



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 572**

51 Int. Cl.:

C09B 23/02 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07H 19/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04023147 .4**

96 Fecha de presentación : **02.07.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1491591**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.12.2004**

54

Título: **Nuevos marcadores fluorescentes de cianina que contienen un grupo enlazador sulfamido.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.11.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.11.2009

73

Titular/es: **Visen Medical, Inc.**
45 Wiggins Avenue
Bedford, Massachusetts 01730, US

72

Inventor/es: **Caputo, Giuseppe y**
Della Ciana, Leopoldo

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 329 572 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

Nuevos marcadores fluorescentes de cianina que contienen un grupo enlazador sulfamido.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una nueva clase de tintes fluorescentes pertenecientes a la familia de las cianinas. Los nuevos tintes fluorescentes pueden ser excitados utilizando diodos y láseres diódicos emisores de luz potentes pero económicos; los mismos exhiben una solubilidad satisfactoria en agua y pueden combinarse o conjugarse a una gran diversidad de moléculas o superficies para propósitos de marcación.

Antecedentes de la invención

En los últimos años se ha producido un gran aumento en la investigación concerniente a la marcación fluorescente de compuestos biológicos para el propósito de desarrollar métodos de ensayo más sencillos y más sensibles.

En particular, una clase de tintes fluorescentes ha atraído gran atención, concretamente la clase de los tintes de cianina. Mientras que en el pasado gran parte del trabajo acerca de estos compuestos se enfocaba en la obtención de materiales lipófilos para utilización en procesos fotográficos, el campo de aplicación actual en las ciencias biológicas requiere en su lugar especies hidrófilas. Además, ha surgido un nuevo requisito, en la necesidad de proporcionar enlaces espaciadores reactivos para utilización en la fijación de los tintes a biomoléculas.

Con referencia a la estructura básica de los compuestos tal como se muestra en la Fig. 1, puede verse que tales grupos enlazadores pueden estar unidos generalmente o bien a la porción aromática de la molécula, o a los nitrógenos de indolenina, o al puente polimetino formando que forma el resto Q.

Por ejemplo, Waggoner *et al.*, describieron en Cytometry 10, 3-10 (1989) grupos yodoacetamido unidos a la estructura aromática, para el propósito de marcar moléculas que contienen tiol, y grupos isotiocianuro unidos también a la estructura aromática para marcación de compuestos que contienen grupo amino (en Cytometry 10, 11-19 (1989)).

Mank y colaboradores en Anal. Chem. 67, 1742-1748 (1995) fabricaron derivados de tintes cianina de ésteres de hidroxisuccinimida (NHS) a partir de grupos carboxilo o grupos carboximetilo unidos a la estructura aromática, para derivatización en precolumna de aminas en cromatografía líquida. Las aminas marcadas podían detectarse luego con sensibilidad muy alta por fluorescencia visible inducida por láseres diódicos.

Waggoner y colaboradores desarrollaron marcadores de cianina en los cuales la función reactiva NHS está conectada al nitrógeno de indolenina por una cadena alquílica (Mujumdar *et al.*, Bioconjugate Chem. 4, 105-111, 1993). Este enfoque fue seguido también por Brush y Erie (EE.UU. 5.808.044) que describieron un método para fabricar cianina-fosforamiditos útiles en marcación de nucleótidos.

Patonay y colaboradores describieron una clase de tricarbocianina de tintes de cianina que contienen grupos isotiocianuro unidos al puente polimetino por un enlazador tiofenol para la fijación de moléculas con la funcionalidad amino en J. Org. Chem., 57, 4578-4580 (1992).

Si bien los enfoques anteriores consiguieron diversos grados de éxito, en muchos casos introducían efectos secundarios indeseables en los tintes. Por ejemplo, cuando el grupo reactivo está unido directamente a una estructura aromática, la eficiencia fluorescente del tinte se ve afectada negativamente como se muestra en Anal. Chem. 67, 1742-1748 (1995). En otros casos, la existencia de una cadena lateral flexible unida directamente al N de indolenina permite que la molécula marcada se ponga en contacto estrecho con la cadena cromófora de polimetino: esto puede perturbar o afectar negativamente también a la fluorescencia del tinte por extinción intermolecular. Finalmente, algunos enfoques (v.g. Organic Chem., 57, 4578-4580 (1992)) pueden utilizarse solamente para tintes particulares.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se han desarrollado tintes fluorescentes de cianina con grupos reactivos adecuados enlazados al entramado aromático por una cadena sulfamidoalquilo, como se muestra en Fig. 1.

Una gran diversidad de marcadores fluorescentes de cianina pueden fabricarse siguiendo este método, útil para marcación de moléculas que contengan funcionalidades amino, tiol e hidroxilo. Por el mismo procedimiento general, los marcadores de cianina pueden hacerse también más adecuados para fijación de moléculas que contienen aldehídos, derivados de ácidos carboxílicos tales como cloruros, anhídridos y ésteres activos, o grupos maleimido. La presente invención ofrece ventajas considerables sobre los métodos previamente descritos en términos de eliminación de todas las posibles interferencias entre los marcadores fluorescentes de cianina y la molécula marcada. La misma es también de aplicabilidad más general.

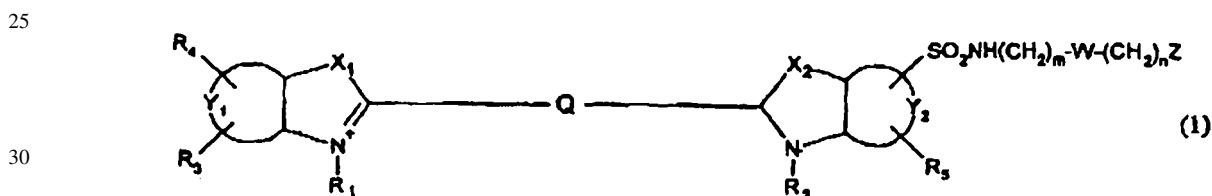
Estas valiosas propiedades se obtienen por fijación de un grupo espaciador alquilen flexible a la estructura aromática rígida del tinte por un enlace sulfamido muy estable y de introducción fácil. Dado que la porción reactiva de los marcadores está posicionada en el mismo extremo de la cadena alquilen arriba mencionada, la molécula marcada

ya no puede entrar en contacto estrecho con el segmento cromóforo de polimetino del tinte. Sin embargo, la flexibilidad proporcionada por la cadena alquilenos puede ser ventajosa en muchos casos a fin de obtener un rendimiento de marcación satisfactorio, especialmente con moléculas impedidas.

Se seleccionó el grupo aril-sulfamido debido a que el mismo no interfiere con el comportamiento fluorescente del tinte y debido también a que su precursor, el grupo sulfonato, se encuentra comúnmente en un número muy grande de arilaminas, que son necesarias para la síntesis de los tintes de cianina. En contraste, el grupo carboxilo, que se seleccionó como enlazador o para activación directa por la vía de los ésteres de NHS, no sólo causa una disminución en el rendimiento cuántico de fluorescencia de los tintes como ha sido demostrado por Mank y colaboradores en Anal. Chem. 67, 1742-1748 (1995), sino que, además, los precursores de aminoaril-carboxilo adecuados para la síntesis de los tintes no están disponibles tan generalmente como los ácidos aminoaril-sulfónicos o sulfonatos correspondientes. La última afirmación es particularmente aplicable a la serie del naftaleno. En este caso, los grupos carboxilo y amino precisan estar localizados en anillos aromáticos distintos para permitir la formación del precursor de indolina. Sin embargo, en todos los ácidos amino-naftalenocarboxílicos disponibles comúnmente, ambos grupos funcionales están unidos al mismo anillo. En contraste, están disponibles docenas de ácidos aminonaftaleno-sulfónicos debido a su uso como compuestos intermedios de tintes y en muchos de tales compuestos los grupos amino y sulfónico se encuentran en anillos distintos como se requiere por la presente invención.

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención está dirigida a tintes fluorescentes de la fórmula:



en donde:

X_1 y X_2 se seleccionan independientemente del grupo constituido por $-O-$, $-S-$, $-C(CH_3)_2-$ o $-C(=CH_2)-$;

Y_1 e Y_2 son átomos de carbono e hidrógeno requeridos para formar un anillo benzo-condensado o nafto-condensado;

Q es una cadena polimetino;

R_1 y R_2 se seleccionan independientemente del grupo constituido por H , alquilo C_1-C_4 , grupo alquilensulfónico o grupo alquilensulfonato en donde el grupo alquilenos tiene de 1 a 4 átomos de carbono;

R_3 , R_4 y R_5 se seleccionan independientemente del grupo constituido por H , un grupo sulfónico, un grupo sulfonato, alquilensulfónico, alquilensulfonato y $-SO_2NH(CH_2)_m-W-(CH_2)_n-Z$, en donde alquilenos tiene 1 a 4 átomos de carbono, con la salvedad de que al menos uno de R_1 a R_5 contiene un sulfonato o grupo sulfonato (sic);

W está ausente o es un grupo seleccionado de $-SO_2NH$, $-O-$, $-COO-$, o $-CONH-$; $n = 0-12$ y $m = 0-12$ con las salvedades de que $m + n \leq 12$ y al menos uno de m y n es diferente de 0;

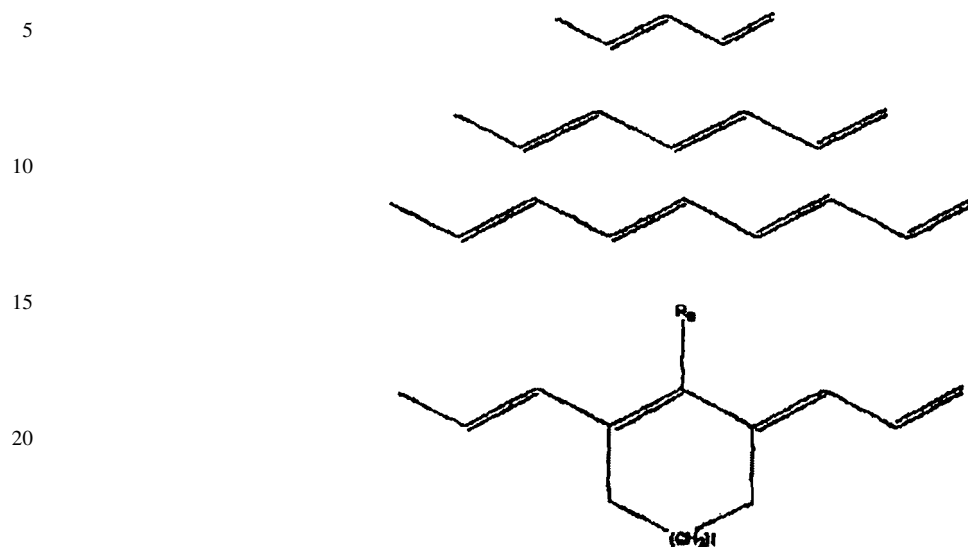
y Z es, o contiene una funcionalidad nucleófila N , O o S o es, o contiene una funcionalidad capaz de reaccionar con los nucleófilos N , O o S .

Las funcionalidades nucleófilas incluyen grupos $-NH_2$, $-OH$, y $-SH$; grupos capaces de reaccionar con tales funcionalidades incluyen $-COCl$, $-COOCOR$, $-CONHNH_2$, ésteres de N -hidroxisuccinimido, NCS , $-CHO$, $-COCH_2I$, fosoramidito y maleimido; R es un alquilo C_1-C_4 .

Preferiblemente, al menos dos de los grupos R_1 a R_5 contienen un grupo ácido sulfónico o sulfonato.

Preferiblemente, R_3 , R_4 , R_5 pueden ser todos ellos un grupo del tipo $-SO_2NH(CH_2)_m-W-(CH_2)_n-Z$, proporcionando así un tinte con hasta cuatro funcionalidades reactivas.

Q es preferiblemente una cadena polimetino que tiene de 3 a 7 átomos de carbono, seleccionada preferiblemente del grupo constituido por:



donde R_6 es H, un átomo de halógeno o el grupo $\text{SO}_2\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{-W-(CH}_2)_n\text{Z}$, e i es 0 ó 1.

Se incluyen también dentro del alcance de la invención los tautómeros de valencia de los compuestos de fórmula (1) en los cuales la tautomería de valencia tiene por objeto significar el desplazamiento de los enlaces conjugados en la cadena polimetino.

De modo más específico, los tintes marcadores fluorescentes de la presente invención pueden representarse por las fórmulas generales de las Figuras 2 y 3 en donde X_1 y X_2 son como se define arriba y preferiblemente $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$. Dos métodos generales para la preparación de 2,3,3-trimetil-(3H)-indoles con grupos enlazadores sulfamidoalquilo se muestran en la Figura 4. Estos compuestos son compuestos intermedios clave en las síntesis de los tintes de cianina. Esquemas similares pueden seguirse para las síntesis de 1,1,2-(1H)-benz[o]indoles con grupos enlazadores sulfamidoalquilo. De acuerdo con el esquema que se muestra en la Figura 4a, la síntesis comienza con cloruro de 4-acetamidobenceno-sulfonilo, económico y fácilmente asequible (un material de partida en la síntesis de los fármacos sulfa). Este compuesto reacciona con una gran diversidad de compuestos de aminoalquilo $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{Z}$. En muchos casos, es necesario proteger la funcionalidad Z durante este paso o en pasos subsiguientes. Las funcionalidades protegidas se indican como Z (prot). Esto puede realizarse utilizando grupos protectores estándar. Por ejemplo, los grupos carboxilo puede protegerse en forma de ésteres terc-butílicos, los grupos alcohol como tetrahidropiranyl (THP)-acetales, y las aminas como trifluoroacetamidas, o, más convenientemente, puede utilizarse un gran exceso de diaminoalcanos: el grupo amino distal puede protegerse luego como una trifluoroacetamida. En el paso siguiente de la Figura 4a, el grupo protector acetamido se elimina por hidrólisis básica. En estas condiciones, los enlaces sulfamido formados previamente son estables. Los grupos amino aromáticos primarios resultantes se reducen a hidrazinas por la acción de SnCl_2 en ácido clorhídrico concentrado. En el paso final, se realiza una síntesis de indoles de Fischer por condensación de los derivados hidrazino con 3,3-dimetil-2-butanona.

De acuerdo con un esquema alternativo (Figura 4b), la síntesis de indoles de Fischer tiene lugar en el primer paso, es decir, se condensa el ácido 4-hidrazinobencenosulfónico con 3,3-dimetil-2-butanona. El producto, ácido 2,3,3-trimetil-(3H)-indol-4-sulfónico, sal de potasio, se convierte en cloruro de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol-4-sulfocloruro-sulfonilo por calentamiento del mismo con pentacloruro de fósforo. Como en el método anterior, el sulfocloruro se hace reaccionar luego con una gran diversidad de compuestos de aminoalquilo $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_n\text{Z}$ (prot). Los grupos protectores pueden eliminarse del modo más conveniente después de la alquilación en N de la indolenina.

De modo más específico, los compuestos que caen dentro del dominio de la presente invención se sintetizan como se muestra en las Figuras 5-44.

Esquemas similares pueden seguirse para la síntesis de oxa- y tiacianinas con grupos enlazadores sulfamidoalquilo. En particular, se utilizan 2-metilbenzoxazoles, 2-metilnaftoxazoles, 2-metilbenzotiazoles y 2-metilnaftotiazoles con los sustituyentes apropiados en el anillo benzo o nafto (grupos sulfónico o sulfamidoalquilo) en lugar de los correspondientes 2,3,3-trimetil-(3H)-indoles y 1,1,2-(1H)-benz[o]indoles. Pueden fabricarse también tintes asimétricos (oxa-indocianinas, tia-indocianinas, oxa-tiacianinas) por elección apropiada de los heterociclos correspondientes.

ES 2 329 572 T3

Las propiedades ópticas de algunas series de tintes en solución salina tamponada con fosfato se resumen en la Tabla siguiente:

TINTE	Absorción ($\lambda_{\max}$)	Emisión ($\lambda_{\max}$)
Serie del 2,3,3-indol:		
Trimetino	550	565
Pentametino	650	668
Serie del 2,3,3-indol:		
Heptametino-H-ciclohexeno	747	776
Heptametino-Cl-ciclohexeno	776	803
Serie del 1,2,2-benz[o]indol		
Trimetino	580	600
Pentametino	670	695
Heptametino-H-ciclohexeno	780	807
Heptametino-Cl-ciclohexeno	810	843
Serie mixta indol/benz[o]indol		
Trimetino	565	580
Pentametino	660	675
Heptametino-H-ciclohexeno	766	778
Heptametino-Cl-ciclohexeno	790	822

Pueden realizarse inmunoensayos que están basados en medidas de fluorescencia en el paso de cuantificación. Estas medidas incluyen intensidad de fluorescencia, tiempo de vida de la fluorescencia o anisotropía (polarización de la fluorescencia). A este fin, el compuesto fluorescente de la invención se conjuga con un reactivo de fijación inmunológica, tal como un anticuerpo monoclonal o policlonal o un antígeno.

La conjugación de los tintes de cianina con un grupo espaciador sulfamidoalquileo a anticuerpos anti- β -HCG y anti-fetoproteínas- α se describe en los Ejemplos 26 y 28. Ensayos estándar de separación que emplean los conjugados

de cianina y la medida de la intensidad de fluorescencia del marcador fluorescente capturado se describen en los Ejemplos 25 y 27, respectivamente.

Los tintes de la presente invención tienen también utilidad en cualquiera aplicación corriente para detección de ácidos nucleicos que requiera un reactivo de detección sensible. El ácido nucleico contenido en la muestra puede ser RNA o DNA, o una mezcla de los mismos. Cuando el ácido nucleico es DNA, el DNA puede ser opcionalmente DNA monocatenario, bicatenario, tricatenario o tetracatenario. El ácido nucleico puede ser natural (de origen biológico) o sintético (preparado artificialmente) y puede estar presente en la muestra como fragmentos de ácido nucleico, oligonucleótidos, o polímeros de ácido nucleico. La presencia del ácido nucleico en la muestra puede ser debida a una metodología experimental con o sin éxito, contaminación indeseable, o a un estado de enfermedad.

Los tintes fluorescentes de la presente invención pueden utilizarse también para métodos de secuenciación de DNA. Típicamente, una sonda marcada con fluoróforo específica para la secuencia se hibrida con el DNA diana y las escaleras de la secuencia se identifican por fluorescencia inducida por láser u otros medios apropiados para detección del DNA marcado por fluorescencia.

El Ejemplo 29 describe un método para la marcación de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y didesoxirribonucleótidos con los tintes de la invención. Las estructuras de los compuestos obtenidos por este método se muestran en las Figuras 45-56.

Una forma particularmente útil de ensayo de fluorescencia es la utilización de la polarización de la fluorescencia. La polarización de la fluorescencia ocurre cuando una molécula fluorescente es excitada con luz polarizada, lo que da como resultado que la luz emitida por la molécula fluorescente esté asimismo polarizada. Una determinación cuantitativa de la polarización de la molécula excitada puede obtenerse por medida de la intensidad relativa de la luz emitida paralela y perpendicularmente al plano de polarización de la luz de excitación. Este tipo de ensayo tiene la ventaja de ser homogéneo, es decir que no requiere paso de separación alguno. El Ejemplo 30 describe la preparación de un conjugado teofilina-(sulfamidoalquilamino)cianina.

Ejemplo 1

Preparación de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol-4-sulfocloruro (I)

5 g de sal de potasio del ácido 2,3,3-trimetil-(3H)-indol-5-sulfónico seca (18 mmol), preparada como se describe en Mank *et al.*, Anal. Chem. 1995, 67, p. 1744, se mezclaron con 7,5 g de PCl_5 (36 mmol) y 2 ml de POCl_3 (22 mmol) en un matraz de 500 ml con fondo redondo. El matraz, provisto de un condensador de reflujo, se calentó en atmósfera de argón durante 2 horas a 110°C en un baño de aceite. Los cloruros de fósforo sin reaccionar se eliminaron a vacío a 110°C utilizando una bomba de membrana que operaba a 7 mm Hg. La mezcla enfriada se trituró con 2 porciones de 150 ml de hexano seco a fin de eliminar las impurezas. Los extractos hexánicos se desecharon y el sulfocloruro bruto se secó a 110°C a vacío (rendimiento: 90%).

Ejemplo 2a

Preparación del derivado sulfonamida de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol con el éster terc-butílico de glicina, 5-($\text{SO}_2\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{terc-butil}$)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (IIa)

5,15 g de sal de dibencenosulfimida del éster terc-butílico de glicina (12 mmol) y 8 ml de piridina se disuelven en 100 ml de cloroformo. Se añaden a esta solución con agitación 2 g de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol-4-sulfocloruro bruto (7,8 mmol) del Ejemplo 1. Después de agitar a la temperatura ambiente durante una noche, se evaporan el disolvente y la piridina a vacío. El residuo se trata 3 veces con 100 ml de cloroformo que se elimina a continuación nuevamente a vacío. La sulfonamida bruta se disuelve luego en cloroformo y se precipita por adición gota a gota a un litro de dietil-éter. (Rendimiento: 70%).

Ejemplo 2b

Preparación del derivado sulfonamida de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol con el éster terc-butílico de β -alanina, 5-($\text{SO}_2\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{terc-butil}$)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (IIb)

La sulfonamida se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2a a partir de 2,18 g de hidrocloreto del éster terc-butílico de β -alanina (12 mmol), 8 ml de piridina y 2 g de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol-4-sulfocloruro (7,8 mmol) del Ejemplo 1 (rendimiento: 67%).

ES 2 329 572 T3

Ejemplo 2c

Preparación del derivado sulfonamida de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol con el éster terc-butílico de 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-terc-butil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol γ -aminobutírico (IIc)

La sulfonamida se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2a a partir de 2,35 g de hidrocloreuro del éster γ -aminobutírico terc-butílico γ -aminobutírico (12 mmol), 8 ml de piridina y 2 g de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol-4-sulfocloruro (7,8 mmol) del Ejemplo 1 (rendimiento: 90%).

Ejemplo 2d

Preparación del derivado sulfonamida de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol con el éster terc-butílico del ácido ε -aminocaproico, 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-terc-butil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (IId)

La sulfonamida se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2 a partir de 2,68 g de hidrocloreuro del éster terc-butílico del ácido ε -aminocaproico (12 mmol), 8 ml de piridina y 2 g de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol-4-sulfocloruro (7,8 mmol) del Ejemplo 1. (Rendimiento: 80%).

Ejemplo 2e

Preparación del derivado sulfonamida de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol con 1,4-diaminobutano, 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3D)-indol (IIe)

La sulfonamida se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2a a partir de 8 ml de 1,4-diaminobutano (80 mmol), 8 ml de piridina y 2 g de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol-4-sulfocloruro (7,8 mmol) del Ejemplo 1. (Rendimiento: 75%).

Ejemplo 2f

Preparación del derivado sulfonamida de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol con 1,6-diaminohexano, 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (IIIf)

La sulfonamida se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2a a partir de 10 g de 1,6-diaminohexano (86 mmol), 8 ml de piridina y 2 g de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol-4-sulfocloruro (7,8 mmol) del Ejemplo 1. (Rendimiento: 80%).

Ejemplo 2g

Preparación del derivado sulfonamida de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol con 6-amino-1-hexanol, 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (IIg)

La sulfonamida se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2a a partir de 1,4 g de 6-amino-1-hexanol (12 mmol), 8 ml de piridina y 2 g de 2,3,3-trimetil-(3H)-indol-4-sulfocloruro (7,8 mmol) del Ejemplo 1. (Rendimiento: 78%).

Ejemplo 3a

Preparación de 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NHCOCF₃)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (IIIa)

Se trataron 1,8 g de la sulfonamida preparada de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2d con anhídrido trifluoroacético a la temperatura ambiente. (Rendimiento: 96%).

Ejemplo 3b

Preparación de 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NHCOCF₃)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (IIIb)

Se trataron 1,8 g de la sulfonamida preparada de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2e con anhídrido trifluoroacético a la temperatura ambiente. (Rendimiento: 99%).

ES 2 329 572 T3

Ejemplo 4

Preparación de 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OTHP)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol (IVa)

- 5 1,8 g de la sulfonamida preparada de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 2g se trataron con un exceso de 3,4-dihidro-2H-pirano a la temperatura ambiente y unas cuantas gotas de ácido trifluoroacético como catalizador. (Rendimiento: 90%).

10 Ejemplo 5

Preparación de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol-6-sulfocloruro (V)

- 15 Se disolvió ácido 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol-6-sulfónico, preparado como se describe en WO 97/13810) en metanol y se agitó con hidróxido de potasio saturado en isopropanol. Precipitó la sal de potasio y se recogió en un filtro, se lavó con isopropanol y se secó a vacío. Se mezclaron 6,0 g de la sal (18,3 mmol), con 7,5 g de PCl₅ (36 mmol) y 2 ml de POCl₃ (22 mmol) en un matraz de 500 ml con fondo redondo. El matraz, provisto de un condensador de reflujo, se calentó en atmósfera de argón durante 2 horas a 110°C en un baño de aceite. Se eliminaron los cloruros de fósforo sin reaccionar a vacío a 110°C utilizando una bomba de membrana que operaba a 7 mm Hg. La mezcla
20 enfriada se trituró con 2 porciones de 150 ml de hexano seco a fin de eliminar las impurezas. Los extractos hexánicos se desecharon y el sulfocloruro bruto se secó a 110°C a vacío (rendimiento: 60%).

Ejemplo 6a

- 25 *Preparación del derivado sulfonamida de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol con el éster terc-butílico de glicina, 6-(SO₂NH-CH₂-COO-terc-butil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol (VIa)*

- 30 Se disuelven 5,15 g de sal de dibencenosulfimida del éster terc-butílico de glicina (12 mmol) y 8 ml de piridina en 100 ml de cloroformo. Se añaden a esta solución con agitación 2,5 g de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol-6-sulfocloruro (7,6 mmol) del Ejemplo 5. Después de agitar a la temperatura ambiente durante una noche, se evaporan el disolvente y la piridina a vacío. El residuo se trata 3 veces con 100 ml de cloroformo, que se elimina de nuevo a vacío. La sulfonamida bruta se disuelve luego en cloroformo y se precipita por adición gota a gota a 1 l de dietil-éter. (Rendimiento: 90%).

35

Ejemplo 6b

- 40 *Preparación del derivado sulfonamida de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol con éster terc-butílico de β-alanina, 6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COO-terc-butil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol (VIb)*

- La sulfonamida se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 6a a partir de 2,18 g de hidrocloreuro del éster terc-butílico de β-alanina (12 mmol), 8 ml de piridina y 2,5 g de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol-6-sulfocloruro (7,6 mmol) del Ejemplo 5 (rendimiento: 81%).

45

Ejemplo 6c

- 50 *Preparación del derivado sulfonamida de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol con el éster γ-amino-butírico terc-butílico, 6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-terc-butil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol (VIc)*

- La sulfonamida se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 6a a partir de 2,35 g de hidrocloreuro del éster γ-aminobutírico terc-butílico (12 mmol), 8 ml de piridina y 2,5 g de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol-6-sulfocloruro (7,6 mmol) del Ejemplo 5 (rendimiento: 80%).

55

Ejemplo 6d

- 60 *Preparación del derivado sulfonamida de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol con el éster terc-butílico del ácido ε-aminocaproico, 6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-terc-butil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol (VIId)*

- Se preparó la sulfonamida de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 6a a partir de 2,68 g de hidrocloreuro del éster terc-butílico del ácido ε-aminocaproico (12 mmol), 8 ml de piridina y 2,5 g de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol-6-sulfocloruro (7,6 mmol) del Ejemplo 5. (Rendimiento: 89%).

65

ES 2 329 572 T3

Ejemplo 6e

Preparación del derivado sulfonamida de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol con 1,4-diaminobutano, 7-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol (VIe)

La sulfonamida se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13 a partir de 8 ml de 1,4-diaminobutano (80 mmol), 8 ml de piridina y 2,5 g de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol-6-sulfocloruro (7,6 mmol) del Ejemplo 12. (Rendimiento: 90%).

Ejemplo 6f

Preparación del derivado sulfonamida de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol con 1,6-diaminohexano, 6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol (VI f)

Se preparó la sulfonamida de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13 a partir de 10 g de 1,4-diaminohexano (86 mmol), 8 ml de piridina y 2 g de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol-7-sulfocloruro (7,6 mmol) del Ejemplo 12. (Rendimiento: 90%).

Ejemplo 6g

Preparación del derivado sulfonamida de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol con 6-amino-1-hexanol, 7-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol (VIg)

La sulfonamida se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 10 a partir de 1,4 g de 6-amino-1-hexanol (12 mmol), 8 ml de piridina y 2,5 g de 1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol-4-sulfocloruro (7,6 mmol) del Ejemplo 9. (Rendimiento: 99%).

Ejemplo 7a

Preparación de 6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NHCOCF₃)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol (VIIa)

Se trataron 2,6 g de la sulfonamida preparada de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 6e con anhídrido trifluoroacético a la temperatura ambiente. (Rendimiento: 83%).

Ejemplo 7b

Preparación de 7-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NHCOCF₃)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol (VIIb)

Se trataron 3,1 g de la sulfonamida preparada de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 6f con anhídrido trifluoroacético a la temperatura ambiente. (Rendimiento: 91%).

Ejemplo 8

Preparación de 7-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OTHP)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indol (VIII)

Se trataron 2,8 g de la sulfonamida preparada de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 6g con tetrahidropireno a la temperatura ambiente. (Rendimiento: 97%).

Ejemplo 9a

Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio (IXa)

En un matraz de 100 ml con fondo redondo, se disolvieron 2,5 g (7,1 mmol) de 5-(SO₂NH-CH₂-COO-terc-butil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol del Ejemplo 2a en 30 ml de sulfolano caliente en atmósfera de argón. Se añadió a esta solución 1,4-butanosultona (1 ml, 9,8 mmol). La mezcla se calentó luego a 130°C durante 12 horas. Después de enfriar, se mezcló la solución oscura con 50 ml de tolueno. El precipitado pardo se filtró y se lavó con 2 porciones de 50 ml de tolueno. El grupo protector se eliminó por disolución del producto bruto en unos pocos mililitros de metanol/ácido clorhídrico concentrado. La solución resultante se agitó durante 2 horas a la temperatura ambiente y el producto del título se precipitó por adición gota a gota a 500 ml de éter y se secó a vacío. (Rendimiento: 90%).

ES 2 329 572 T3

Ejemplo 9b

Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio (IXb)

- 5 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,2 g (7,1 mmol) de 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH-terc-butil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol, Ejemplo 2b, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona (rendimiento: 89%).

10 Ejemplo 9c

Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio (IXc)

- 15 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,5 g (7,1 mmol) de 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-terc-butil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol, Ejemplo 2d, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona (rendimiento: 58%).

20 Ejemplo 9d

Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio (IXd)

- 25 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,8 g (7,1 mmol) de 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-terc-butil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol, Ejemplo 2d, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona (rendimiento: 89%).

30 Ejemplo 9e

Preparación de 1-(5-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio (IXe)

- 35 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,2 g (7,1 mmol) de 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NHCOCF₃)-2,3,3-trimetil-(3H)-indol, Ejemplo 3a, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona (rendimiento: 79%).

Ejemplo 9f

- 40 *Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio (IXf)*

- El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,2 g (7,1 mmol) de 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NHCOCF₃)-2,3,3-trimetil-benz[o]-(3H)-indol, Ejemplo 3b, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona (rendimiento: 99%).

45

Ejemplo 9g

Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio (IXg)

- 50 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,2 g (7,1 mmol) de 5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OTHP)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]-indol, Ejemplo 4, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona (rendimiento: 89%).

55

Ejemplo 10a

Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio (Xa)

- 60 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,2 g (7,1 mmol) de 6-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]-indol, Ejemplo 6a, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona (rendimiento: 95%).

65

Ejemplo 10b

Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio (Xb)

- 5 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,2 g (7,1 mmol) de 6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COO-terc-butil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]-indol, Ejemplo 6b, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona seguido por hidrólisis ácida (rendimiento: 90%).

10 Ejemplo 10c

Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio (Xc)

- 15 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,5 g (7,1 mmol) de 6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-terc-butil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]-indol, Ejemplo 6c, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona seguido por hidrólisis ácida (rendimiento: 85%).

Ejemplo 10d

- 20 *Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio (Xd)*

- 25 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,8 g (7,1 mmol) de 6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-terc-butil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]-indol, Ejemplo 6d, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona (rendimiento: 88%).

Ejemplo 10e

- 30 *Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio (Xe)*

- 35 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,2 g (7,1 mmol) de 6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NHCOF₃)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]-indol, Ejemplo 7a, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona (rendimiento: 80%).

Ejemplo 10f

- 40 *Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio (Xf)*

- 45 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,2 g (7,1 mmol) de 6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NHCOF₃)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]-indol, Ejemplo 7b, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona. (Rendimiento: 67%).

Ejemplo 10g

- 50 *Preparación de 1-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio (Xg)*

- 55 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 9a a partir de 2,2 g (7,1 mmol) de 6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OTHP)-2,3,3-trimetil-(3H)-benz[o]-indol, Ejemplo 8, y 1,0 ml (9,8 mmol) de 1,4-butanosultona. (Rendimiento: 3,0 g).

Ejemplo 11a

- 60 *Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIa)*

- 65 En un matraz de fondo redondo equipado con condensador de reflujo, se calentó a reflujo una mezcla de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (de Mujumdar *et al.*, Bioconjugate Chemistry, 1993, 4, 105-11) y 163 mg (0,83 mmol) de N,N'-difeníl-formamidina en 2 ml de ácido acético durante 3 h. Se evaporó el ácido acético a vacío y el producto se trituró con una mezcla de acetato de etilo y agua. El producto bruto se redisolvió en una mezcla de anhídrido acético (2 ml) y piridina (2 ml). Se añadieron 316 mg del 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio preparado del Ejemplo 9a, y la mezcla se calentó

ES 2 329 572 T3

a 110°C durante 30 minutos. Después de enfriar, se precipitó el tinte por adición de etil-éter. El producto bruto se purificó por cromatografía Michel-Miller sobre Lichroprep RP18, tamaño de partícula 25-40 micrómetros, utilizando una mezcla metanol:agua como eluyente (rendimiento: 70%).

5 Ejemplo 11b

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIb)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 326 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9b (rendimiento: 50%).

15 Ejemplo 11c

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIc)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 336 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9c (rendimiento: 30%).

25 Ejemplo 11d

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 357 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9d (rendimiento: 45%).

35 Ejemplo 11e

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato trifluoroacetato (XIe)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 409 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9e (rendimiento: 30%).

45 Ejemplo 11f

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato trifluoroacetato (XI f)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 429 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₃⁺)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio trifluoroacetato del Ejemplo 9f (rendimiento: 35%).

55 Ejemplo 11g

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIg)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 346 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9g (rendimiento: 70%).

Ejemplo 12a

Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIIa)

- 5 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (de Mujumdar *et al.*, Bioconjugate Chemistry, 1993, 4, 105-111) se disolvieron en 1,8 ml de ácido acético en un matraz de 25 ml con fondo redondo. Se añadieron con agitación 845 mg (6,4 mmol) de 1,3,3-trimetoxipropeno. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 30 min. Se añadieron 10 ml de dietil-éter y la mezcla se agitó durante 15 minutos más y se enfrió en un baño de hielo. Se decantó el sobrenadante y el residuo se disolvió en una pequeña cantidad de ácido acético/metanol (50/50) en atmósfera de argón. Se añadió éter frío y la solución se enfrió en un baño de hielo hasta que se produjo un precipitado amarillo. Este precipitado se recogió por filtración y se lavó con una pequeña cantidad de éter frío.
- 10 Se disolvieron 241 mg (0,50 mmol) del precipitado en 10 ml de metanol, después de lo cual se añadieron 216 mg (0,50 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio preparado en el Ejemplo 9a (0,50 mmol) y 120 mg (1,22 mmol) de acetato de potasio. Se produjo en seguida un color azul. La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante una noche y se diluyó con etil-éter. Se separó un sólido azul oscuro. El precipitado se recogió, se disolvió en ácido clorhídrico 1 M. La solución resultante se evaporó hasta sequedad en el evaporador rotativo. Se eliminaron las trazas de ácido clorhídrico por secado del residuo a vacío en presencia de KOH sólido. La purificación por cromatografía Michel-Miller sobre Lichroprep RP18 (25-40 micrómetros, Merck, con metanol/agua 60:40 como el eluyente) proporcionó 345 mg (77%, calculado para la sal dipotásica) del tinte intermedio (XIIa-Cl). El átomo de cloro en el anillo de ciclohexeno se eliminó por agitación durante una noche del producto en un pequeño volumen de una solución de etanotiolato de sodio en N,N-dimetilformamida. El compuesto del título se aisló con
- 15 25 rendimiento esencialmente cuantitativo por precipitación en éter.

Ejemplo 12b

- 30 *Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIIb)*

- El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 223 mg (0,5 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9b (rendimiento: 55%).
- 35

Ejemplo 12c

- 40 *Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIIc)*

- El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 230 mg (0,5 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9c (rendimiento: 67%).
- 45

Ejemplo 12d

- 50 *Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIId)*

- El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 244 mg (0,5 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9d (rendimiento: 80%).
- 55

Ejemplo 12e

- 60 *Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato trifluoroacetato (XIIe)*

- El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 280 mg (0,5 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio trifluoroacetato del Ejemplo 9e (rendimiento: 30%).
- 65

Ejemplo 12f

Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3''H)-indolio-5-sulfonato trifluoroacetato (XIIIf)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 282 mg (0,5 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio trifluoroacetato del Ejemplo 9f (rendimiento: 48%).

Ejemplo 12g

Preparación de 2-{5'-[1''-(5-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (IIg)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 237 mg (0,5 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9g (rendimiento: 80%).

Ejemplo 13a

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIIIa)

300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (de Mujumdar *et al.*, Bioconjugate Chemistry, 1993, 4, 105-111) se disolvieron en 1,8 ml de ácido acético en un matraz de 25 ml con fondo redondo. Se añadieron 298 mg (0,83 mmol) de cloruro de 5-fenilamino-2,4-trimetileno-2,4-pentadienilideno-fenil-amonio con agitación. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 30 min. Se añadieron 10 ml de dietil-éter y la mezcla se agitó durante 15 minutos más y se enfrió en un baño de hielo. El sobrenadante se decantó y el residuo se disolvió en una pequeña cantidad de ácido acético/metanol (50/50) en atmósfera de argón. Se añadió éter frío y la solución se enfrió en un baño de hielo hasta que se produjo un precipitado pardo. Este precipitado se recogió por filtración y se lavó con una pequeña cantidad de éter frío.

Se disolvieron 322 mg (0,50 mmol) del precipitado en 10 ml de metanol, después de lo cual se añadieron 216 mg (0,50 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio preparado en el Ejemplo 9a (0,50 mmol) y 120 mg (1,22 mmol) de acetato de potasio. Se produjo en seguida un color azul. La mezcla se (soared (sic) ?) a la temperatura ambiente durante una noche y se diluyó con etil-éter. Se separó un sólido azul oscuro. Se recogió el precipitado, y se disolvió en ácido clorhídrico 1 M. La solución resultante se evaporó hasta sequedad en el evaporador rotativo. Las trazas de ácido clorhídrico se eliminaron por secado a vacío en presencia de KOH sólido. La concentración por cromatografía Michel-Miller sobre Lichroprep RP18 (25-40 micrómetros, Merck, con metanol/agua 70:30 como eluyente) proporcionó un rendimiento de 30% del tinte intermedio (XIII-a-Cl). El átomo de cloro en el anillo de ciclohexeno se eliminó por agitación del producto durante una noche en un pequeño volumen de una solución de etanotiolato de sodio en N,N-dimetilformamida. El compuesto del título se aisló con rendimiento esencialmente cuantitativo por precipitación con éter.

Ejemplo 13b

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIIIb)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 223 mg (0,5 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9b (rendimiento: 25%).

Ejemplo 13c

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-3',5'-heptatrien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIIIc)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 230 mg (0,5 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9c (rendimiento: 37%).

Ejemplo 13d

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 244 mg (0,5 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9d (rendimiento: 50%).

Ejemplo 13e

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIIIe)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 280 mg (0,5 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9e (rendimiento: 35%).

Ejemplo 13f

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIII f)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 282 mg (0,5 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9f (rendimiento: 40%).

Ejemplo 13g

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XIIIg)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 237 mg (0,5 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9g (rendimiento: 65%).

Ejemplo 14a

Preparación de 2-{3'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIVa)

En un matraz de fondo redondo equipado con condensador de reflujo, una mezcla de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (de WO 97/13810) y 163 mg (0,83 mmol) de N,N'-difenílformamida en 2 ml de ácido acético se calentó a reflujo durante 3 horas. Se evaporó el ácido acético a vacío y el producto se trituró con una mezcla de acetato de etilo y agua. El producto bruto se redisolvió en una mezcla de anhídrido acético (2 ml) y piridina (2 ml). Se añadieron 352 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio preparado en el Ejemplo 10a, y la mezcla se calentó a 110°C durante 30 min. Después de enfriar, se precipitó el tinte por adición de etil-éter. El producto bruto se purificó por cromatografía Michel-Miller sobre Lichroprep RP18, tamaño de partícula 25-40 micrómetros, utilizando una mezcla metanol/agua (70/30) como eluyente (rendimiento: 46%).

Ejemplo 14b

Preparación de 2-{3'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIVb)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 362 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10b (rendimiento: 40%).

Ejemplo 14c

Preparación de 2-{3'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIVc)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 373 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10c (rendimiento: 49%).

Ejemplo 14d

Preparación de 2-{3'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIVd)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 373 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10d (rendimiento: 34%).

Ejemplo 14e

Preparación de 2-{3'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIVe)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 445 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio trifluoroacetato del Ejemplo 10e (rendimiento: 30%).

Ejemplo 14f

Preparación de 2-{3'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIVf)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 465 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10f (rendimiento: 45%).

Ejemplo 14g

Preparación de 2-{3'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIVg)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 383 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10g (rendimiento: 47%).

Ejemplo 15a

Preparación de 2-{5'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3''-pentadien-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-indolio-5-sulfonato (XVa)

338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (de WO 97/13810) se disolvieron en 1,8 ml de ácido acético en un matraz de 25 ml con fondo redondo. Se añadieron con agitación 845 mg (6,4 mmol) de 1,3,3-trimetoxipropeno. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 30 min. Se añadieron 10 ml de dietil-éter y la mezcla se agitó durante 15 minutos más y se enfrió en un baño de hielo. Se decantó el sobrenadante y el residuo se disolvió en una pequeña cantidad de ácido acético/metanol (50/50) en atmósfera de argón. Se añadió éter frío y la solución se enfrió en un baño de hielo hasta que se produjo un precipitado amarillo. Este precipitado se recogió por filtración y se lavó con una pequeña cantidad de éter frío.

Se disolvieron 266 mg (0,50 mmol) del precipitado en 10 ml de metanol, después de lo cual se añadieron 241 mg (0,50 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio preparado en el Ejemplo 10a y 120 mg (1,22 mmol) de acetato de potasio. Se produjo en seguida un color azul. La mezcla se agitó a

ES 2 329 572 T3

la temperatura ambiente durante una noche y se diluyó con etil-éter. Se separó un sólido azul oscuro. El precipitado se recogió, y se disolvió en ácido clorhídrico 1 M. la solución resultante se evaporó a sequedad en el evaporador rotativo. Las trazas de ácido clorhídrico se eliminaron por secado del residuo a vacío en presencia de KOH sólido. La purificación por cromatografía Michel-Miller sobre Lichroprep RP18 (25-40 micrómetros, Merck, con metanol/agua 60:40 como eluyente) proporcionó un 73% del compuesto del título.

Ejemplo 15b

- 10 *Preparación de 2-{5'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-indolio-5-sulfonato (XVb)*

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 248 mg (0,5 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10b (rendimiento: 67%).

Ejemplo 15c

- 20 *Preparación de 2-{5'-[3''-(6-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(3''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-indolio-5-sulfonato (XVc)*

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 255 mg (0,5 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10c (rendimiento: 55%).

Ejemplo 15d

- 30 *Preparación de 2-{5'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-indolio-5-sulfonato (XVd)*

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 269 mg (0,5 mmol) de 3-(5-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10d (rendimiento: 47%).

Ejemplo 15e

- 40 *Preparación de 2-{5'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-indolio-5-sulfonato (XVe)*

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 305 mg (0,5 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1,1,2-tri-metil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10e (rendimiento: 60%).

Ejemplo 15f

- 50 *Preparación de 2-{5'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-indolio-5-sulfonato (XVf)*

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 319 mg (0,5 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-trifluoroacetato del Ejemplo 10f (rendimiento: 79%).

Ejemplo 15g

- 60 *Preparación de 2-{5'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVg)*

65 El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 262 mg (0,5 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-trifluoroacetato del Ejemplo 10g (rendimiento: 59%).

Ejemplo 16a

Preparación de 2-{7'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIa)

Se disolvieron 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (de WO 97/13810) en 1,8 ml de ácido acético en un matraz de 25 ml con fondo redondo. Se añadieron con agitación 298 mg (0,83 mmol) de cloruro de 5-fenilamino-2,4-trimetileno-2,4-pentadienilideno-fenilamonio. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 30 min. Se añadieron 10 ml de dietil-éter y la mezcla se agitó durante 15 minutos más y se enfrió en un baño de hielo. Se decantó el sobrenadante y el residuo se disolvió en una pequeña cantidad de ácido acético/metanol (50/50) en atmósfera de argón. Se añadió éter frío y la solución se enfrió en un baño de hielo hasta que se produjo un precipitado pardo. Este precipitado se recogió por filtración y se lavó con una pequeña cantidad de éter frío.

Se disolvieron 322 mg (0,50 mmol) del precipitado en 10 ml de metanol, después de lo cual se añadieron 241 mg (0,50 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio preparado en el Ejemplo 10a y 120 mg (1,22 mmol) de acetato de potasio. Se produjo en seguida un color azul. La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante una noche y se diluyó con etil-éter. Se separó un sólido azul oscuro. El precipitado se recogió, y se disolvió en ácido clorhídrico 1 M. La solución resultante se evaporó a sequedad en el evaporador rotativo. Las trazas de ácido clorhídrico se eliminaron por secado del residuo a vacío en presencia de KOH sólido. La purificación por cromatografía Michel-Miller sobre Lichroprep RP18 (25-40 micrómetros, Merck, con metanol/agua 70:30 como el eluyente) proporcionó un 30% de rendimiento del compuesto del título.

Ejemplo 16b

Preparación de 2-{7'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIb)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 248 mg (0,5 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10b (rendimiento: 36%).

Ejemplo 16c

Preparación de 2-{7'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIc)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 255 mg (0,5 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10c (rendimiento: 89%).

Ejemplo 16d

Preparación de 2-{7'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVI d)

El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 269 mg (0,5 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10d (rendimiento: 41%).

Ejemplo 16e

Preparación de 2-{7'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIe)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 305 mg (0,5 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1,1,2-tri-metil-(1H)-benz[o]indolio trifluoroacetato del Ejemplo 10e (rendimiento: 30%).

Ejemplo 16f

Preparación de 2-{7'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3'-5'-heptatrien-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIff)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 319 mg (0,5 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₃⁺)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio trifluoroacetato del Ejemplo 10f (rendimiento: 45%).

Ejemplo 16g

Preparación de 2-{7'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3'-5'-heptatrien-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIg)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 262 mg (0,5 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10g (rendimiento: 70%).

Ejemplo 17a

Preparación de 2-{3'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIIa)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 316 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9a (rendimiento: 40%).

Ejemplo 17b

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIIb)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 326 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9b (rendimiento: 55%).

Ejemplo 17c

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIIc)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 336 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9c (rendimiento: 37%).

Ejemplo 17d

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIIId)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 357 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9d (rendimiento: 35%).

ES 2 329 572 T3

Ejemplo 17e

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIIe)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 409 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-tri-metil-(3H)-indolio del Ejemplo 9e (rendimiento: 38%).

Ejemplo 17f

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-di-metil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIIIf)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 429 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio trifluoroacetato del Ejemplo 9f (rendimiento: 45%).

Ejemplo 17g

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIIIf)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 346 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9g (rendimiento: 78%).

Ejemplo 18a

Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIIIa)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 316 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9a (rendimiento: 45%).

Ejemplo 18b

Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIIIb)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 326 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9b (rendimiento: 53%).

Ejemplo 18c

Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIIIc)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 336 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9c (rendimiento: 47%).

Ejemplo 18d

Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIIIId)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 357 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9d (rendimiento: 44%).

Ejemplo 18e

Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-di-metil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIIIe)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 409 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-tri-metil-(3H)-indolio del Ejemplo 9e (rendimiento: 42%).

Ejemplo 18f

Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIII f)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 429 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio trifluoroacetato del Ejemplo 9f (rendimiento: 34%).

Ejemplo 18g

Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XVIII g)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 12a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 346 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9g (rendimiento: 67%).

Ejemplo 19a

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIXa)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 316 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9a (rendimiento: 36%).

Ejemplo 19b

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIXb)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 326 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9b (rendimiento: 33%).

Ejemplo 19c

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIXc)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 336 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9c (rendimiento: 41%).

Ejemplo 19d

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIXd)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 357 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9d (rendimiento: 22%).

Ejemplo 19e

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIXe)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 409 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-tri-metil-(3H)-indolio del Ejemplo 9e (rendimiento: 35%).

Ejemplo 19f

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIXf)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 429 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio trifluoroacetato del Ejemplo 9f (rendimiento: 32%).

Ejemplo 19g

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato (XIXg)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 338 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 346 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 9g (rendimiento: 33%).

Ejemplo 20a

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il]-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXa)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 352 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio preparado en el Ejemplo 10a (rendimiento: 30%).

Ejemplo 20b

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il]-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXb)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 352 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10b (rendimiento: 33%).

ES 2 329 572 T3

Ejemplo 20c

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXc)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 352 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio preparado en el Ejemplo 10c (rendimiento: 39%).

Ejemplo 20d

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXd)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 352 mg (0,73 mmol) y 357 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10d (rendimiento: 43%).

Ejemplo 20e

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXe)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 409 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10e (rendimiento: 33%).

Ejemplo 20f

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₃⁺)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-indolio-6-sulfonato (XXf)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 429 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₃⁺)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio trifluoroacetato del Ejemplo 10f (rendimiento: 45%).

Ejemplo 20g

Preparación de 2-{3'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1'-propen-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-indolio-6-sulfonato (XXg)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 346 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 10g (rendimiento: 78%).

Ejemplo 21a

Preparación de 2-{5'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXIa)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 352 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10a (rendimiento: 27%).

ES 2 329 572 T3

Ejemplo 21b

Preparación de 2-{5'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il]-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-di-metil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXIb)}

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 352 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio preparado en el Ejemplo 10b (rendimiento: 36%).

Ejemplo 21c

Preparación de 2-{5'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il]-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXIc)}

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 352 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio preparado en el Ejemplo 10c (rendimiento: 39%).

Ejemplo 21d

Preparación de 2-{5'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il]-1-(δ-sulfonato-butyl)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXId)}

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 352 mg (0,73 mmol) y 357 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10d (rendimiento: 48%).

Ejemplo 21e

Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il]-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXIe)}

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 409 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10e (rendimiento: 30%).

Ejemplo 21f

Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-indolio-6-sulfonato (XXIf)}

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-5-sulfonato y 429 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio trifluoroacetato del Ejemplo 10f (rendimiento: 45%).

Ejemplo 21g

Preparación de 2-{5'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il]-3-(δ-sulfonato-butyl)-1,1-dimetil-(1H)-indolio-6-sulfonato (XXIg)}

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 11a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 346 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 10g (rendimiento: 56%).

Ejemplo 22a

Preparación de 2-{7'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXIIa)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 352 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio preparado en el Ejemplo 10a (rendimiento: 14%).

Ejemplo 22b

Preparación de 2-{7'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXIIb)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 352 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio preparado en el Ejemplo 10b (rendimiento: 25%).

Ejemplo 22c

Preparación de 2-{7'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXIIc)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 352 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio preparado en el Ejemplo 10c (rendimiento: 23%).

Ejemplo 22d

Preparación de 2-{7'-[3''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXIIId)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 352 mg (0,73 mmol) de y 357 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COOH)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10d (rendimiento: 28%).

Ejemplo 22e

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-1-(δ-sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato (XXIIe)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato y 409 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-6-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1,1,2-tri-metil-(1H)-benz[o]indolio del Ejemplo 10e (rendimiento: 20%).

Ejemplo 22f

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il}-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-indolio-6-sulfonato (XXIIIf)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 429 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio trifluoroacetato del Ejemplo 10f (rendimiento: 65%).

Ejemplo 22g

Preparación de 2-{7'-[1''-(δ-sulfonatobutil)-6''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-1'',1''-dimetil-(1''H)-benz[o]-indol-2''-ilideno]-3',5'-(propano-1''',3'''-diil)-1',3',5'-heptatrien-1'-il]-3-(δ-sulfonatobutil)-1,1-dimetil-(1H)-indolio-6-sulfonato (XXIIg)

Se preparó el compuesto del título de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 13a a partir de 300 mg (0,73 mmol) de 3-(δ-sulfonatobutil)-1,1,2-trimetil-(1H)-benz[o]indolio-6-sulfonato y 346 mg (0,73 mmol) de 1-(δ-sulfonatobutil)-5-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-OH)-2,3,3-trimetil-(3H)-indolio del Ejemplo 10g (rendimiento: 53%).

Ejemplo 23

Procedimiento General para la Preparación de Ésteres de Succinimidilo de los Tintes con un Grupo Enlazador -SO₂NH(CH)_nCOOH

El procedimiento siguiente describe la preparación de ésteres de succinimidilo de los tintes con un grupo enlazador (N-carboxialquil)sulfamóilo, -SO₂NH(CH)_nCOOH.

0,5 mol de un tinte de cianina que contenía un grupo enlazador -SO₂NH(CH)_nCOOH, preparado como se muestra en los Ejemplos 11a-d - 22a-d, 83,9 mg (1,5 mmol) de N-hidroxisuccinimida, y 100 mg (1,5 mmol) de diciclohexilcarbodiimida (DCC) se disolvieron en 10 ml de acetonitrilo seco. Después de agitar durante una noche, la mezcla de reacción se filtró para eliminar diciclohexil-urea. Se evaporó el acetonitrilo a la temperatura ambiente. Después de trituración con 50 ml de acetato de etilo, el residuo se disolvió en una cantidad mínima de acetonitrilo seco y se reprecipitó por adición de dietil-éter.

Ejemplo 24

Procedimiento General para la Preparación de Fosforamiditos de los Tintes con un grupo enlazador -SO₂NH(CH₂)₆OH

El procedimiento siguiente describe la preparación de fosforamiditos de los tintes con un grupo enlazador (N-hidroxiálquil)sulfamóilo, -SO₂NH(CH₂)₆OH.

Un tinte de cianina que contenía un grupo enlazador -SO₂NH(CH₂)₆OH (0,5 mmol, preparado como se muestra en los Ejemplos 11g-22g) se secó por coevaporación con acetonitrilo seco, seguido por disolución en 30 ml de acetonitrilo seco. Se añadieron a la solución unos cuantos granos de tetrazol, seguidos por el reactivo de fosfitación, bis-(N,N-diisopropil)-β-cianoetil-fosforamidito (232 mg, 0,77 mmol). La reacción se monitorizó por TLC. Se evaporó el disolvente y el matraz de evacuó a alto vacío durante una noche. El sólido resultante se trituró varias veces con dietiléter seco y se secó a alto vacío durante una noche, después de lo cual se guardó en atmósfera de argón a -20°C.

Ejemplo 25

Marcación de un anticuerpo anti-HCG con los tintes de ésteres de succinimidilo del Ejemplo 23

El acoplamiento de los tintes ésteres de succinimidilo del Ejemplo 23 se llevó a cabo como sigue.

Se prepararon soluciones stock para las reacciones de acoplamiento:

(1) 5 ml/ml de tinte succinimidil-éster del Ejemplo 23 en DMF seca.

(2) 1,0 mg/ml de anti-HGH de conejo (DAKO) en tampón carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,3.

Se añadieron 50 μl de tinte a 1 ml de solución stock anti-HCG. La mezcla se mezcló concienzudamente en un mezclador vortical y se incubó durante una noche en la oscuridad a la temperatura ambiente en una incubadora de sacudidas. La mezcla de reacción se cromatografió luego sobre Sephadex G-25 utilizando NaCl 150 mM, y tampón de fosfato 10 mM de pH 7,0. Dependiendo del tinte empleado, se estimó una relación de tinte a anticuerpo de 5-7, utilizando la fórmula siguiente: Tinte/IgG = A_{color}·ε_{IgG}/(A₂₇₈-c%·A_{color})·ε_{color}, donde A_{color} es la absorbancia del conjugado para la absorción máxima del tinte, ε_{IgG} es el coeficiente de extinción del anticuerpo IgG a 278 nm, ε_{color} es el coeficiente de extinción del tinte a su absorción máxima, A₂₈₀ es la absorbancia del conjugado a 280 nm y c% es el porcentaje de absorción del tinte a 278 nm con respecto a su absorción máxima.

Ejemplo 26

Realización de un inmunoensayo de fluorescencia con estándares de β -HCG

- 5 Para la determinación cuantitativa de los estándares de β -HCG, se llevó a cabo un test sándwich. A una serie de tubos de ensayo siliconizados se añadieron 50 μ l de solución estándar de β -HCG (0 mUI/ml; 10 mUI/ml; 25 mUI/ml; 50 mUI/ml; 100 mUI/ml; 200 mUI/ml). A continuación, 50 μ l de una solución que contenía $3,9 \times 10^{-8}$ M de anti-HCG marcado como se describe en el Ejemplo 25 en tampón de dilución de pH 7,0 (tampón Tris 0,1 M, 20% de suero de ternero fetal, 0,05 Timerosal y 0,02% Tween 20). Se añaden a cada tubo de test 150 μ l adicionales de solución
- 10 tampón (fosfato de Na 150 mM con 20 g/l de seroalbúmina bovina) y finalmente una cuenta de poliestireno de 6,5 mm recubierta con IgG de captura anti- β -HCG por medio de una capa de estreptavidina-biotina. La mezcla se incubaba durante una noche a 37°C en una incubadora de sacudidas. Las cuentas de captura se lavan luego 3 veces con agua destilada y se transfieren después a tubos de ensayo que contienen 2 ml de ácido sulfúrico 0,1 M. Después de 30 min, la solución de ácido sulfúrico se pipetea en cubetas de fluorescencia y se mide el contenido de tinte por espectroscopia de
- 15 fluorescencia. Una curva de calibración típica es como sigue: 0 mUI/ml - 0,050 FI, 10 mUI/ml - 1,56 FI; 25 mUI/ml - 3,54 FI; 50 mUI/ml - 5,01 FI; 100 mUI/ml - 8,93 FI; 200 mUI/ml - 15,99 FI, donde FI es la intensidad de fluorescencia relativa en unidades arbitrarias.

20 Ejemplo 27

Marcación de anticuerpos anti-fetoproteína α con los tintes de succinimidil-ésteres del Ejemplo 23

- El acoplamiento de anti-fetoproteína α con los tintes de succinimidilésteres del Ejemplo 23 se llevó a cabo de la misma manera que el del anti- α -HCG consignado en el Ejemplo 25.

Se prepararon soluciones stock para las reacciones de acoplamiento:

- (3) 4,0 mg/ml de tinte succinimidil-éster del Ejemplo 23 en DMF seca.
- 30 (4) 2,0 mg/ml de anti-fetoproteína α de conejo (DAKO) en tampón carbonato/bicarbonato 0,1 M, pH 9,3.

- Se añadieron 50 μ l de tinte a 1 ml de solución stock de anti-fetoproteína α . La mixtura se mezcló concienzudamente
- 35 en un mezclador vorticial y se incubó durante una noche en la oscuridad a la temperatura ambiente en una incubadora de sacudidas. La mezcla de reacción se cromatografió luego sobre Sephadex G-25 utilizando un tampón de NaCl 150 mM y fosfato 10 mM de pH 7,0. Dependiendo del tinte empleado, se estimó una relación de tinte a anticuerpo de 3,5-4,5, utilizando la fórmula siguiente: $\text{Tinte/IgG} = A_{\text{color}} \cdot \epsilon_{\text{IgG}} / (A_{278} - c_{\%} A_{\text{color}}) \epsilon_{\text{color}}$,

- 40 donde A_{color} es la absorbancia del conjugado a la absorción máxima del tinte, ϵ_{IgG} es el coeficiente de extinción del anticuerpo IgG a 278 nm, ϵ_{color} es el coeficiente de extinción del tinte a su absorción máxima, A_{280} es la absorbancia del conjugado a 280 nm, y $c_{\%}$ es el porcentaje de absorción del tinte a 278 nm con respecto a su absorción máxima.

45 Ejemplo 28

Realización de un inmunoensayo de fluorescencia con estándares de fetoproteína- α

- Para la determinación cuantitativa de los estándares de fetoproteína α , se llevó a cabo un test sándwich. A una serie
- 50 de tubos de test siliconizados, se añadieron 50 μ l de una solución estándar de fetoproteína α (0 ng/ml; 5 ng/ml; 15 ng/ml; 50 mUI/ml, 100 mUI/ml; 250 ng/ml); y a continuación, 50 μ l de una solución que contenía $5,8 \times 10^{-8}$ M de anti-fetoproteína α marcada como se describe en el Ejemplo 27 en tampón de dilución de pH 7,0 (tampón Tris 0,1 M, 20% suero de ternero fetal, 0,05 Timerosal y 0,02% Tween 20). Se añade a cada tubo de test una cantidad adicional de 150 μ l de solución tampón (fosfato de Na 150 mM con 20 g/l de seroalbúmina bovina), y finalmente se añade a
- 55 cada tubo de test una cuenta de poliestireno de 6,5 mm recubierta con IgG de captura anti-fetoproteína α por medio de una capa de estreptavidina-biotina-biotina. La mezcla se incubaba durante una noche a 37°C en una incubadora de sacudidas. Las cuentas de captura se lavan luego 3 veces con agua destilada y se transfieren después a tubos de test que contienen 2 ml de ácido sulfúrico 0,1 M. Después de 30 min, se pipetea la solución de ácido sulfúrico en cubetas de fluorescencia y se mide el contenido de tinte por espectroscopia de fluorescencia. Una curva de calibración típica
- 60 es como sigue: 0 ng/ml - 0,71 FI; 5 ng/ml - 0,92 FI; 15 ng/ml - 1,25 FI; 50 ng/ml - 1,97 FI; 100 mUI/ml - 4,01 FI; 250 mUI/ml - 7,56 FI, donde FI es la intensidad de fluorescencia relativa en unidades arbitrarias.

Ejemplo 29

Método para marcación de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y didesoxirribonucleótidos con los tintes de succinimidilésteres del Ejemplo 23

5 Se prepararon 3-Amino-1-propinil-ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y didesoxirribonucleótidos (nucleótidos AP-3) como se describe en EE.UU. 5.151.507. En tales compuestos, el enlazador 3-amino-1-propinilo está unido a la posición 5 de las pirimidinas o la posición 7 de las 7-desazapurinas. Los nucleótidos AP-3 se disolvieron a una concentración final de 10 mM. Se prepararon soluciones stock que contenían 2 mg/100 μ l de tintes de succinimidil-éster del Ejemplo 23 en dimetilsulfóxido anhidro. A 0,1 μ mol de ribonucleótidos AP-3, desoxirribonucleótidos o
10 didesoxirribonucleótidos se añadieron 30 μ l de tampón de carbonato 0,25 M de pH 9,0, seguido por la adición de 5 μ l de tintes de succinimidil-éster en dimetilsulfóxido. La mezcla se mezcló rápidamente en un mezclador vorticial y se incubó luego durante una noche en la oscuridad a la temperatura ambiente en la incubadora de sacudidas. Los nucleótidos marcados con tinte se purificaron por RP-HPLC en gradiente (tampón A: acetato de trietilamonio 100 mM de pH 7,0 en agua; tampón B: acetato de trietilamonio 100 mM en acetonitrilo al 70% (v/v); caudal: 1,0 ml/min),
15 evaporado hasta casi sequedad y diluido en EDTA 1 mM, tampón Tris-HCl 10 mM de pH 8,0.

Ejemplo 30

20 *Preparación de un conjugado teofilina-cianina*

515 mg (0,56 mmol) de 2-{5'-[1''-(δ -sulfonatobutil)-5''-(SO₂NH-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂)-3'',3''-dimetil-(3''H)-indol-2''-ilideno]-1',3'-pentadien-1'-il}-1-(δ -sulfonatobutil)-3,3-dimetil-(3H)-indolio-5-sulfonato del Ejemplo 12e y
25 165 mg (0,56 mmol) de ácido teofilina-8-(3',3'-dimetil)butírico (ácido 8-(2',6'-dihidroxi-1',3'-dimetilpurin-8'-il)-3,3-butírico; preparado por condensación de 5,5-diamino-1,3-dimetiluracil-hidratado con anhídrido 3,3-dimetilglutárico en piridina de acuerdo con el método de Traube) se disolvieron a la temperatura ambiente en 1 ml de piridina seca. Se añadieron a la solución 116 mg (0,56 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida y 64 mg (0,56 mmol) de N-hidroxisuccinimida. Se continuó agitando a la temperatura ambiente durante una noche. Se eliminó por filtración la dicitclourea precipitada y la piridina se evaporó a vacío. El residuo se disolvió en la cantidad mínima de una mezcla
30 50:50 agua/metanol y se purificó por cromatografía RP-HPLC (eluyente: agua/metanol 50:50).

35

40

45

50

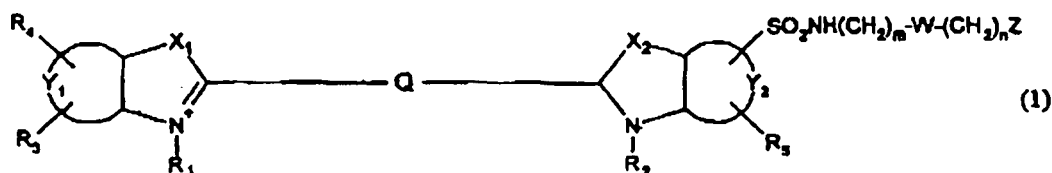
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto fluorescente de la fórmula:



en donde:

X₁ y X₂ se seleccionan independientemente del grupo constituido por -O-, -S-, -C(CH₃)₂- o -C(=CH₂)-

Y₁ e Y₂ son átomos de carbono e hidrógeno requeridos para formar un anillo benzo-condensado o nafto-condensado;

Q es una cadena polimetino;

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente del grupo constituido por H, alquiloC₁-C₄, grupo alquilensulfónico o grupo alquilensulfonato en donde el grupo alquileo tiene de 1 a 4 átomos de carbono;

R₃, R₄ y R₅ se seleccionan independientemente del grupo constituido por H, un grupo sulfónico, un grupo sulfonato, alquilensulfónico, alquilensulfonato y -SO₂NH(CH₂)_m-W-(CH₂)_nZ, en donde alquileo tiene 1 a 4 átomos de carbono, con la salvedad de que al menos uno de R₁ a R₅ contiene un grupo sulfónico o sulfonato;

W está ausente o es un grupo seleccionado de -SO₂NH-, -O-, -COO-, o -CONH-; n = 0-12 y m = 0-12 con las salvedades de que m + n ≤ 12 y al menos uno de m y n es diferente de 0;

y Z es una funcionalidad nucleófila N, O o S o es una funcionalidad capaz de reaccionar con los nucleófilos N, O o S.

2. Un compuesto fluorescente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde Z es una funcionalidad nucleófila seleccionada del grupo constituido por -NH₂, -OH, y -SH.

3. Un compuesto fluorescente de acuerdo con la reivindicación 1, en donde Z es una funcionalidad capaz de reaccionar con nucleófilos N, O, S seleccionados del grupo constituido por -COCl, -COOCOR, -CONHNH₂, ésteres de N-hidroxisuccinimido, -NCS, -CHO, -CHOCH₂I y fosforamidito y maleimido; R es un alquiloC₁-C₄.

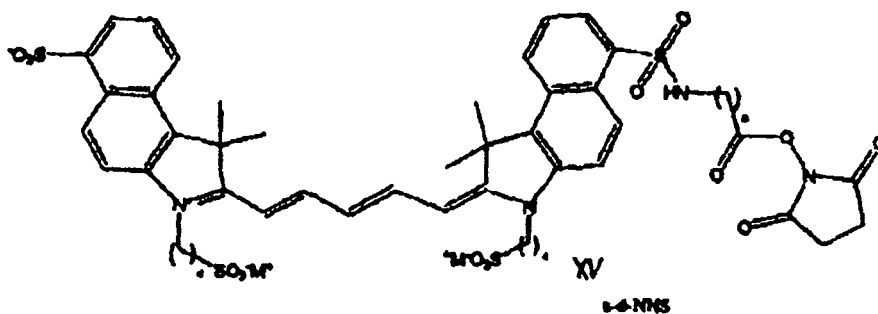
4. Un compuesto fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos dos de los grupos R₁ a R₅ contienen un grupo ácido sulfónico o un grupo sulfonato.

5. Un compuesto fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde R₃, R₄, R₅ son todos ellos un grupo de la fórmula -SO₂NH(CH₂)_m-W-(CH₂)_nZ.

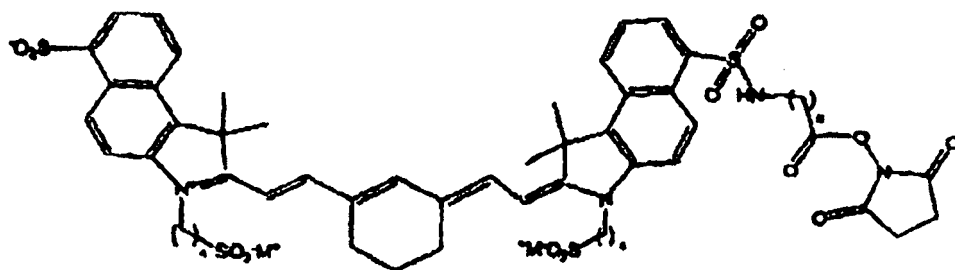
6. Un compuesto fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde X₁ y X₂ son ambos -C(CH₃)₂.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, representado por la fórmula estructural siguiente:

a)



b)

**XVIa-4-1043**

8. Una sonda de ácido nucleico marcada con un compuesto fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Un reactivo de fijación inmunológica marcado con un compuesto fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

10. Un nucleótido marcado con un compuesto fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

11. Un nucleósido marcado con un compuesto fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

12. Un ensayo para detectar la presencia o cantidad de un analito en una muestra que comprende poner en contacto una sonda de ácido nucleico o un reactivo de fijación inmunológica marcado con un compuesto fluorescente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en condiciones adecuadas para fijación con un analito, en donde la fijación es representativa de la presencia o cantidad del analito en la muestra, y determinar la magnitud de dicha fijación por medida de la fluorescencia de la sonda de ácido nucleico fijada o el reactivo de fijación inmunológica marcado con dicho compuesto fluorescente.

13. Un kit para un ensayo de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y una sonda de ácido nucleico o un reactivo de fijación inmunológica.

FIG. 1

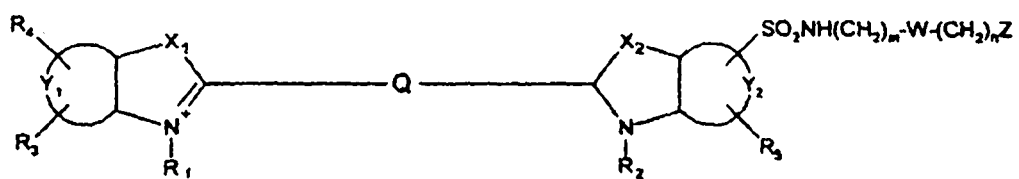
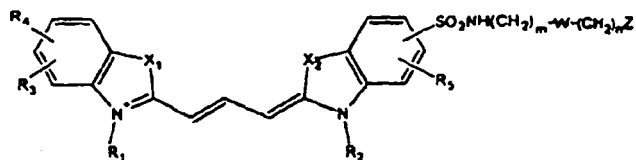
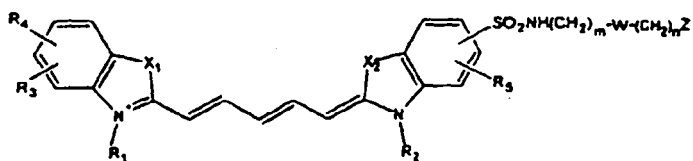


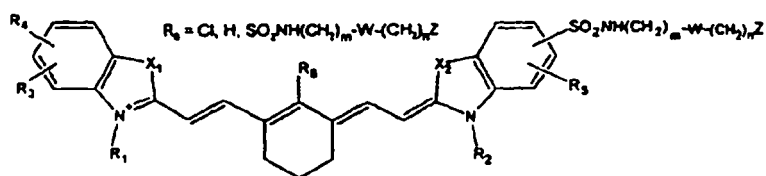
FIG. 2



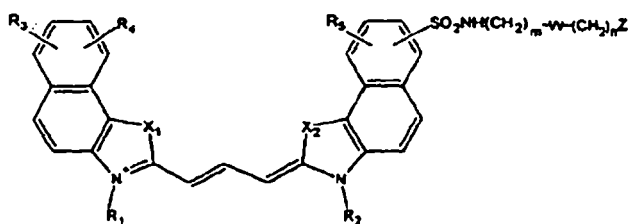
2 a



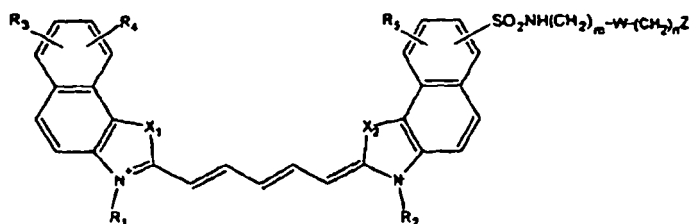
2 b



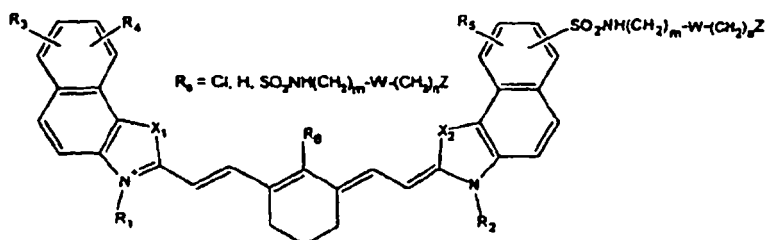
2 c



2 d



2 e



2 f

FIG. 3

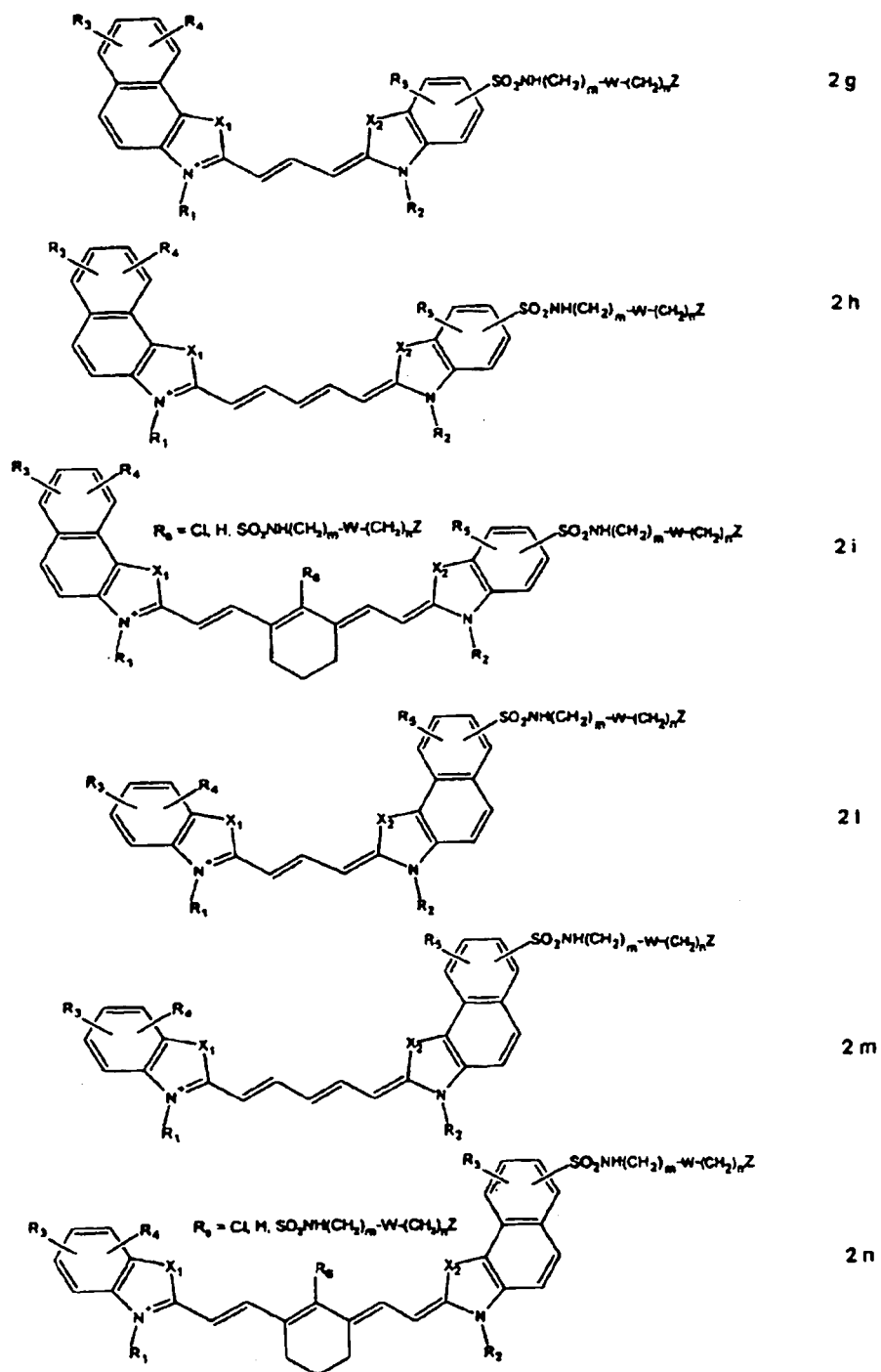
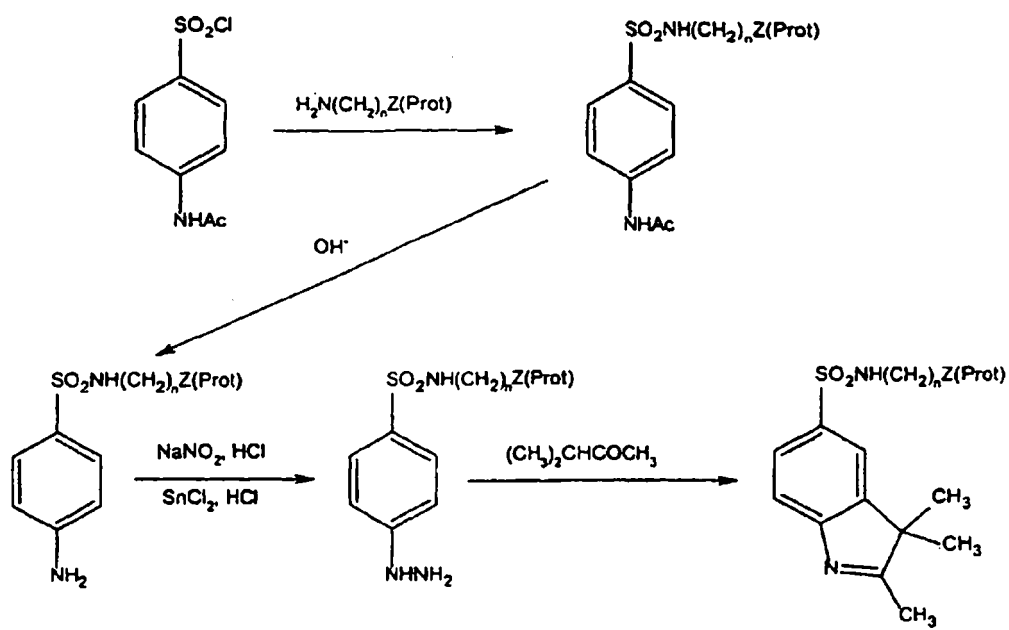
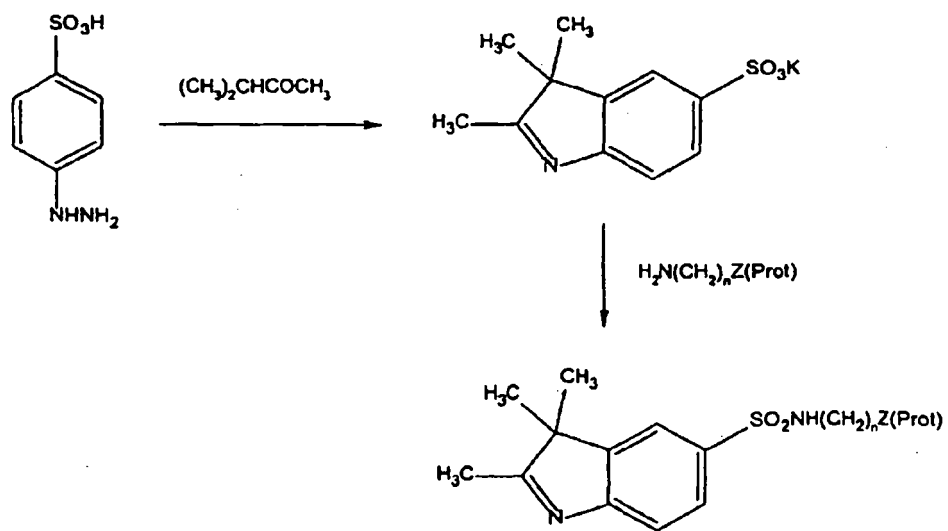


FIG. 4



(a)



(b)

FIG. 5

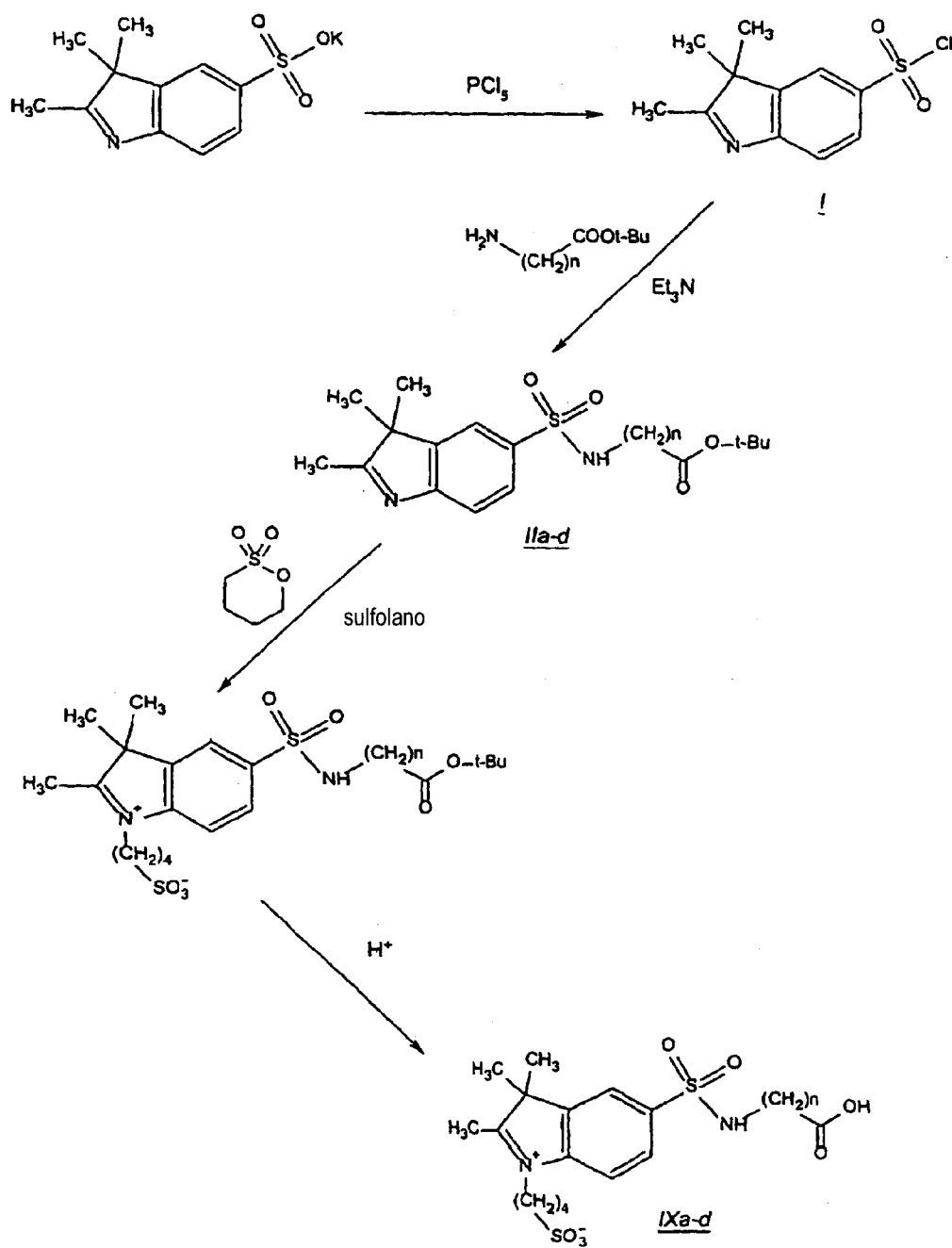


FIG. 6

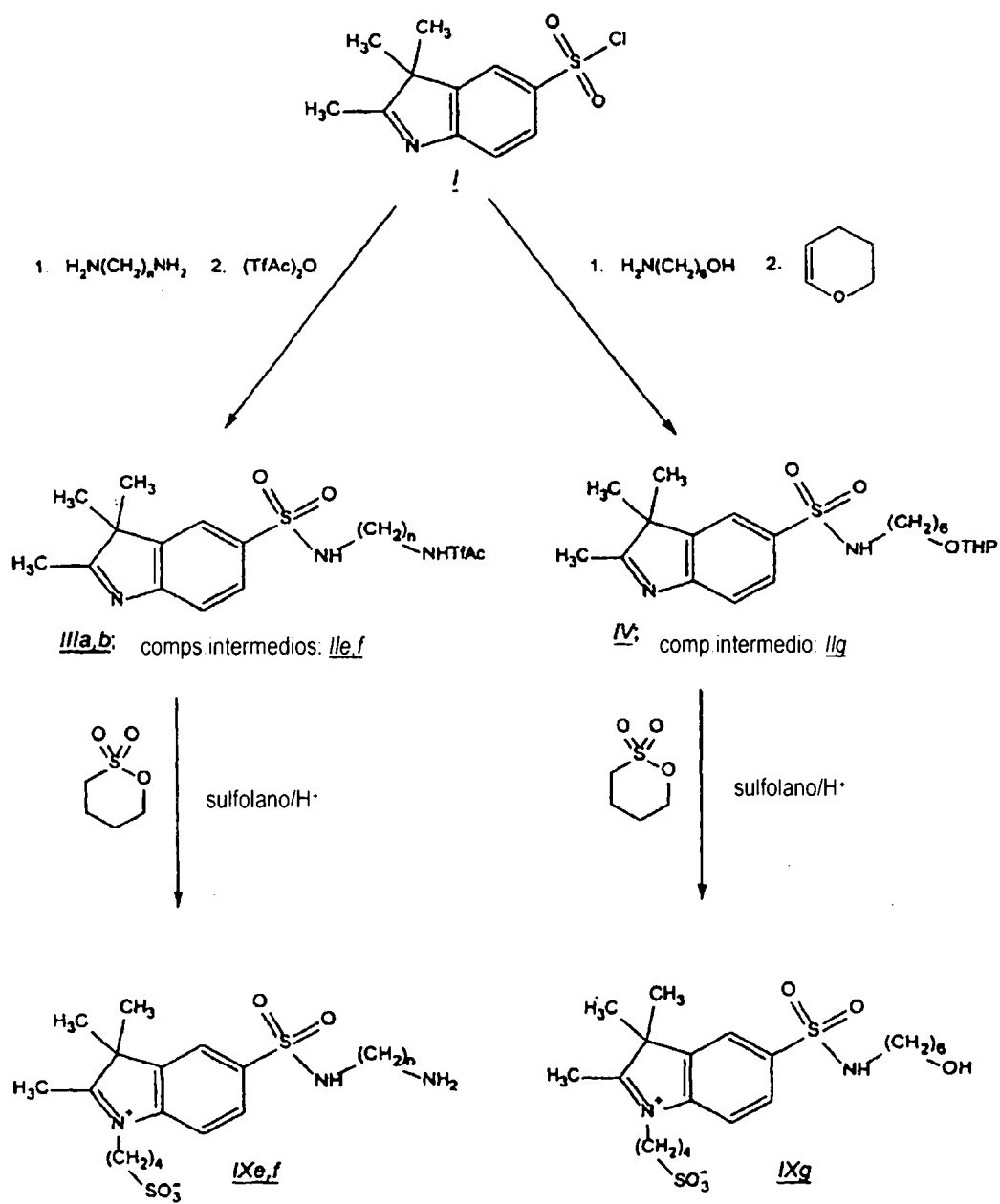


FIG. 7

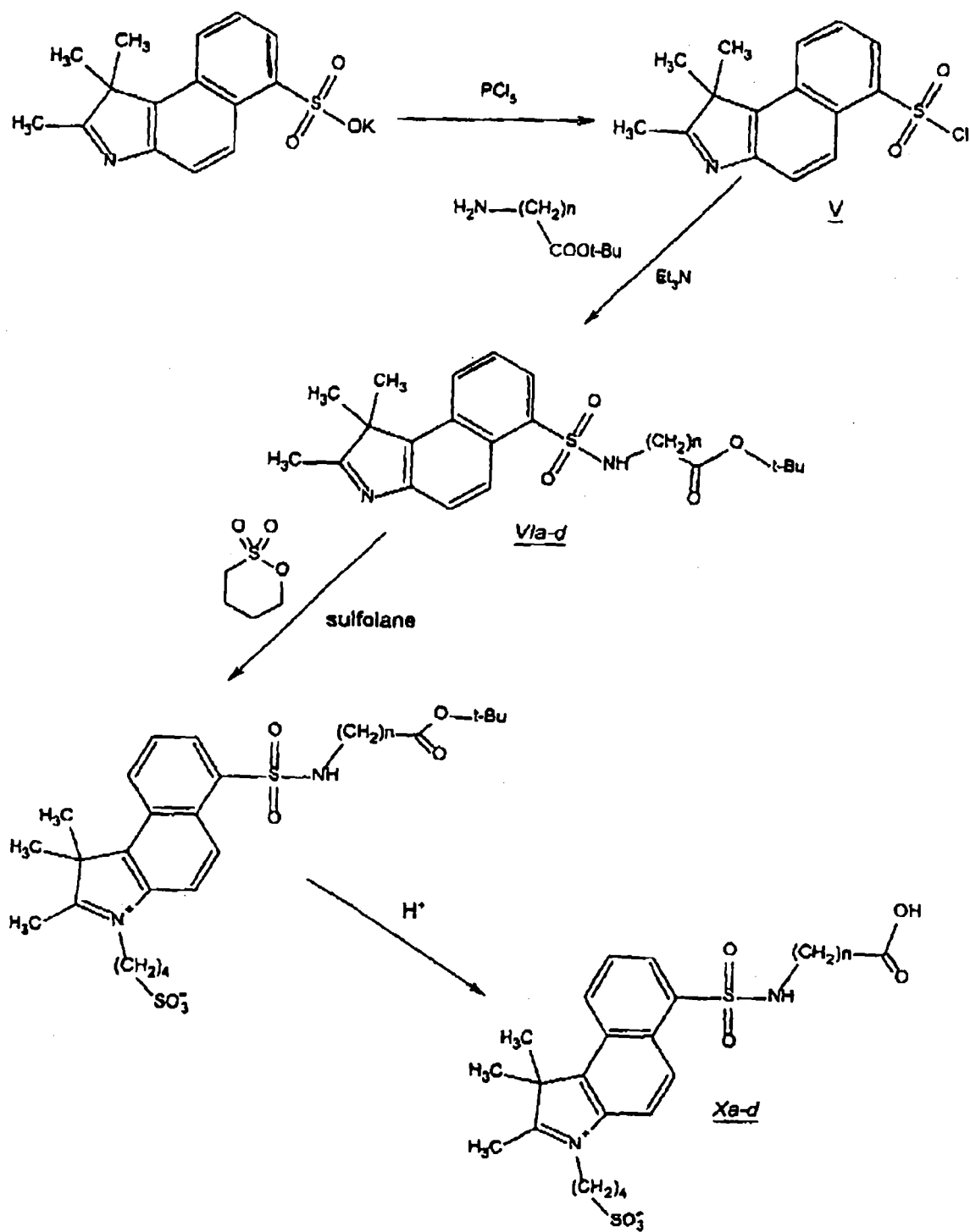


FIG. 8

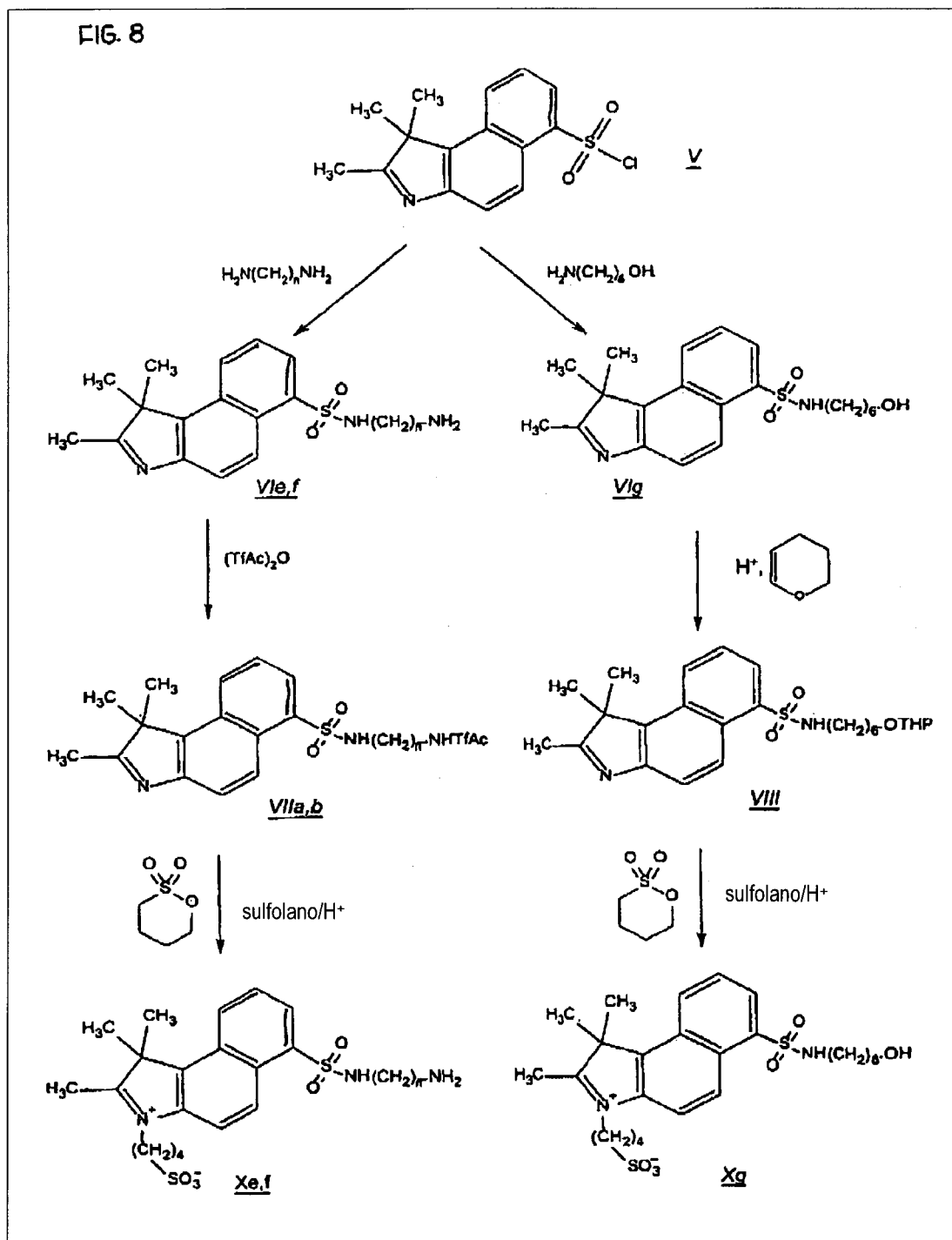


FIG. 9

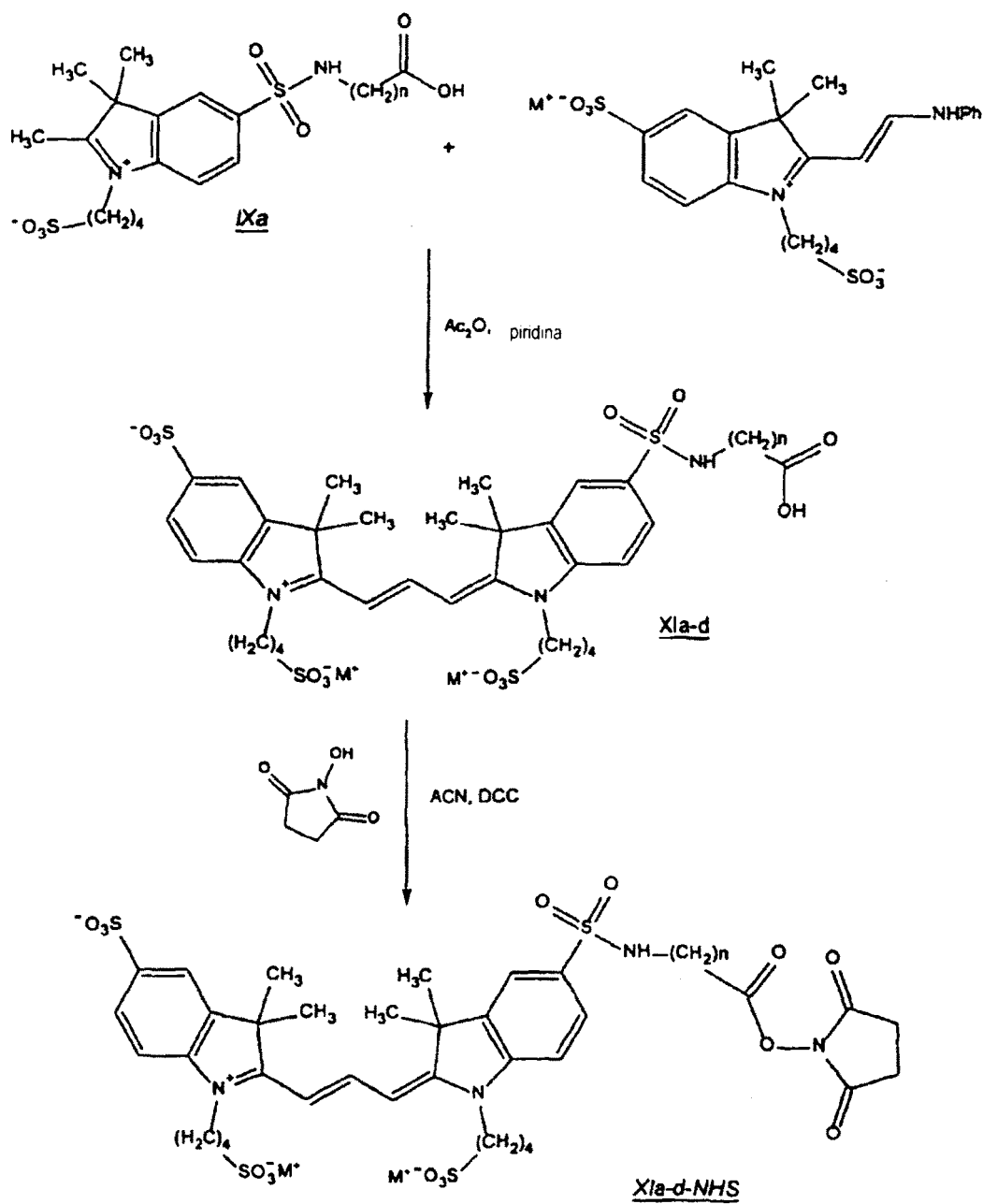


FIG. 10

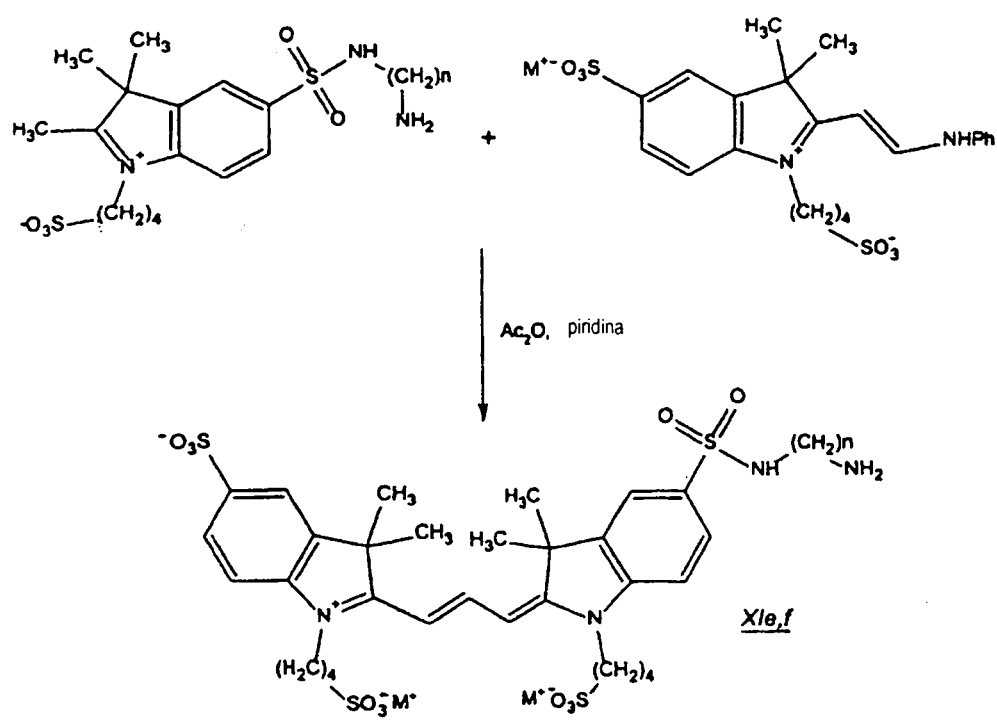
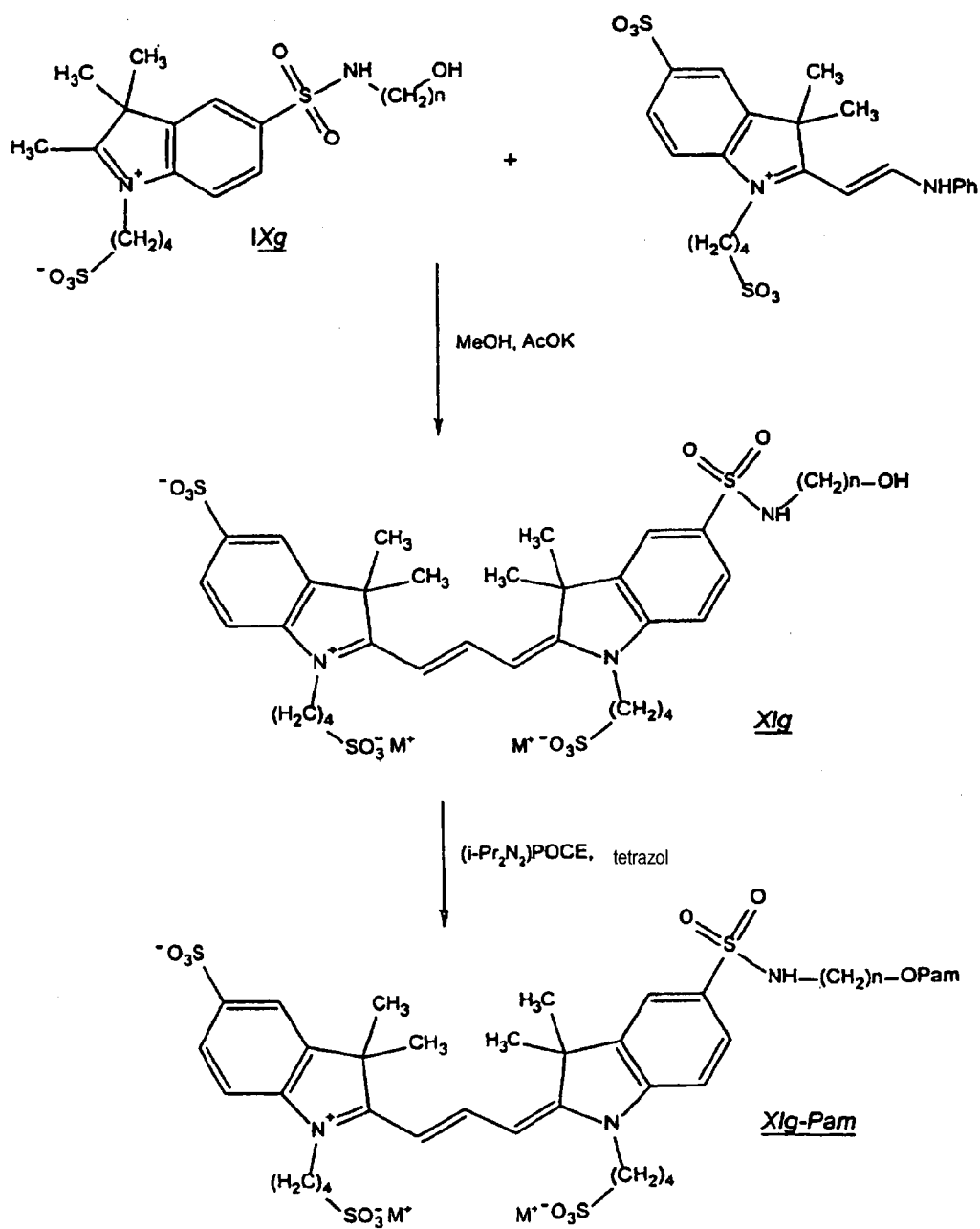


FIG. 11



$(i\text{-Pr}_2\text{N}_2)\text{POCE}$ = bis-(N,N-diisopropyl)-cianoetil fosforamidito
Pam = Fosforamidito

FIG. 12

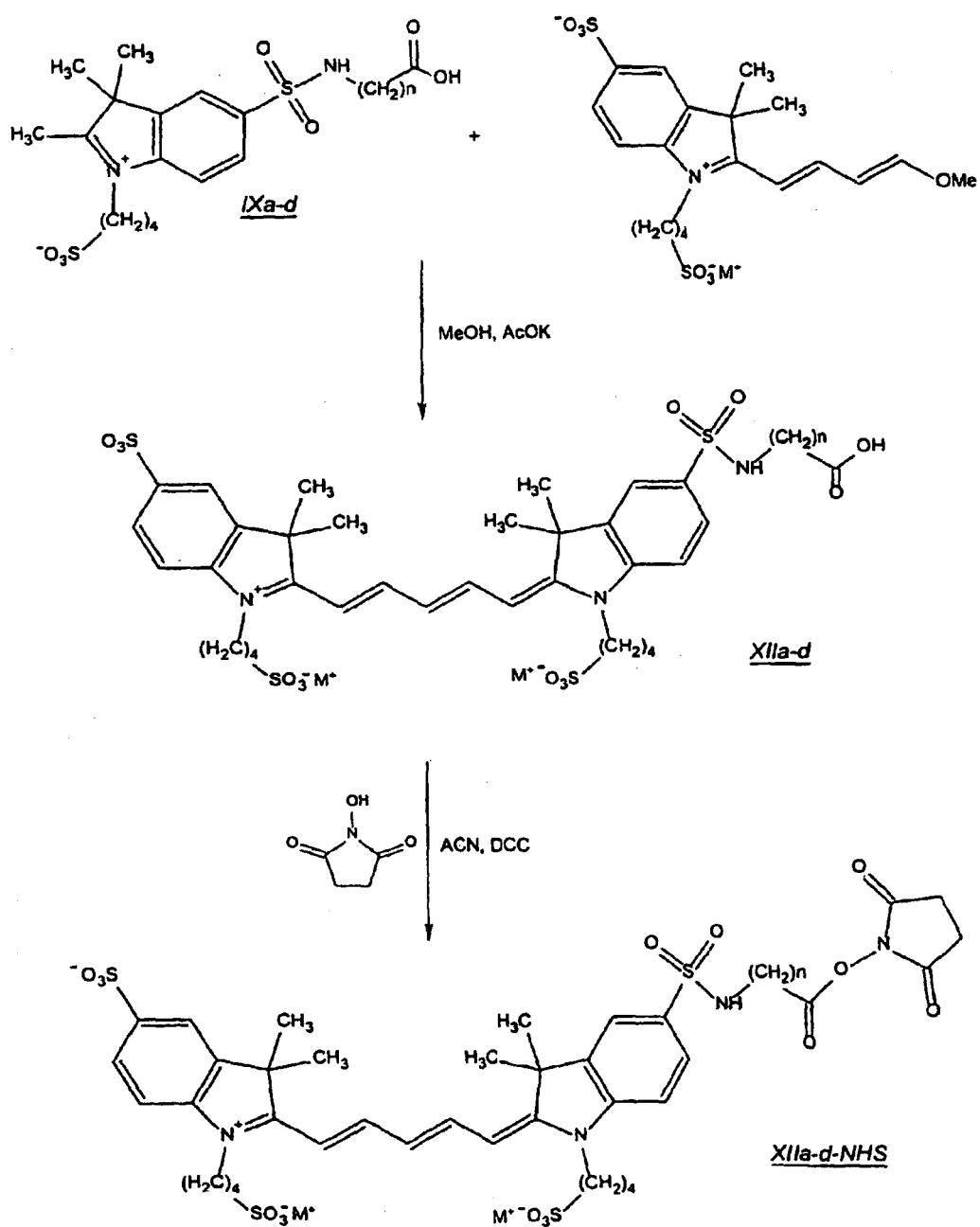


FIG. 13

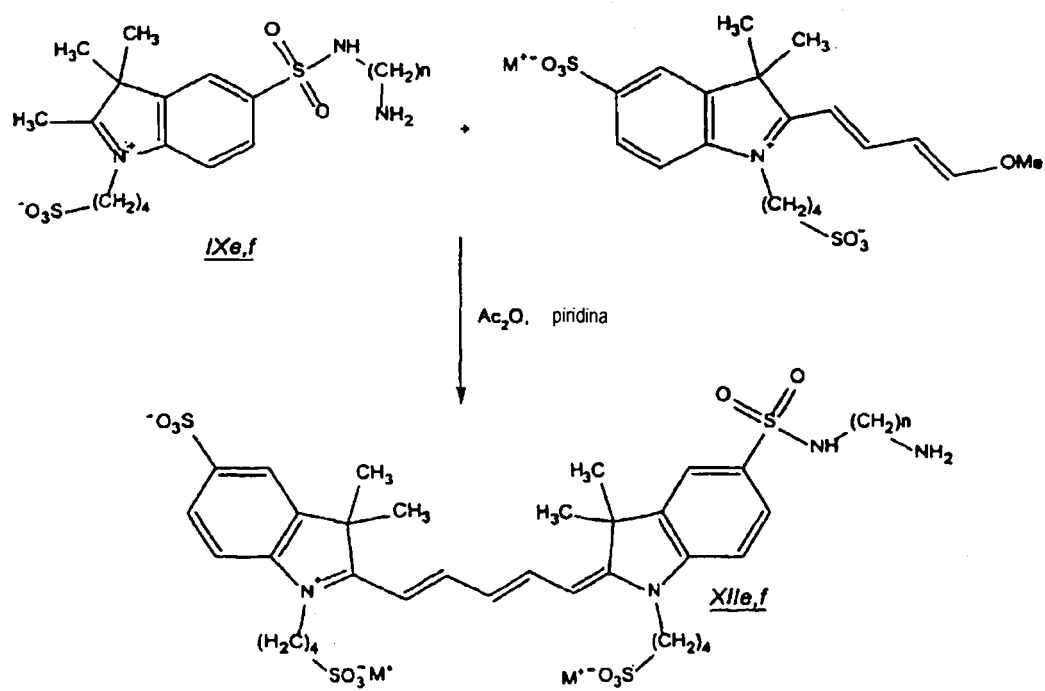
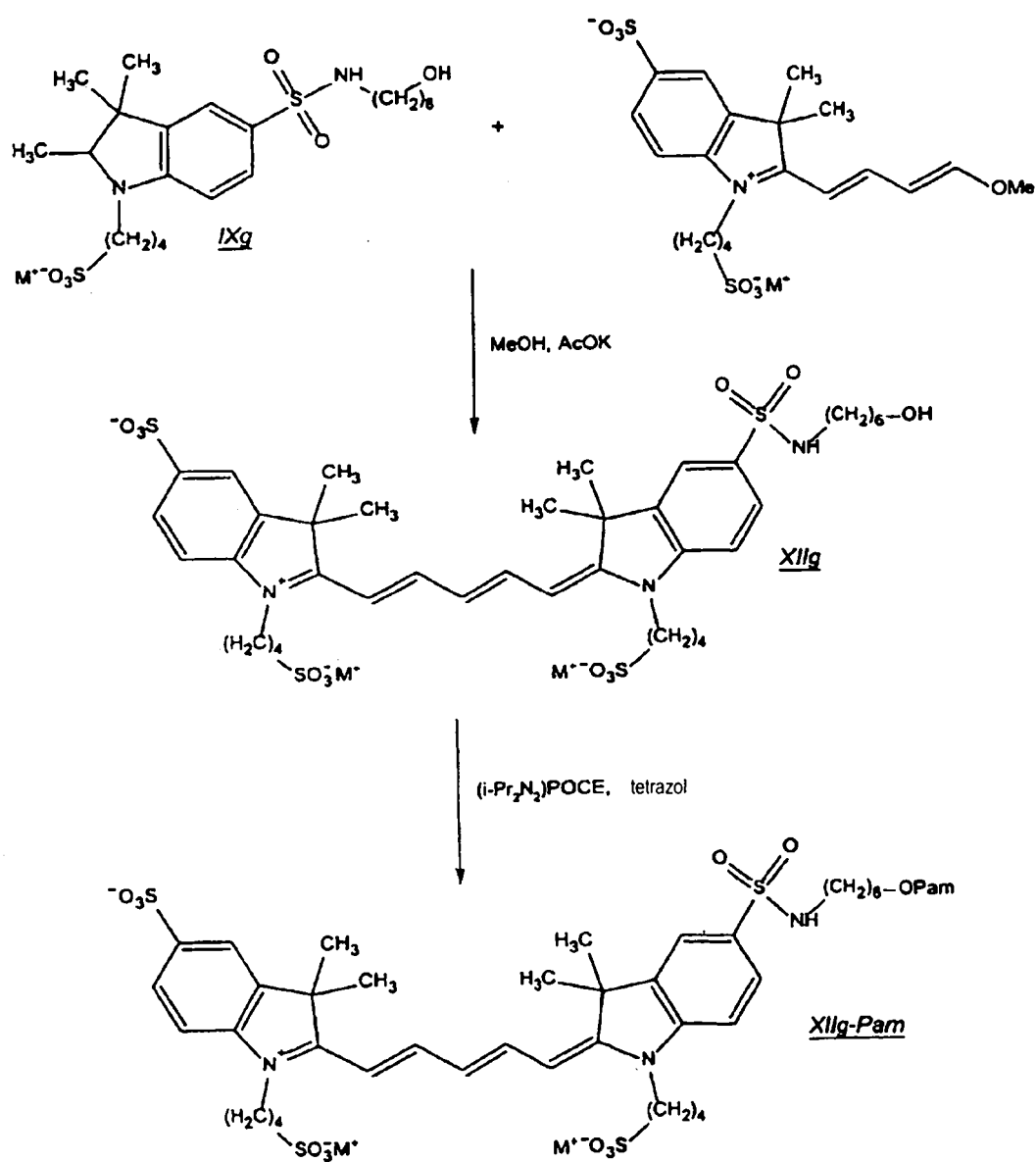


FIG. 14



(i-Pr₂N₂)POCE = bis-(N,N-diisopropil)-cianoetil fosforamidito
Pam = Fosforamidito

FIG. 15

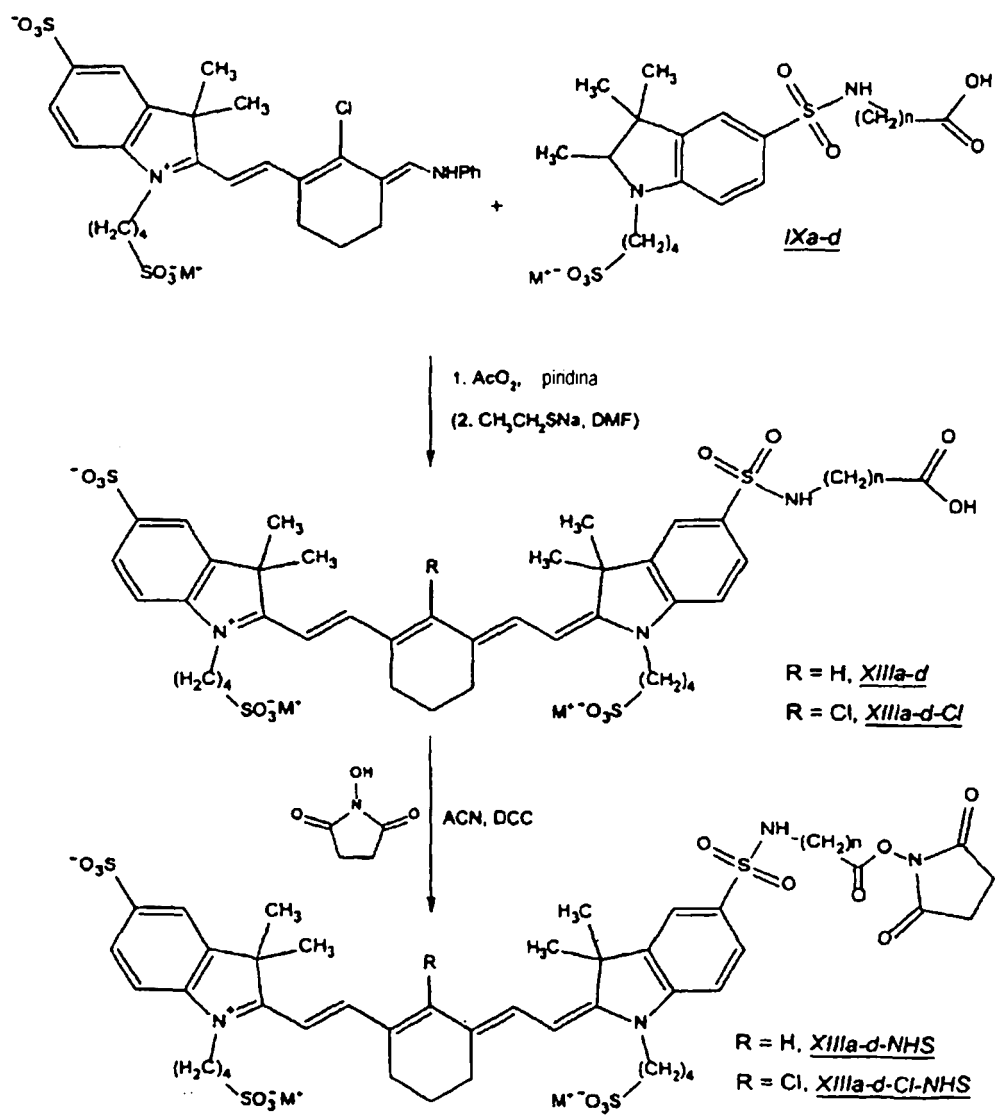


FIG. 16

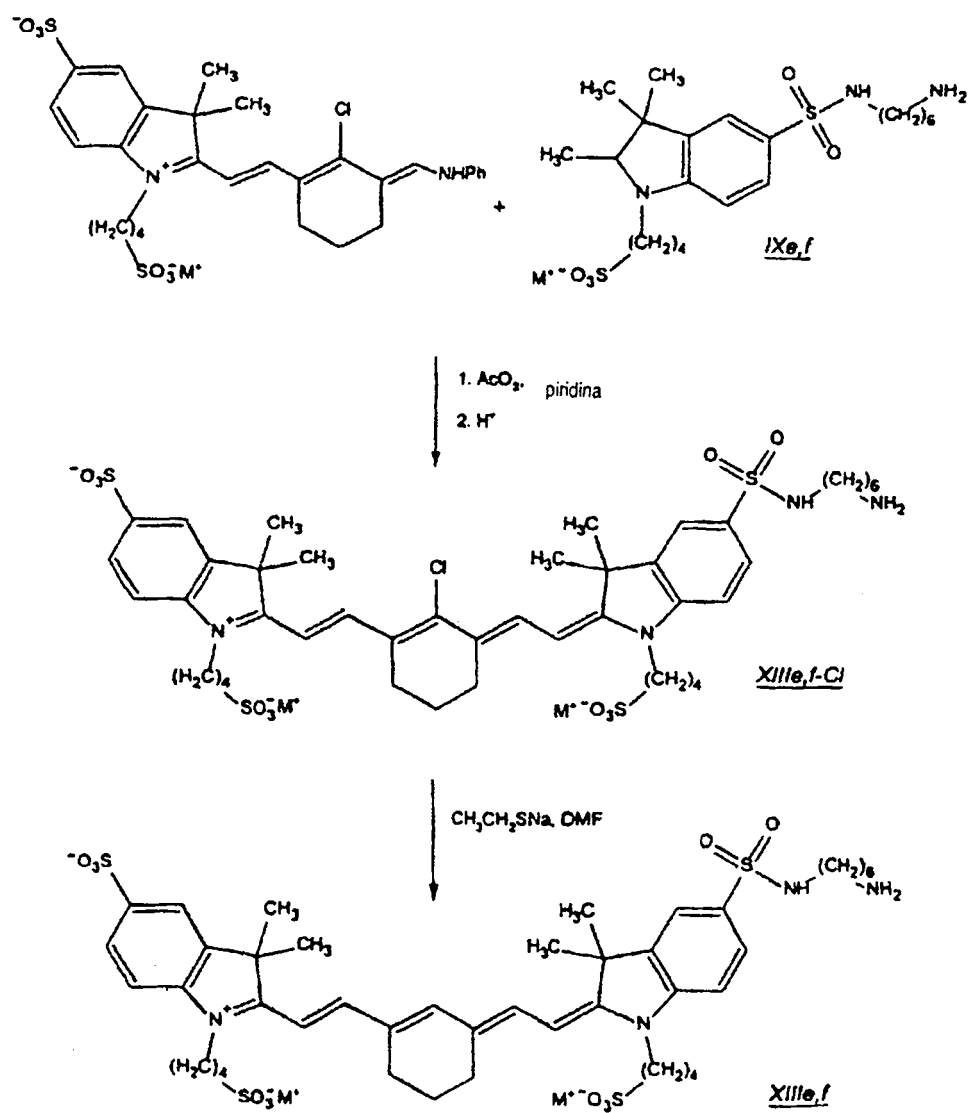
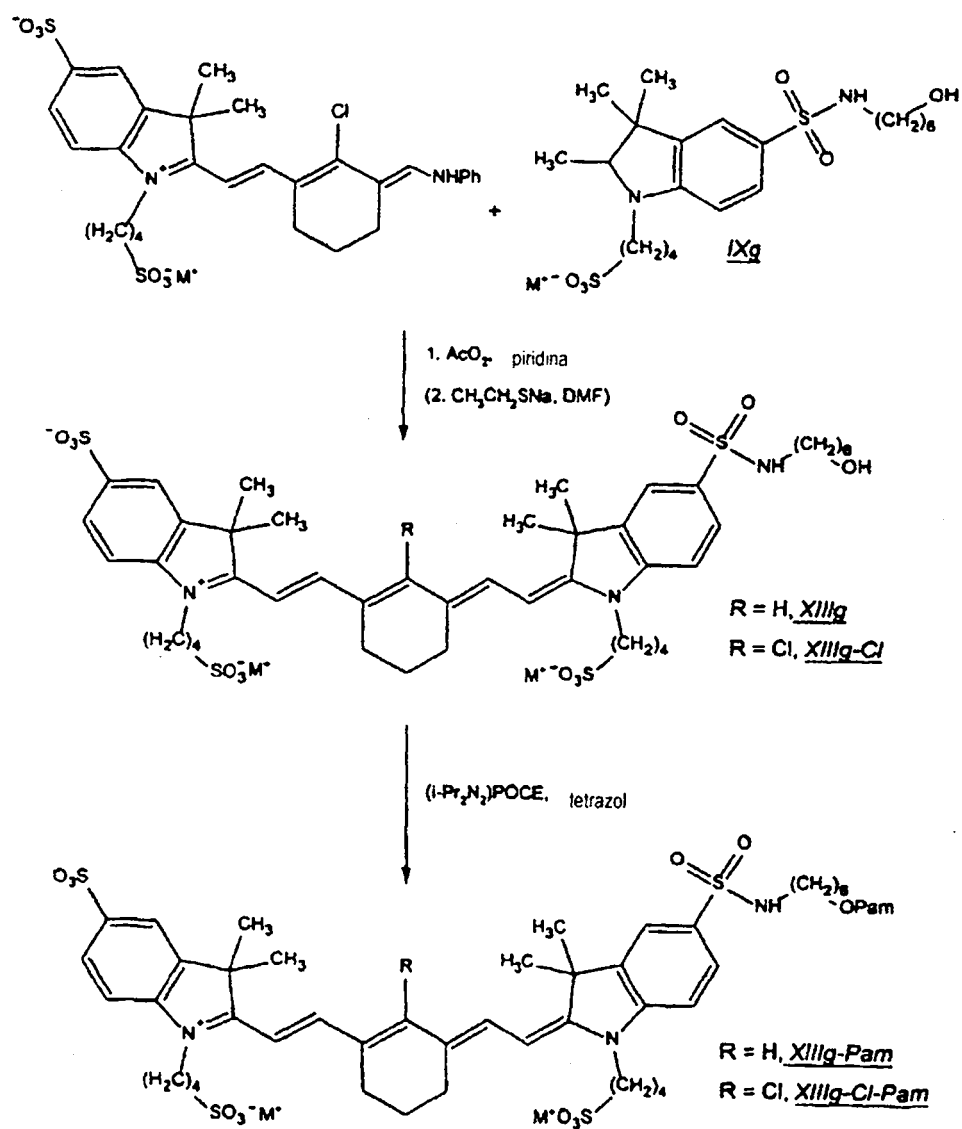


FIG. 17



(i-Pr₂N₂)POCE = bis-(N,N-diisopropil)-cianoetil fosforamidito
Pam = Fosforamidito

FIG. 18

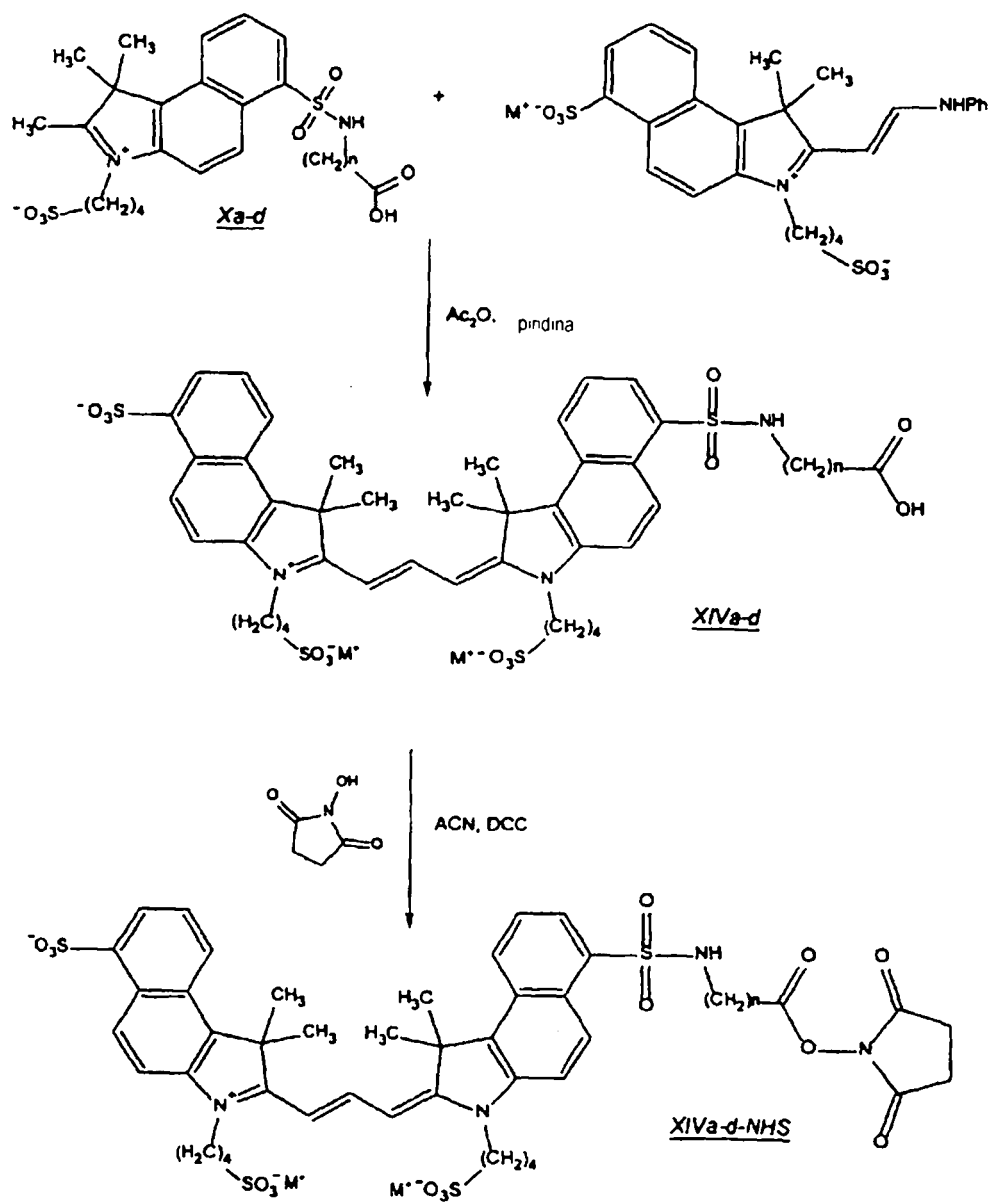


FIG. 19

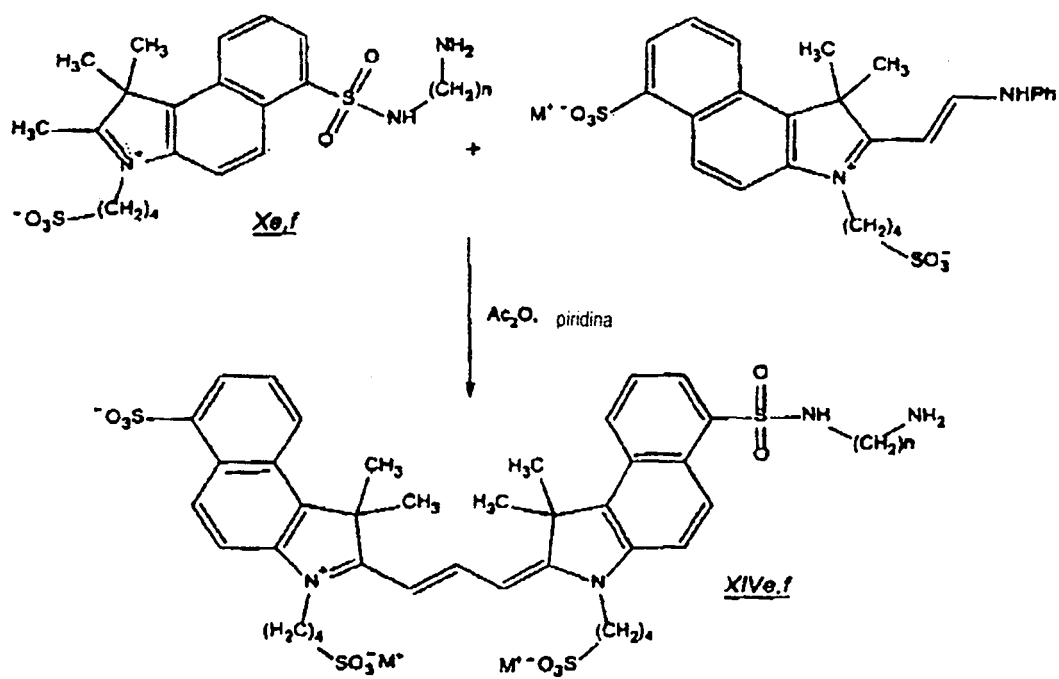
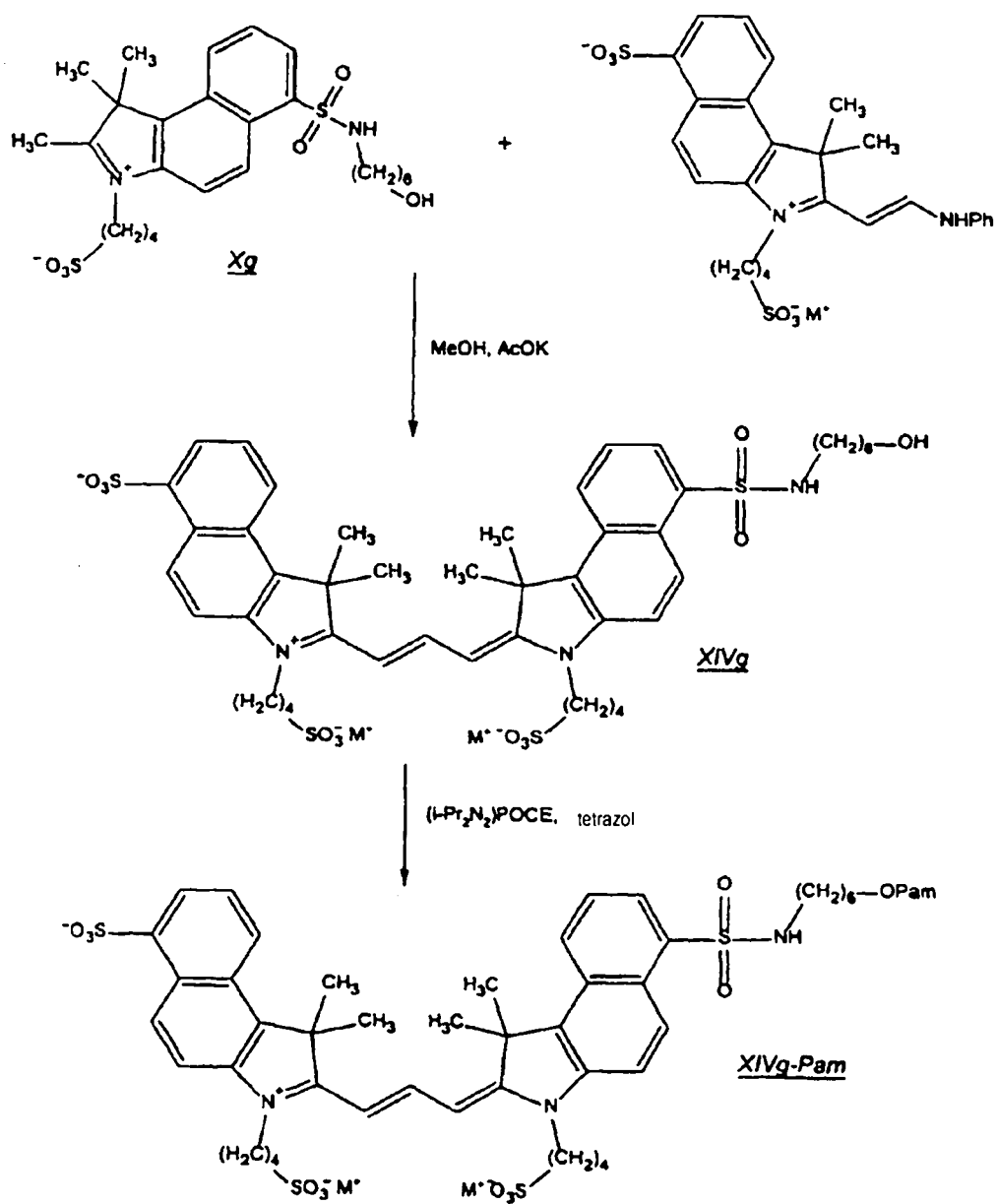


FIG. 20



(i-Pr₂N₂)POCE = bis-(N,N-diisopropil)-cianoetil fosforamidito
 Pam = Fosforamidito

FIG. 22

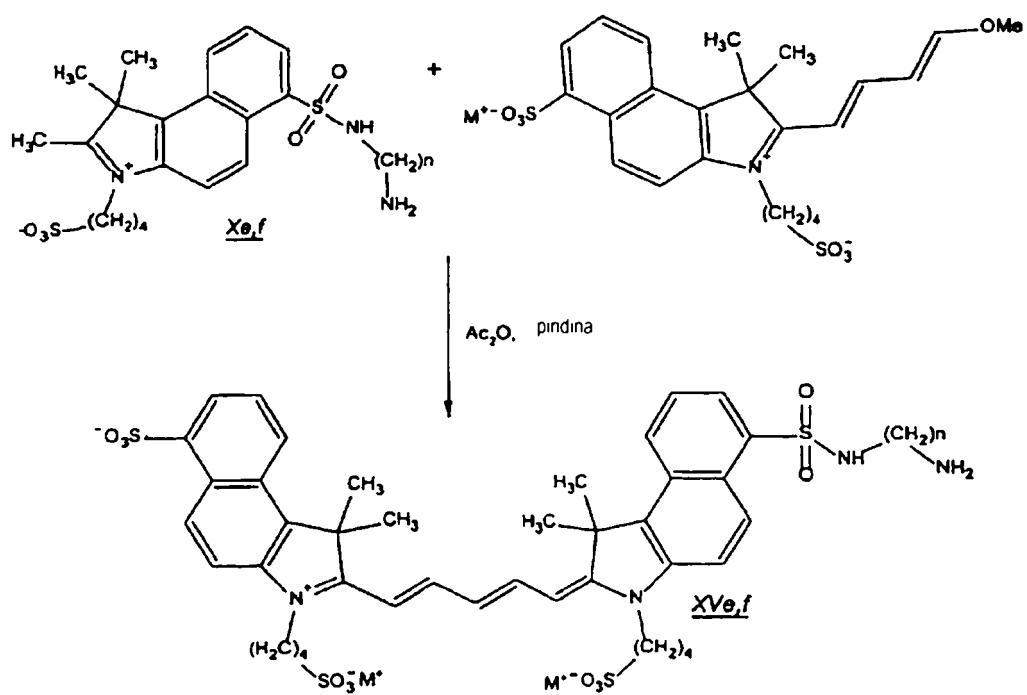
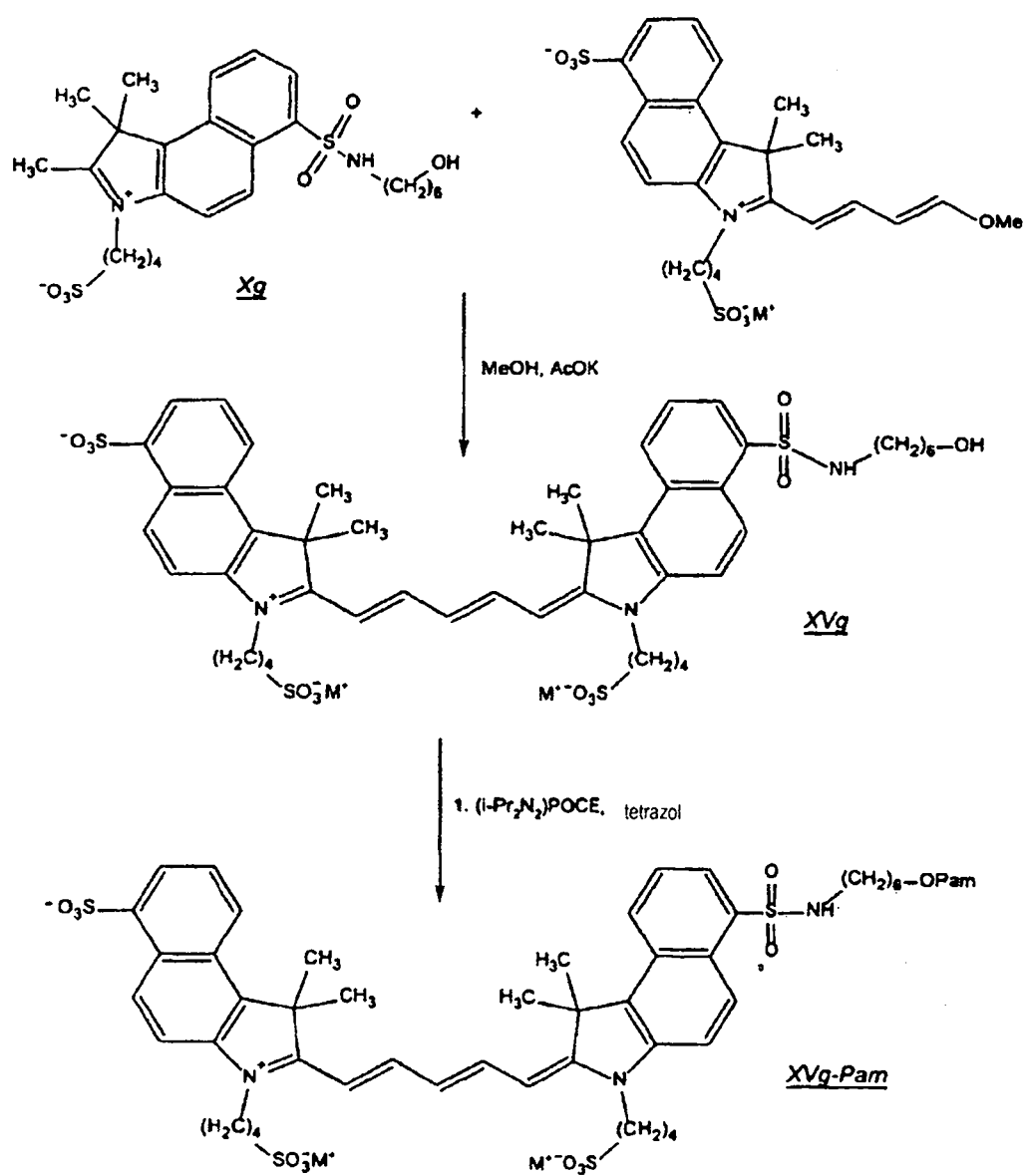


FIG. 23



$(i\text{-Pr}_2\text{N}_2)\text{POCE}$ = bis-(N,N-diisopropil)-cianoetil fosforamidito
 Pam = Fosforamidito

FIG. 24

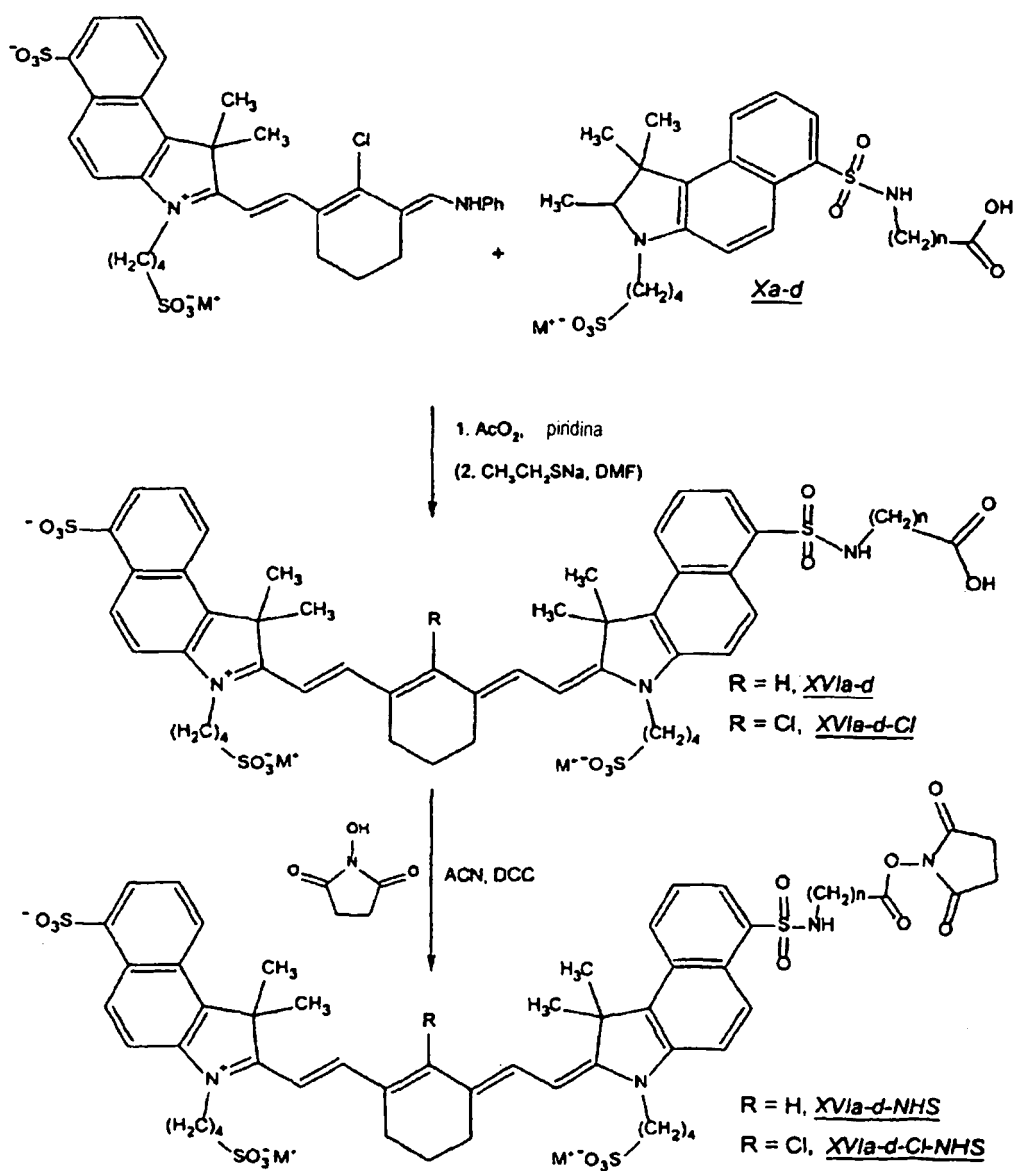
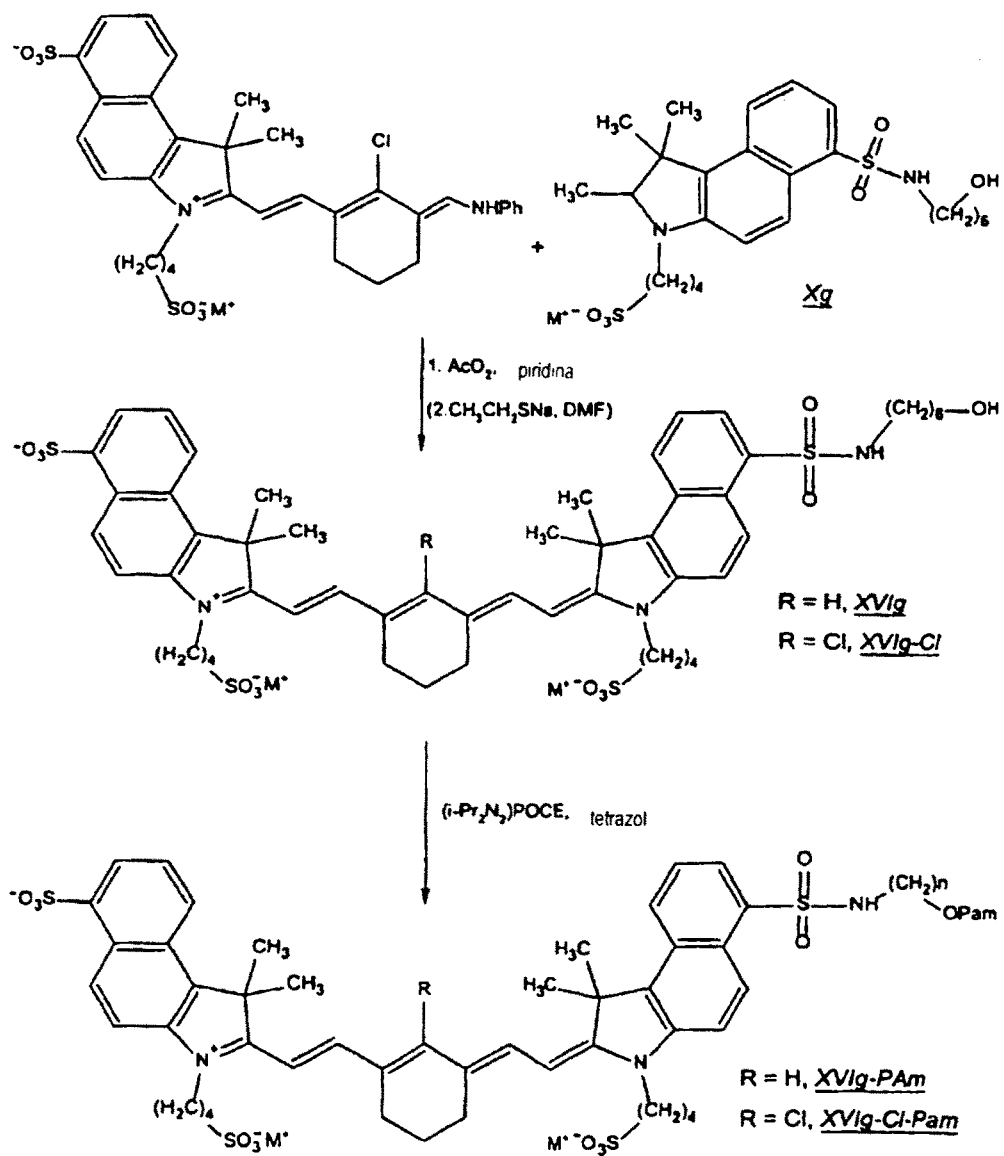


FIG. 26



(i-Pr₂N₂)POCE = bis-(N,N-diisopropil)-cianoetil fosforamidito
 Pam = Fosforamidito

FIG. 27

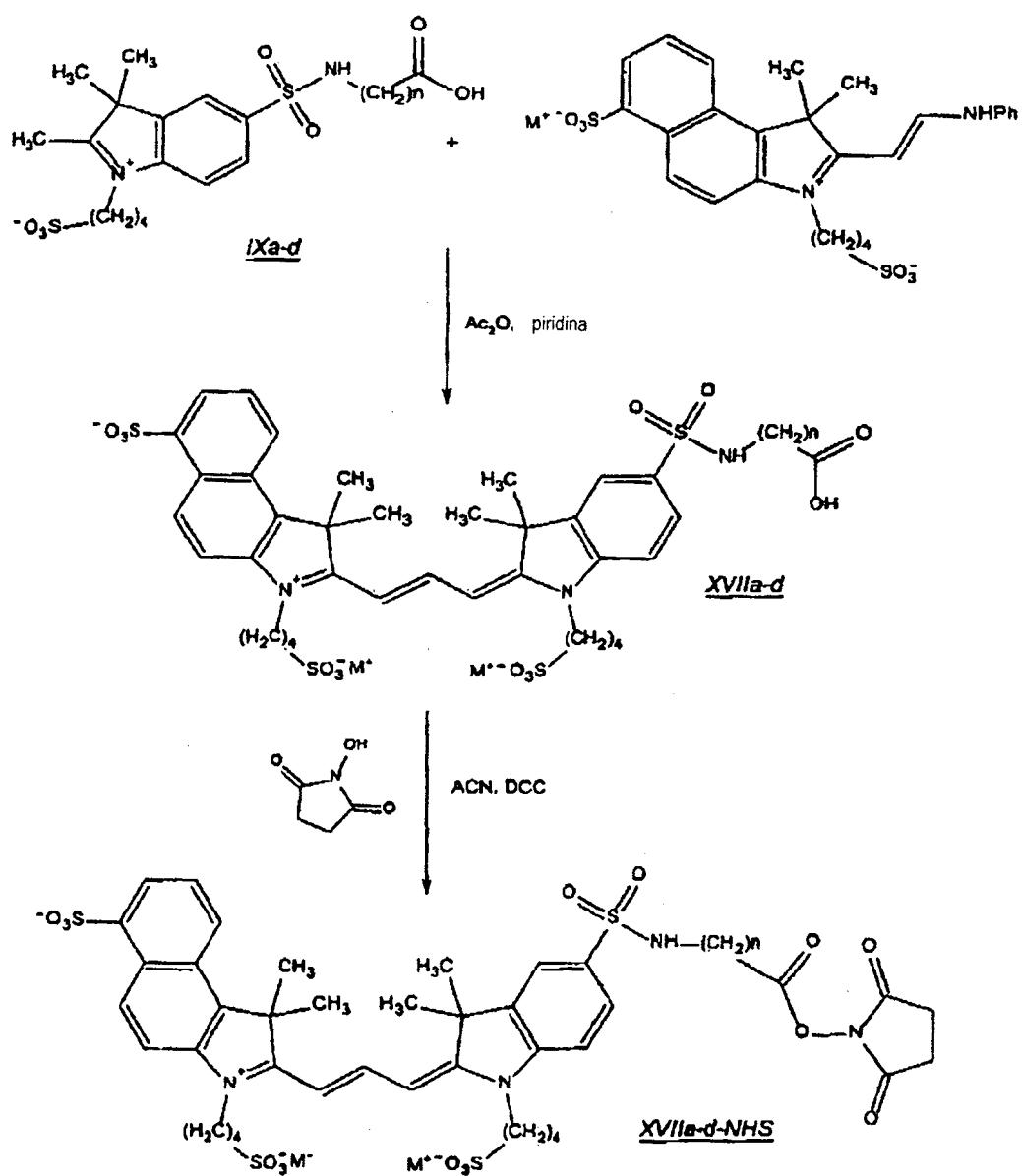


FIG. 28

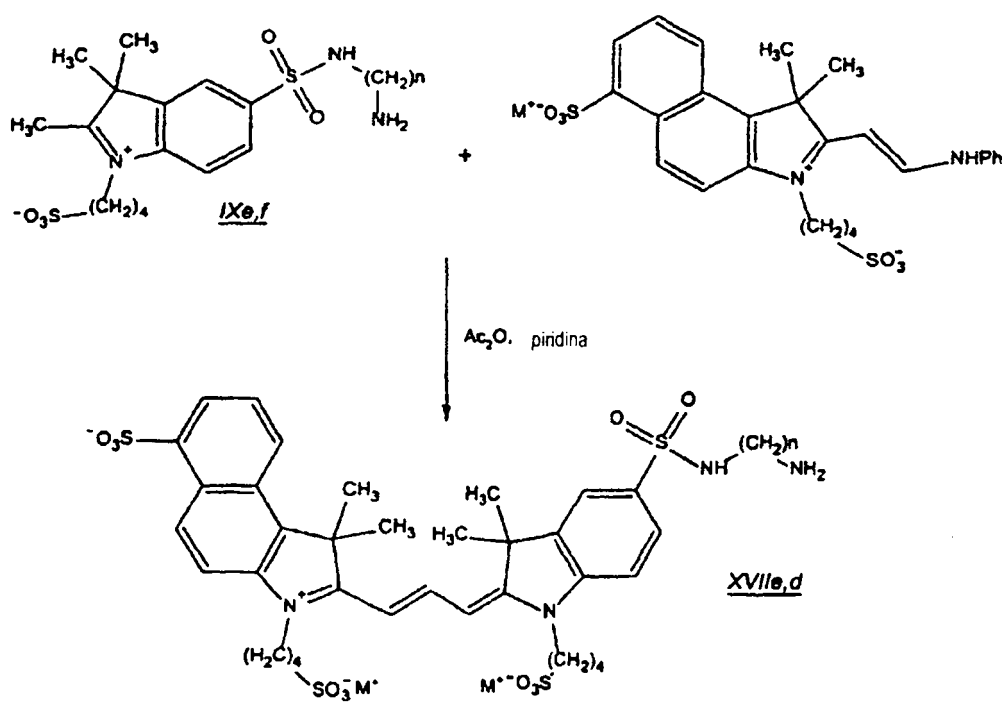
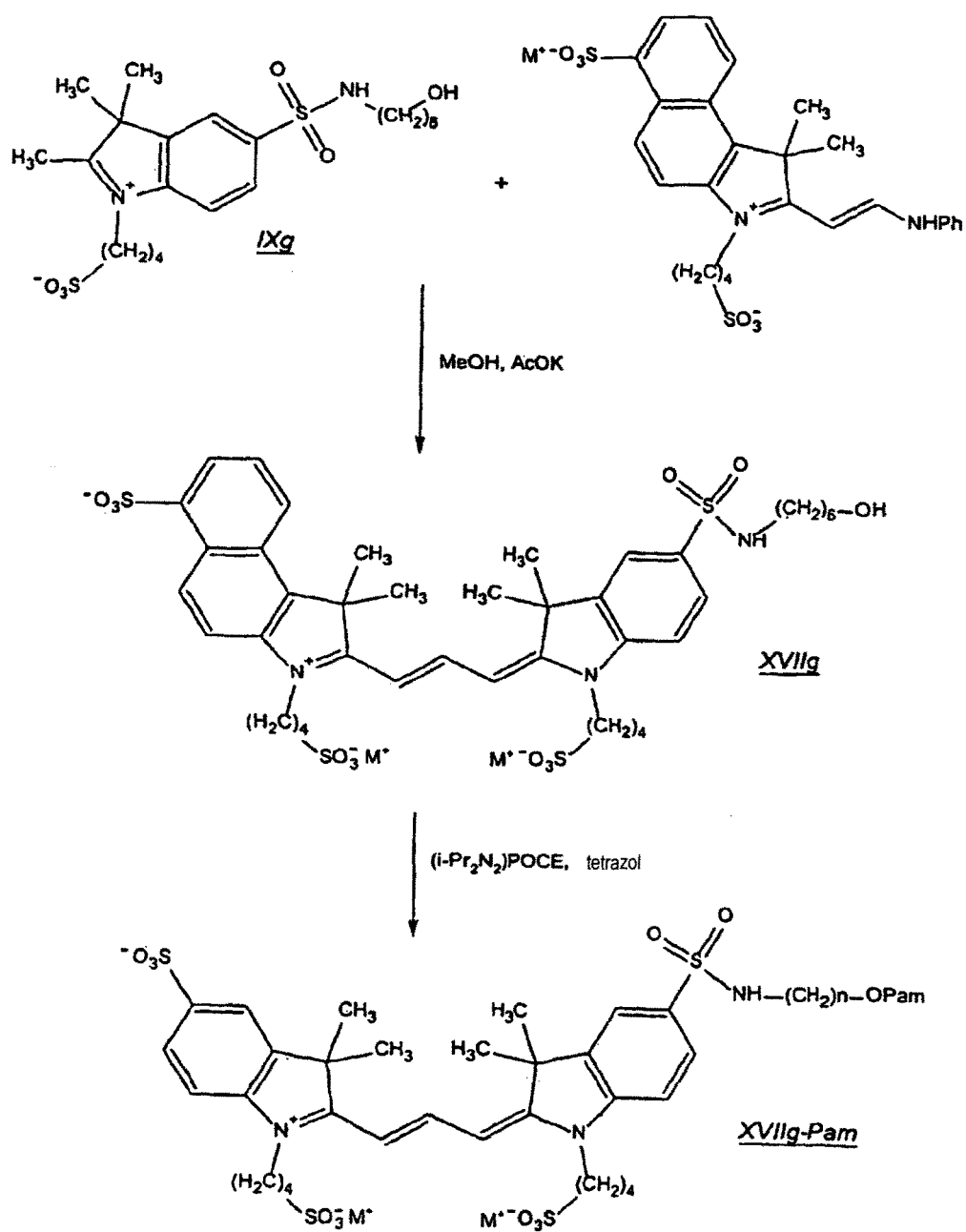


FIG. 29



(i-Pr₂N₂)POCE = bis-(N,N-diisopropyl)-cianoetil fosforamidito
 Pam = Fosforamidito

FIG. 30

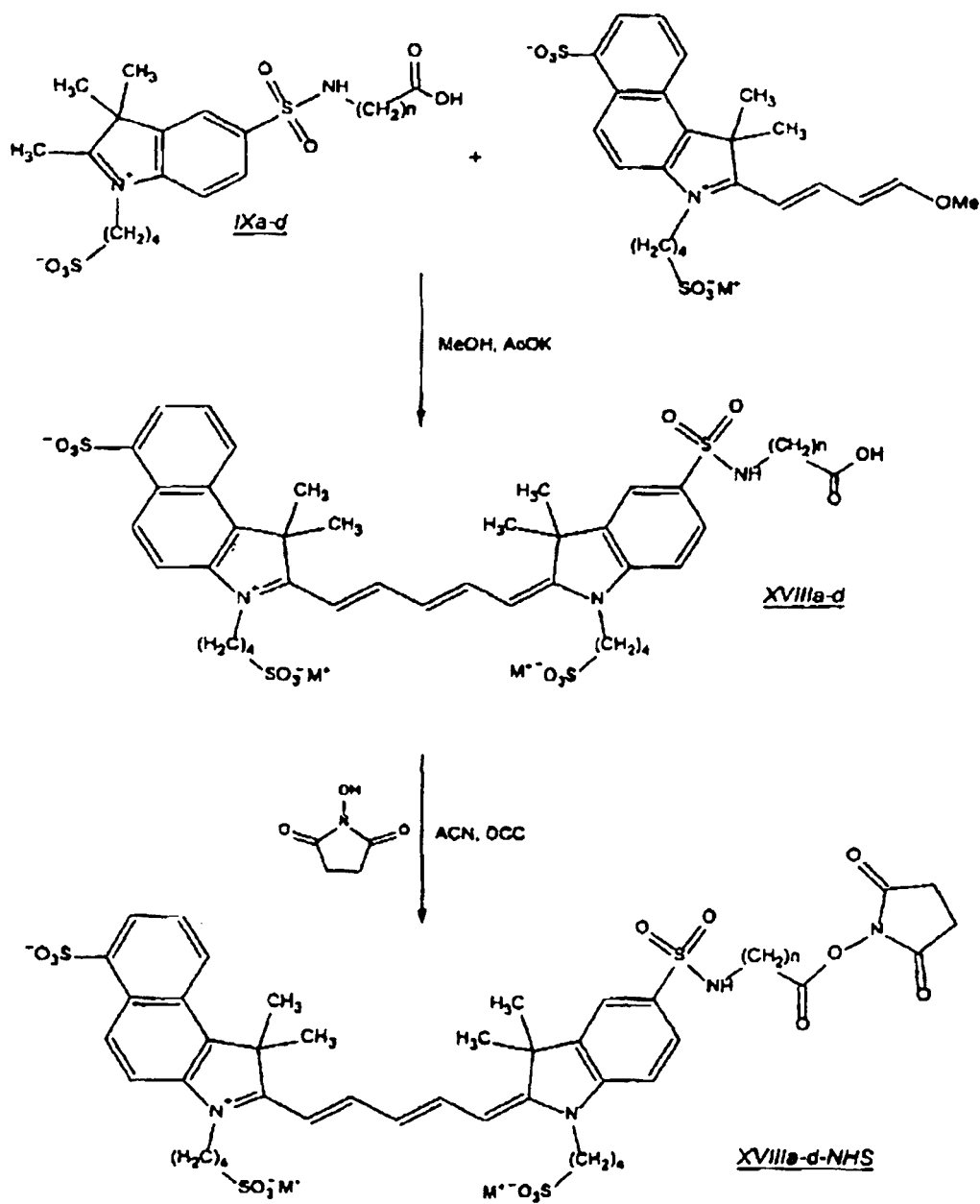


FIG. 31

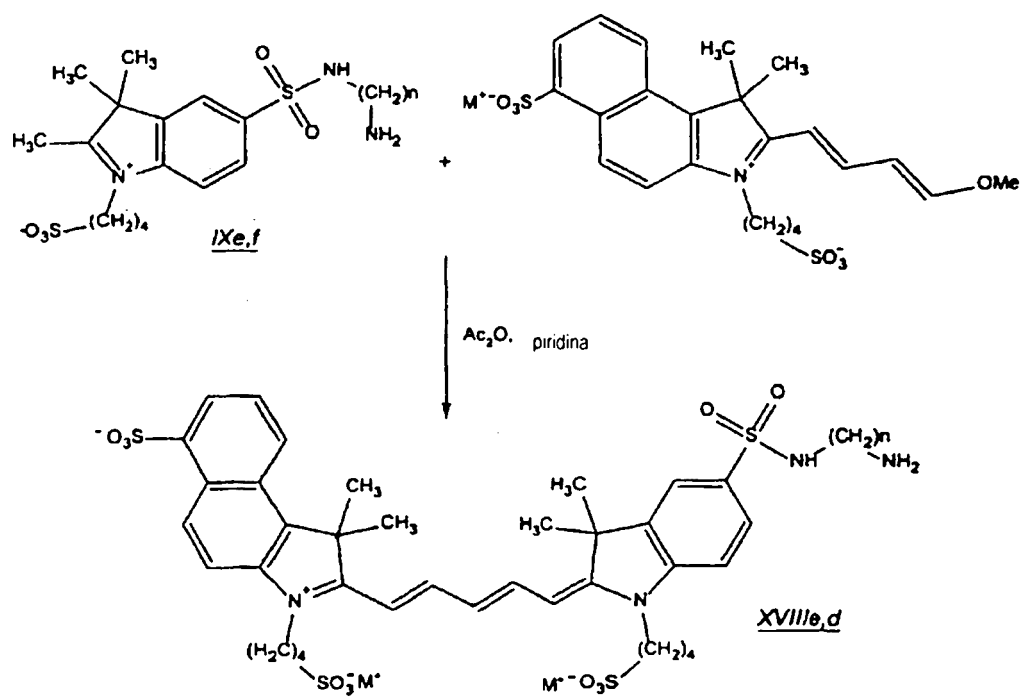


FIG. 33

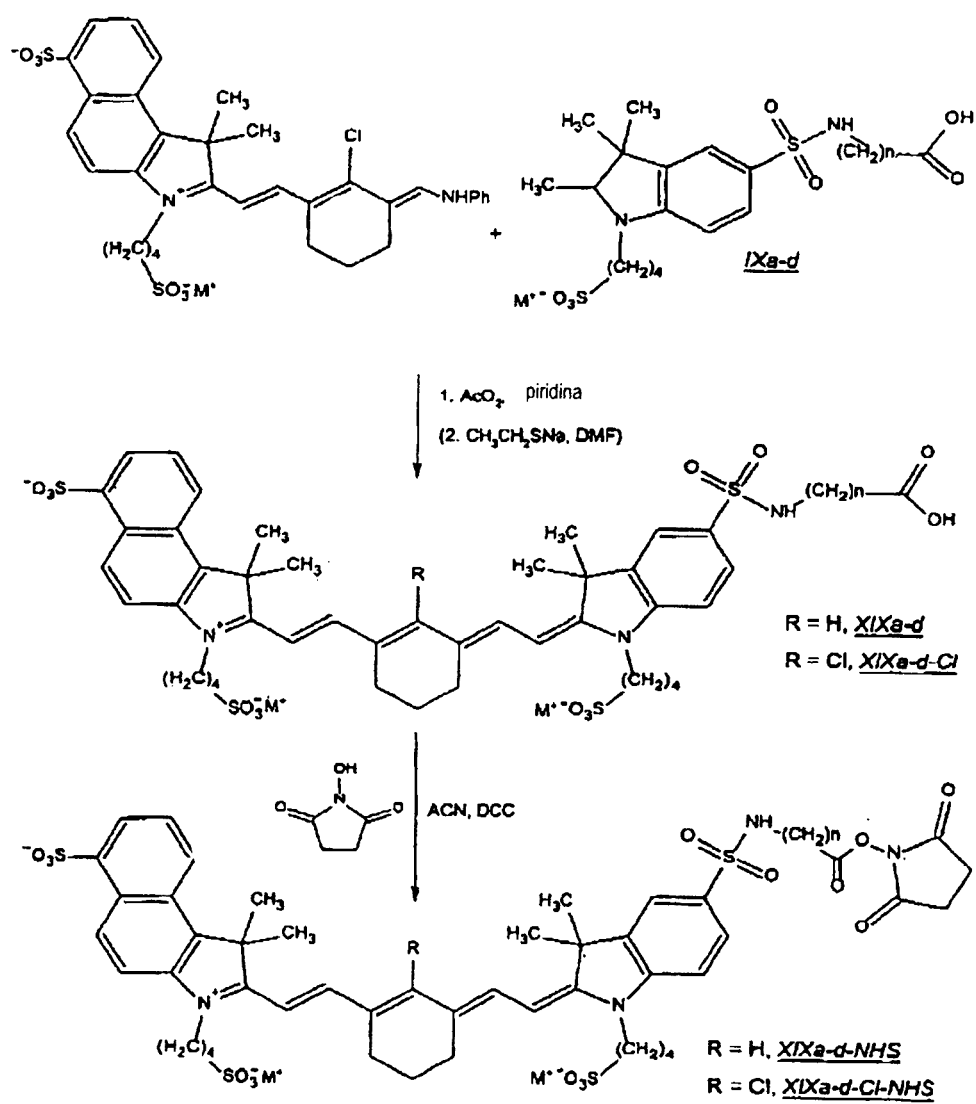


FIG. 34

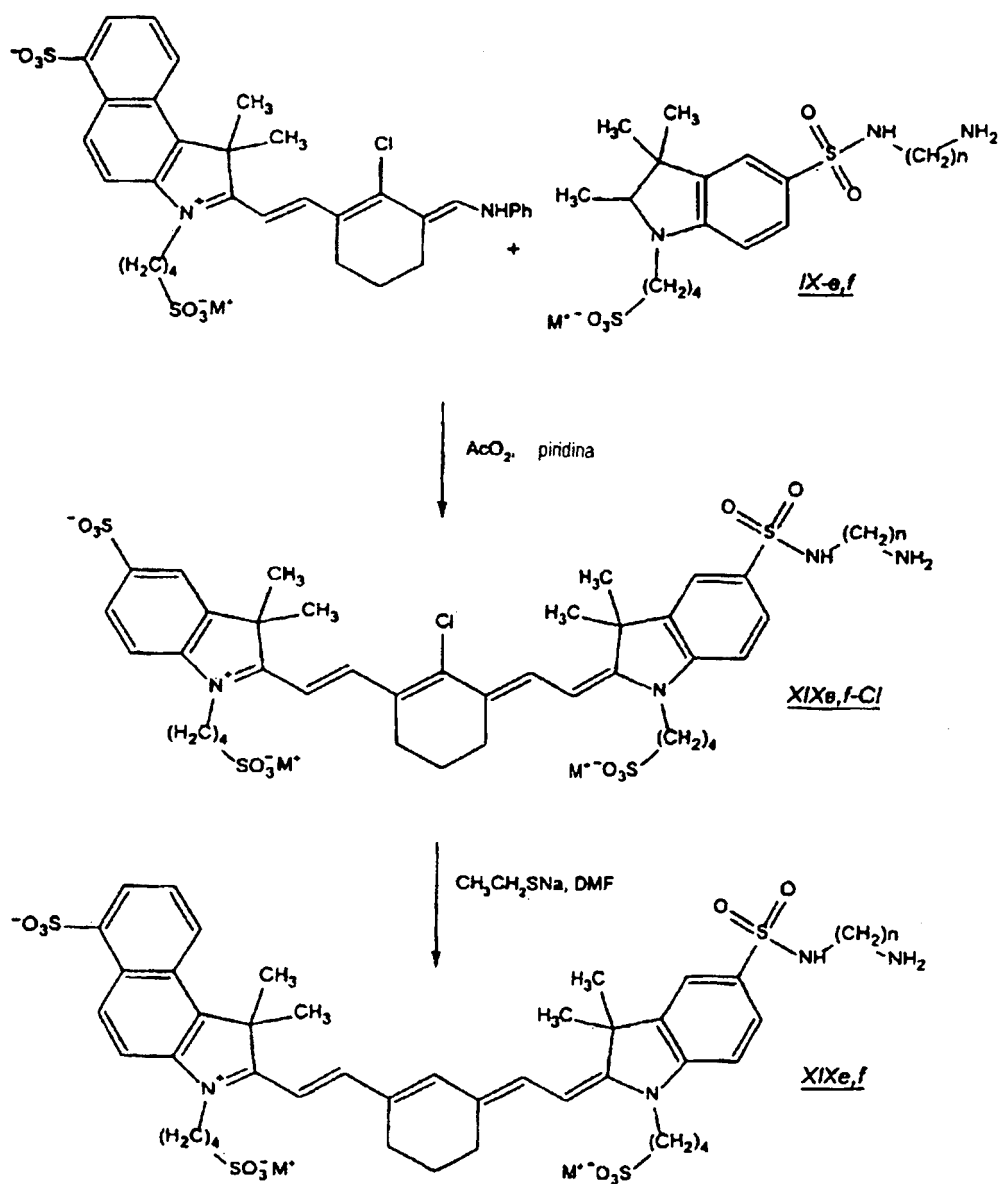
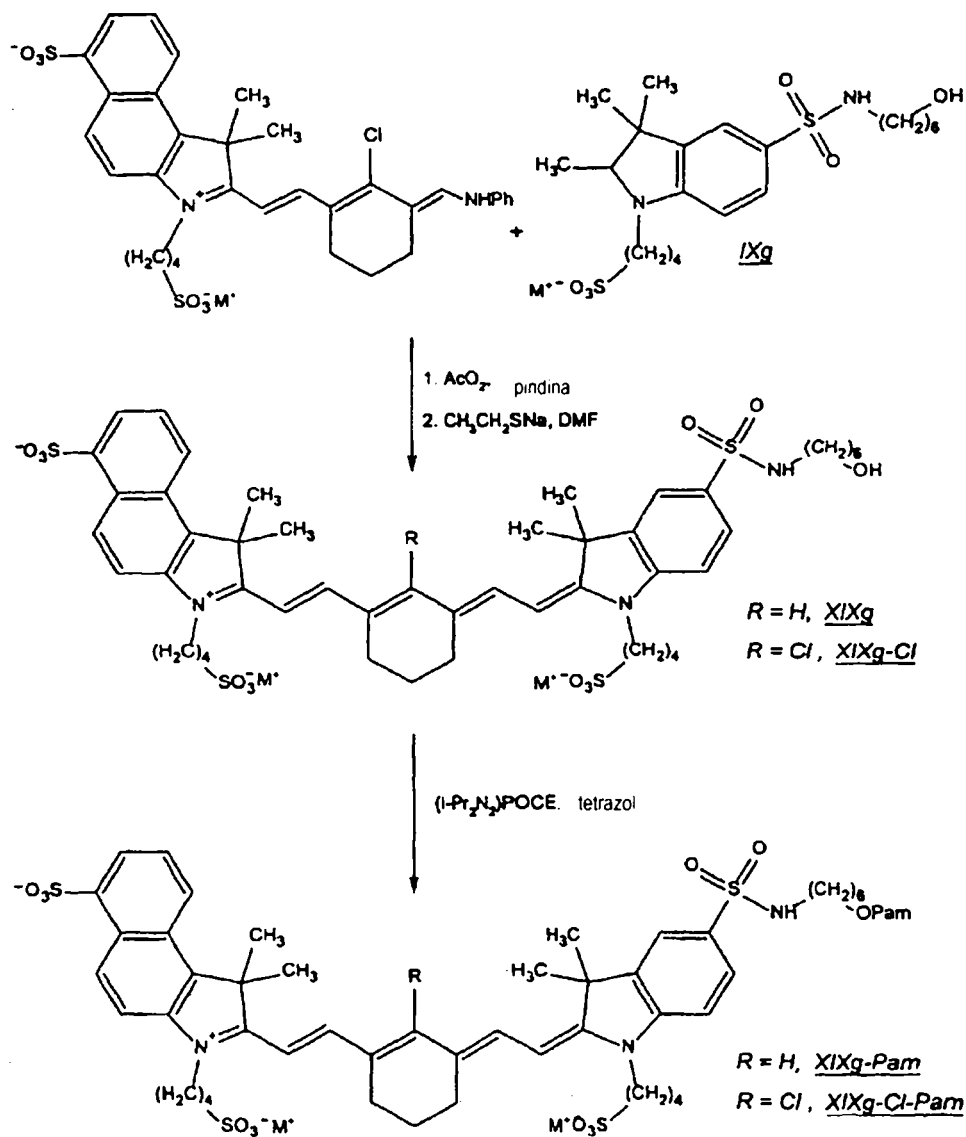


FIG. 35



$(i-Pr_2N)_2POCE$ = bis-(N,N-diisopropil)-cianoetil fosforamidito
Pam = Fosforamidito

FIG. 36

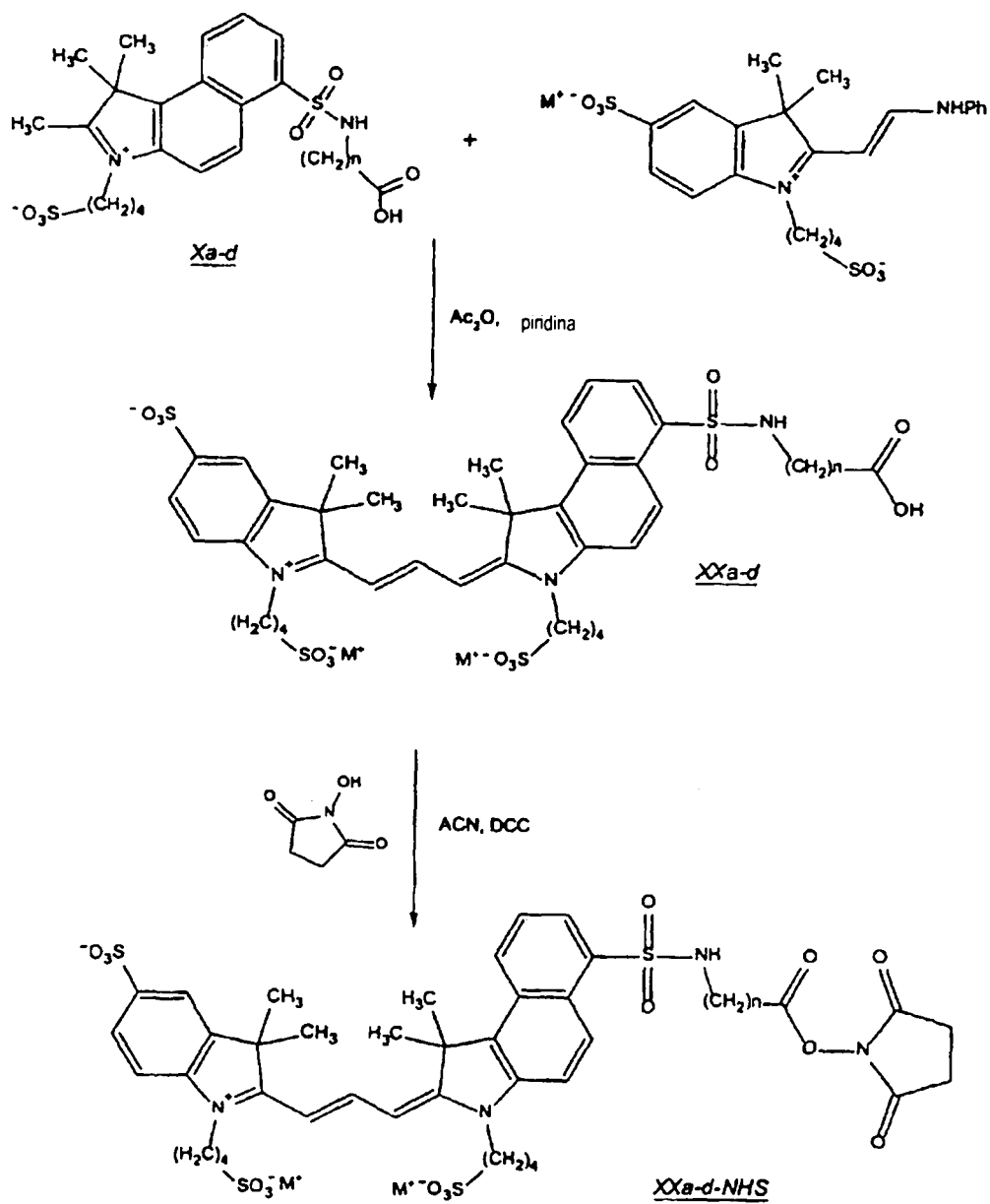


FIG. 37

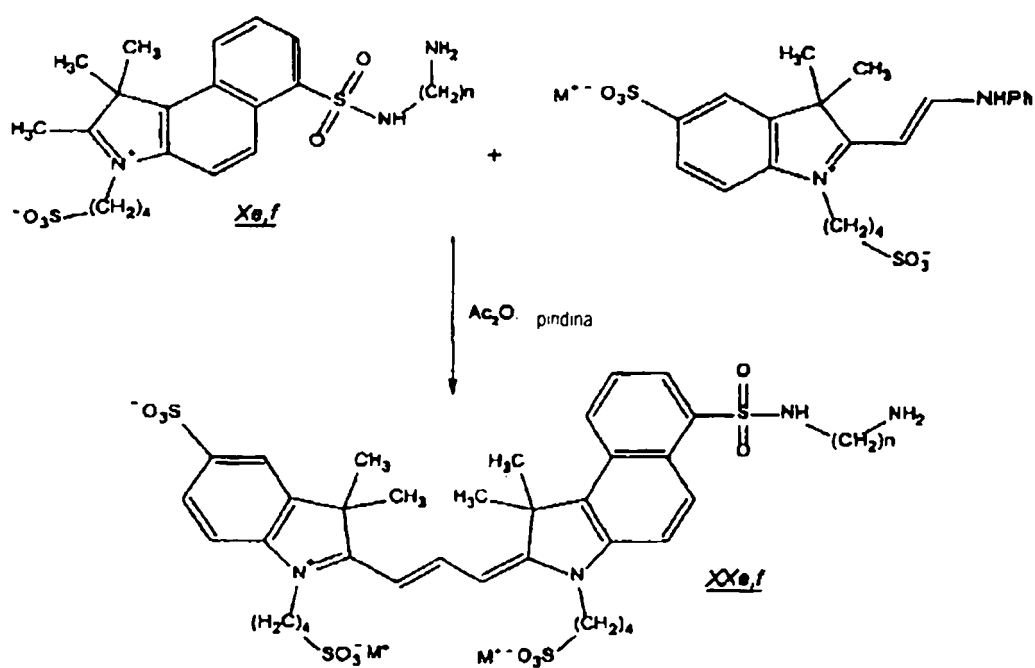


FIG. 38

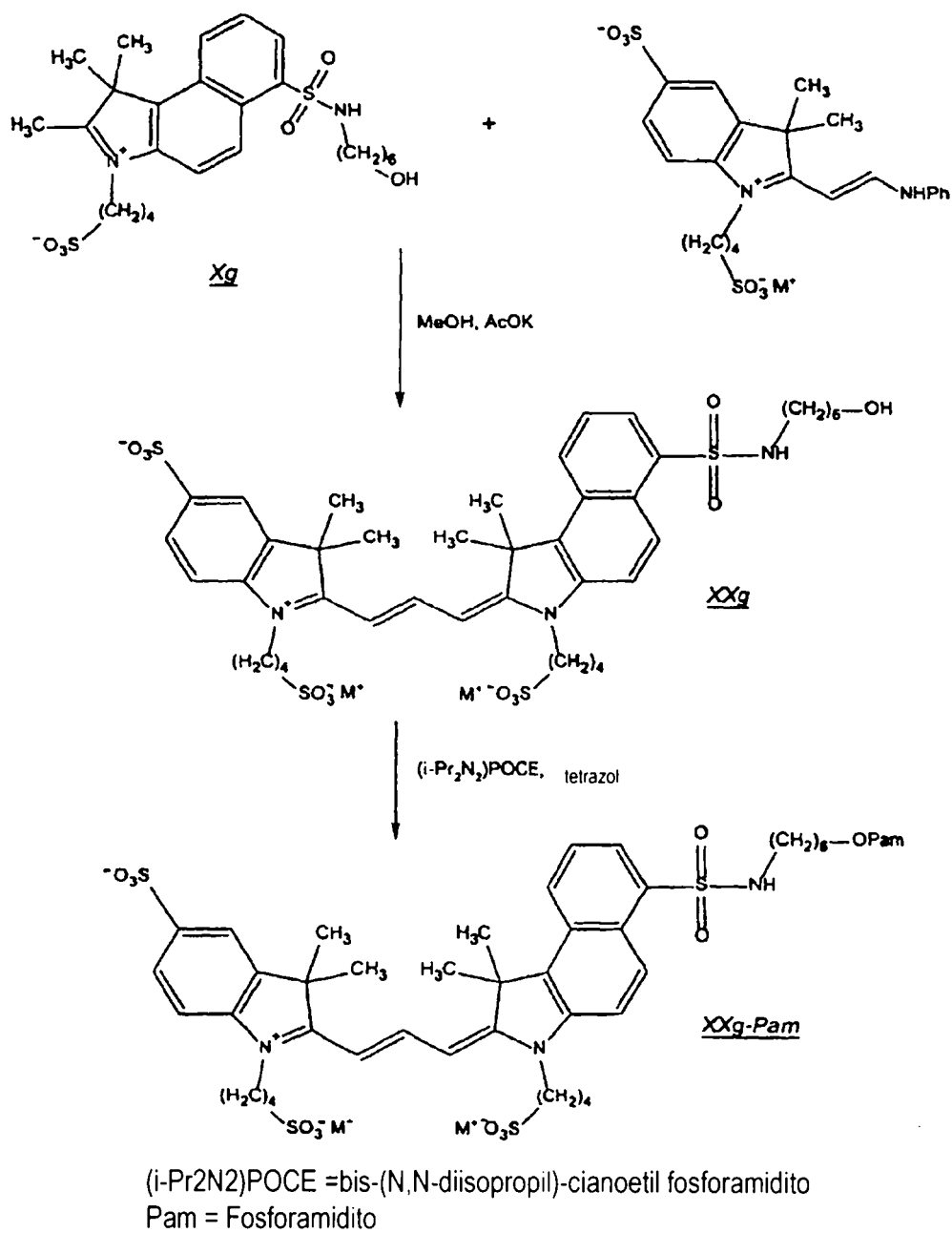


FIG. 39

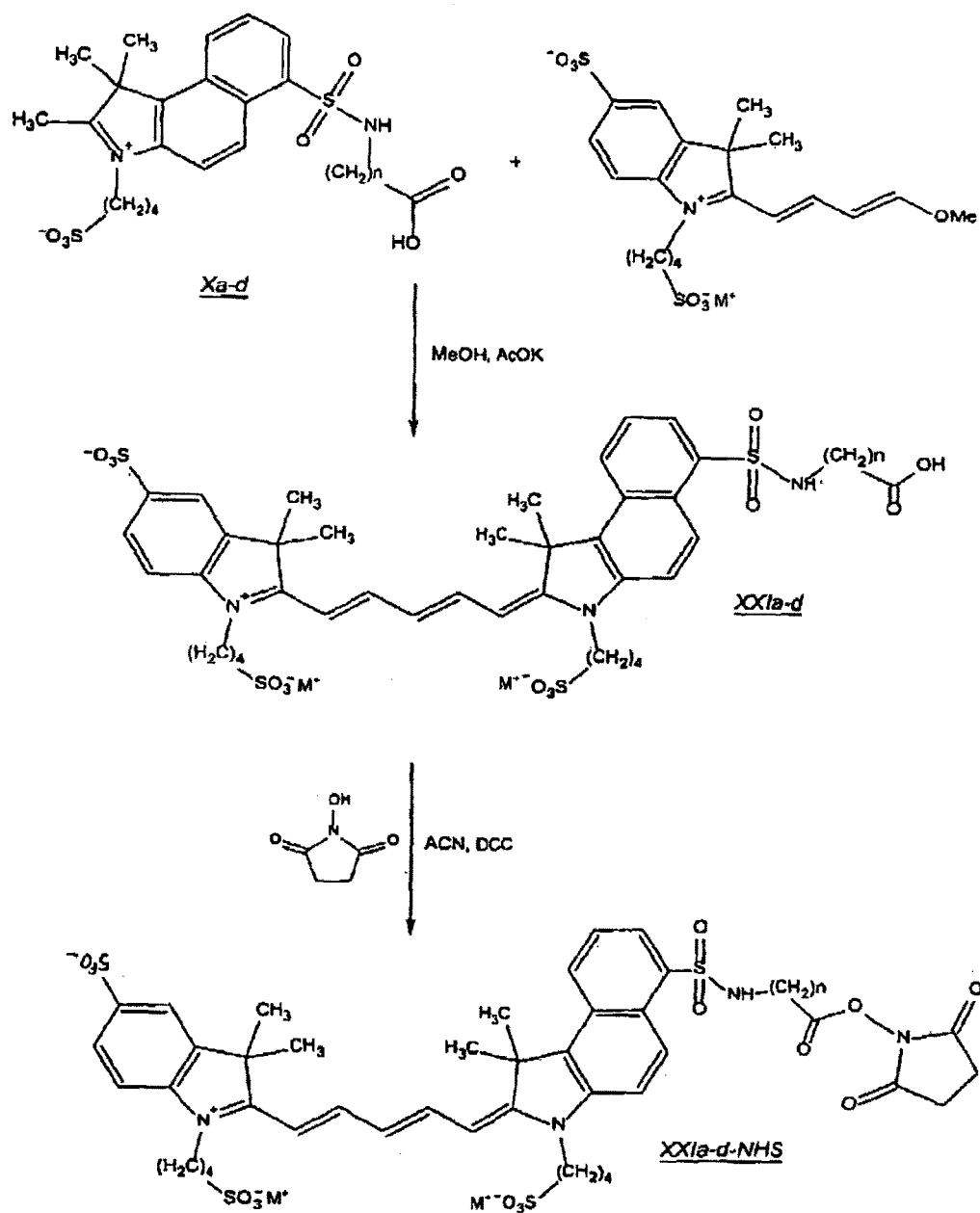


FIG. 40

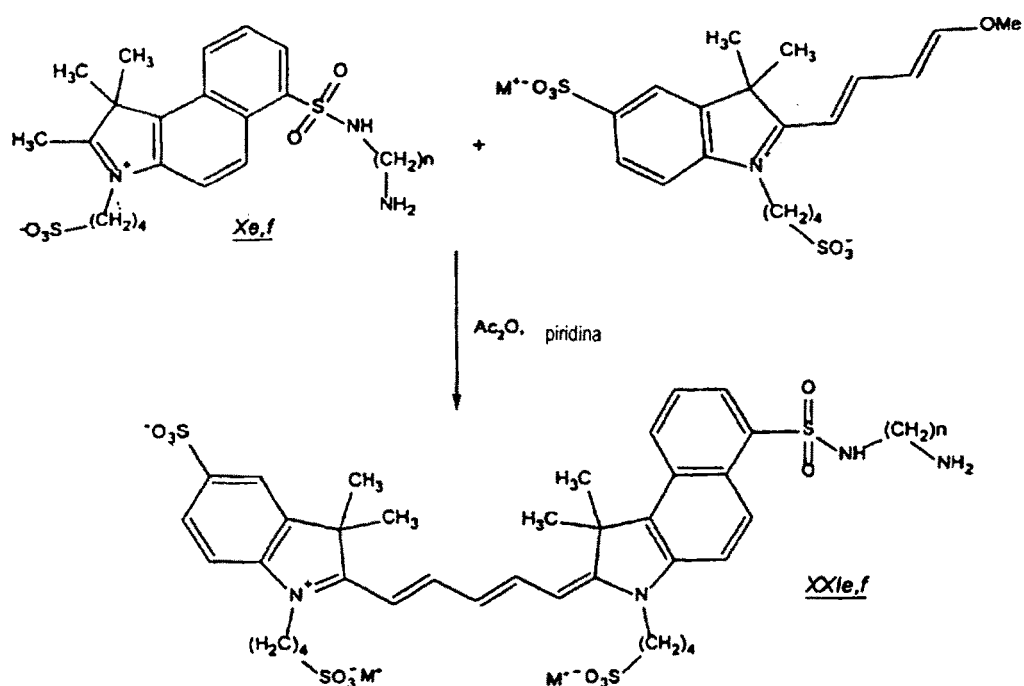
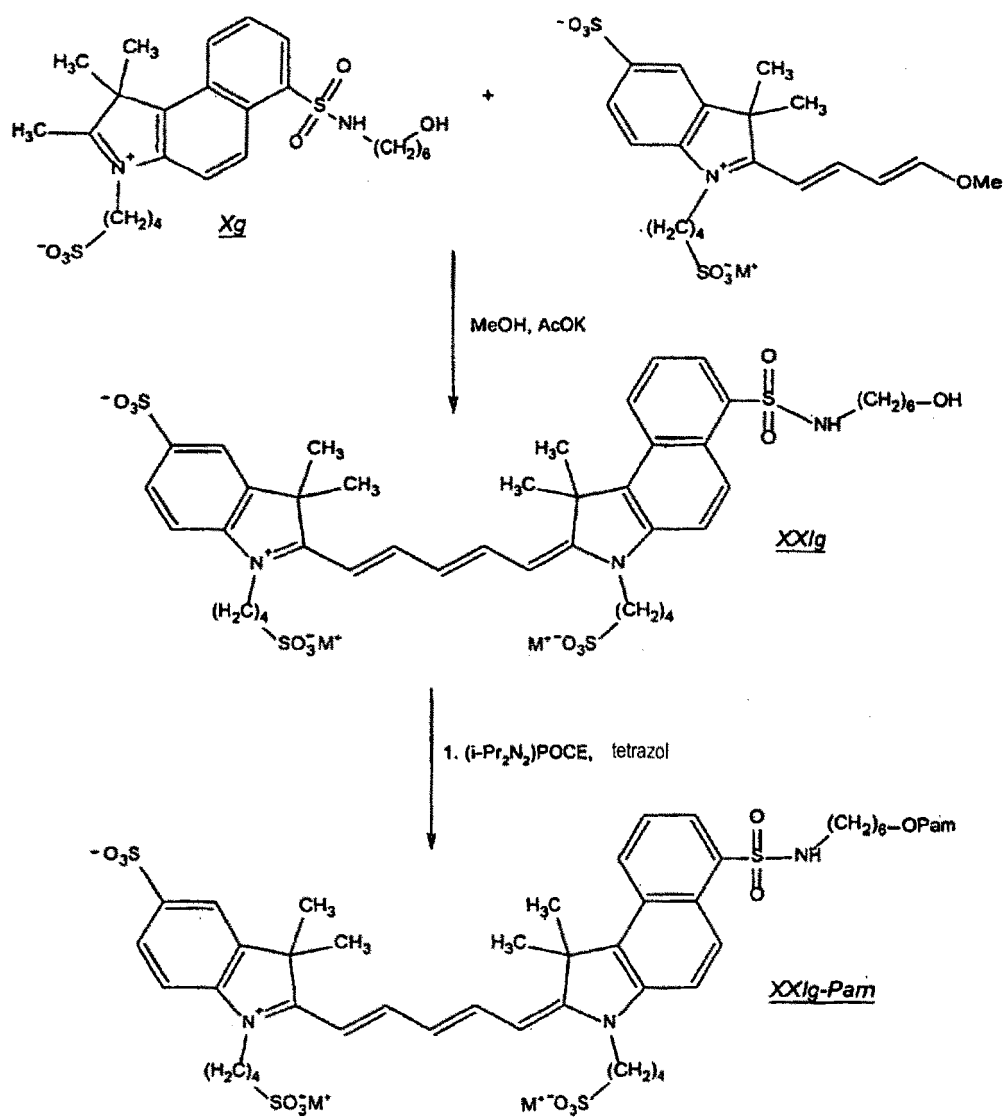


FIG. 41



(i-Pr₂N₂)POCE = bis-(N,N-diisopropil)-cianoetil fosforamidito
 Pam = Fosforamidito

FIG. 42

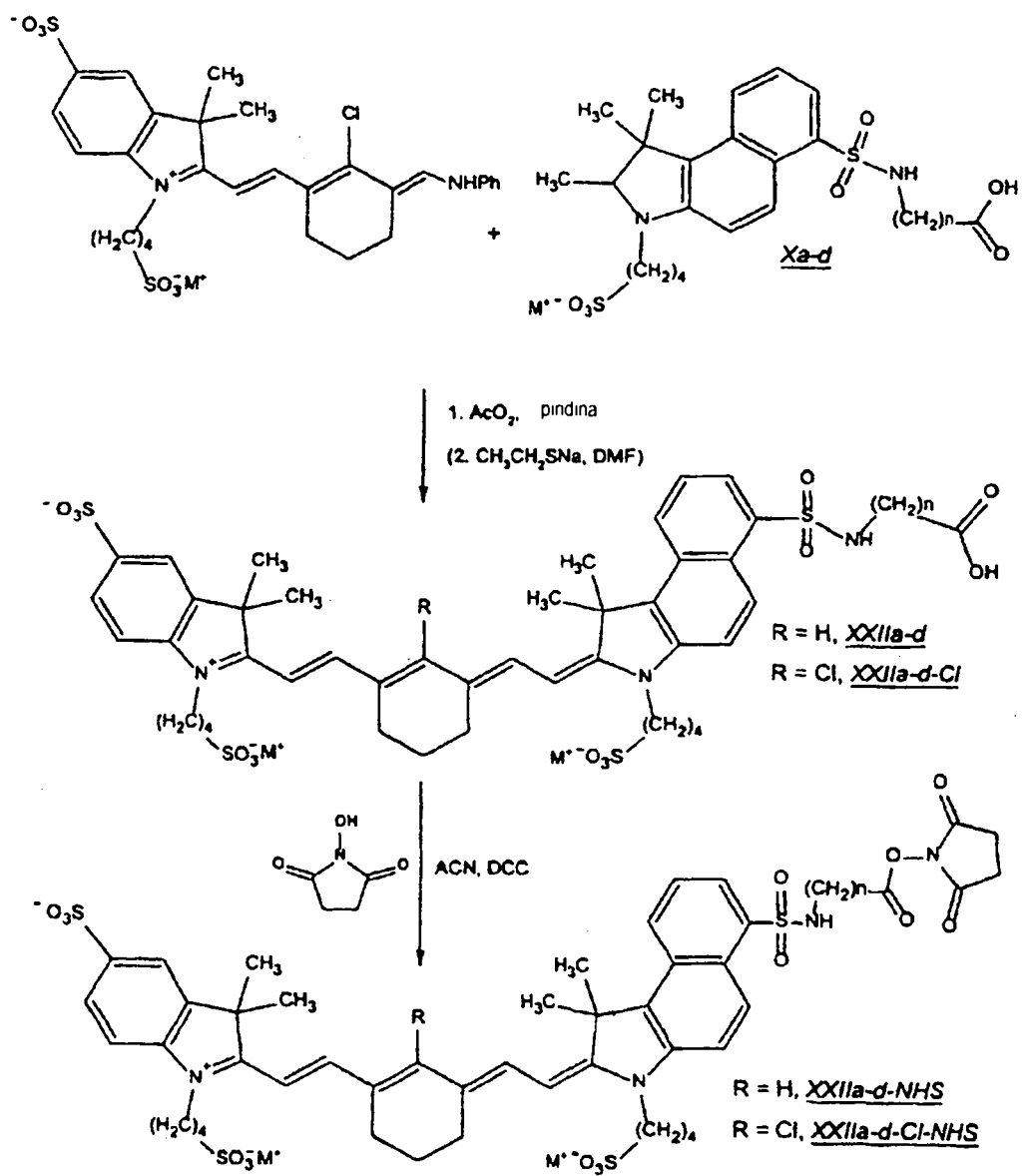


FIG. 43

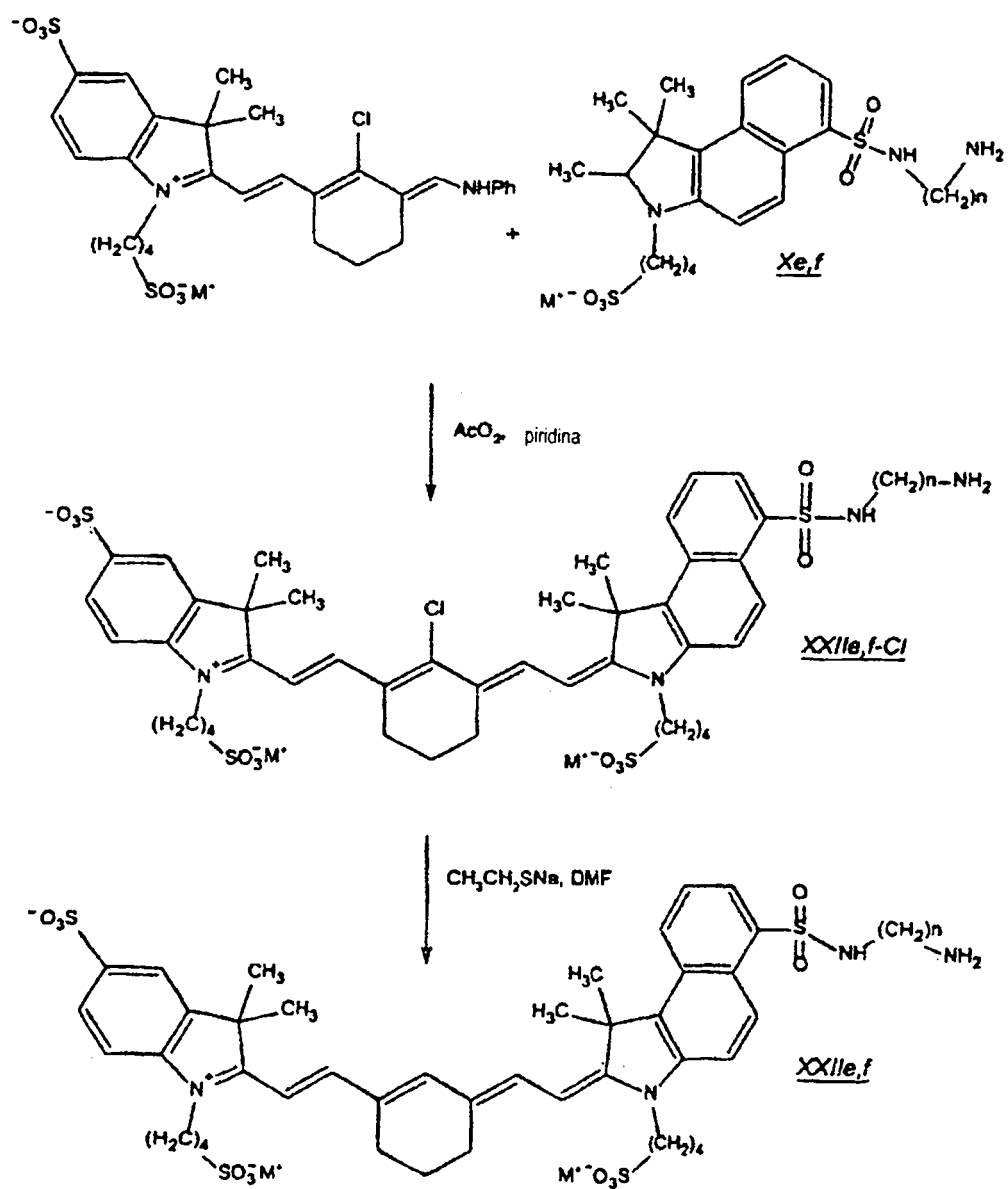
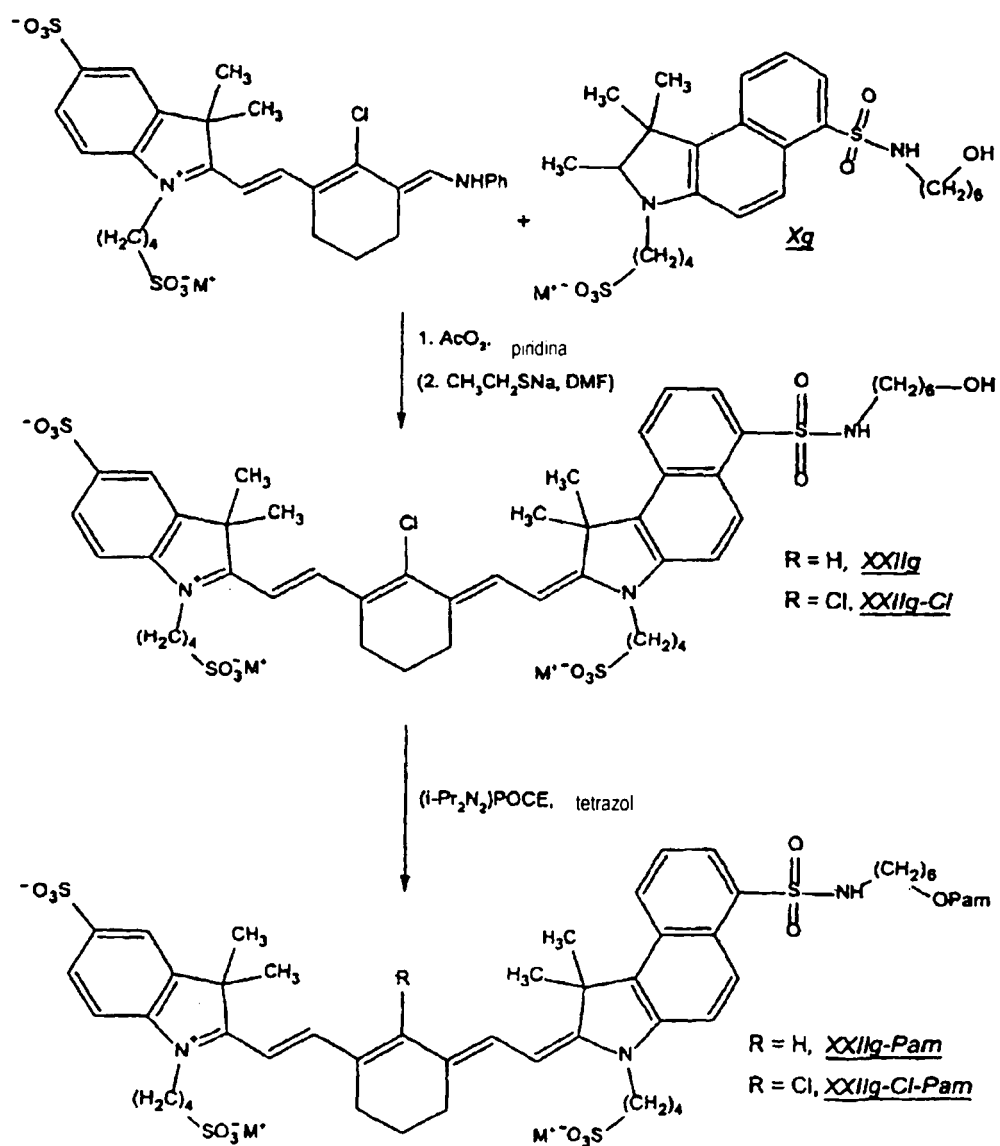


FIG. 44



$(i\text{-Pr}_2\text{N}_2)\text{POCE}$ = bis-(N,N-diisopropil)-cianoetil fosforamidito
 Pam = Fosforamidito

FIG. 45

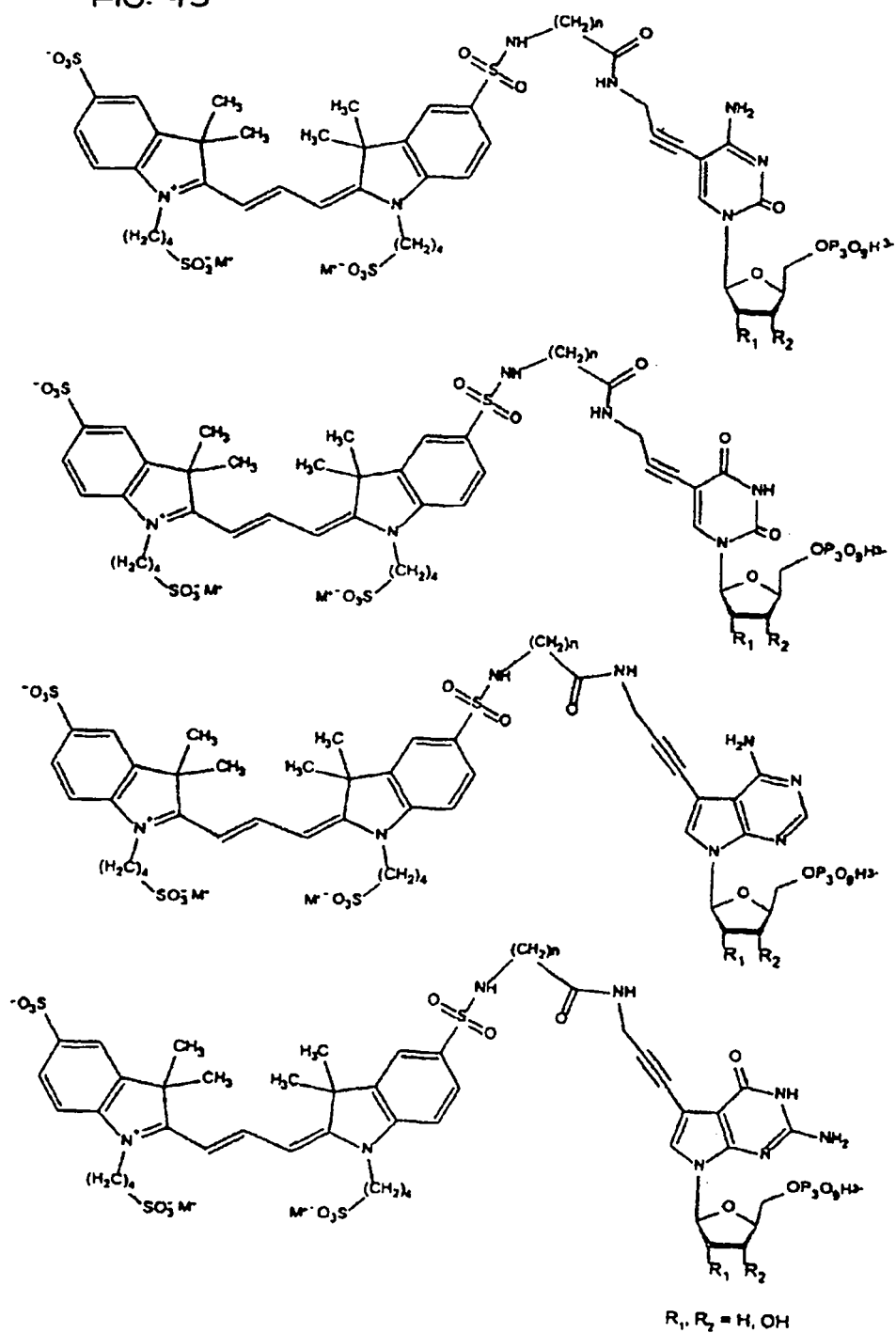


FIG 46

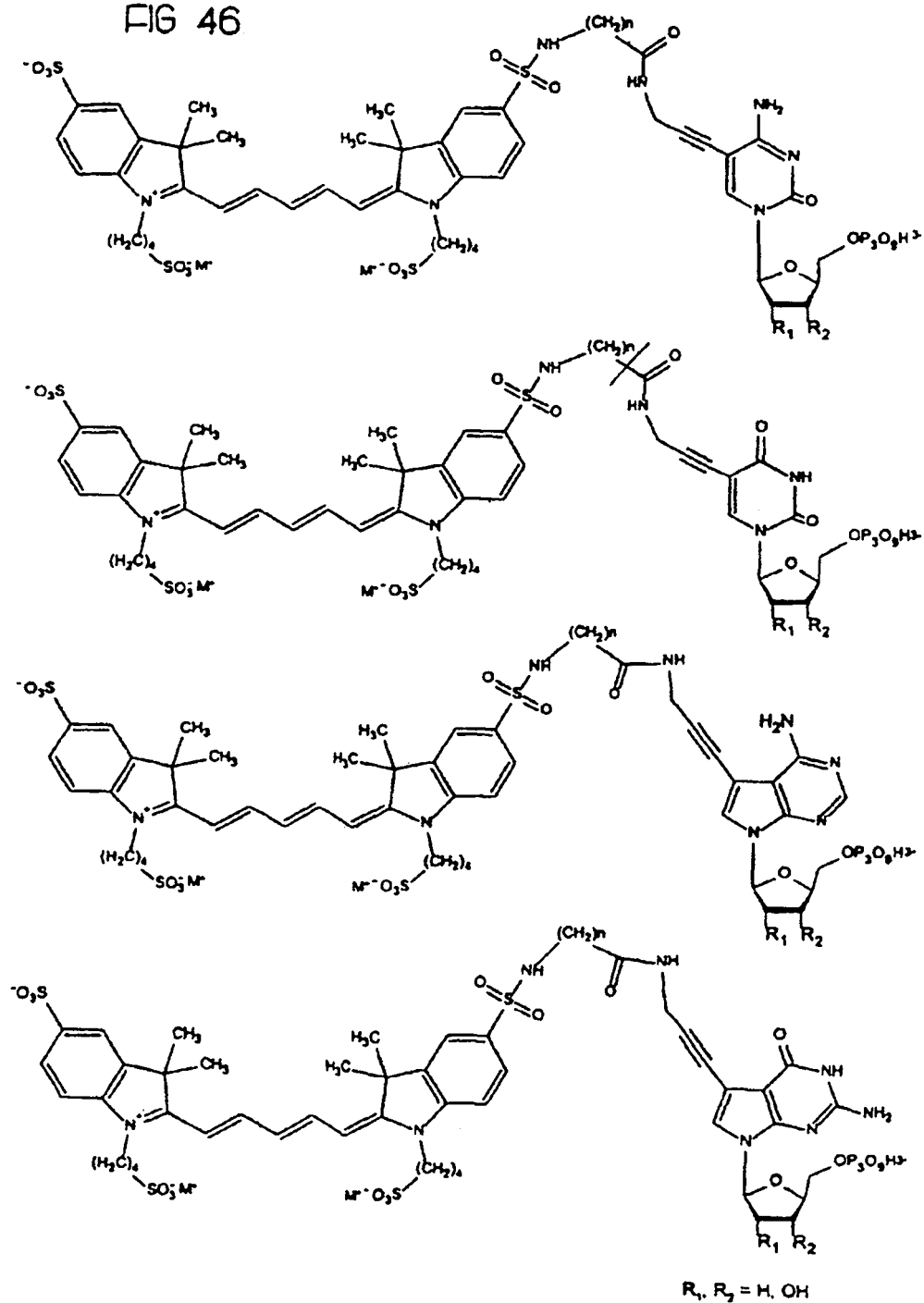


FIG. 47

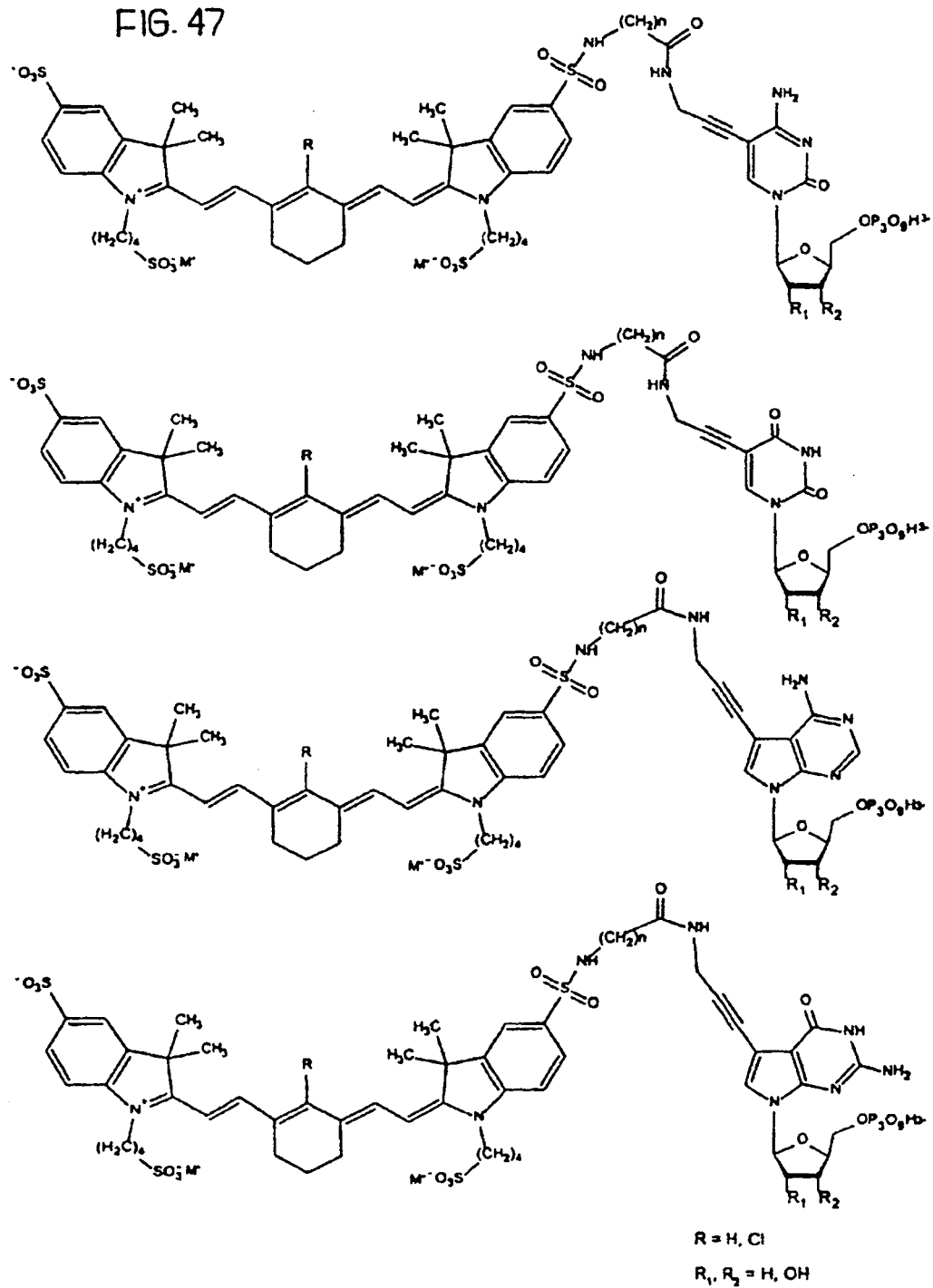


FIG. 48

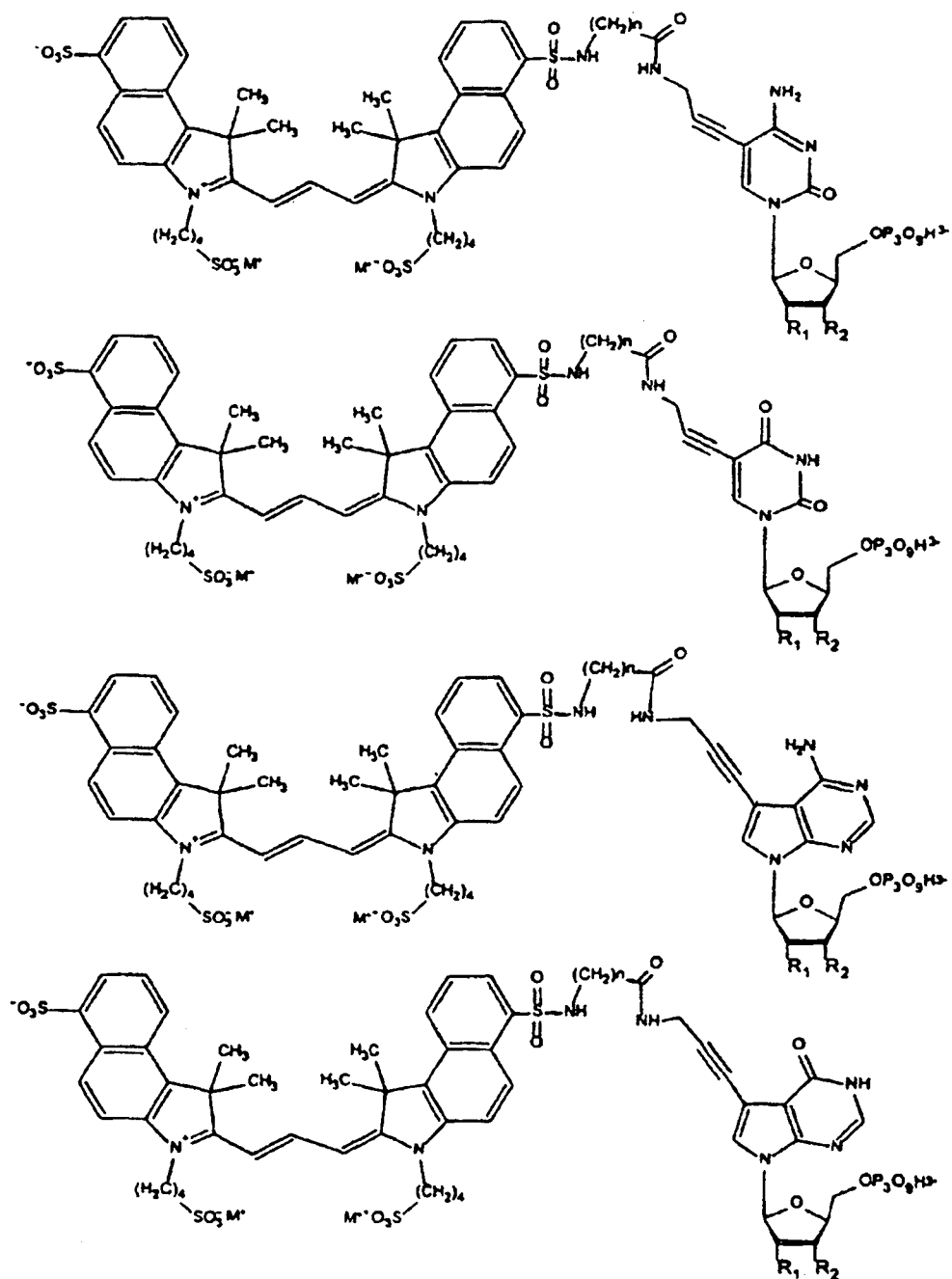

 $\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{H}, \text{OH}$

FIG. 49

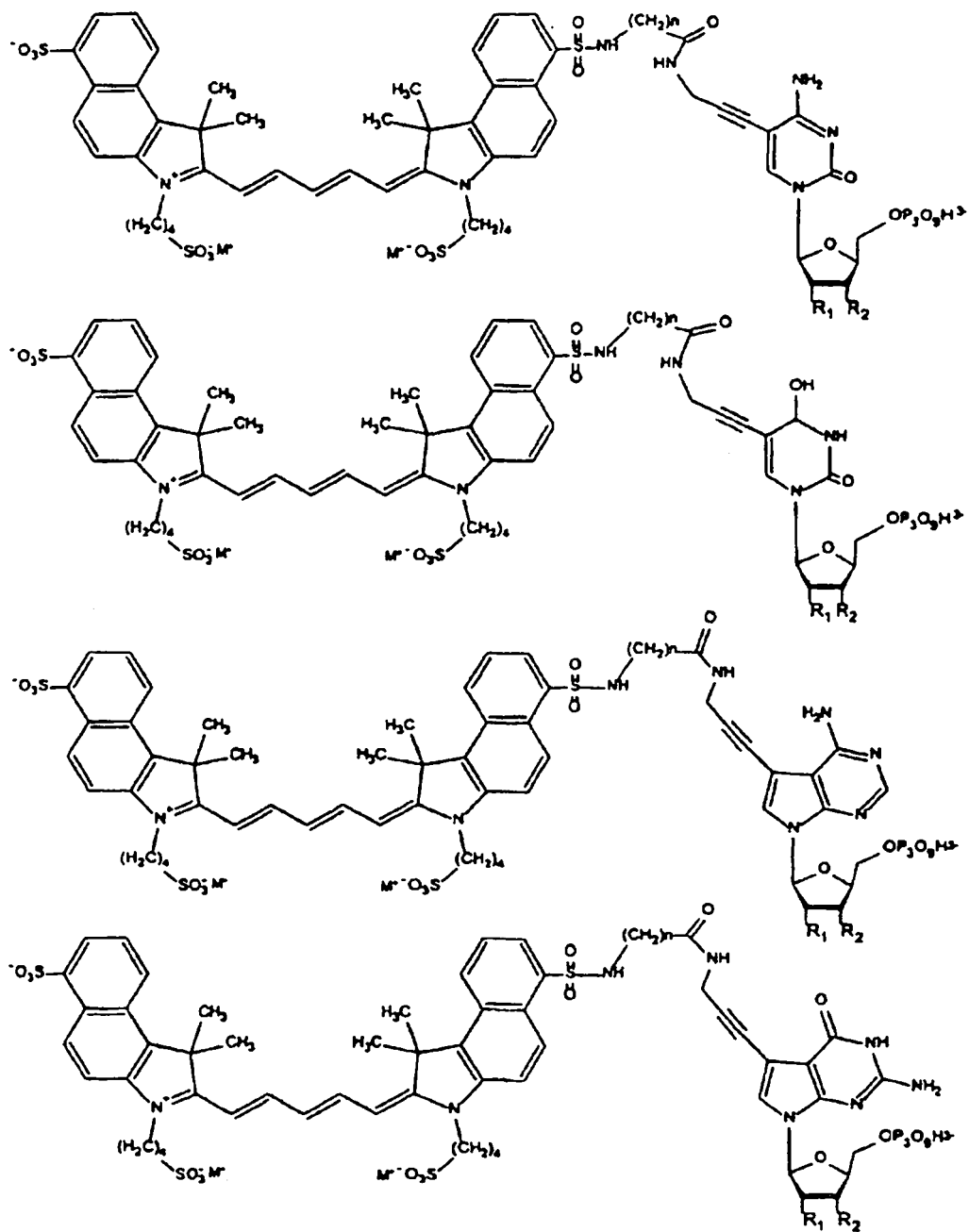
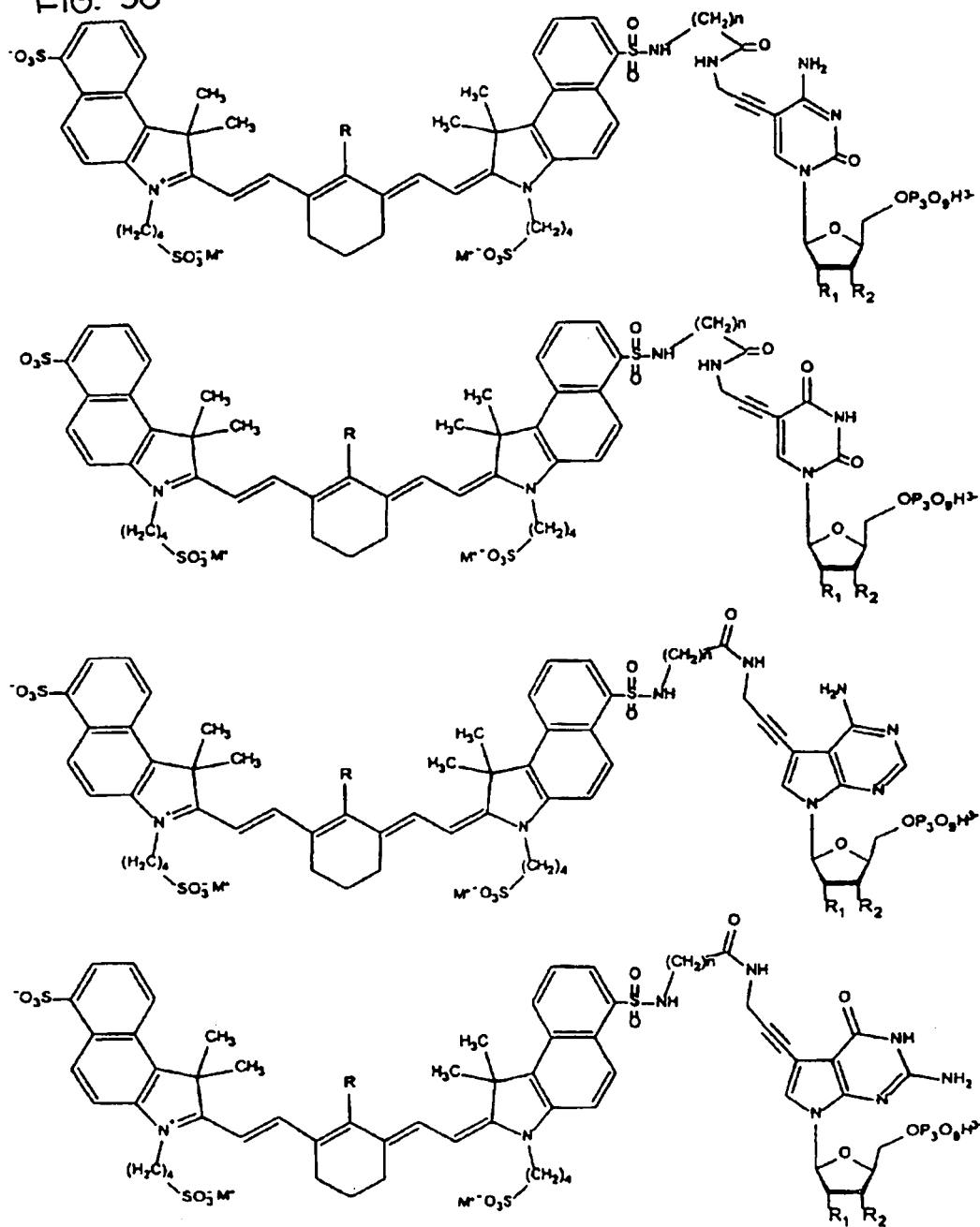
R₁, R₂ = H, OH

FIG. 50



R = H, Cl

$$R_1, R_2 = H, OH$$

FIG. 51

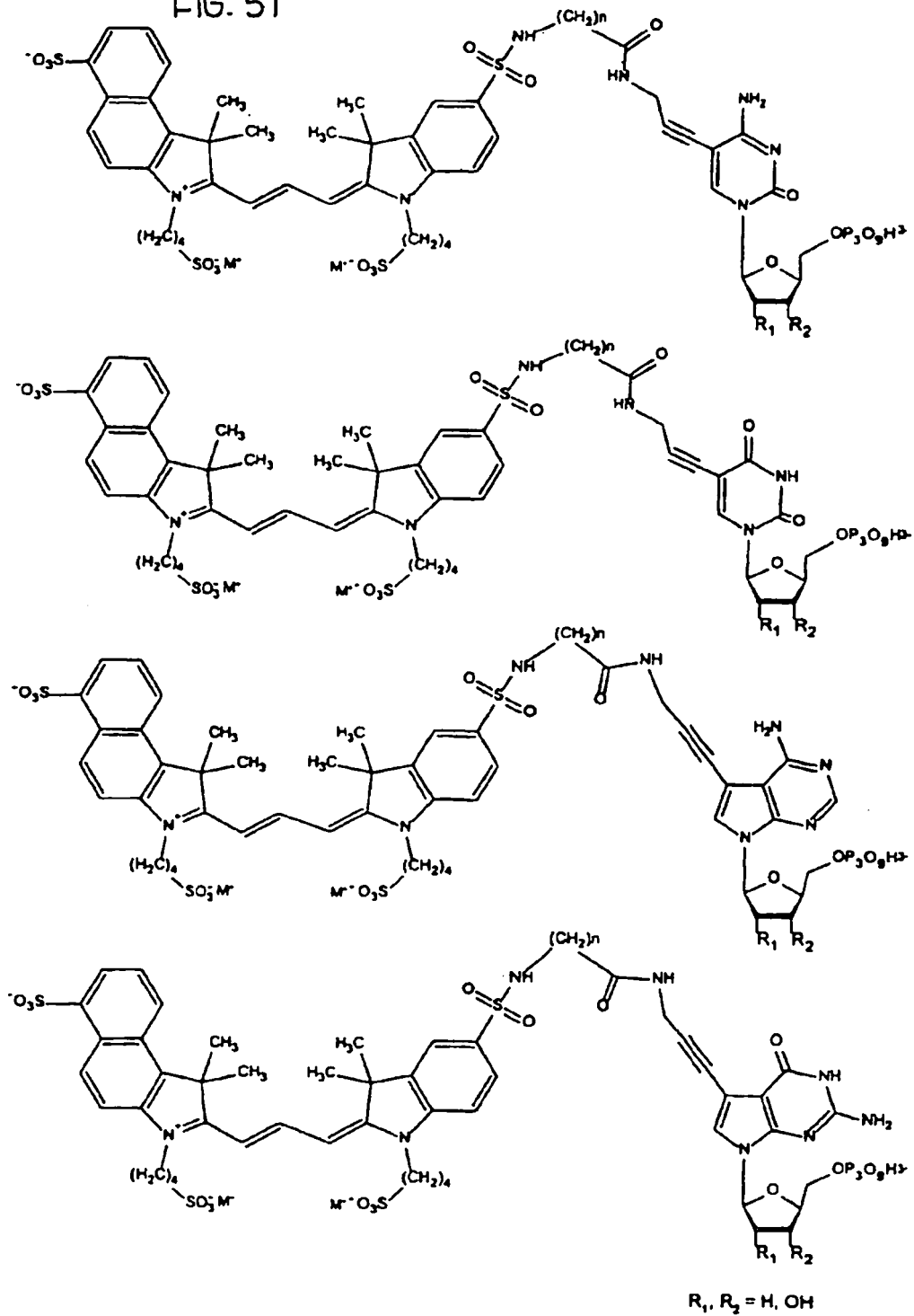
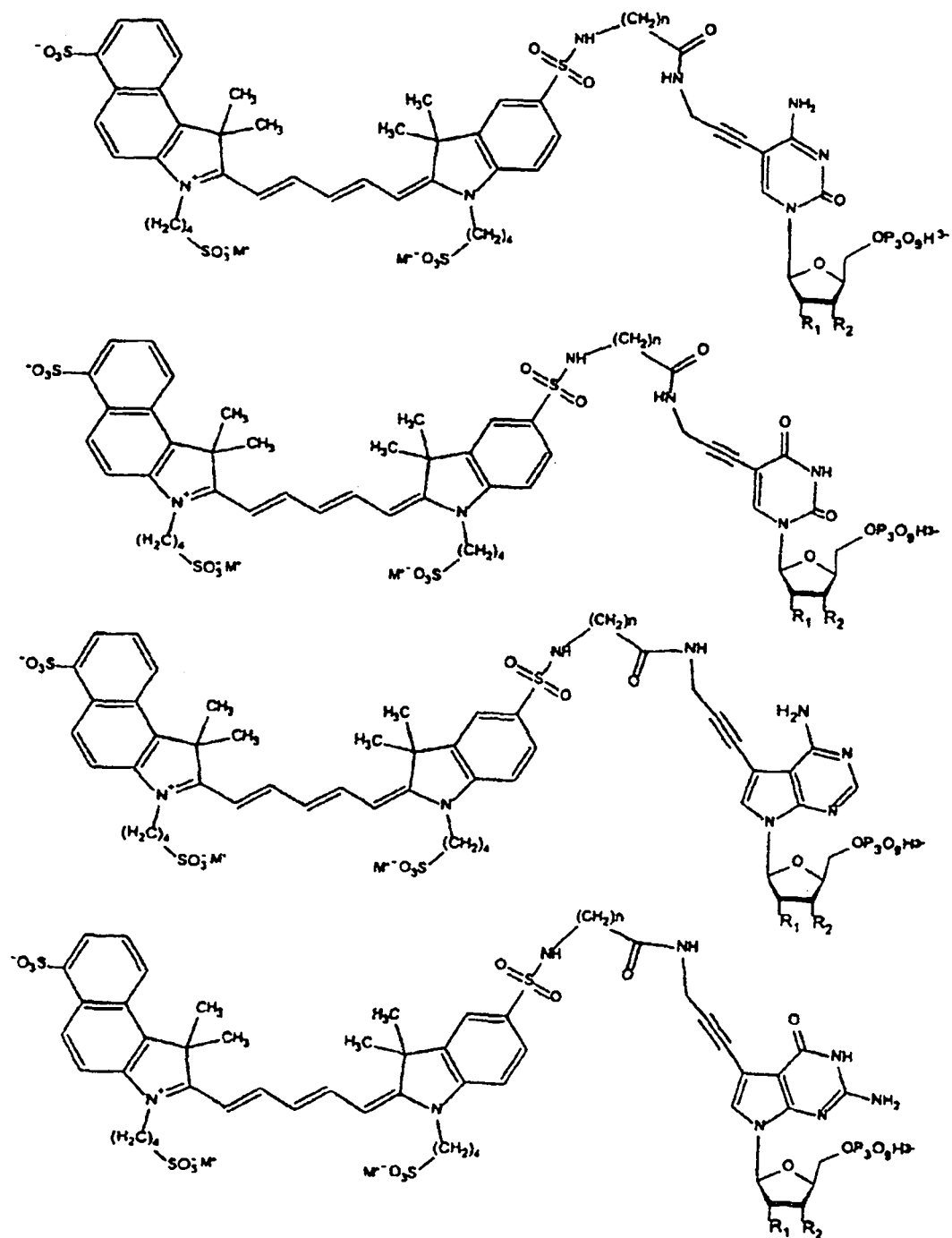
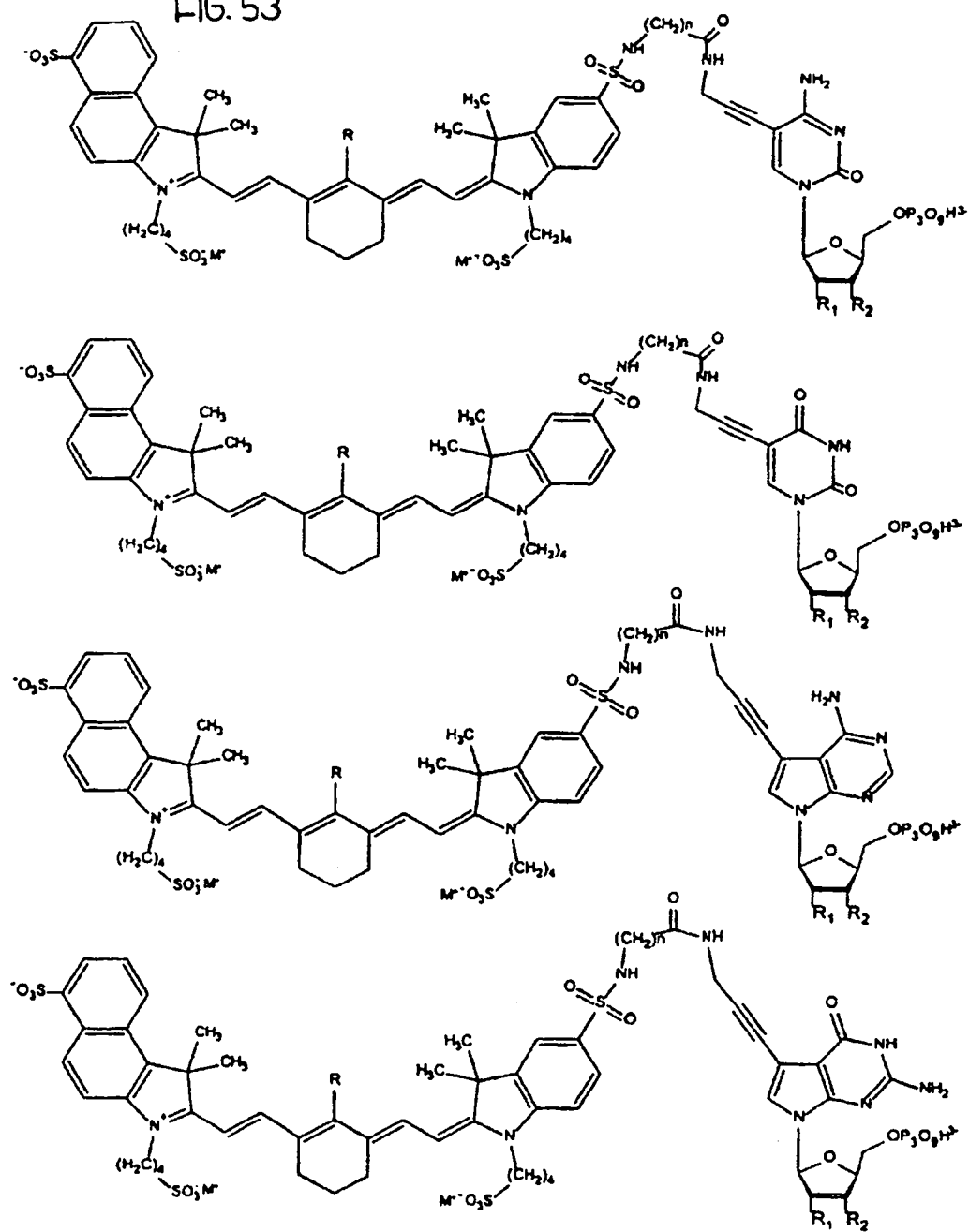


FIG. 52



$R_1, R_2 = H, OH$

FIG. 53



$R = H, Cl$

$R_1, R_2 = H, OH$

FIG. 54

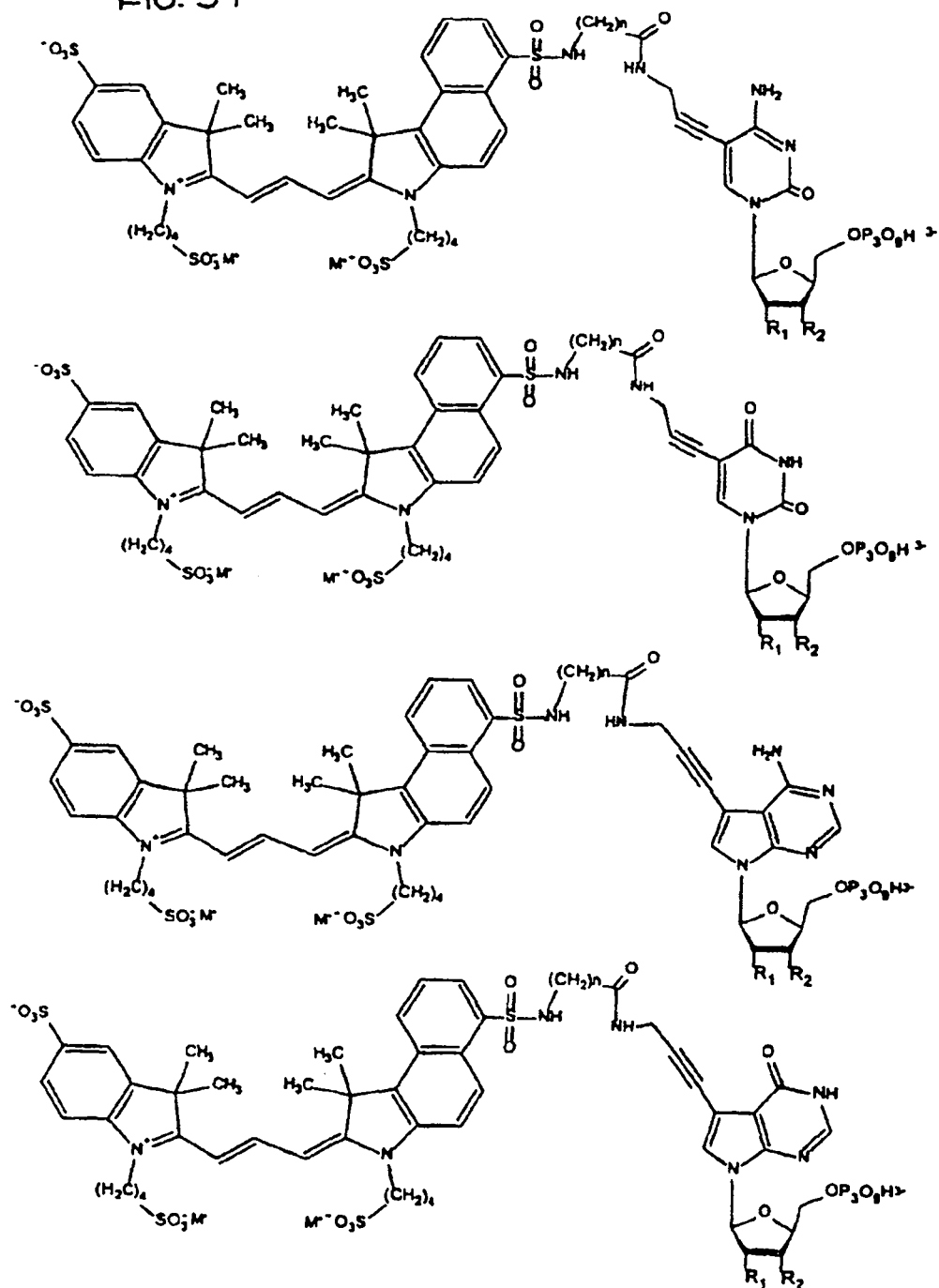
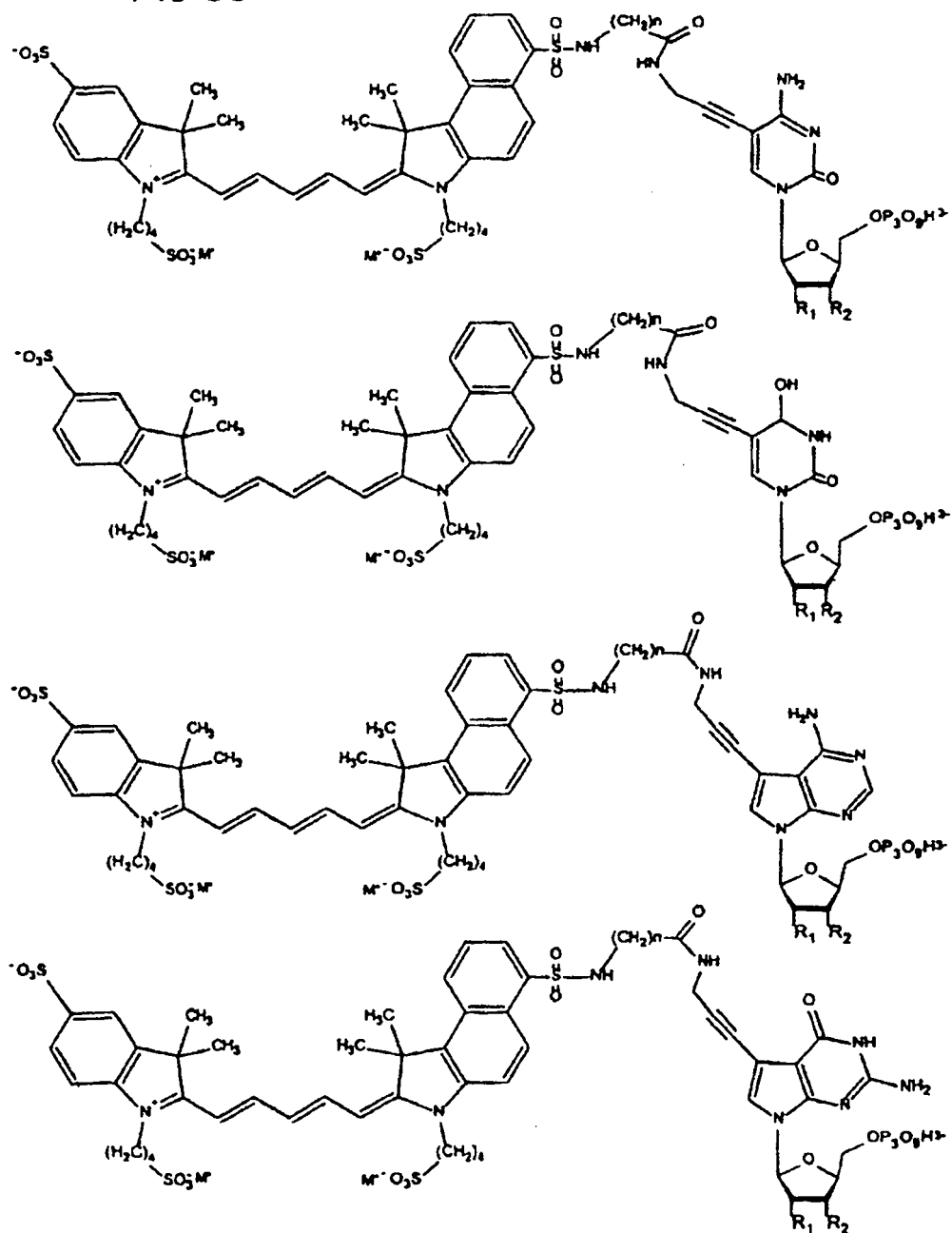
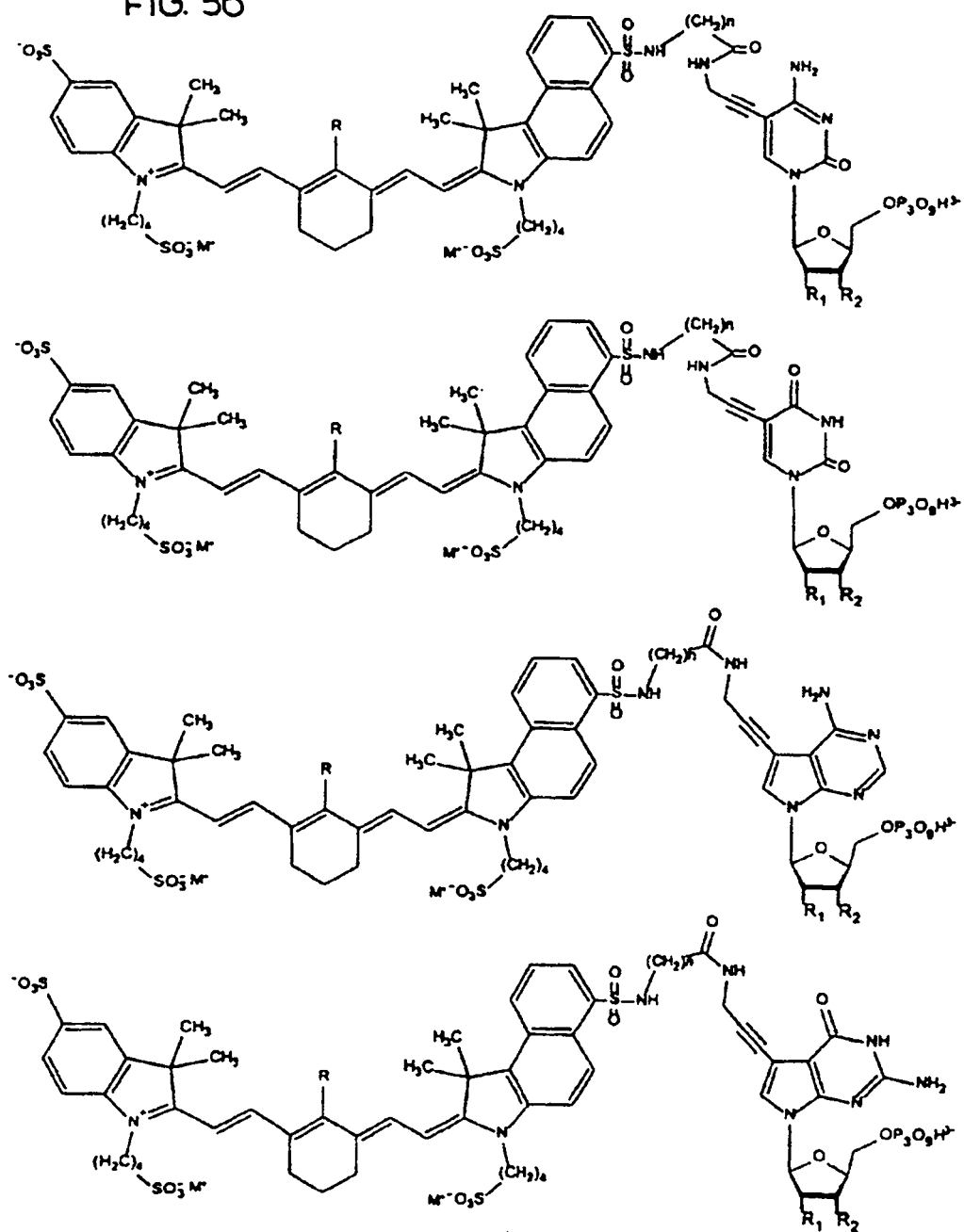

 $\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{H}, \text{OH}$

FIG. 55



$\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{H}, \text{OH}$

FIG. 56



R = H, Cl

R₁, R₂ = H, OH

FIG. 57

