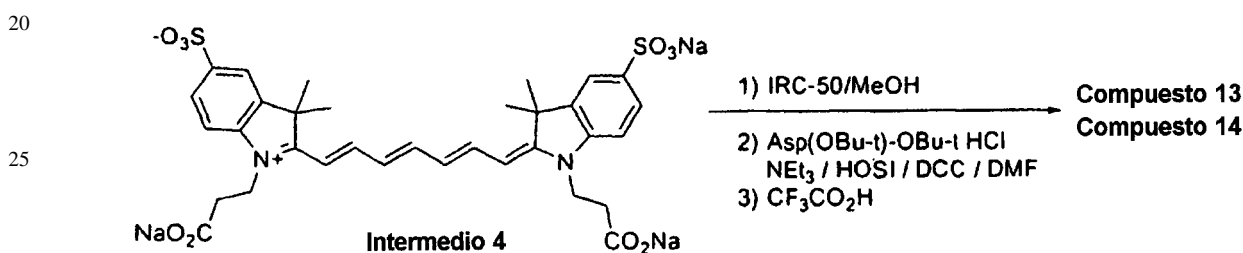
5 El Compuesto 11 se sintetizó a partir de 5-fenil-2,3,3-trimetil-indolenina, en un método similar a aquel para el Compuesto 1.

10 RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 1,78 (s, 12H), 2,39 (s, 3H), 2,70-2,84 (m, 8H), 3,30 (MeOH), 4,30-4,46 (m, 4H), 4,60-4,68 (m, 2H), 6,39 (J=13,2Hz, 2H), 6,66 (J=13,2Hz, 2H), 7,30-7,48 (m, 9H), 7,56-7,72 (m, 3H), 8,05 (J=13,2Hz, 13,2Hz).

## Ejemplo 9

*Síntesis del Compuesto 13 y del Compuesto 14*

15 A continuación se muestra la ruta sintética del Compuesto 13 y del Compuesto 14.



35 Se disolvió en 5 ml de metanol un compuesto intermedio (375 mg) que se obtuvo haciendo reaccionar 5-sulfo-2,3,3-trimetilindolenina (preparada según el método descrito en la Publicación No Examinada de Patente Japonesa (KOKAI) n° (Hei) 2-233658) y monohidrocloreto de 1,7-diaza-1,7-difenil-1,3,5-heptatrieno en metanol en presencia de trietilamina y anhídrido acético, y después se aplicó a una columna llena de una resina de intercambio catiónico IRC-50 (Organo, eluyente: metanol). El disolvente se evaporó para dar la forma protónica del ácido carboxílico. El producto resultante se disolvió en 3 ml de dimetilformamida, y a la disolución se le añadieron 338 mg (1,2 mmoles) de hidrocloreto de aspartato de dibutilo, 24 mg (0,2 mmoles) de dimetilaminopiridina y 121 mg (1,2 mmoles) de trietilamina, y después la mezcla se enfrió en un baño de hielo. A la mezcla se le añadieron 230 mg (2 mmoles) de hidroxisuccinimida (HOSI) y 288 mg (1,4 mmoles) de N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC), y la mezcla resultante se agitó toda la noche. A la mezcla de reacción se le añadieron 200 ml de un disolvente mixto de acetato de etilo/hexano (1:1), y los cristales precipitados se recogieron mediante filtración. Los cristales se purificaron mediante cromatografía en columna (eluyente: cloruro de metileno:metanol = 10:1 a 2:1) para obtener un compuesto de diamida (135 mg) y un compuesto de monoamida (94 mg).

45 Cada uno de los compuestos resultantes de diamida (120 mg) y de monoamida (60 mg) se disolvió en 2 ml de ácido trifluoroacético, y después la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se disolvió en agua/metanol (1/1 (v/v)), y se purificó mediante cromatografía en columna usando Sephadex (LH-20, Pharmacia, eluyente: metanol). Los cristales resultantes se disolvieron en un pequeño volumen de metanol, y a la disolución se le añadió una disolución saturada de acetato potásico en metanol. Los cristales precipitados se recogieron mediante filtración para obtener el Compuesto 13 (35 mg, rendimiento 7%) y el Compuesto 14 (15 mg, rendimiento 5%).

*Compuesto 13*

55 RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ 1,73 (s, 12H), 2,50-2,65 (m, 4H), 2,68-2,73 (m, 4H), 4,28-4,38 (m, 4H), 4,39-4,50 (m, 2H), 4,90 (D<sub>2</sub>O), 6,47 (d, J=13,2Hz, 2H), 6,74 (t, J=13,2Hz, 2H), 7,40-7,50 (m, 2H), 7,60 (t, J=13,2Hz, 1H), 7,80-8,05 (m, 6H).

*Compuesto 14*

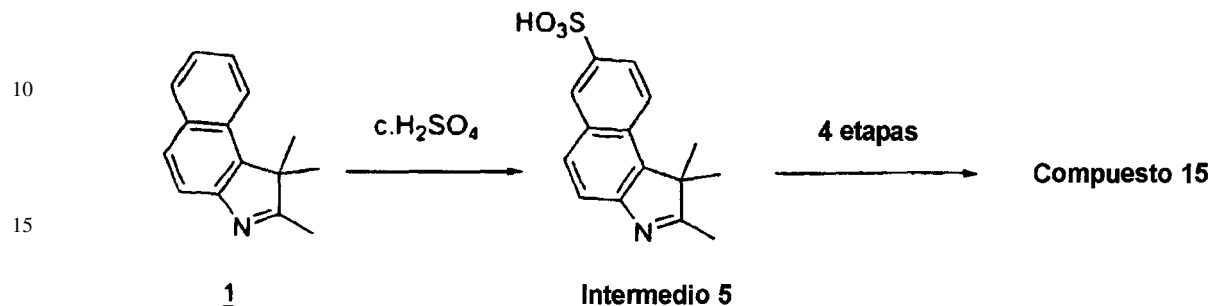
60 RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ 1,65 (s, 6H), 1,70 (s, 6H), 2,40 (d, J=7,2Hz, 2H), 2,58 (t, J=7,2Hz, 2H), 2,70 (t, J=7,2Hz, 2H), 4,18-4,30 (m, 4H), 4,90 (D<sub>2</sub>O), 6,18 (d, J=13,2Hz, 1H), 6,34 (d, J=13,2Hz, 1H), 6,48-6,62 (m, 2H), 7,20 (d, J=7,2Hz, 1H), 7,30 (d, J=7,2Hz, 1H), 7,48 (t, J=13,2 Hz, 1H), 7,68-7,95 (m, 6H).

65

## Ejemplo 10

## Síntesis del Compuesto 15

5 A continuación se muestra la ruta sintética del Compuesto 15.



20 El material de partida (41,8 g, 0,2 moles) se disolvió en ácido sulfúrico conc. (156 ml, 2,9 moles) y se hizo reaccionar a 140°C durante 1 hora, y después la mezcla se enfrió hasta 80°C. Después de añadir la disolución resultante a agua con hielo (300 ml), se añadió con cuidado a la mezcla una disolución obtenida disolviendo hidróxido sódico (96,6 g, 2,4 moles) en agua (100 ml). Los cristales precipitados se recogieron mediante filtración y se lavaron con agua (120 ml). Al cristal bruto resultante se le añadió agua (300 ml) y metanol (100 ml), y la mezcla se puso a reflujo en agitación durante 30 minutos, y después se enfrió hasta la temperatura ambiente. Los cristales resultantes se recogieron por filtración y se lavaron con agua (100 ml) y metanol (120 ml) para obtener el Intermedio 5 (37,9 g, rendimiento: 66%).

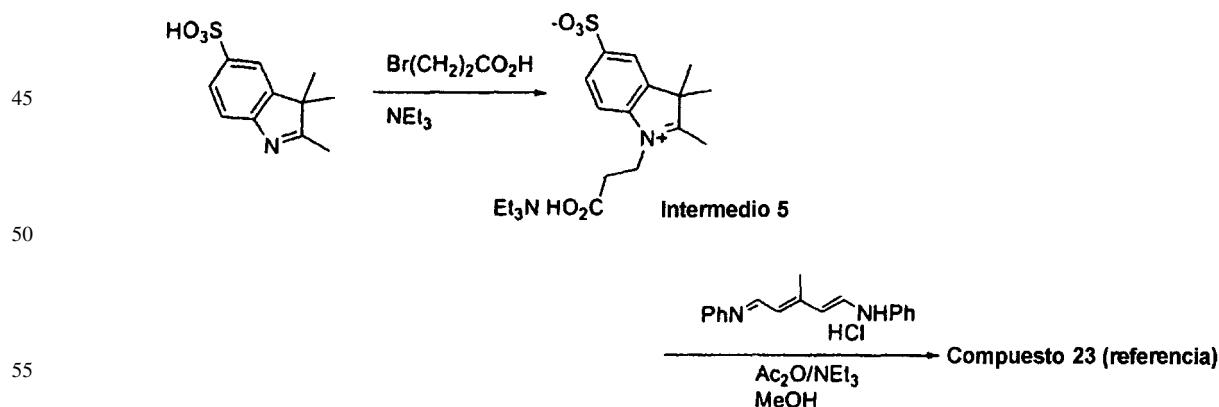
30 El Compuesto 15 se obtuvo a partir del Intermedio 5 en un método similar a aquel para el Compuesto 13.

35 RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ 2,00 (s, 12H), 2,72 (d, J=7,2Hz, 4H), 2,82 (t, J=7,2Hz, 4H), 3,30 (MeOH), 4,58 (t, J=7,2Hz, 4H), 4,70 (t, J=7,2Hz, 4H), 4,86 (H<sub>2</sub>O), 6,42 (d, J=13,2Hz, 2H), 6,62 (dd, J=13,2, 13,2Hz, 2H), 7,62-7,70 (m, 3H), 7,95-8,12 (m, 6H), 8,28 (d, J=7,2Hz, 2H), 8,42 (s, 2H).

## Ejemplo de referencia 11

## Síntesis del Compuesto 23 de referencia

40 A continuación se muestra la ruta sintética del Compuesto 23 de referencia.



## Síntesis del Intermedio 6

60 Se calentaron y agitaron a 160°C durante 6 horas 5-sulfo-2,3,3-trimetilindolenina (sintetizada según el método descrito en la Publicación No Examinada de Patente Japonesa (KOKAI) n° (Hei) 2-233658) (24,0 g, 0,1 moles), ácido 2-bromopropiónico (23,0 g, 0,15 moles) y trietilamina (10,1 g, 0,1 moles). Después de que la reacción estuvo terminada, se añadió metanol (200 ml) a la mezcla de reacción y se enfrió hasta la temperatura ambiente, y después los cristales resultantes se recogieron mediante filtración para obtener el Intermedio 6 (6,0 g, rendimiento: 19,3%).

65

## ES 2 305 444 T3

### Síntesis del Compuesto 23 de referencia

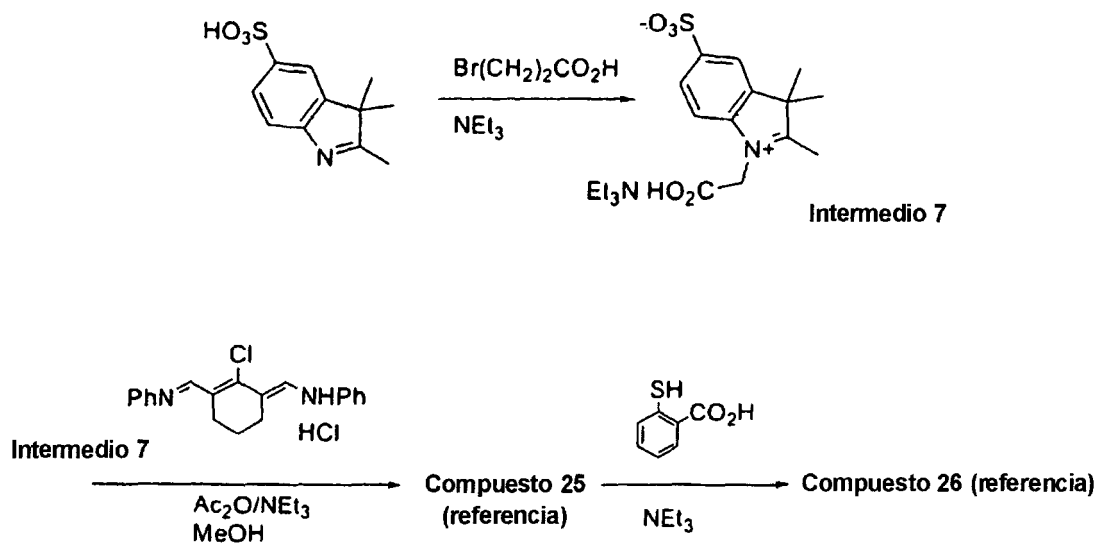
Se disolvió el Intermedio 1 (3,1 g, 10 mmoles) obtenido anteriormente y el monohidrocloreto de 1,7-diaza-1,7-difenil-1,3,5-heptatrieno (Publicación No Examinada de Patente Japonesa (KOKAI) n° (Hei) 8-295658) (1,5 g, 5 mmoles) en metanol (20 ml), y a la disolución resultante se le añadió trietilamina (2,5 g, 25 mmoles) y anhídrido acético (4,6 g, 45 mmoles), y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. A la mezcla de reacción se le añadió acetato de sodio (3,3 g, 33 mmoles), y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los cristales resultantes se recogieron por filtración y se lavaron con metanol (20 ml) para obtener el Compuesto 23 de referencia (2,0 g, rendimiento: 50,0%).

RMN <sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 1,60 (s, 12H), 2,30 (s, 3H), 2,60 (t, 4H, J=7,2Hz), 4,20 (t, 4H, J=7,2Hz), 6,25 (d, 2H, J=14,5Hz), 6, 55 (dd, 2H, 14,5, 14,5Hz), 7, 25 (d, 2H, J=7,0Hz), 7,70-7,80 (m, 4H), 8,00 (dd, 2H, J=14,5, 14,5Hz).

### Ejemplo de referencia 12

### Síntesis del Compuesto 25 de referencia y del Compuesto 26 de referencia

A continuación se muestra la ruta sintética del Compuesto 25 de referencia y del Compuesto 26 de referencia.



### Síntesis del Intermedio 7

El Intermedio 7 se sintetizó a partir de 5-sulfo-2,3,3-trimetilindolenina y ácido bromoacético en un método similar a aquel para el Intermedio 6 (16,6 g).

### Síntesis del Compuesto 25 de referencia

El Compuesto 25 de referencia se sintetizó a partir del Intermedio 7 y del Intermedio 8 (obtenido según el método descrito en Zh. Org. Khim., 13, p. 1189-1192, 1977), en un método similar a aquel para el Compuesto 23 de referencia (15,0 g).

MS(FAB-, glicerina) m/z = 844.

### Síntesis del Compuesto 26 de referencia

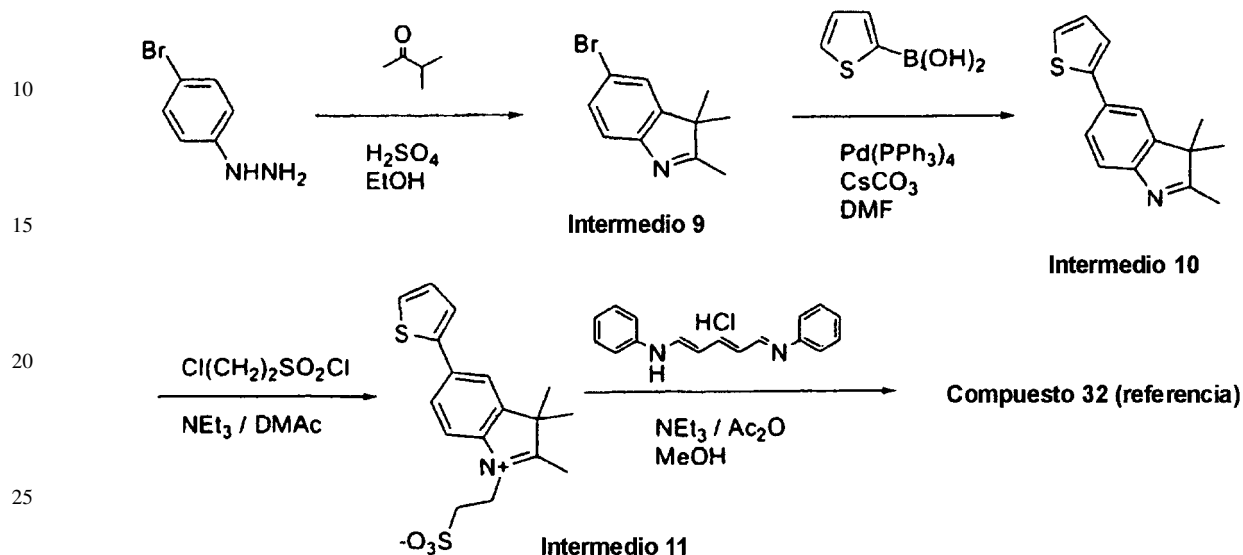
El Compuesto 25 de referencia (4,2 g, 5 mmoles) y trietilamina (1,0 g) se añadieron a agua (20 ml), y entonces a la disolución obtenida se le añadió ácido o-mercaptobenzoico (0,93 g, 6 mmoles) y se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. A la mezcla obtenida se le añadió acetato de potasio (2,0 g, 20 mmoles), y después se le añadió etanol (20 ml), el cristal resultante se filtró para obtener el Compuesto 26 de referencia (1,3 g, rendimiento: 27%).

MS(FAB-, glicerina) m/z = 962.

Ejemplo 13 de referencia

*Síntesis del Compuesto 32 de referencia*

5 A continuación se muestra la ruta sintética del Compuesto 32 de referencia.

*Síntesis del Intermedio 9*

Se disolvió monohidrocloreto de 4-bromofenilhidrazina (73,8 g, 0,33 mmoles) y 3-metil-2-butanona (33,2 g, 0,40 mmoles) en etanol (450 ml), y a la disolución resultante se le añadió ácido sulfúrico conc. (7,5 ml) y se puso a reflujo con agitación durante 8 horas. Después de enfriar la mezcla hasta la temperatura ambiente, la disolución se concentró hasta 100 ml a presión reducida. Al residuo, se añadió agua (400 ml) y acetato de etilo (400 ml), y después el pH de la capa acuosa se ajustó a 7 a 8 con disolución de hidróxido sódico. La disolución resultante se extrajo con acetato de etilo, se lavó con disolución saturada de cloruro de sodio, y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: hexano:acetato de etilo = 5:1 a 1:1), para obtener el Intermedio 9 como un líquido marrón (58,6 g, rendimiento 76%).

*Síntesis del Intermedio 10*

Se añadió el Intermedio 9 (4,76 g, 20 mmoles) y ácido tiofenborónico (3,84 g, 30 mmoles) a dimetilformamida (50 ml), y a la disolución resultante se le añadió tetraquisfenilfosfinapaladio (1,16 g, 9 mmoles) y cloruro de cesio (13,3 g, 40 mmoles), y se calentó y agitó en atmósfera de nitrógeno a 100°C durante 4 horas. Después de añadir agua (200 ml), la mezcla se extrajo con acetato de etilo (200 ml) y se lavó con disolución saturada de cloruro de sodio, y después la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (eluyente: hexano:acetato de etilo = 2:1 a 1:1), para obtener el Intermedio 10 como un sólido marrón (2,8 g, rendimiento: 58%).

*Síntesis del Intermedio 11*

Se añadió el Intermedio 10 (1,40 g, 6 mmoles) y trietilamina (0,59 g, 6 mmoles) a dimetilformamida (3 ml), y a la mezcla se le añadió gota a gota cloruro de 2-cloroetanosulfonilo (1,42 g, 9 mmoles) con enfriamiento con hielo. Después de que la agitación se continuó a temperatura ambiente durante 30 minutos, a la disolución se le añadió una disolución obtenida disolviendo hidróxido de sodio (0,23 g, 6 mmoles) a agua (2 ml), y se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 1 hora. A la mezcla se le añadió acetato de etilo, y la capa superior se eliminó por decantación. El residuo se secó para obtener el Intermedio 11. El Intermedio 11 se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional.

*Síntesis del Compuesto 32 de referencia*

El Intermedio 11 obtenido anteriormente y el monohidrocloreto de 1,7-diaza-1,7-difenil-1,3,5-heptatrieno se disolvieron en metanol (5 ml), y a la disolución resultante se le añadió trietilamina (160 mg, 2 mmoles) y ácido acético anhidro (230 mg, 2 mmoles), y después la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas. A esta mezcla se le

## ES 2 305 444 T3

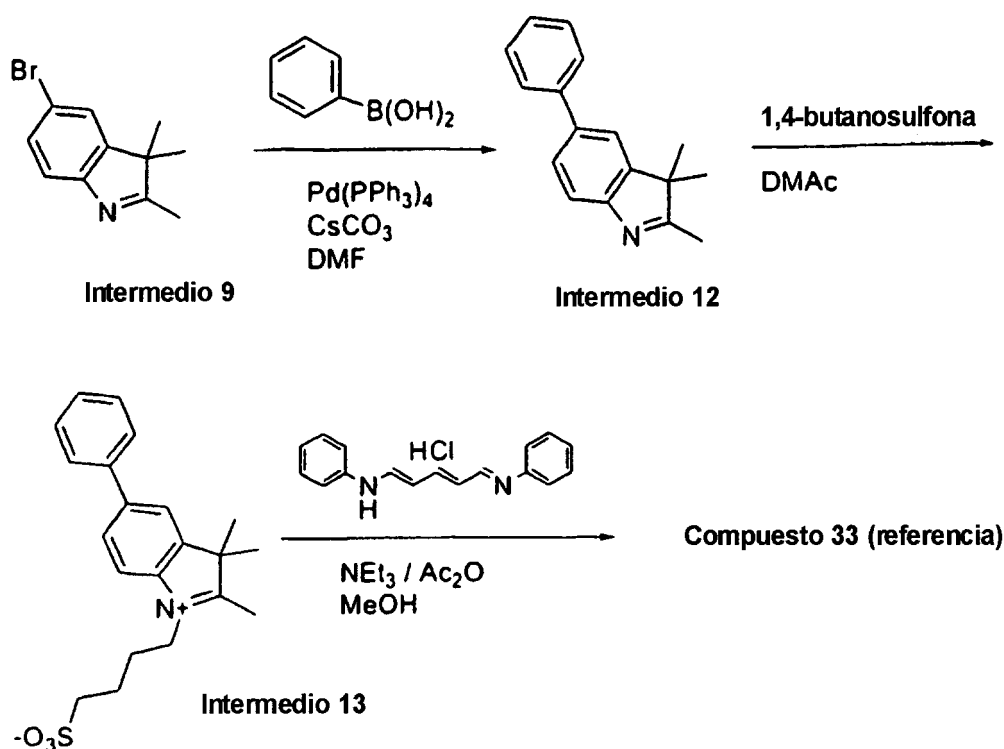
añadió acetato de etilo (20 ml), y los cristales precipitados se recogieron mediante filtración y se lavaron con acetato de etilo (10 ml). Los cristales se disolvieron en metanol (10 ml), y después a la disolución se le añadió una disolución saturada de acetato de potasio en metanol (10 ml). Los cristales precipitados se recogieron mediante filtración y se lavaron con metanol. Los cristales se purificaron mediante Sephadex LH-20 (diluyente: metanol) para obtener el Compuesto 32 de referencia (15 mg, rendimiento: 2% (a partir del Intermedio 2)).

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 1,75 (s, 12H), 3,25 (t, 4H, J=7,2Hz), 4, 50 (t, 4H, J=7,2Hz), 6,40 (d, 2H, J=14, 5Hz), 6,63 (dd, 2H, 14,5, 14,5Hz), 7,07-7,12 (m, 2H), 7,33-7,45 (m, 6H), 7,53-7,75 (m, 5H), 7,96 (dd, 2H, J=14,5, 14,5Hz)  
MS(FAB-, Glicerina) m/z = 760.

Ejemplo de referencia 14

*Síntesis del Compuesto 33 de referencia*

A continuación se muestra la ruta sintética del Compuesto 33 de referencia.



*Síntesis del Intermedio 12*

El Intermedio 12 se sintetizó a partir del Intermedio 9 y dihidroxifenilborano, en un método similar a aquel para el Intermedio 10 (3,6 g, rendimiento: 77%).

*Síntesis del Intermedio 13*

El Intermedio 12 (1,40 g, 6 mmoles) y 1,4-butanedisulfona (1,22 g, 9 mmoles) se disolvieron en dimetilacetamida (2 ml), y la disolución se agitó a 135°C durante 5 horas. A la disolución se le añadió acetato de etilo (20 ml) y se enfrió hasta la temperatura ambiente, y después los cristales precipitados se filtraron y se lavaron con acetato de etilo para obtener el Intermedio 13 (10 ml) (1,84 g, rendimiento: 84%).

*Síntesis del Compuesto 33 de referencia*

Se disolvieron el Intermedio 13 (1110 mg, 3 mmoles) y el monohidrocloruro de 1,7-diaza-1,7-difenil-1,3,5-heptatrieno (285 mg, 1 mmol) en metanol (5 ml), y a la disolución resultante se le añadió trietilamina (480 mg, 5 mmoles) y ácido acético anhidro (670 mg, 7 mmoles), y después se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas. A la mezcla de reacción se le añadió acetato de etilo (10 ml), y los cristales precipitados se recogieron mediante filtración y se lavaron con acetato de etilo (10 ml). Los cristales se disolvieron en metanol (5 ml) y se les añadió una disolución saturada

## ES 2 305 444 T3

de acetato de potasio en metanol (10 ml), y los cristales precipitados se filtraron y se lavaron con 5 ml. El cristal se purificó con Sephadex LH-20 (diluyente: metanol) para obtener el Compuesto 33 de referencia (250 mg, rendimiento: 30%).

5 RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 1,80 (s, 12H), 1,95-2,05 (m, 8H), 2,90 (t, 4H, J=7,2Hz), 4,20 (t, 4H, J=7,2Hz), 6,38 (d, 2H, J=14,5Hz), 6,62 (dd, 2H, 14,5, 14,5Hz), 7,30-7,48 (m,8H), 7,60-7,74 (m, 9H), 7,93(dd, 2H, J=14,5,14,5Hz)  
MS(FAB-, alcohol nitrobenfílico) m/z = 803.

10 Ejemplo de referencia 15

### Síntesis del Compuesto 34 de referencia

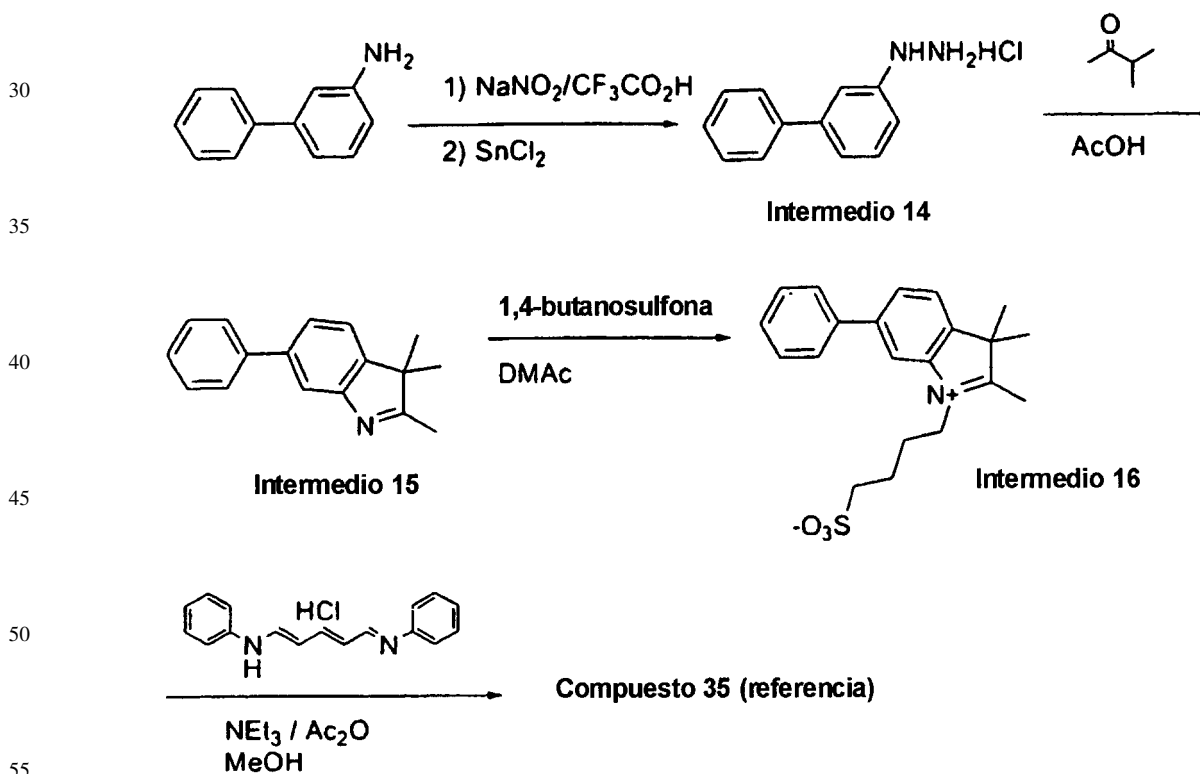
15 El Compuesto 34 de referencia se sintetizó a partir del Intermedio 9 y ácido 4-metilmercaptofenilborónico, en un método similar a aquel para el Compuesto 33 de referencia (15 mg).

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 1,68 (s, 12H), 1,95-2,10 (m, 8H), 2,50 (s, 6H), 3,00 (t, 4H, J=7,2Hz), 4,10 (t, 4H, J=7,2Hz), 6,30 (d, 2H, J=14,5Hz), 6,62 (dd, 2H, 14,5, 14,5Hz), 7,20-7,70 (m, 19H).

20 Ejemplo de referencia 16

### Síntesis del Compuesto de referencia 35

25 A continuación se muestra la ruta sintética del Compuesto 35 de referencia.



### Síntesis del Intermedio 14

60 Se añadieron 25,0 g de 3-aminodifenileno (0,15 moles) a 100 ml de ácido trifluoroacético, y la mezcla se enfrió hasta la temperatura interna de 0°C. A la mezcla se le añadió gota a gota una disolución obtenida disolviendo 10,2 g de nitrito de sodio (0,15 moles) en 100 ml de agua, mientras la temperatura de la mezcla de reacción se mantenía por debajo de 5°C. Después de que la adición gota a gota estuvo terminada, la mezcla se agitó a la misma temperatura durante 15 minutos, y después a la mezcla se le añadió una disolución obtenida disolviendo 100 g de cloruro estánnico (0,54 moles) en 50 ml de ácido clorhídrico concentrado, mientras que la temperatura de la mezcla de reacción se mantenía por debajo de 10°C. Después de terminar la adición gota a gota, los cristales precipitados mediante adición de 250 ml de agua se recogieron por filtración y se lavaron con 200 ml de cloruro de metileno. El Intermedio 14 resultante se secó y se usó para la síntesis del Intermedio 15 sin purificación.

65

*Síntesis del Intermedio 15*

El Intermedio 14 obtenido anteriormente (cantidad total) y 12,9 g de 3-metil-2-butanona (0,15 moles) se añadieron a 140 ml de ácido acético, y la mezcla se calentó con agitación durante 2 horas y 30 minutos. Después de que la mezcla se enfriase hasta la temperatura ambiente, los cristales precipitados se eliminaron por filtración, y el filtrado se concentró a presión reducida hasta un cuarto del volumen. Al residuo se le añadió 300 ml de agua y 300 ml de ácido acético, y los precipitados insolubles se eliminaron por filtración usando celita. El precipitado se extrajo con acetato de etilo (300 ml, 200 ml x 2), y el extracto se lavó con disolución saturada de hidrogenocarbonato de sodio y con salmuera saturada, y después se secó sobre sulfato de sodio y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: hexano:acetato de etilo = 3:1 a 2:1). El cristal obtenido se recrystalizó en 50 ml de hexano para obtener el Intermedio 15. 1,3 g (rendimiento: 4%).

*Síntesis del Compuesto 35 de referencia*

El Compuesto 35 de referencia se sintetizó a partir del Intermedio 15 en un método similar a aquel para el Intermedio 13 y para el Compuesto 33 de referencia (65 mg).

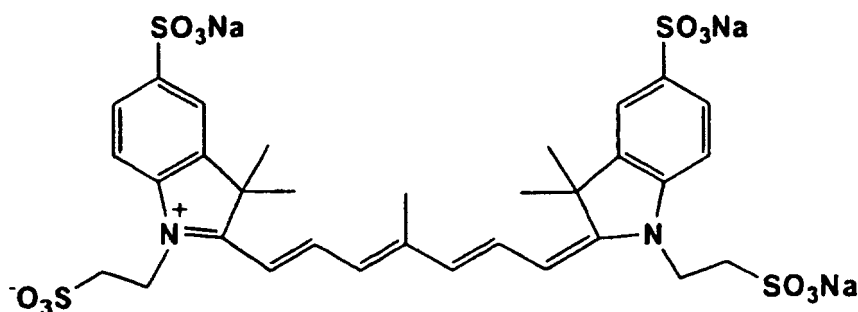
MS(FAB-, Glicerina)  $m/z = 842,804$ .

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm) 1,70 (s, 12H), 1,90-2,00 (m, 8H), 2,90 (t, 4H,  $J=7,2\text{Hz}$ ), 4,10 (t, 4H,  $J=7,2\text{Hz}$ ), 6,22 (d, 2H,  $J=14,5\text{Hz}$ ), 6,55 (dd, 2H, 14,5, 14,5Hz), 7,30-7,60 (m, 17H), 7,77 (dd, 2H,  $J=14,5, 14,5\text{Hz}$ ).

Ejemplo 1 de Ensayo

*Ensayo de Formación de Imágenes mediante Fluorescencia*

Se injertaron subcutáneamente trozos de tejido tumoral de carcinoma de colon de ratón (carcinoma de colon 26) en la mama izquierda de ratones atímicos BALB/c (5 semanas, Clea Japan, Inc.). Diez días después, cuando el tumor creció hasta un diámetro de alrededor de 8 mm, los ratones se sometieron al ensayo. Como fuente de luz de excitación de fluorescencia, se usó un láser de zafiro de titanio. Los ratones del ensayo se expusieron uniformemente a la luz del láser usando una guía de luz de tipo anillo (Sumita Optical Glass Co.) en la que la dispersión de la irradiación estaba dentro del 10%. La salida de la potencia de irradiación se ajustó de forma que la potencia fuese alrededor de 40  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  cerca de la superficie de la piel de los ratones. La fluorescencia se excitó a la longitud de onda de excitación máxima de cada compuesto, y la emisión de la fluorescencia de los ratones se detectó y fotografió a través de un filtro de corte de longitud de onda corto (IR84, IR86, Fuji Photo Film CO., LTD.) con una cámara CCD (C4880, Hamamatsu Photonics K.K.). El filtro de corte se seleccionó para que se adecuase a la longitud de onda de excitación del compuesto. El tiempo de exposición se ajustó dependiendo de la intensidad de la fluorescencia de cada compuesto. El Compuesto 2, como compuesto de ensayo (0,5 mg/ml), se disolvió en disolución salina fisiológica o en tampón de fosfato (pH 7,4) y se administró a los ratones vía una vena de la cola a una dosis de 5,0 mg/kg. A un tiempo dado después de la administración del compuesto de ensayo, los ratones se anestesiaron con éter dietílico, y se fotografiaron las imágenes de la luz fluorescente de todo el cuerpo de los ratones. Para comparación, se administró cada uno de ICG (5 mg/kg, i.v.) y el siguiente compuesto (Compuesto A), y la formación de imágenes se llevó a cabo de la misma manera que antes. Los resultados se muestran en las Figs. 1 a 3.

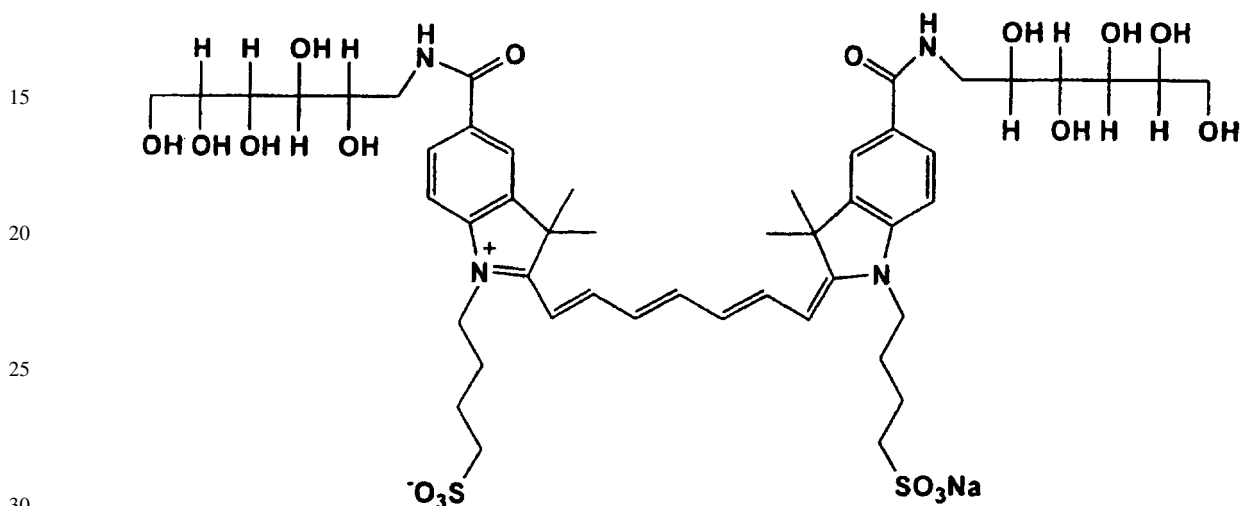


El Compuesto 2 dio imágenes claras de los tumores a un tiempo más corto después de la administración, en comparación con los compuestos de referencia. La posición del tumor no estaba clara dentro de la hora después de la administración de los compuestos de referencia. Mientras, el Compuesto 2 dio con éxito imágenes claras del tumor a un tiempo de 10 a 30 minutos después de la administración, y se reveló como altamente eficaz como agente de contraste fluorescente (Fig. 1).

## Ejemplo 2 de Ensayo

*Ensayo de Formación de Imágenes mediante Fluorescencia*

5 Se prepararon ratones que tienen tumores de la misma manera que en el Ejemplo 1 del Ensayo, y las condiciones para la irradiación fueron las mismas que las explicadas en el Ejemplo 1 del Ensayo. El Compuesto 5, Compuesto 7 y Compuesto 10 se usaron como compuestos de ensayo. Cada uno de los compuestos de ensayo (0,5 mg/ml) se disolvió en disolución salina fisiológica o en tampón de fosfato (pH 7,4) y se administró a los ratones vía una vena de la cola a una dosis de 5,0 mg/kg. Para comparación, se administró a los ratones el siguiente compuesto (Compuesto B, 5 mg/kg, i.v.).



La luz se generó usando un sistema de láser de estado sólido, pulsado, ajustable, que consiste en un oscilador paramétrico óptico (OPO) bombeado mediante el tercer armónico de un láser de Nd:Yag (Coherent Inc.). Se escogió una longitud de onda de excitación de  $\lambda_{ex} = 740$  nm, y se guió con una fibra óptica hasta los ratones atómicos que contienen el tumor. Se obtuvo la imagen de la excitancia fluorescente específica del colorante usando una combinación de filtro (Corion) y una cámara CCD intensificada (Roper Scientific.) a diferentes tiempos después de la administración del colorante (Fig. 4). Las imágenes mediante fluorescencia se tomaron antes de la administración y a 1 min., 10 min., 30 min., 60 min., 2 horas, 4 horas, 24 horas después de la administración intravenosa del colorante vía la vena de la cola lateral, a una dosis estándar de 5 mg/kg. En los primeros 60 minutos, la temperatura corporal de los animales se mantuvo a 38°C con una almohadilla calefactora. Las propiedades de las imágenes mediante fluorescencia de los compuestos se comparó en modelos de tumores de ratones atómicos. Los resultados se muestran en las Figs. 5 a 8. El Compuesto 5, Compuesto 7 y Compuesto 10 dieron imágenes claras de tumores a un tiempo más corto después de la administración, en comparación con el compuesto de referencia (Compuesto B). La posición del tumor no estaba clara dentro de la hora después de la administración del compuesto de referencia (Fig. 8), mientras que los compuestos de la presente invención dieron con éxito imágenes claras del tumor a un tiempo de 10 a 30 minutos después de la administración (Figs. 5 a 7) y revelaron ser muy eficaces como agentes de contraste fluorescentes.

**Aplicabilidad industrial**

El agente de contraste fluorescente del infrarrojo cercano de la presente invención puede emitir fluorescencia en el infrarrojo cercano mediante una luz de excitación. La fluorescencia del infrarrojo cercano es superior en permeabilidad a través de los tejidos biológicos, y por lo tanto el agente permite la detección de una lesión en una parte profunda de un cuerpo vivo.

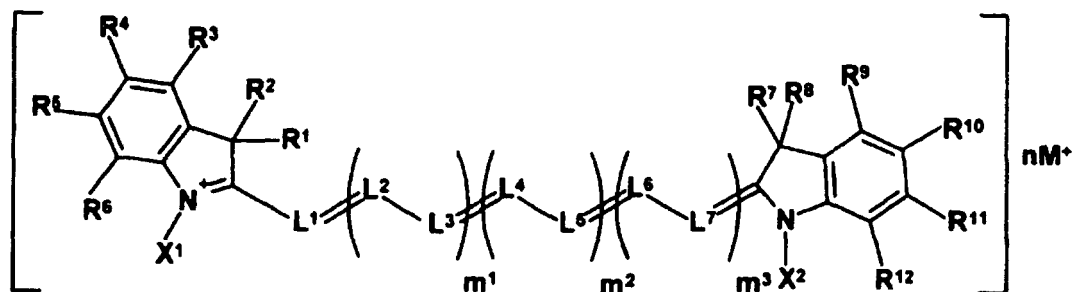
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la siguiente fórmula [I], o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

5

10

15



20 en la que

$R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^7$  y  $R^8$  representan independientemente un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_{10}$  sustituido o no sustituido, o un grupo arilo sustituido o no sustituido, y  $R^1$  y  $R^2$ , y/o  $R^7$  y  $R^8$ , se pueden unir entre sí para formar un anillo;

25

$R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$  y  $R^{12}$  representan independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_6$  sustituido o no sustituido, un grupo arilo sustituido o no sustituido, un átomo de halógeno, un grupo ciano, un grupo carboxilo, un grupo sulfo, o un grupo heteroarilo sustituido o no sustituido, en el que el grupo heteroarilo se selecciona de un grupo tienilo, un grupo benzotienilo, un grupo furilo, un grupo benzofurilo, un grupo pirrolilo, un grupo imidazolilo, y un grupo quinolilo, y sus sustituyentes se seleccionan de un grupo hidroxilo, un átomo de halógeno, un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_6$ , un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_6$  halogenado, un grupo alcoxi de  $C_1$ - $C_6$ , un grupo alquilen  $C_1$ - $C_6$ -dioxo, un grupo carboxilo, un grupo alcoxi  $C_1$ - $C_6$ -carbonilo, un grupo amino no sustituido, un grupo amino sustituido con alquilo de  $C_1$ - $C_6$ , un grupo sulfo, y un grupo ciano, y  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$  y  $R^{12}$  se pueden unir entre sí para formar un anillo;

35

$m^1$  representa 0 ó 1;

$m^2$  representa 0 ó 1;

40

$m^3$  representa 0 ó 1;

$L^1$ ,  $L^2$ ,  $L^3$ ,  $L^4$ ,  $L^5$ ,  $L^6$ , y  $L^7$  representan independientemente un grupo metino sustituido o no sustituido, con la condición de que cuando dos o más de los grupos metino tengan sustituyentes, los sustituyentes se puedan unir entre sí para formar un anillo;

45

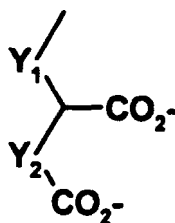
$M$  representa un átomo de hidrógeno, un metal, o una sal de amonio cuaternario;

$n$  representa un número entero de 1 a 7, necesario para neutralizar la carga,

50

$X^2$  representa un grupo alquilo de  $C_1$ - $C_{15}$  sustituido o no sustituido, o un grupo arilo sustituido o no sustituido, y  $X^1$  es un grupo representado por la siguiente fórmula (i):

55



60

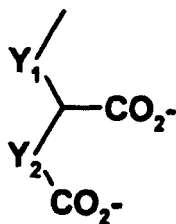
en la que  $Y^1$  y  $Y^2$  representan independientemente un grupo enlazante divalente, sustituido o no sustituido,  $X^1$  y  $X^2$  en total tienen 2 a 4 grupos carboxilo, para uso en un método de formación *in vivo* de imágenes mediante fluorescencia.

65

2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que cada uno de  $m^1$ ,  $m^2$  y  $m^3$  es 1, para uso en un método de formación *in vivo* de imágenes mediante fluorescencia.

## ES 2 305 444 T3

3. El compuesto según la reivindicación 1 ó 2, en el que  $X^1$  y  $X^2$  representan independientemente un grupo representado por la siguiente fórmula (i):



5

10

15

en la que  $Y_1$  y  $Y_2$  representan independientemente un grupo divalente sustituido o no sustituido, para uso en un método de formación *in vivo* de imágenes mediante fluorescencia.

20

4. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos uno de  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ , y  $R^{12}$  es un grupo arilo sustituido o no sustituido, o un grupo heteroarilo sustituido o no sustituido, para uso en un método de formación *in vivo* de imágenes mediante fluorescencia.

25

5. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que  $Y^1$  representa  $-(CH_2)_pCONH-$ , en el que  $p$  representa un número entero de 1 a 4, e  $Y^2$  representa  $-(CH_2)-$  o  $-(CH_2)_2-$ , para uso en un método de formación *in vivo* de imágenes mediante fluorescencia.

30

6. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en la formación de imágenes de tumores.

7. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para uso en angiografía.

8. Un agente de contraste fluorescente del infrarrojo, que comprende un compuesto según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

35

9. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de una composición para uso en la formación de imágenes mediante fluorescencia de un cuerpo vivo.

10. Uso según la reivindicación 9, en el que la composición es para uso en la formación de imágenes de tumores.

11. Uso según la reivindicación 9, en el que la composición es para uso en angiografía.

40

45

50

55

60

65

Fig.1

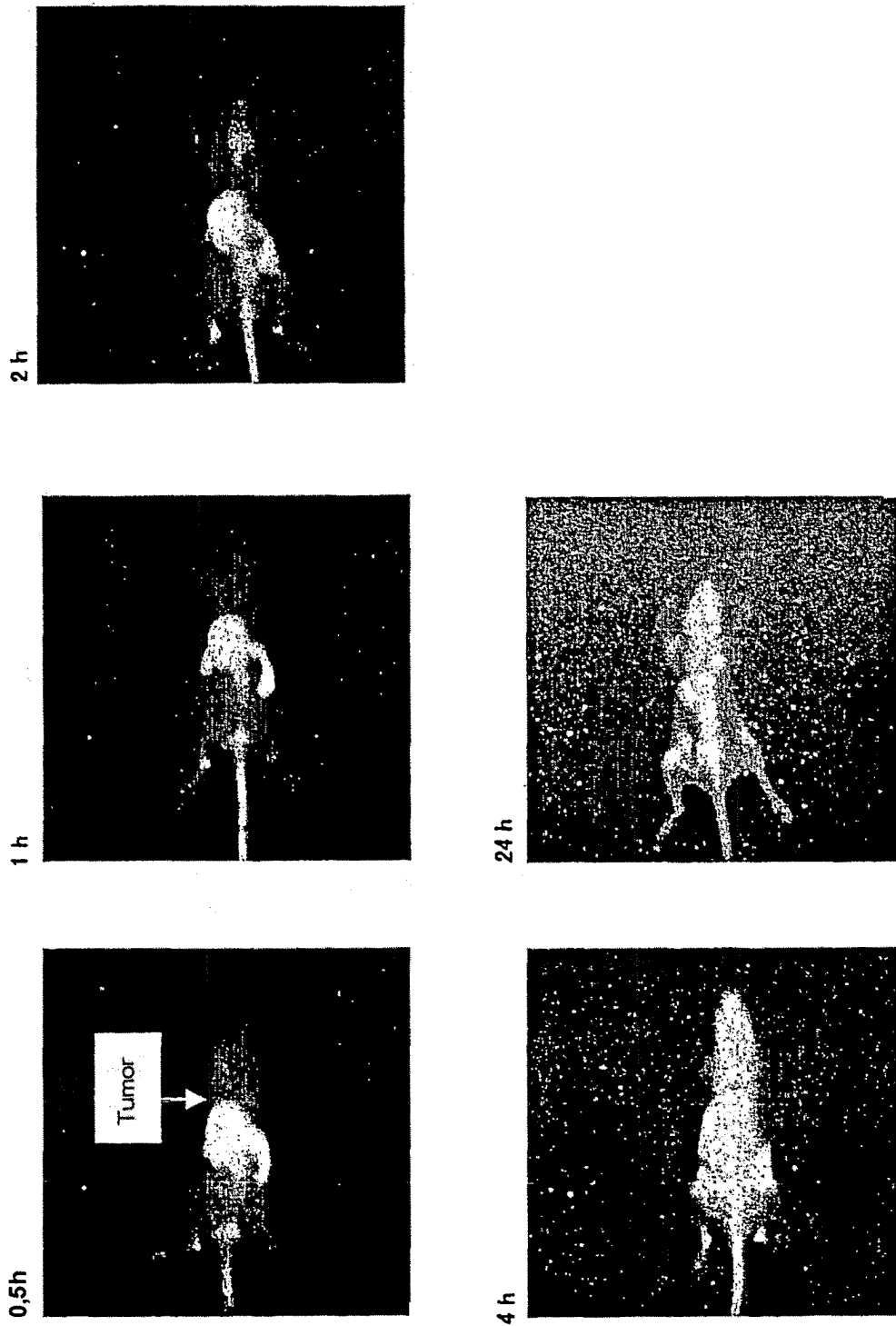


Fig.2

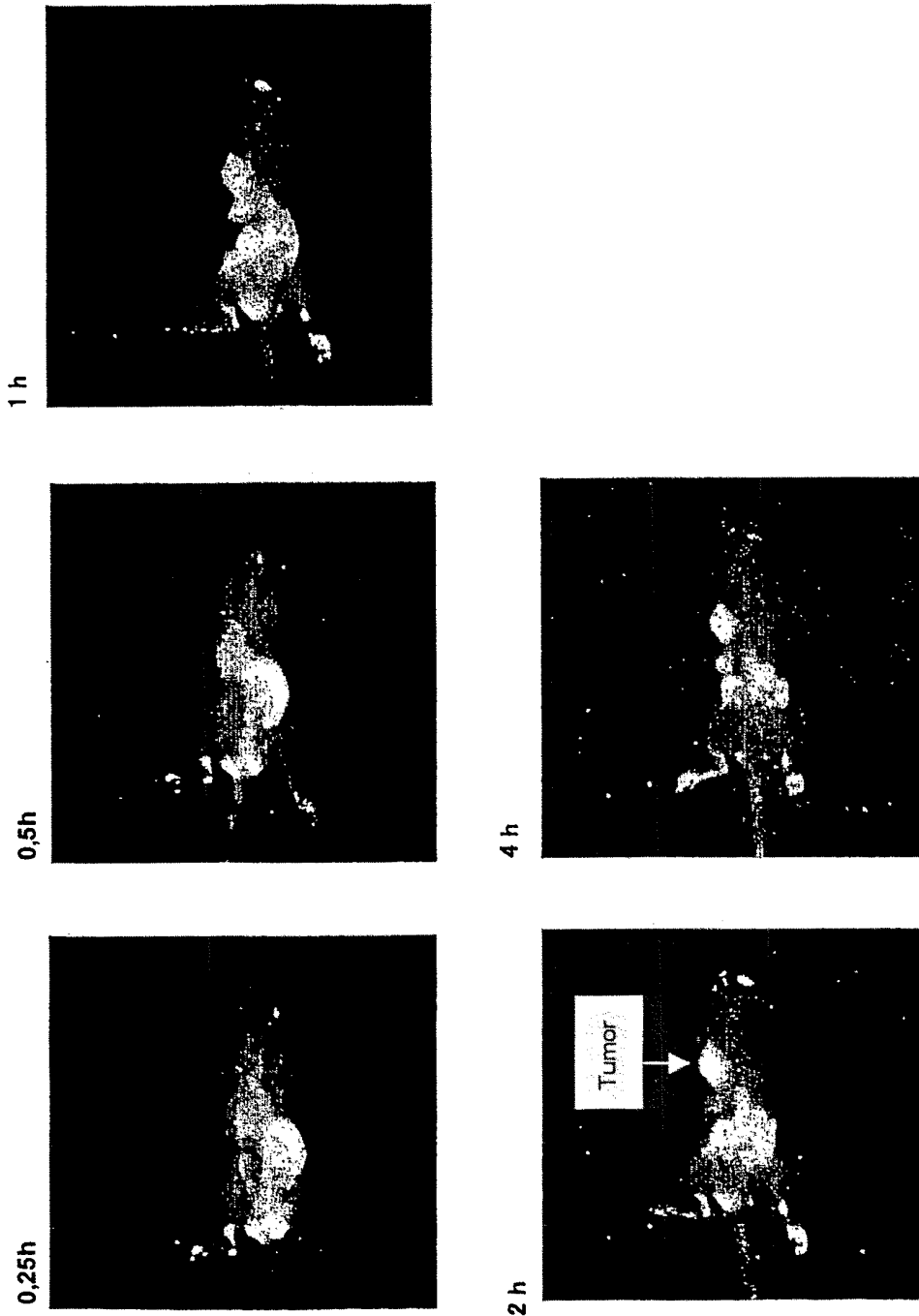


Fig.3

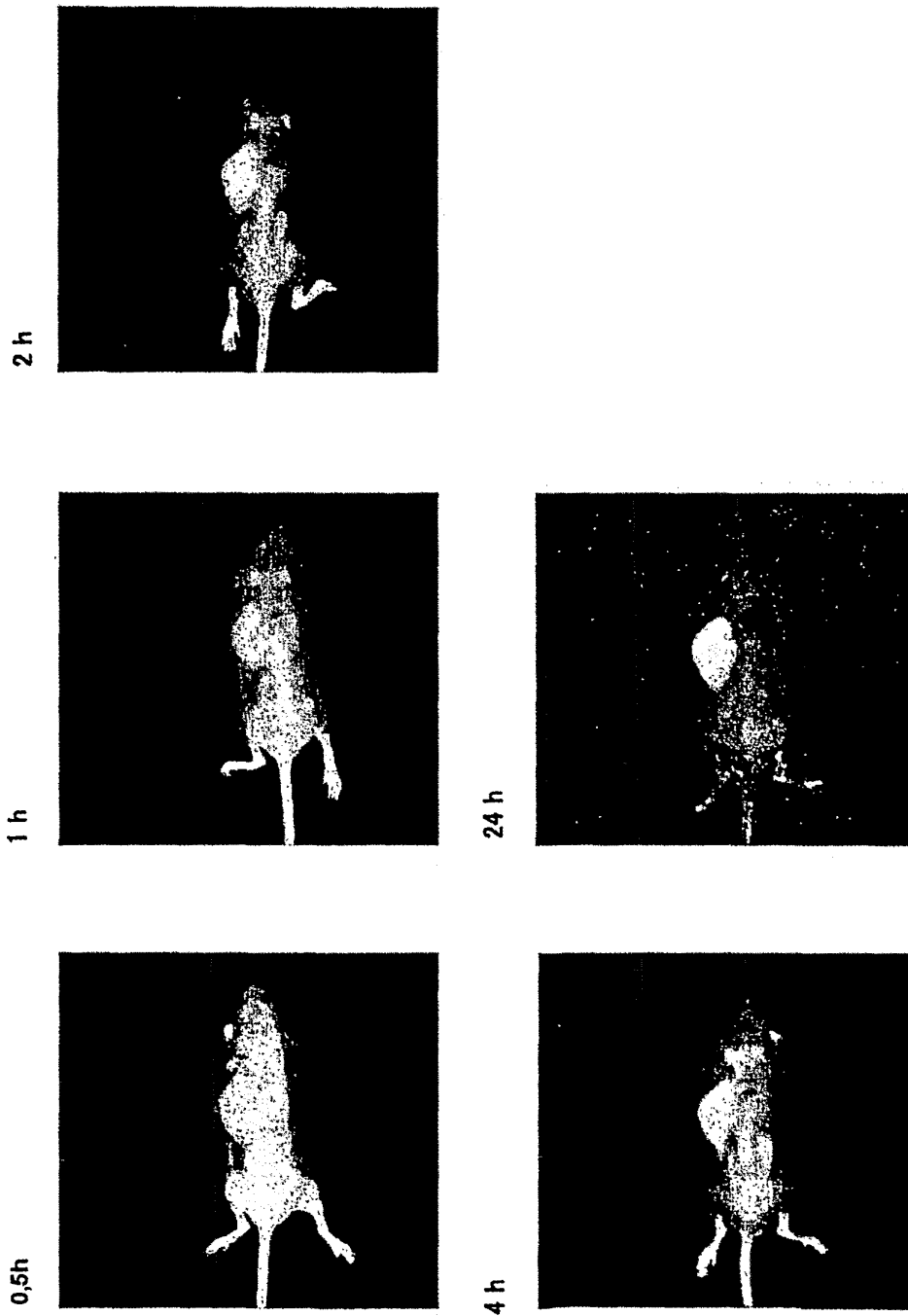


Fig.4

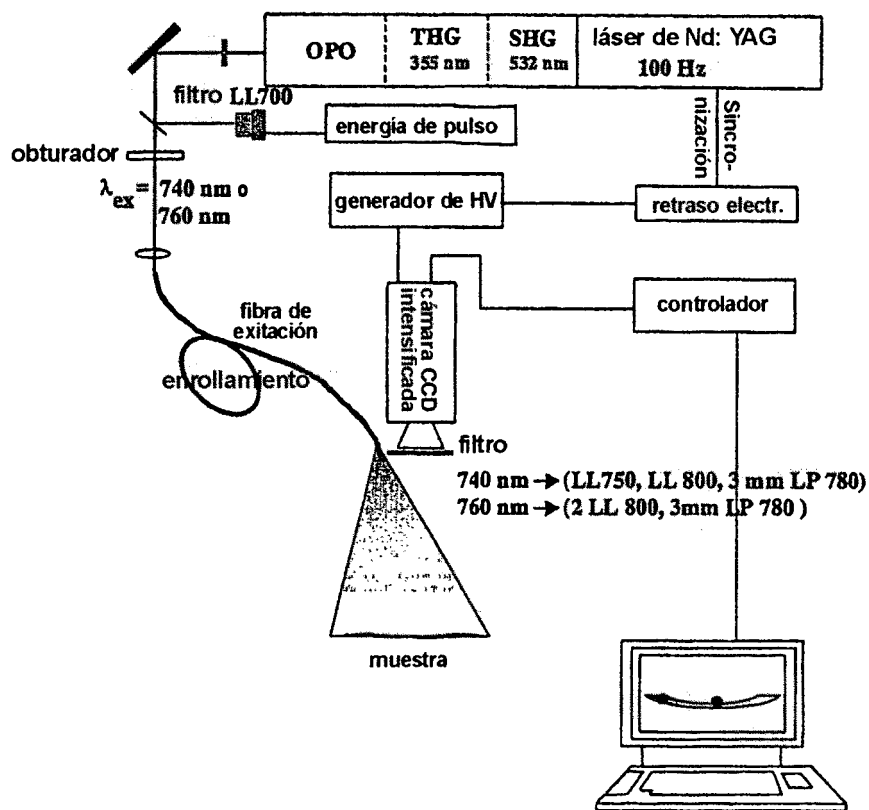


Fig.5

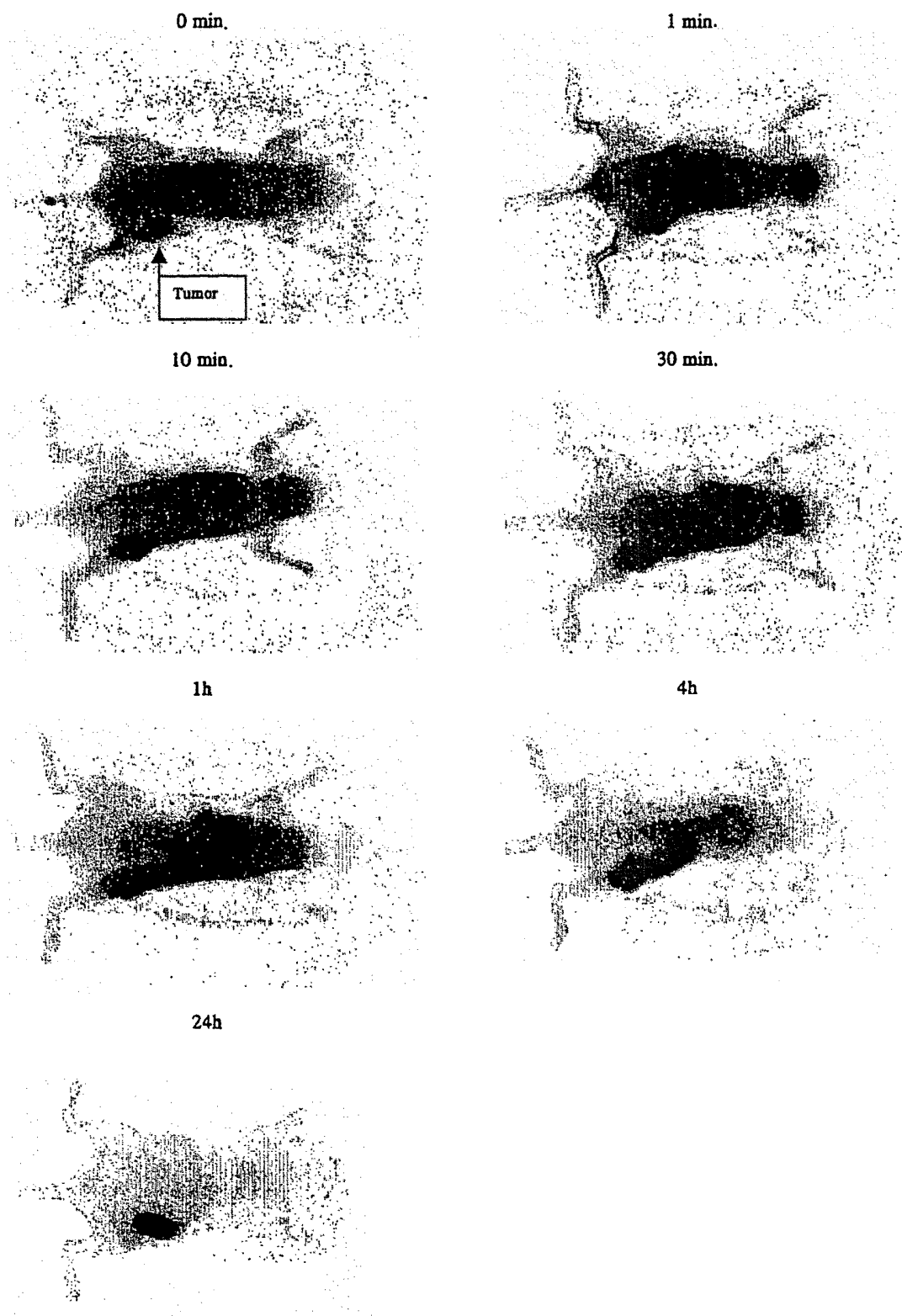


Fig.6

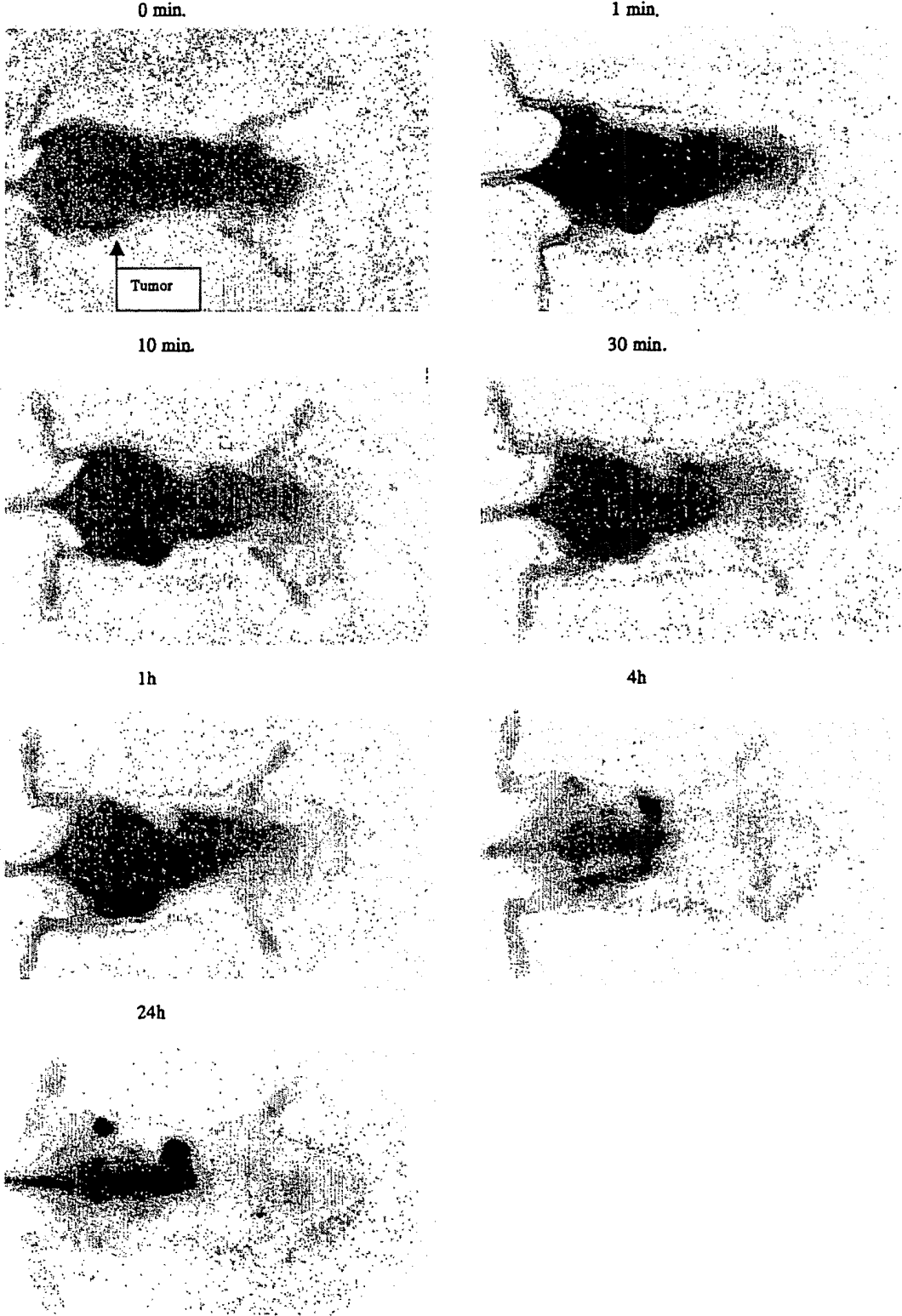


Fig.7

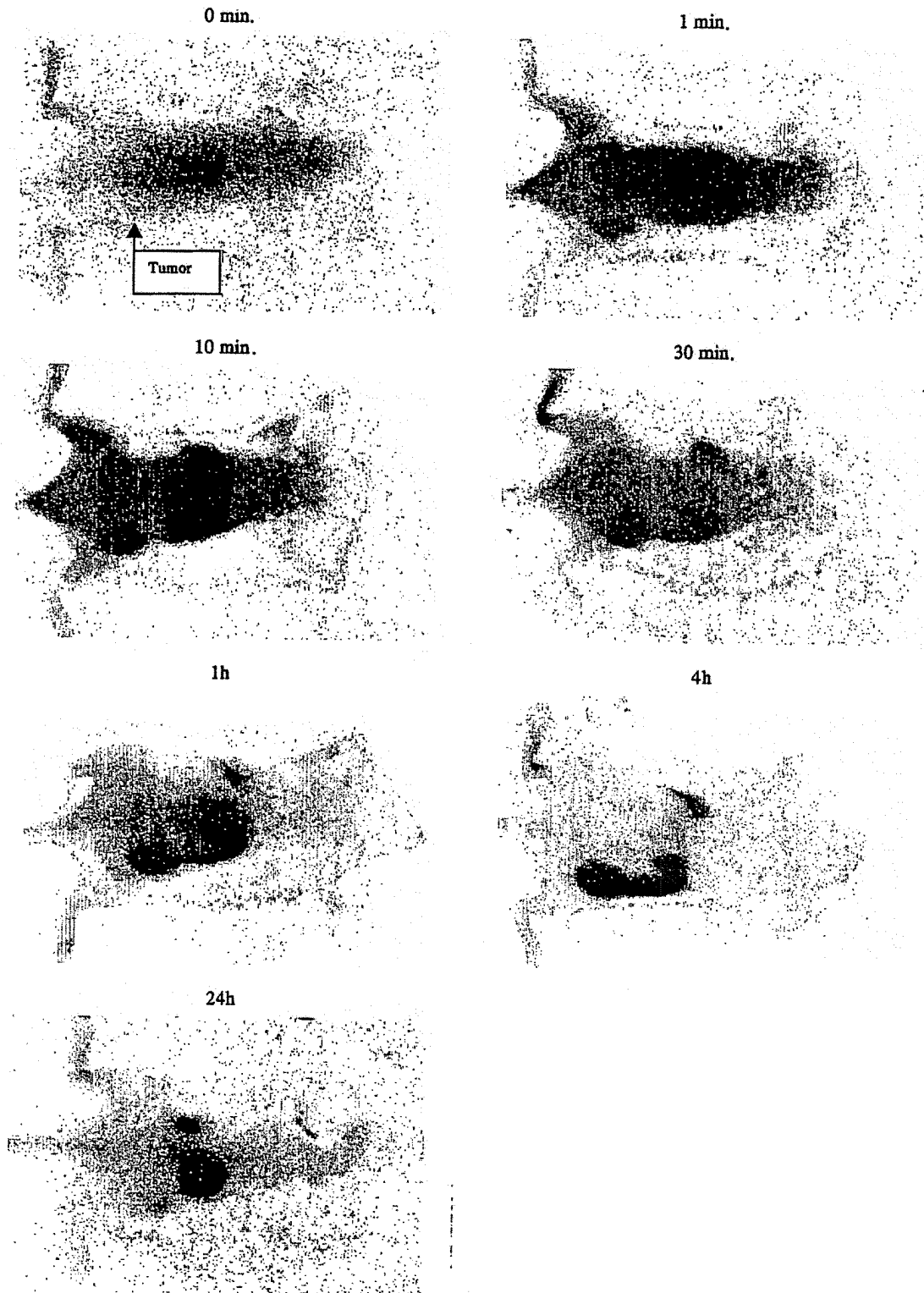
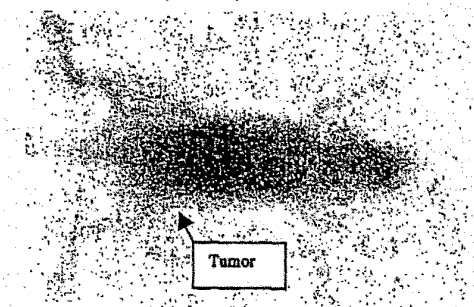
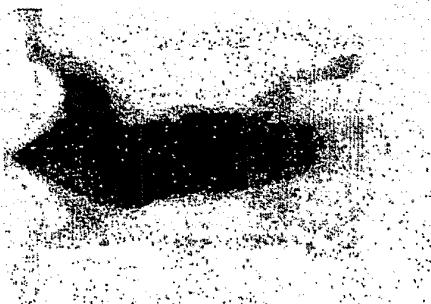


Fig.8

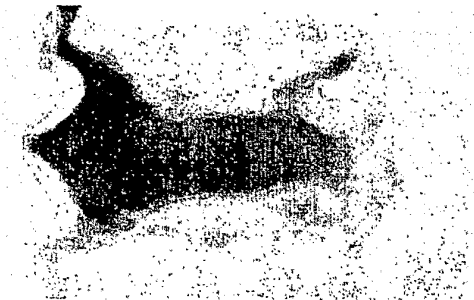
No.:8, ratón 17, 0 min., Archivo 10SLi7



No.:8, ratón 17, 1 min., Archivo 10SLi12



No.:8, ratón 17, 10 min., Archivo 10SLi17



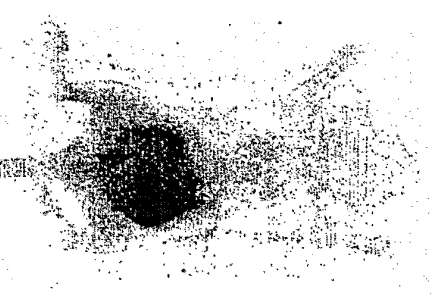
No.:8, ratón 17, 30 min., Archivo 10SLi30



No.:8, ratón 17, 1h, Archivo 10SLi43



No.:8, ratón 17, 4h, Archivo 10SLi53



No.:8, ratón 17, 24h, Archivo 11SLi2

