

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 466**

51 Int. Cl.:

G01N 21/64	(2006.01)	C07D 311/90	(2006.01)
A61K 49/00	(2006.01)	C07D 209/12	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)		
G01N 33/58	(2006.01)		
G01N 33/574	(2006.01)		
C07D 417/00	(2006.01)		
A61B 5/00	(2006.01)		
A61B 90/00	(2006.01)		
C09B 23/01	(2006.01)		
G01N 33/573	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.03.2017 PCT/US2017/022824**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.09.2017 WO17161197**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2017 E 17767580 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2024 EP 3430383**

54 Título: **Colorantes de NIR dirigidos a CA IX y sus usos**

30 Prioridad:

16.03.2016 US 201662309412 P

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

26.11.2024

73 Titular/es:

**ON TARGET LABORATORIES, LLC (100.0%)
Kurtz Purdue Technology Center 1281 Win
Hentschel Blvd.
West Lafayette, Indiana 47906, US**

72 Inventor/es:

**KULARATNE, SUMITH A.;
GAGARE, PRAVIN y
KANDULURU, ANANDA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 989 466 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

Colorantes de NIR dirigidos a CA IX y sus usos

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a colorantes de infrarrojo cercano (NIR) dirigidos a anhidrasa carbónica nueve (CA IX) y a su uso en diagnóstico. Más específicamente, esta divulgación proporciona compuestos y uso para diagnosticar células que expresan CA IX (un marcador ampliamente aceptado de tejidos hipóxicos y regiones hipóxicas de tumores), tales como células cancerosas de riñón, endometriales, urinarias, colorrectales, de ovarios, de mama, pancreáticas y de esófago, y regiones hipóxicas de muchos tumores sólidos, y enfermedades relacionadas. La divulgación describe además composiciones que incorporan los compuestos, y kits que incorporan los compuestos.

15 **Antecedentes de la invención**

La anhidrasa carbónica (CA) es una familia de metaloenzimas de cinc que catalizan la hidratación reversible de dióxido de carbono para dar bicarbonato y un protón. De quince isoformas de CA (CA I, II, III, VA, VB, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV y XV) presentes en el ser humano, doce de ellas presentan actividad catalítica. Tres isoformas CA VIII, X y XI no son catalíticas y se denominan proteínas relacionadas con CA. Aparte de las diferencias en la eficiencia catalítica, 12 isoformas activas también difieren en cuanto a localización celular, distribución tisular y participación en procesos fisiológicos. Además, la expresión aberrante de las enzimas está habitualmente asociada con una gran cantidad de enfermedades. Estas incluyen: glaucoma (CA II, IV), cáncer (CA IX, XII), edema (CA II), esterilidad (CA XIII), mal de altura (CA II), obesidad (CA VA) y anemia hemolítica (CA I). De 15 isoformas de CA (CA de clase alfa), las isoformas de CA IV, IX, XII, XIV están asociadas con la membrana celular. Aunque tanto CA IX como XII se expresan en tumores sólidos, se ha mostrado que CA IX se expresa de manera más prevalente en tumores sólidos y muestra expresiones bajas en tejidos normales, haciendo de ese modo que sea un excelente biomarcador para administración de fármacos dirigidos para cánceres.

El gen de CA9 codifica para una glicoproteína transmembrana de 459 aminoácidos que existe como homodímero. Está compuesta por: un dominio de tipo proteoglicano (PG) (59 aa), dominio catalítico (CA) (257 aa), un dominio de péptido señal (que se retira antes de la maduración de la enzima) (37 aa), dominio transmembrana (TM) (20 aa) y un dominio intracelular C-terminal (25 aa). La espectrometría de masas y cristalografía de rayos X han confirmado la presencia de un puente disulfuro intermolecular entre residuos de Cys137 adyacentes del homodímero maduro que, acoplados con una región de residuos hidrófobos, se propone que estabilizan la superficie de contacto de dímero. También existen sitios de glicosilación unidos en N y unidos en O en Asn 309 y Thr 78, respectivamente.

El dominio catalítico de CA IX es estructuralmente homólogo a las alfa-CA con una alta conservación de aminoácidos dentro del sitio activo. El sitio activo está ubicado en una cavidad cónica más grande (15 Å de profundidad), que abarca desde la superficie hasta el centro de la proteína. El átomo de cinc está ubicado en el fondo de la cavidad. En CA IX tres residuos de histidina (His 226, 228 y 251, según se numeran en la secuencia de aa de longitud completa) coordinan el ion de cinc en la base de la hendidura del sitio activo; en la estructura cristalina (ID de PDB: 3IAI) el grupo sulfonamida-amina en la acetazolamida (AZM) desplaza una molécula de agua unida/hidróxido a cinc (Zn-OH/H₂O) manteniendo una coordinación tetraédrica alrededor del ion de cinc. Se produce variabilidad entre las isoformas de CA en las cavidades hidrófoba e hidrófila del sitio activo y aminoácidos de superficie. En CA IX, Leu-223, Val-253, Val-263, Leu-267, Leu-273, Leu-330 y Pro-334 definen la región hidrófoba, mientras que Asn-194, His-196, Ser-197, Gln-199, Thr-201 y Gln-224 identifican la hidrófila.

La eficiencia catalítica de CA IX es rápida y comparable a la de CA II; CA II muestra una k_{cat} de $1,4 \times 10^6$ mientras que CA IX tiene una k_{cat} de $3,8 \times 10^5$. La presencia del dominio de PG en CA IX es única en comparación con las otras isoformas de CA y se piensa que es responsable de su capacidad de adhesión celular y mantener su actividad catalítica en el microentorno tumoral ácido.

Se piensa que el papel más crítico de CA IX es la regulación del pH extracelular, especialmente en el microentorno tumoral. Las células cancerosas en proliferación producen con frecuencia grandes cantidades de lactato, dióxido de carbono y protones durante el metabolismo oncogénico haciendo que la función de CA sea fundamental en la supervivencia de células tumorales. Estos productos metabólicos se acumulan en el entorno extracelular y reducen significativamente el pH extracelular. Con el fin de mantener un pH intracelular casi fisiológico, aniones de bicarbonato generados por CA IX durante la hidrólisis de dióxido de carbono se transportan al interior de la célula mediante transportadores de aniones para tamponar los niveles de pH intracelulares. Además, protones producidos a partir de la reacción permanecen de manera extracelular, contribuyendo por tanto a la naturaleza ácida del medio tumoral. Por tanto, la perturbación de esta ruta reguladora tendrá efectos perjudiciales sobre la supervivencia global de células tumorales.

En un estado no patológico, la expresión de CA IX se limita al epitelio intestinal; específicamente, las superficies basolaterales de los enterocitos cripticos del duodeno, yeyuno e ileon. Los niveles más prominentes de CA IX se observan en estas células de la cripta en proliferación, lo que sugiere que CA IX puede participar en la proliferación

de células madre intestinales y regulación de determinadas funciones metabólicas. La transferencia de tipo Northern y la tinción inmunohistoquímica también han confirmado que la expresión de CA IX en el epitelio celómico del ovario, células de folículos pilosos, células de conductos pancreáticos y red testicular fetal. Además, se observan altos niveles de CA IX en tejidos embrionarios en desarrollo del intestino, pulmón y músculo esquelético y disminuyen en tejidos adultos. Estas observaciones indican que la expresión de CA IX está principalmente asociada con zonas de bajo pH y altas tasas de proliferación celular en tejidos normales. No se ha confirmado si esto hace o no que CA IX sea un elemento regulador en tejidos normales.

CA IX se expresa de manera ectópica en una variedad de tejidos neoplásicos. Se ha observado la expresión en tumores malignos de mama, pulmón, riñón, colon/recto, cuello uterino, cavidad oral, cabeza/cuello, vesícula biliar, hígado, cerebro (alto grado), páncreas y epitelio gástrico. No existe ninguna diferencia entre el ADNc de CA IX aislado a partir de tejidos normales y tumorales, lo cual implica una función fisiológica similar en ambos tejidos. La expresión de CA IX depende de la activación del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) [mediante la regulación por incremento de HIF-1 α o la regulación por disminución de Von Hippel-Lindau (VHL)]. Específicamente, la activación de la ruta mediada por HIF-1 que induce la expresión de CA IX puede deberse a una reducción de los niveles de O₂ celulares, una activación de rutas de señalización mediante la presencia de factores de crecimiento y elementos de respuesta inflamatoria, y en algunos casos debido a mutaciones en el supresor tumoral, VHL, tal como se observa en casos de carcinoma de células renales (RCC) en los que CA IX se expresa de manera homogénea. Más recientemente, se ha mostrado que CA IX tiene niveles de expresión significativos en células estromales que participan en un circuito de interferencia molecular con células cancerosas. Específicamente, se ha mostrado que CA IX se expresa en fibroblastos asociados con cáncer (CAF) mediante estabilización basada en redox de HIF-1. Se postula que la expresión de CA IX en CAF proporciona el entorno extracelular ácido necesario para impulsar transiciones epitelio-mesénquima (EMT) en células cancerosas adyacentes. El conjunto de estos hallazgos indica CA IX como marcador diagnóstico de acontecimientos de hipoxia tumoral en muchos tumores sólidos.

La expresión de los niveles de CA IX también sirve como marcadores de pronóstico para varios tipos de cáncer. Específicamente, los pacientes que padecen de cáncer de cerebro, mama, cuello uterino, rectal o de pulmón que también presentan altos niveles de CA IX muestran normalmente un pronóstico peor. En cambio, para pacientes con carcinoma de células renales de células claras, bajos niveles de CA IX indican un mal desenlace clínico. La contribución de CA IX al mantenimiento del microentorno tumoral hipóxico está altamente correlacionada con el pronóstico del paciente, haciendo por tanto que sea tanto un biomarcador como una diana farmacológica.

La hipoxia es una condición habitualmente observada en tumores metastásicos en los que se priva a las células de oxígeno debido a la rápida proliferación y un desplazamiento de su metabolismo. Específicamente, las células tumorales hipóxicas crecen más que su suministro de sangre, conduciendo a regiones de baja concentración de oxígeno (normalmente ≤ 1 % del contenido en oxígeno global) así como a una disminución del pH extracelular (\sim pH 6,5) en el microentorno tumoral. Este estrés hipóxico induce un desplazamiento en el metabolismo general de las células tumorales desde fosforilación oxidativa en las mitocondrias hasta glicólisis aerobia en el citosol como principal fuente de energía. De manera interesante, este desplazamiento metabólico sigue estando presente en las células tumorales independientemente de la cantidad de O₂ disponible en el entorno dado; un fenómeno descrito con frecuencia como efecto de Warburg. Dado que estas células tumorales usan rápidamente la glicólisis, se exportan cantidades aumentadas de ácido láctico a partir de la célula, reduciendo por tanto el pH extracelular. Como resultado, hay una regulación por incremento de factores de homeostasis del pH en células tumorales para establecer un gradiente de pH intracelular/extracelular regulado.

Desde la década de 1930, se ha establecido que hay una correlación entre la hipoxia tumoral y una resistencia a la radioterapia. Además, se ha mostrado que los tumores hipóxicos también presentan una resistencia a productos quimioterápicos comunes y una alta probabilidad de metástasis; por tanto, se ha asociado la hipoxia tumoral con un mal pronóstico del paciente. Los factores inducibles por hipoxia (HIF) son reguladores clave de la respuesta de estrés inducido por hipoxia en células tanto normales como tumorales. Específicamente, se ha asociado un aumento de HIF-1 con la activación de genes inducibles por hipoxia que expresan elementos sensibles a hipoxia (HRE) que regulan por incremento elementos asociados con el metabolismo, proliferación celular, resistencia a fármacos, regulación del pH, angiogénesis, metástasis y la progresión global del cáncer. Para sobrevivir al microentorno ácido, estas células tumorales deben poder mantener un pH intracelular a o cerca de niveles fisiológicos (pH 7,4). Por tanto, la actividad de CA es clave en este proceso regulador.

La expresión de CA IX se correlaciona directamente con una regulación por incremento de elementos de HIF y se ha mostrado que desempeña un papel en la supervivencia de células tumorales, proliferación, migración, crecimiento, adhesión, regulación del pH y rutas de señalización celular. La expresión mínima de CA IX en tejidos normales y su ubicación en la superficie de contacto externa de células tumorales han hecho que sea una diana terapéutica atractiva. Como resultado, se han empleado varios métodos para intentar seleccionar como diana CA IX en cuanto a inhibición de molécula pequeña selectiva de isoforma, direccionamiento específico de ubicación, silenciamiento usando tecnología de iARN y, más recientemente, selección antigénica como diana de CA IX como medio para administrar compuestos terapéuticos anticancerosos directamente al tumor.

Se han estudiado ampliamente los CAI y sus mecanismos de inhibición están bien establecidos. Los compuestos basados en sulfonamida son los más potentes y más usados entre las clases de CAI. Estos compuestos se unen al ion de cinc mediante una sulfonamida como grupo de unión a cinc (ZBG) en una forma desprotonada que desplaza la molécula de agua/hidróxido unida a cinc al tiempo que todavía mantiene la coordinación tetraédrica alrededor del ion de cinc. Aunque algunas sulfonamidas presentan constantes de inhibición en el intervalo sub-nanomolar para CA IX, también inhiben otras isoformas de CA. Esto se debe a la arquitectura conservada del sitio activo entre las CA humanas. Para todas las CA humanas catalíticas, las tres histidinas que coordinan el cinc, Thr 199 (numeración de CA II; denominada "guardián") y Glu 106 están conservadas. Tanto T199 como E106 desempeñan papeles en la catálisis. El hidrógeno de T199 se une al agua/hidróxido unido a cinc mediante su grupo OH, mientras que el hidrógeno de E106 se une a T199.

Los inhibidores de CA (CAI) de bajo peso molecular que usan un ZBG tienden a unirse de manera profunda en la cavidad del sitio activo y no realizan interacciones extensas con aminoácidos que varían entre las isoformas de CA, contribuyendo por tanto a sus perfiles de inhibición indiscriminados. Como resultado, se han desarrollado enfoques alternativos para mejores CAI específicos de isoforma, siendo el "enfoque de cola" uno de los más satisfactorios. En el "enfoque de cola", se añade un resto químico (conocido como cola) sobre el armazón orgánico de un ZBG (por ejemplo, heterocíclico o aromático). Esta cola prolonga el inhibidor permitiendo que realice extensas interacciones con aminoácidos hacia el exterior del sitio activo. La adición de estas colas también puede alterar las propiedades del CAI, por ejemplo haciendo que sea más soluble mediante la adición de una cola que es de naturaleza hidrófila, o manipulando la carga global del compuesto; tal como CAI catiónicos. El uso de diseño de fármacos basado en estructura ha demostrado ser una técnica valiosa para aprovechar las sutiles diferencias que existen entre el sitio activo de las diversas isoformas. Por ejemplo, usar sulfonamidas basadas en esteroides como compuestos principales ha conducido al desarrollo de varios CAI similares que pueden aprovechar la cavidad hidrófoba más grande de CA IX aumentando el número de interacciones hidrófobas mediante contactos de van der Waals.

A pesar de la promesa de un aprovechamiento estructural del sitio activo de CA IX para mejorar los CAI actuales y novedosos, la expresión y cristalización de CA IX de tipo natural ha supuesto una tarea complicada y, por tanto, ha hecho que sea difícil llevar a cabo un análisis estructural extenso. Se ha diseñado por ingeniería un compuesto que imita CA IX, es una CA II modificada (una enzima que se expresa y cristaliza de manera rutinaria) que contiene mutaciones de sitio activo específicas para CA IX. Esto ha proporcionado un molde útil para analizar rápidamente y predecir modos de unión de CAI a CA IX. El análisis estructural de varios CAI ha hecho que sea posible diseñar fármacos que muestran tanto direccionamiento específico de ubicación como propiedades de tipo profármaco que han mostrado ser útiles para inhibir CA IX de manera selectiva.

Aparte del desarrollo de inhibidores de molécula pequeña, también se han diseñado por ingeniería anticuerpos específicos para CA IX y sus conjugados con algunos actualmente en ensayos clínicos de fase III (RECENARX). M75 y G250 son dos de tales anticuerpos monoclonales que reconocen el dominio de proteoglicano de las enzimas. Tras la unión a CA IX, estos anticuerpos provocan una reducción de la adhesión y motilidad de células tumorales, e inducen que linfocitos citotóxicos naturales se dirijan a células tumorales para su erradicación. El desarrollo de anticuerpos monoclonales con alta afinidad de unión elimina el problema de efectos inespecíficos habitualmente encontrados en el diseño de fármacos de CAI.

La ubicación extracelular del sitio activo de CA IX presenta un método alternativo de selección como diana de la enzima en células tumorales. Específicamente, pueden diseñarse CAI que tienen propiedades fisicoquímicas que les permiten ser impermeables con respecto a la membrana plasmática; reduciendo por tanto la probabilidad de inhibir CA citosólicas inespecíficas observado mediante CAI clásicos. Esto presenta una estrategia de diseño de fármacos que incorpora direccionamiento específico de ubicación de CA IX en vez de aprovechar únicamente diferencias en los perfiles de inhibición. Hasta ahora, se han sintetizado y diseñado varios compuestos que muestran una permeabilidad de membrana limitada. Tales compuestos usan restos químicos voluminosos, tal como en albúmina-acetazolamida, o aprovechan restos con carga en forma de sulfonamidas marcadas de manera fluorescente o derivados de sulfonamida catiónicos. El diseño de tales CAI emplea esencialmente dos fundamentos distintos: (1) compuestos de alto peso molecular que son simplemente demasiado voluminosos como para atravesar la membrana plasmática, o (2) un resto catiónico que no puede penetrar en el entorno citosólico reducido. A pesar de que ambos tipos de compuestos muestran una inhibición favorable e impermeabilidad de membrana, el uso de sulfonamidas catiónicas ha mostrado ser la opción más viable para el desarrollo de fármacos ya que los compuestos de alto peso molecular con frecuencia inducen potentes reacciones alérgicas y biodisponibilidad reducida *in vivo*. Como resultado, se han desarrollado varias sulfonamidas catiónicas usando sulfato de amonio cuaternario (QAS) como compuesto principal, o derivados de sulfonamida marcados de manera fluorescente.

Se ha mostrado que las sulfonamidas glicoconjugadas, una clase más reciente de CAI, muestran tanto impermeabilidad de membrana como inhibición selectiva de la isoforma de CA IX. Estos CAI particulares usan bencenosulfonamidas, sulfonamidas o sulfonamidas secundarias cíclicas conjugadas con una cola de mono- o disacárido. El diseño de estos CAI se realizó mediante la influencia del topiramato clínicamente usado (compuesto terapéutico antiepiléptico). Lo más probablemente, el motivo por el que estos compuestos no penetran en la célula se debe a sus altos pesos moleculares y a la adición de un resto de azúcar que no se transporta fácilmente. Además, a diferencia de derivados de sulfonamida voluminosos anteriormente usados, la adición de un resto de azúcar permite

que estos CAI conserven solubilidad en agua y, por tanto, conserven una buena biodisponibilidad. Otro aspecto prometedor es que estos CAI muestran un perfil de inhibición impresionante, con una selectividad de >1000 veces para CA IX con respecto a CA II en algunos casos. Además, la unión de hidrato de carbono presenta una zona de manipulación en estos CAI en los que pueden añadirse enlaces éster escindibles a los carbonilos de la cola de hidrato de carbono que permiten “empaquetar” el CAI en forma de un profármaco. Aunque estos compuestos presentan una gran promesa en cuanto al desarrollo de un fármaco para CA IX, el uso de restos de hidrato de carbono supone un posible dilema. Es decir, el uso de un hidrato de carbono, específicamente un monosacárido, puede interaccionar de manera no intencionada con transportadores de glucosa, de manera similar a las estatinas, en las que se observó miotoxicidad. Sin embargo, esta noción no se ha sometido a prueba. De manera interesante, una manera de evitar tal cuestión sería el desarrollo de conjugados basados en sacarosa que no tendrán interacciones con transportadores específicos debido a la falta de transportadores de sacarosa en tejido humano. De manera interesante, los conjugados de disacárido actuales que se han desarrollado para dar CAI usan un resto de galactosa y muestran una inhibición más fuerte para CA II frente a CA IX. Aunque estos compuestos no entrarán en el citosol, no pueden unirse a CA IX de manera suficientemente estrecha como para considerarse un candidato de fármaco válido. Sin embargo, el uso de otros compuestos basados en disacárido, tal como el conjugado de sacarosa sugerido anteriormente mencionado, puede mostrar una inhibición superior para CA IX y, por tanto, presentar un CAI que es selectivo para CA IX tanto en cuanto a la especificidad de ubicación como en cuanto a la inhibición directa.

Hay muchas publicaciones que contienen tanto dianas de CA IX como colorantes de NIR. Un trabajo selecciona como diana CA IX sintetizando derivados de sulfonamida y sometiéndolos a prueba tanto *in vitro* como *in vivo* [Kevin Groves, Bagna Bao, Jun Zhang, Emma Handy, Paul Kennedy, Garry Cuneo, Claudiu T. Supuran, Wael Yared, Jeffrey D. Peterson, Milind Rajopadhye, Synthesis and evaluation of near-infrared fluorescent sulfonamide derivatives for imaging of hypoxia-induced carbonic anhydrase IX expression in tumors, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, volumen 22, número 1, 1 de enero de 2012, páginas 653-657, ISSN 0960-894X, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.10.058>]. Groves *et al.* sintetizaron derivados de sulfonamida y usaron un enlace amida para acoplarlos a ésteres succinimidílicos de uno o más de cuatro fluorocromos de NIR de indocianina hidrófobos comercialmente disponibles. Muestran la localización de los derivados de sulfonamida sintetizados en tumores en ratones portadores tumor HT-29.

Un agente dirigido a CA IX se ha validado por Bao *et al.* para la detección *in vivo* de tumores que expresan CA IX [Bao B, Groves K, Zhang J, Handy E, Kennedy P, Cuneo G, *et al.* (2012) *In vivo* Imaging and Quantification of Carbonic Anhydrase IX Expression as an Endogenous Biomarker of Tumor Hypoxia. *PLoS ONE* 7(11): e50860. doi:10.1371/journal.pone.0050860]. Se comparó la localización usando un anticuerpo frente a CAIX.

Groves y Bao son ambos inventores de la publicación de solicitud de patente estadounidense 2012/0321563, que da a conocer agentes de obtención de imágenes que seleccionan como diana anhidrasa carbónica. El documento ‘563 reivindica un agente de selección como diana de anhidrasa carbónica compuesto por un resto de unión a anhidrasa carbónica (CAB) de sulfonamida que está unido a un grupo de unión L, y después a un grupo Q opcional, y después finalmente a un cromóforo de NIR. El cromóforo de NIR reivindicado es una estructura de género para el subgrupo de cadena cerrada de la familia de colorantes de cianina.

Claudiu Trandafir Supuran es un coinventor de la publicación de patente internacional n.º WO 2014/136076 titulada “Assembly comprising an absorber of near infrared (NIR) light covalently linked to an inhibitor of carbonic anhydrase”. El absorbedor de luz NIR tiene una sección transversal de absorción óptica no inferior a 100 nm².

Neri y colaboradores usan conjugados de fármaco de molécula pequeña para seleccionar como diana CA IX expresada en tumores sólidos *in vivo* [Krall, N., Pretto, F., Decurtins, W., Bernardes, G. J. L., Supuran, C. T. y Neri, D. (2014), A Small-Molecule Drug Conjugate for the Treatment of Carbonic Anhydrase IX Expressing Tumors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53: 4231-4235. doi: 10.1002/anie.201310709]. Preparan conjugados de ligando de CAIX-grupo de unión-colorante, y muestran que se acumulan preferiblemente en tumores SKRC52 que expresan CAIX subcutáneos en ratones desnudos. Claudiu Supuran también es un inventor de la patente estadounidense n.º 8.628.771 B2 que da a conocer métodos para inhibir el crecimiento de células que expresan CA IX, métodos para examinar inhibidores específicos de CA IX, métodos para visualizar y obtener imágenes de tejidos que se unen selectivamente a la CA IX activada, métodos para seleccionar como diana células que han expresado CA IX, y métodos que usan inhibidores específicos de CA IX acoplados a agentes de terapia génica. El documento ‘771 usa un anticuerpo específico de CA IX conjugado con un radioisótopo para seleccionar como diana y detectar CA IX.

En otro trabajo, Neri y colaboradores muestran que un ligando bivalente contra el marcador tumoral, anhidrasa carbónica IX, conduce a un rendimiento mejorado de selección como diana de tumor en comparación con el homólogo monovalente correspondiente en el modelo de SKRC52 de carcinoma de células renales positivo para CAIX de manera constitutiva [Krall, Nikolaus, Francesca Pretto y Dario Neri. “A bivalent small molecule-drug conjugate directed against carbonic anhydrase IX can elicit complete tumour regression in mice”, *Chem. Sci.* 5.9 (2014): 3640-3644]. Los derivados de acetoazolamida se unen a conjugados de colorante monovalentes y bivalentes usando el colorante comercialmente disponible, IRDye750.

Pomper y colaboradores notifican la síntesis y el rendimiento *in vivo* de [¹¹¹In]XYIMSR-0, un inhibidor de CAIX de motivo doble modificado para obtención de imágenes nucleares del subtipo de células claras de carcinoma de células

renales inspirados por el trabajo bivalente anterior de Neri *et al.* [Yang, X., *et al.* "Imaging of carbonic anhydrase IX with an ¹¹¹In-labeled dual-motif inhibitor", *Oncotarget* 6,32 (2015): 33733-33742]. Pomper sustituyó la porción de IRDye750 de la molécula por ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), una especie más hidrófila que también permite un radiomarcado conveniente con isótopos de metal para tomografía por emisión de positrones, tomografía computerizada por emisión de fotones individuales y terapia radiofarmacéutica. Se usa indio 111 como radionúclido por su semivida relativamente larga (2,8 días) para permitir una monitorización extendida de la farmacocinética. Se usa un marcador de FITC como patrón para medir afinidades de unión a CAIX en los radiotrazadores.

En otro trabajo, Neri y colaboradores describen la síntesis de un ligando de anhidrasa carbónica basado en acetazolamida con alta afinidad por la isoforma asociada con tumor CAIX, marcado con ^{99m}Tc, un radionúclido de emisión gamma ampliamente usado para aplicaciones en medicina nuclear [Nikolaus Krall, Francesca Pretto, Martin Mattarella, Cristina Müller y Dario Neri, A technetium ^{99m}-labeled ligand of carbonic anhydrase IX selectively targets renal cell carcinoma *in vivo*, *J Nucl Med jnumed.* 115.170514, publicado antes de la impresión el 18 de febrero de 2016 (10.2967/jnumed.115.170514)].

Supuran y colaboradores describen el desarrollo de una nueva clase de inhibidores de CAIX que comprenden un sulfamato como grupo de unión a cinc, un grupo de unión variable, y un resto de "cola" de hidrato de carbono [Moeker, Janina, *et al.* "Structural insights into carbonic anhydrase IX isoform especificidad of carbohydrate-based sulfamates", *Journal of medicinal chemistry* 57, 20 (2014): 8635-8645]. Las estructuras cristalinas de dos de estos compuestos en complejo con un compuesto que imita CA IX (una variante de CA II, con residuos de sitio activo que imitan CA IX) y un compuesto en complejo con CA II se han determinado hasta una resolución de 1,7 Å o mejor y demuestran un mecanismo selectivo de unión entre las cavidades hidrófila e hidrófoba de CA IX frente a CA II. Su análisis estructural indica que existen dos modos distintos de unión entre CA IX y CA II del compuesto 5e de Moeker *et al.*, sin embargo, en ambos casos, este compuesto interacciona con la cavidad hidrófila de la enzima. Dado que esta cavidad está generalmente conservada entre CA II y CA IX, puede explicar las afinidades de unión nanomolares entre ambas enzimas. En cambio, el compuesto 5d de Moeker *et al.*, que mostró un perfil de inhibición diferencial entre CA II y CA IX, se une al sitio activo de CA IX mediante interacciones con la cavidad hidrófoba. Esta región en el sitio activo de CA contiene más variabilidad entre residuos de CA II frente a CA IX. Como resultado, esta región se ha denominado una de las "cavidades selectivas" en el sitio activo de CA.

La estructura de rayos X del dominio catalítico de CA IX muestra un pliegue que es significativamente diferente de las otras isoformas de CA en la estructura cuaternaria [Alterio, Vincenzo, *et al.* "Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX", *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.38 (2009): 16233-16238]. Concluyen que la región 125-137 difiere tanto en cuanto a estructura como en cuanto a secuencia en todas estas isozimas y representa un "punto crítico" a tener en cuenta en el diseño de fármacos basado en estructura.

El tratamiento de cáncer requiere normalmente el uso de varias estrategias terapéuticas tales como cirugía, radioterapia y/o quimioterapias. Con frecuencia, deben combinarse terapias debido a la eficacia de una antes de la otra. Por ejemplo, la cirugía y la radioterapia, aunque son eficaces en una gran mayoría de casos, presentan limitaciones ya que sólo pueden seleccionar como diana regiones locales confinadas de tejido neoplásico y no son eficaces en el tratamiento de casos de cáncer altamente metastásico. En este estadio, habitualmente se emplean combinaciones de múltiples compuestos quimioterápicos en un intento por destruir células cancerosas que han migrado desde el sitio de tumor primario. Además, los tumores altamente agresivos e hipóxicos con frecuencia desarrollan resistencia frente a la radiación y algunas quimioterapias, o no pueden operarse; por tanto, alternativas o combinaciones de compuestos quimioterápicos son el único método de tratamiento disponible en estos casos particulares. Esta característica de hipoxia y su asociación con la resistencia frente a la radiación y quimioterapias se han observado en varios tipos de cáncer. Esto se debe lo más probablemente a varios factores incluyendo una reducción del contenido global en O₂ que hace que la generación de radicales libres necesarios para la radioterapia sea extremadamente difícil, el pH extracelular reducido que perturba las funciones de agentes alquilantes, y una regulación por incremento de factores de resistencia a fármacos inducida por HIF. CA IX se ha vinculado a casos de resistencia terapéutica para varios cánceres y con frecuencia se usa como biomarcador de resistencia a la radiación. Tal como sugieren estas evidencias, marcar CA IX mediante un resto de unión a sitio activo unido a un colorante de NIR permite la localización de células cancerosas hipóxicas, indicando su posible uso como medio para ayudar a cirujanos a extirpar tejido canceroso durante la cirugía.

Ferreira y colaboradores compararon la citotoxicidad *in vitro* de cuatro colorantes de NIR: IR125, IR780, IR813 y IR820 [Conceição, David S., Diana P. Ferreira y Luís F. Vieira Ferreira. "Photochemistry and Cytotoxicity Evaluation of Heptamethinecyanine Near Infrared (NIR) Dyes", *International journal of molecular sciences* 14.9 (2013): 18557-18571]. Una fuente de citotoxicidad se debe a que, tras el cruce intersistema al estado de triplete, el sensibilizador puede interaccionar con oxígeno molecular mediante un procedimiento de aniquilación triplete-triplete, generando oxígeno en estado singlete, o, alternativamente, el sensibilizador en su estado triplete puede participar en procesos de transferencia de electrones o formación de productos intermedios de radicales, conduciendo también a la generación de especies reactivas de oxígeno. Pero Ferreira propuso que la causa principal para los valores significativos de citotoxicidad presentados por IR125 y IR813 debía estar relacionada con su inestabilidad en disolución

(durante largos periodos de tiempo) y productos de degradación y fotoproductos que surgen durante la inoculación de los colorantes en el cultivo celular. La adición de un anillo de ciclohexenilo fomentó una estabilización molecular significativa, e IR820 es el único colorante de NIR examinado que no mostró ningún efecto citotóxico principal, tanto en presencia como en ausencia de luz.

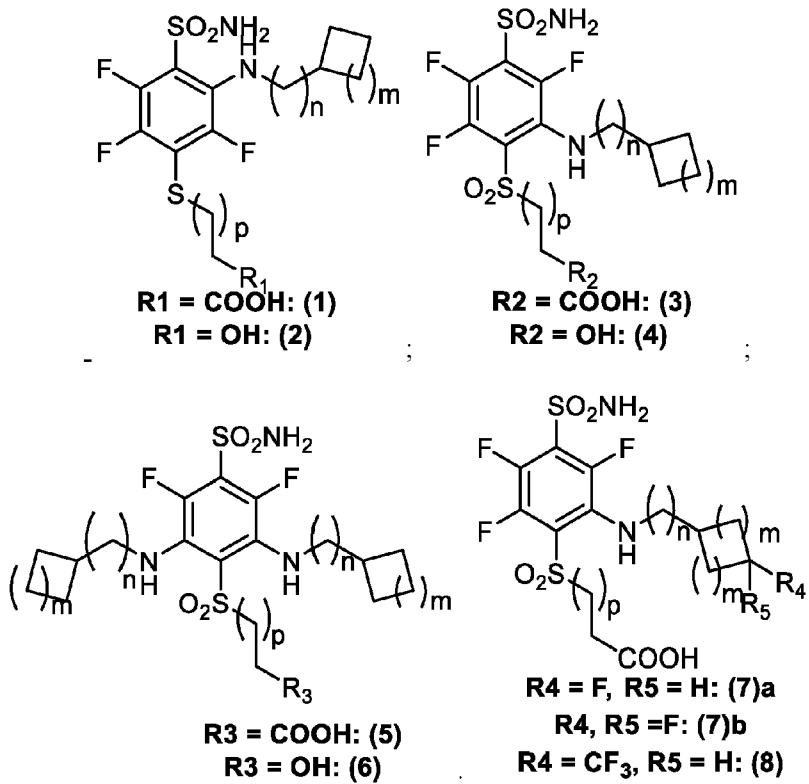
Los documentos de Groves K. *et al.* (2011), Nikolaus K. *et al.* (2014), Tai-Cheng H. *et al.* (2015), los documentos WO 2015/114171 y WO 2012/154884, dan a conocer un agente de unión a CA-IX unido a un colorante de NIR para detectar células o tejidos cancerosos en un sujeto.

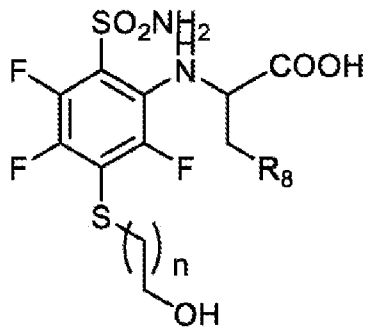
Breve sumario de la invención

Esta divulgación proporciona ligandos dirigidos a CA IX unidos a colorantes de NIR mediante diferentes grupos de unión para mejorar las propiedades clínicas (por ejemplo, estabilidad, propiedades PK, solubilidad, rápida acumulación en tumor, fluorescencia superior, rápido aclaramiento de la piel y razones superiores de tumor con respecto a fondo) de los compuestos. La divulgación también proporciona usos de los compuestos en cirugía guiada por imágenes y métodos para sintetizar los mismos. Esta divulgación proporciona mejoras de la afinidad de unión de ligandos de CA IX incorporando grupos hidrófobos a los ligandos (usando la estructura cristalina de la proteína CA IX) para ajustarse en las cavidades de unión adicionales en la región hidrófoba del sitio activo de la proteína. Esta divulgación también proporciona ligandos de afinidad superior novedosos para mejorar la afinidad *in vivo* y las propiedades PK de conjugados de NIR. Esta divulgación proporciona además una variación de la longitud del grupo de unión entre los ligandos y los colorantes de NIR para encontrar una distancia optimizada para ajustarse en la cavidad en forma de cono de 15 Å que abarca desde el centro de la proteína hasta la superficie, conservando de ese modo la afinidad de unión del ligando al sitio activo mediante eliminación del efecto de impedimento estérico de colorante de NIR voluminoso. Esta divulgación también proporciona una variación de la carga total del conjugado de ligando-grupo de unión-colorante de NIR añadiendo cargas positivas al grupo de unión o reduciendo el número de cargas negativas en las moléculas de colorante para mejorar la especificidad para la proteína CA IX. Esta divulgación también proporciona compuestos para su uso en la obtención de imágenes dirigida de tumores que expresan CA IX y métodos de uso, por ejemplo, en obtención de imágenes y cirugía que implica tumores y tejidos positivos para CA IX.

Los compuestos de la presente invención tienen la forma: B-W-X-Y-Z

en la que B es una molécula dirigida a CA IX seleccionada del grupo que consiste en ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sufonil)propiónico (C-SPA),



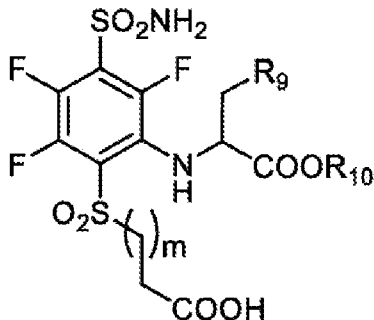


R8 = p-Ph: (13)

R8 = CH(CH₃)₂: (14)

R8 = Imidazol: (15)

R8 = Indol: (16)



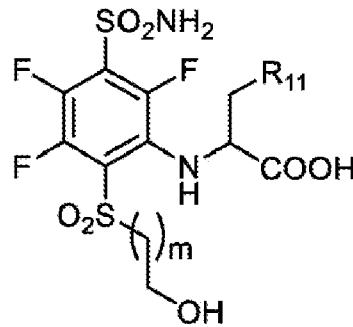
R9 = p-Ph, R10 = H: (17)

R9 = CH(CH₃)₂, R10 = H: (18a)

R9 = CH(CH₃)₂, R10 = Bz: (18b)

R9 = Imidazol, R10 = H: (19)

R9 = Indol, R10 = H: (20)

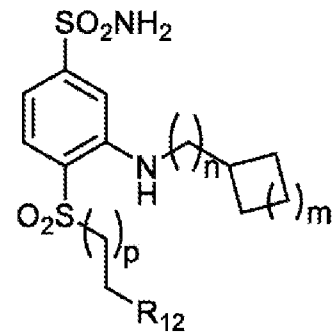


R11 = p-Ph: (21)

R11 = CH(CH₃)₂: (22)

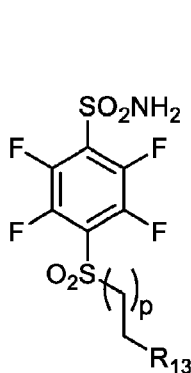
R11 = Imidazol: (23)

R11 = Indol: (24)



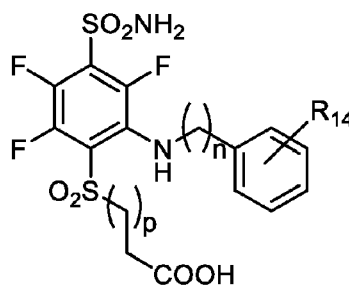
R12 = COOH: (25)

R12 = OH: (26)



R13 = COOH: (27)

R13 = OH: (28)

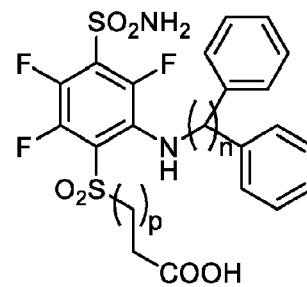


R14 = H: (30)

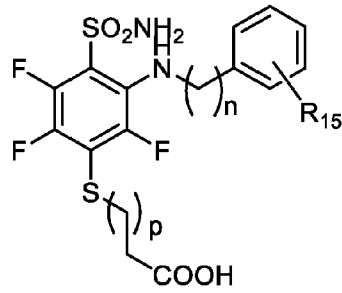
R14 = F: (31)

R14 = CF₃: (32)

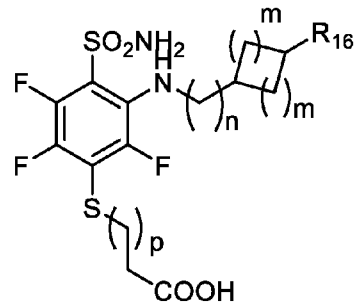
R14 = p-Ph: (33)



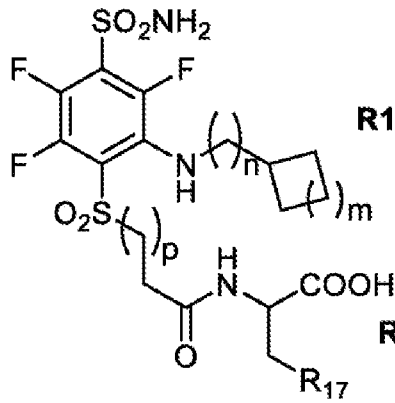
(29)



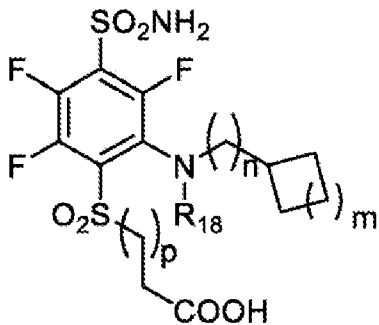
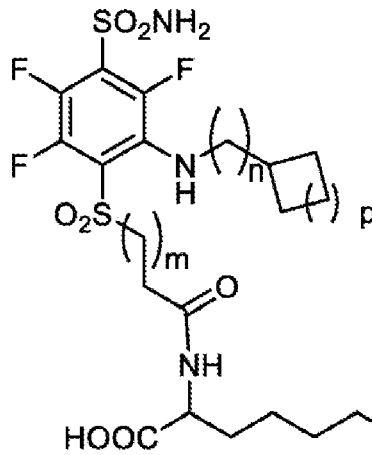
- R15 = F: (34)**
- R15 = CF₃: (35)**
- R15 = p-Ph: (36)a**
- R15 = H: (36)b**



- R16 = F: (37)**
- R16 = CF₃: (38)**



- R17 = COOH: (39)**
- R17 = (CH₂)₂Guanidinio: (40)**
- R17 = p-Ph: (41)**
- R17 = Imidazol: (42)**
- R17 = Indol: (43)**
- R17 = CH(CH₃)₂: (44)**
- R17 = CH(CH₂CH₃)CH₃: (45)**



R18 = Guanidinio: (47) ; y

5

en las que n es 0, 1, 2 o 3, m es 0, 1, 2 o 3, y p es 0, 1, 2 o 3;

W es un residuo hidrófobo extendido;

10

X es un espaciador hidrófobo;

Y es un espaciador de aminoácidos; y

Z es un colorante de NIR.

5 W es preferiblemente un aminoácido hidrófobo, seleccionado del grupo que consiste en Phe, Val, Leu, Ile, Trp, His, Arg, Lys, Asp, Glu, aminoácidos no polares neutros incluyendo alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina o grupo aromático, grupo ciclohexilo, tirosina, aminoácidos básicos (con carga positiva) tales como arginina, histidina y lisina; aminoácidos polares neutros, tales como glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; o un aminoácido aromático, o un resto hidrófobo. X se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un grupo de unión hidrófobo, ácido ocho-aminooctonoico (EAOA), polietilenglicol (PEG), polietilenamina (PEA) y ácido N-amino-dPEG₂, ácido seis-aminohectanoico (SAHA), ácido ocho-aminooctonoico (EAOA), polietilenglicol (PEG), unidad de polietilenamina (PEA), un péptido que comprende aminoácidos con carga positiva (por ejemplo Arg, Lys, Orn) o aminoácido que contiene amina cuaternaria, una cadena de 6 átomos, un espaciador de 6 átomos de longitud, una cadena de desde 6 hasta 20 átomos de longitud, y un péptido que comprende grupos arilo o aril-alquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido, y en el que un grupo arilo o aril-alquilo tiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos, y el otro grupo arilo o aril-alquilo tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 14, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 átomos, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos. Y se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en:

aminoácidos aromáticos;

25 un espaciador de aminoácidos con un grupo de cadena lateral que contiene calcógeno o un grupo de cadena lateral que contiene azufre;

un espaciador de aminoácidos con un resto tiofenol que contiene azufre;

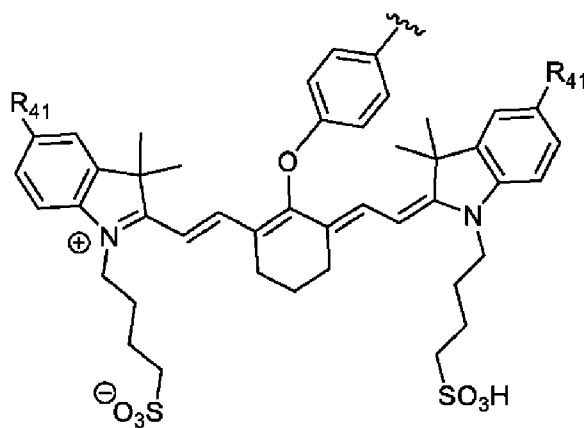
30 aminoácidos ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido aspártico y ácido glutámico;

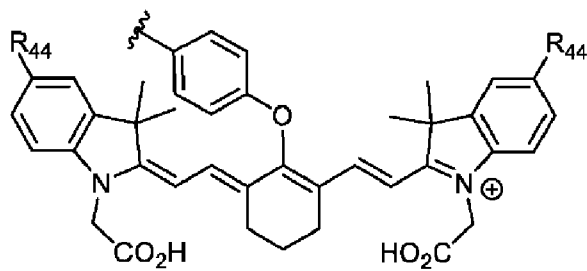
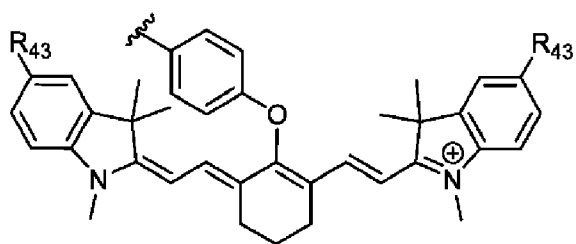
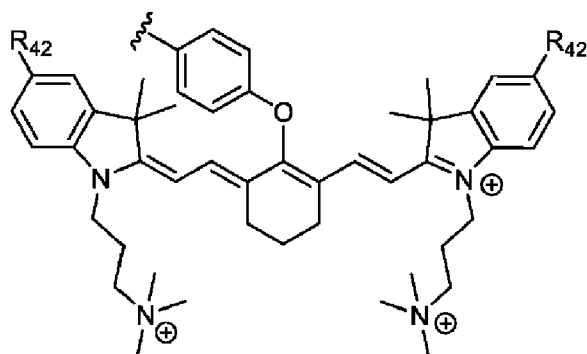
aminoácidos básicos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina y lisina;

35 aminoácidos polares neutros seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; y

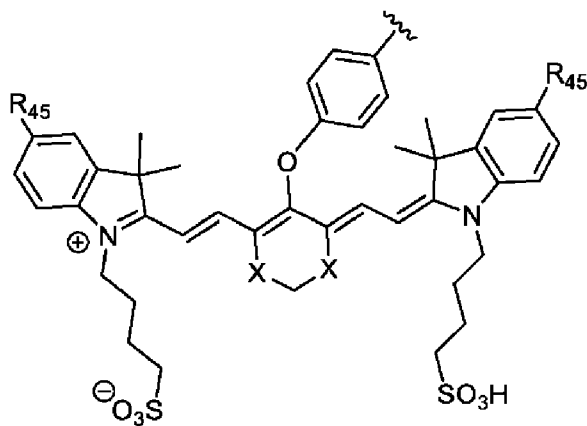
aminoácidos no polares neutros seleccionados del grupo que consiste en alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina.

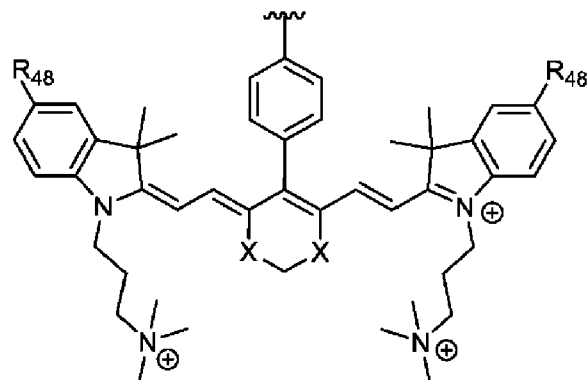
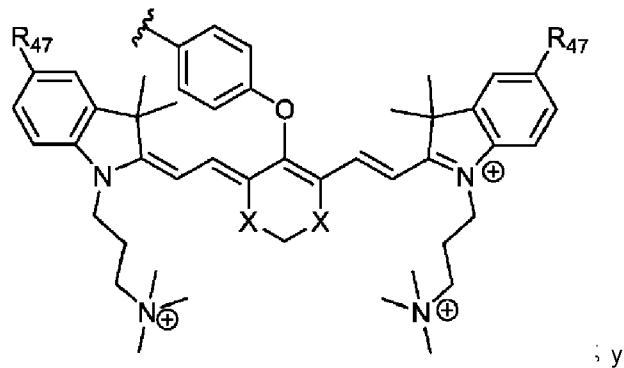
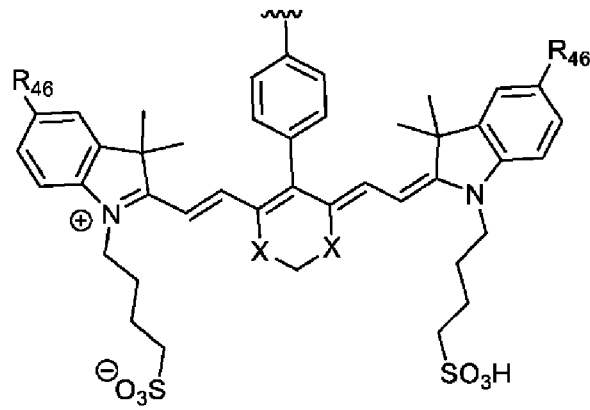
40 Z se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en LS288, IR800, SP054, S0121, KODAK, S2076, S0456,





5





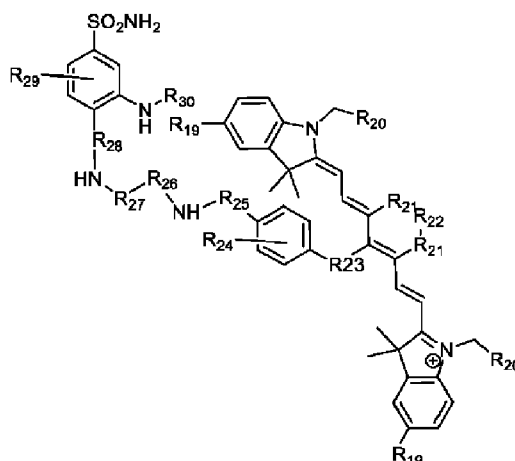
5

en los que R_{41} , R_{42} , R_{43} , R_{44} , R_{45} , R_{46} , R_{47} , R_{48} , = H o SO_3H ; X = O, S o N.

10

Preferiblemente, B comprende ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sufonil)propiónico (C-SPA); X se selecciona del grupo que consiste en EAOA, PEG y PEA; Y se selecciona del grupo que consiste en tirosina, fenilalanina-tirosina, fenilalanina-arginina-tirosina e histidina-tirosina; y Z comprende S0456.

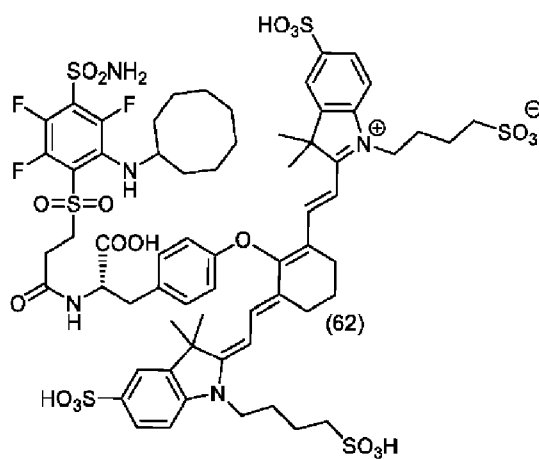
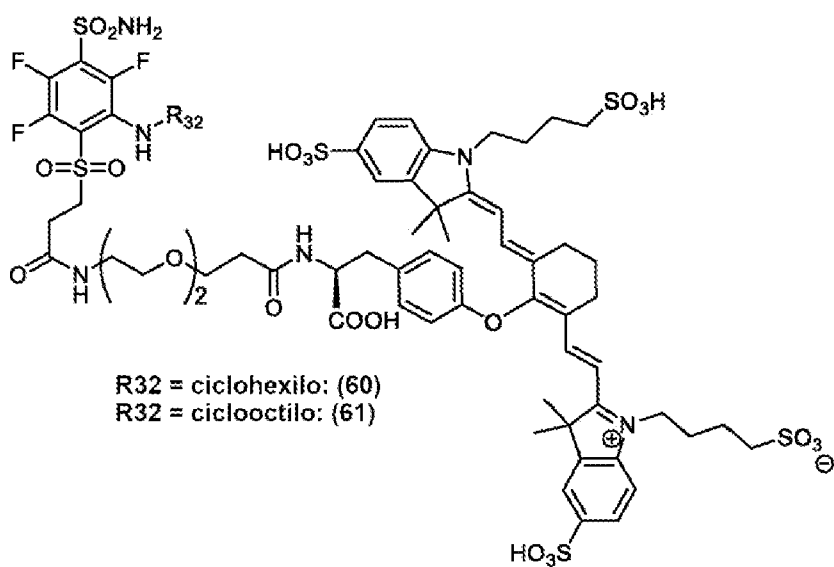
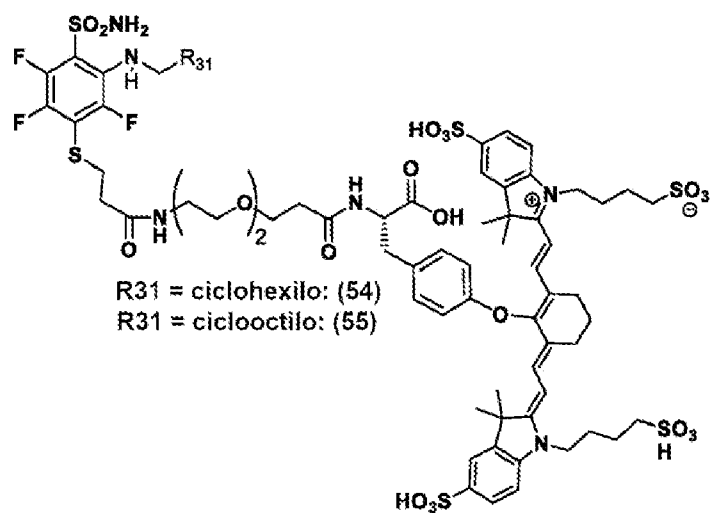
Según la invención, el compuesto tiene la fórmula estructural:

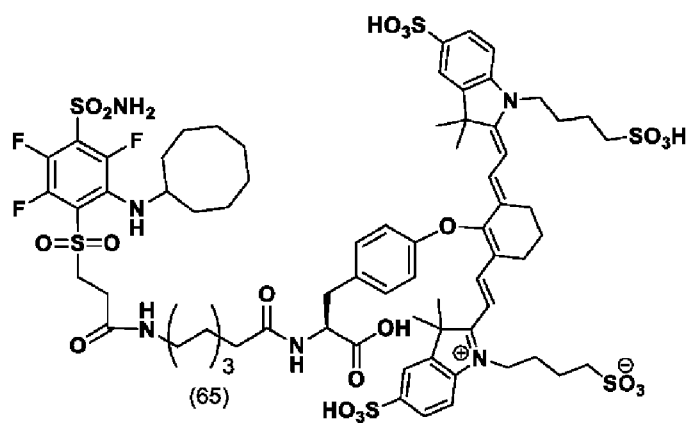
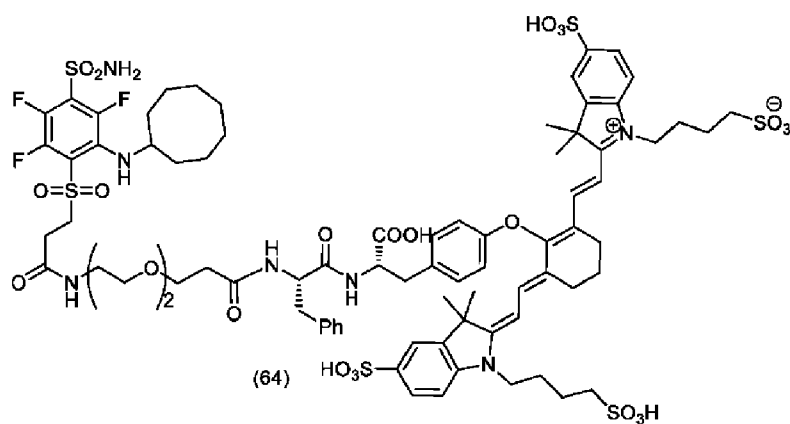
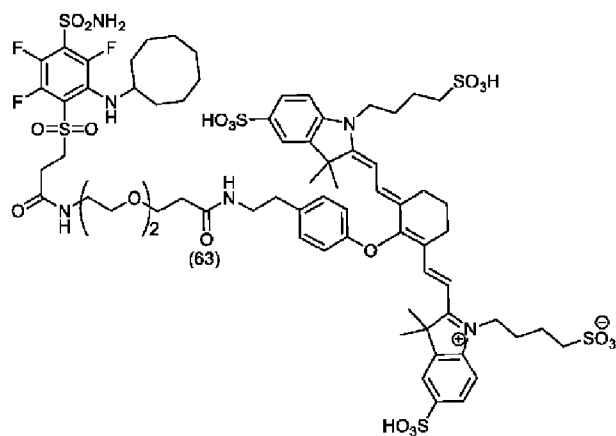


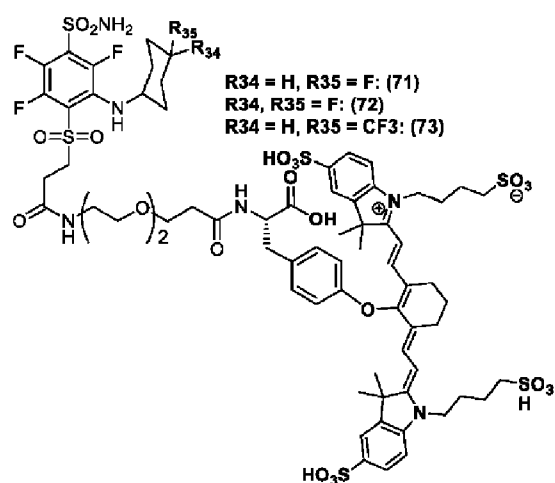
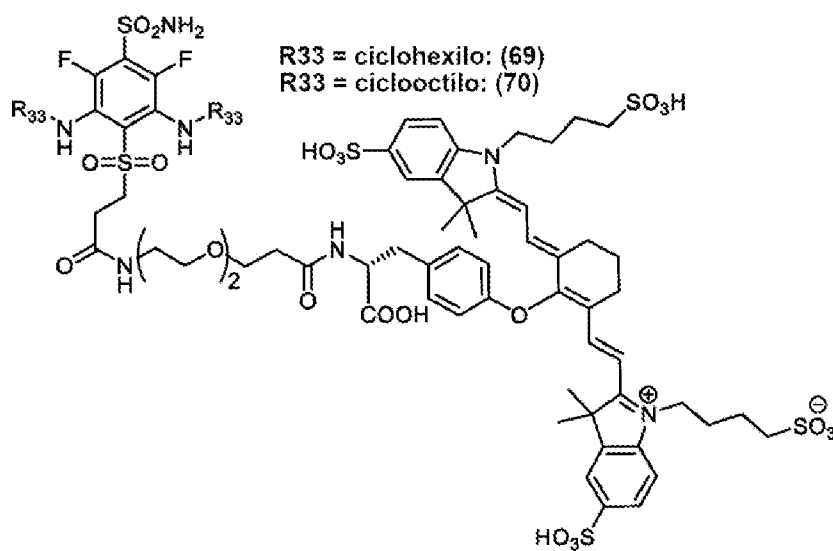
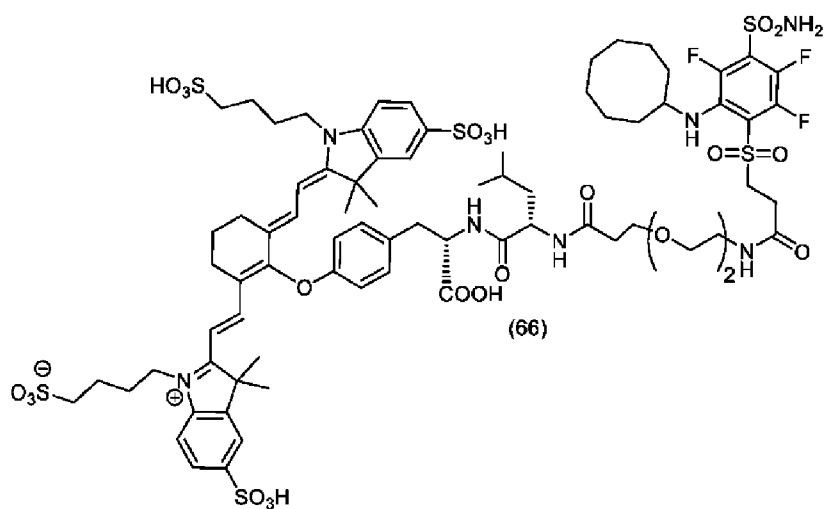
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o isótopos del mismo, en la que:

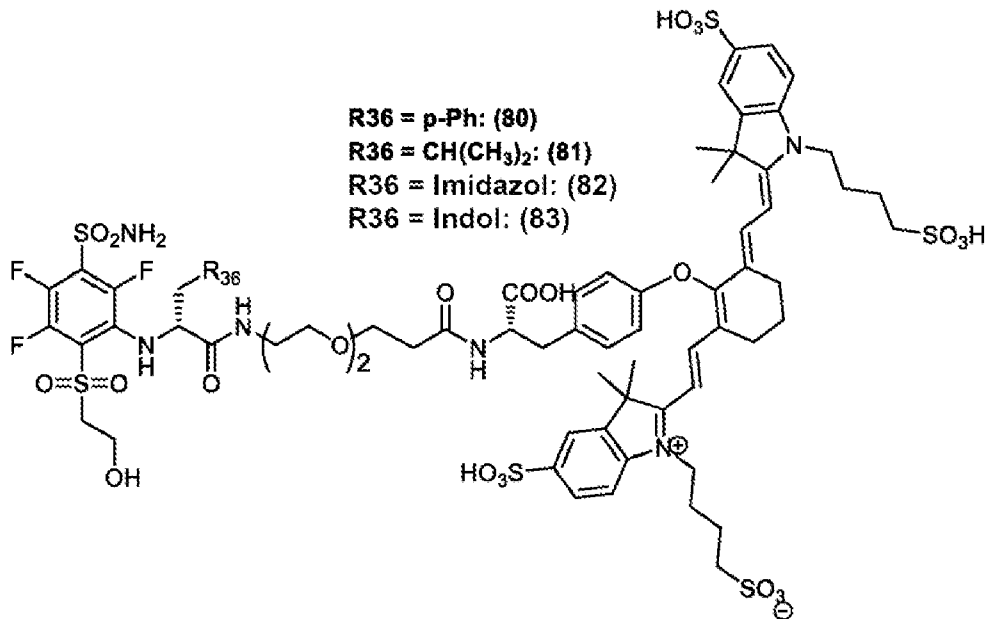
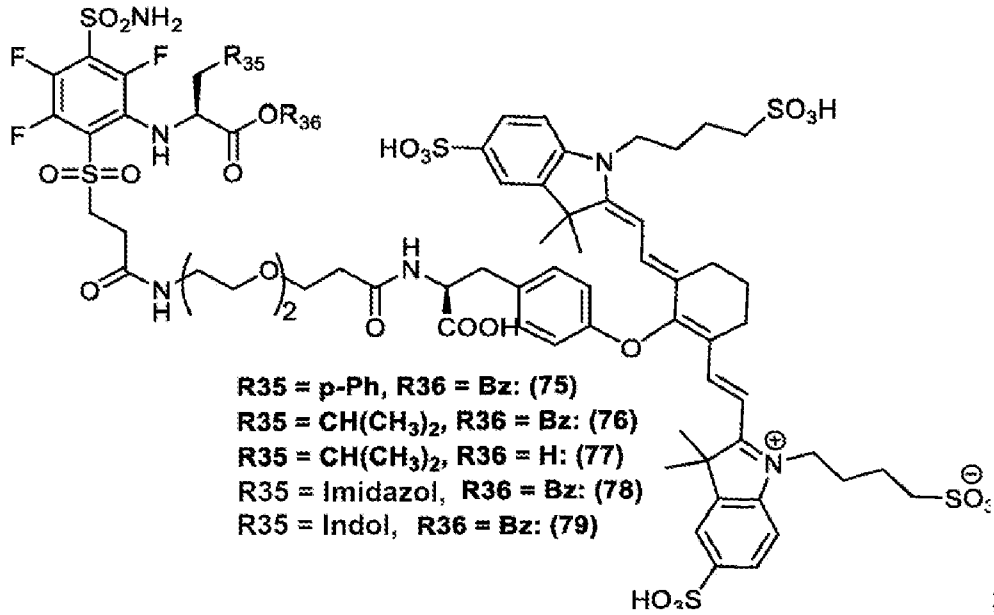
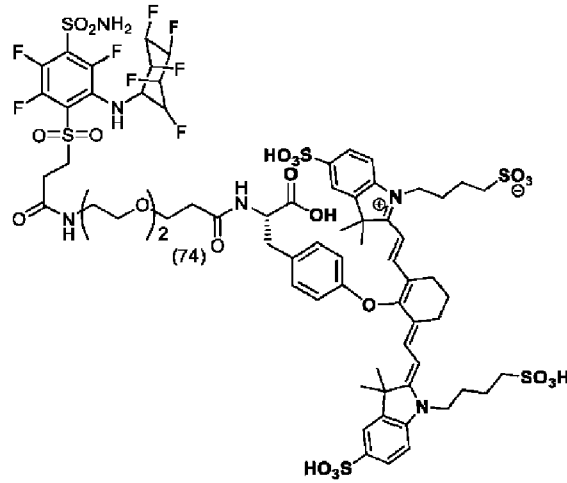
- 5 R_{19} representa un hidrógeno o SO_3H ;
- R_{20} representa un hidrógeno, CH_3 , $\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$, $\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3\text{H}$ o $\text{C}_4\text{H}_8\text{SO}_3^-$, o $\text{C}_4\text{H}_8\text{SO}_3\text{H}$ o $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$;
- 10 R_{21} representa un carbono, opcionalmente uno o más enlaces compartidos,
- R_{22} representa un carbono con opcionalmente uno o más enlaces compartidos;
- 15 R_{23} representa nitrógeno, oxígeno o azufre o ningún átomo (enlace C-C directo entre el anillo aromático y el anillo de vinilo);
- R_{24} es opcional y, cuando está presente, representa un grupo de sustitución aromático para potenciar las propiedades espectrales tal como aumentar el brillo y la estabilidad del puente de vinil éter;
- 20 R_{25} es opcional y, cuando está presente, representa grupos de unión con aminoácidos aromáticos tales como Phe, Trp, His, aminoácidos catiónicos tales como Arg, Lys, aminoácidos aniónicos tales como Asp, Glu, aminoácidos no naturales de ácidos aromáticos/catiónicos/aniónicos;
- R_{26} es opcional y, cuando está presente, representa una cadena de carbono lineal, o grupo de unión de polietilenglicol, grupo de unión catiónico;
- 25 R_{27} es opcional y, cuando está presente, representa un resto hidrófobo tal como Phe, Val, Leu, Ile, Trp, His, Arg, Lys, Asp, Glu;
- 30 R_{28} representa un grupo de unión hidrófobo; y
- R_{29} es opcional y, cuando está presente, representa un grupo de sustitución aromático para potenciar la afinidad de unión, estabilidad, hidrofobia de la molécula tal como F, NO_2 o de los mismos,
- 35 R_{30} es opcional y, cuando está presente, representa un resto hidrófobo tal como Phe, Val, Leu, Ile, Trp, His, o resto cíclico tal como ciclohexilo, ciclooctilo.

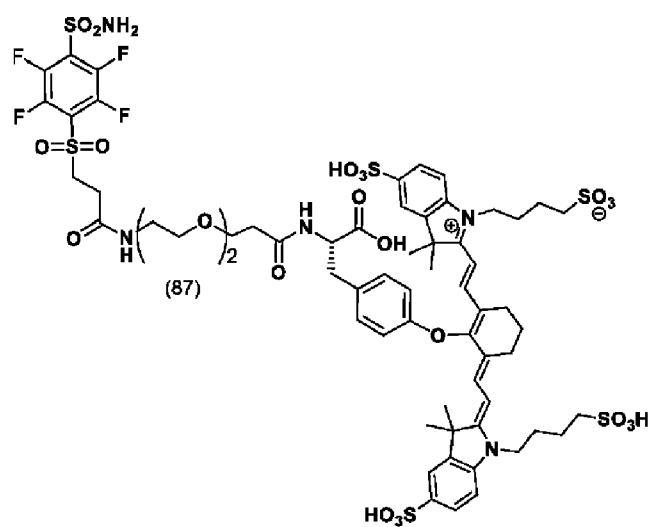
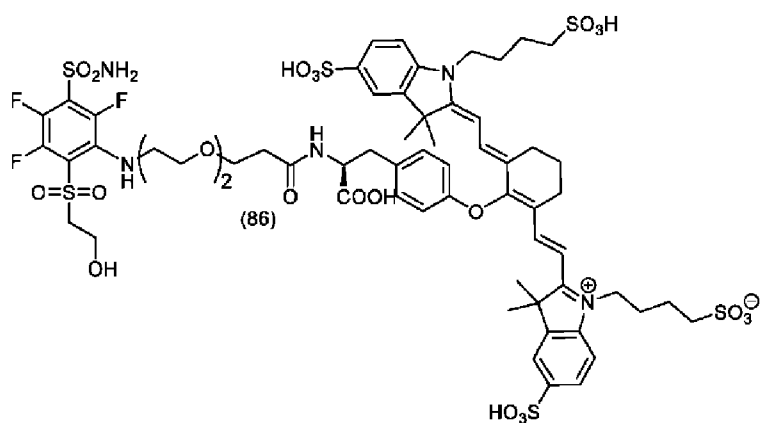
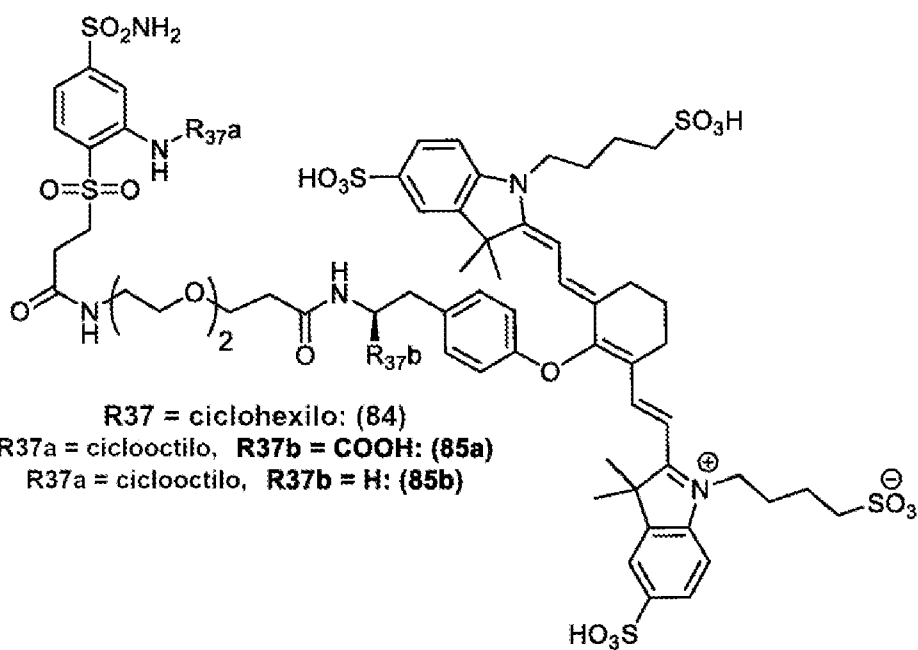
Preferiblemente, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

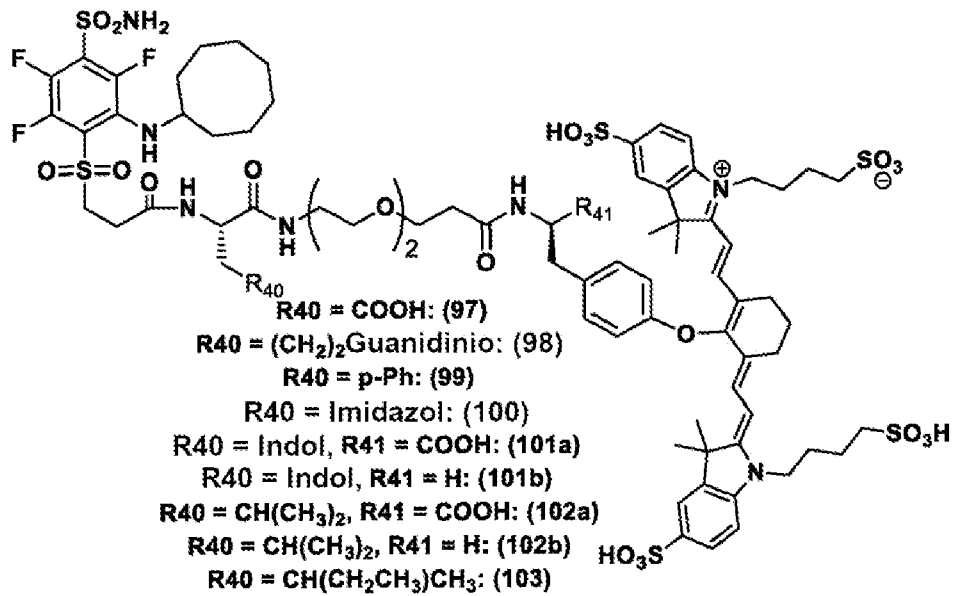
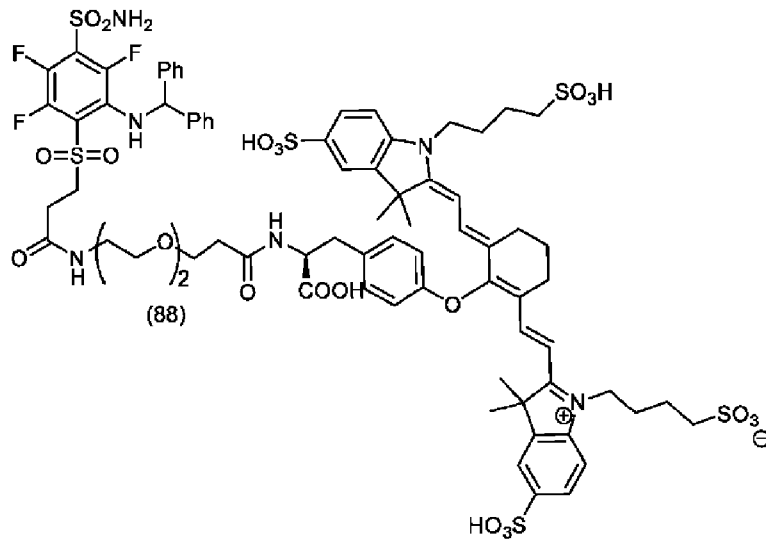


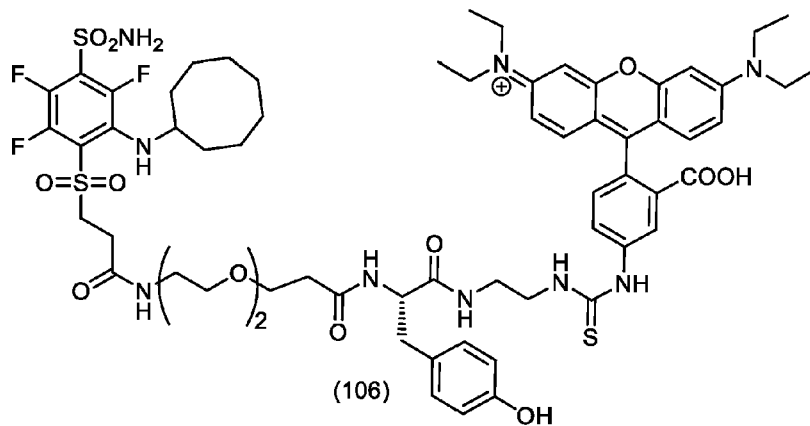
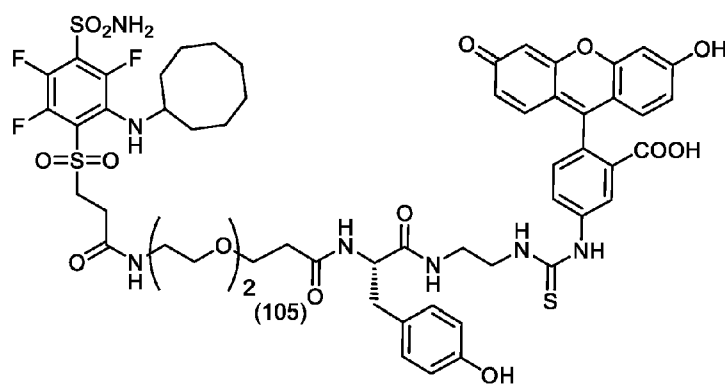
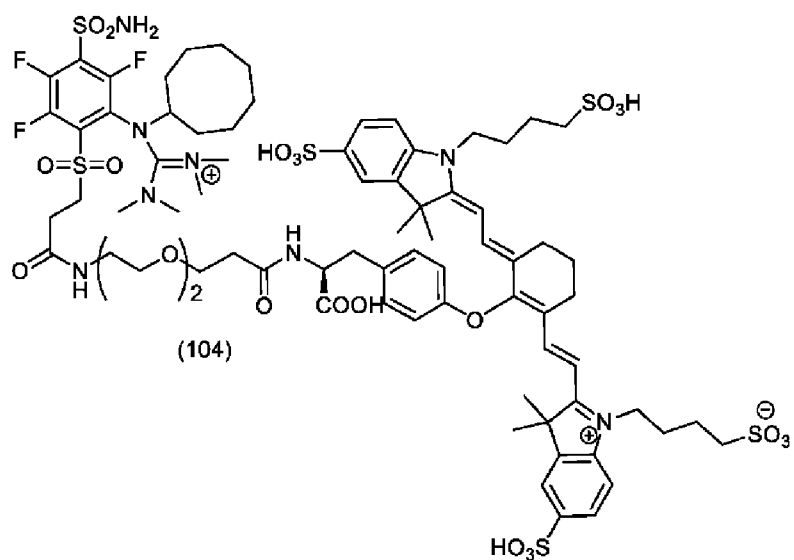


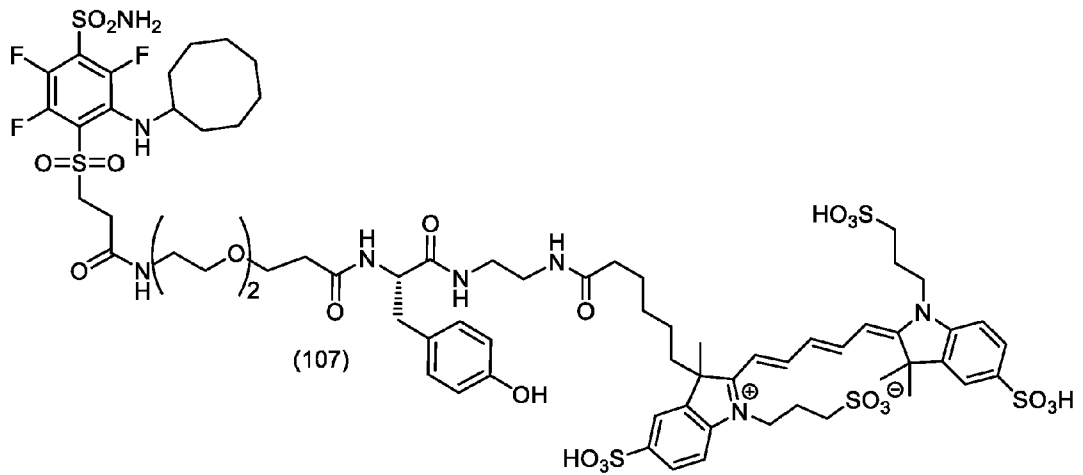




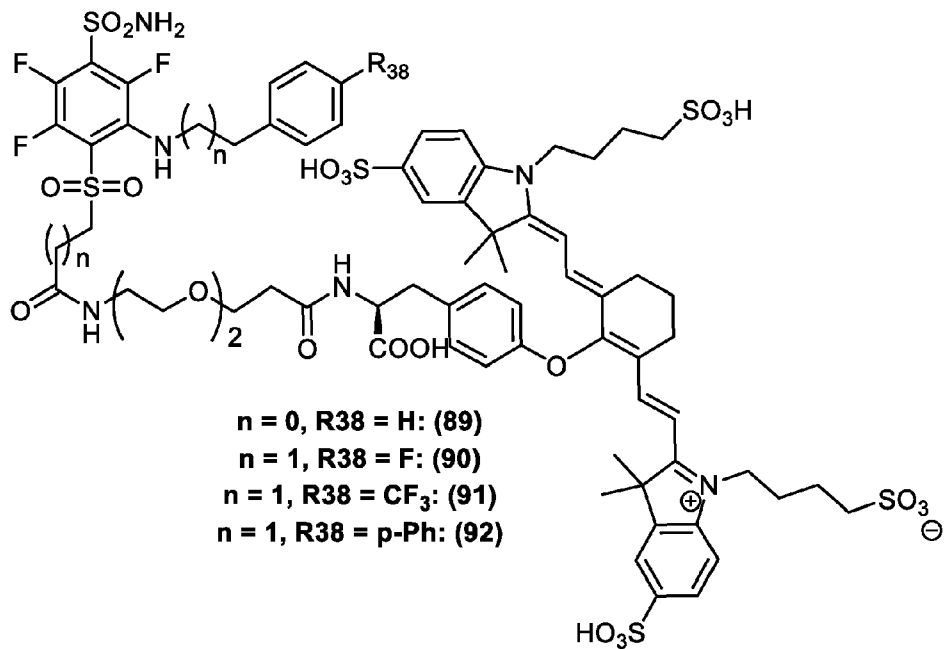




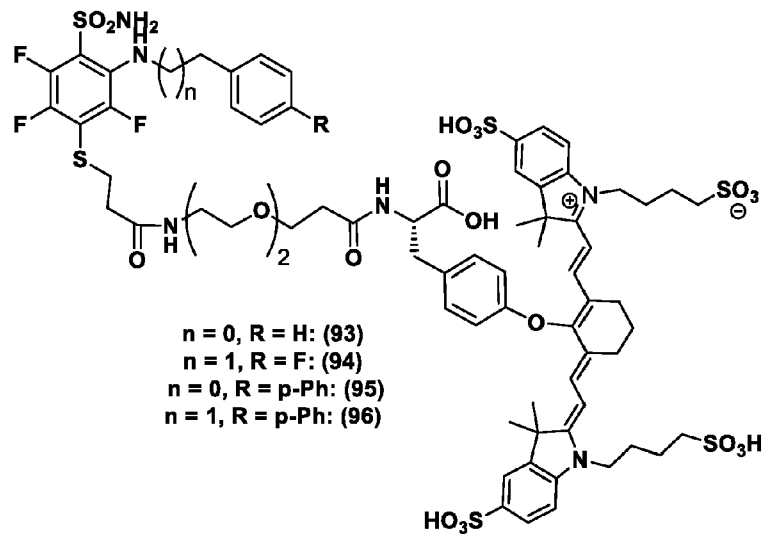




Preferiblemente, dicho compuesto tiene la fórmula:



5



En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen máximos de absorción y emisión entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 900 nm. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen máximos de absorción y emisión de entre aproximadamente 600 nm y 800 nm.

5 Preferiblemente, el compuesto puede o está adaptado para emitir fluorescencia tras la distribución del mismo en tejido.

Preferiblemente, el tejido se selecciona del grupo que consiste en células de próstata, células de cáncer de próstata, células de cáncer de vejiga, células de cáncer pancreático, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de riñón, células de sarcoma, células de cáncer de mama, células de cáncer de cerebro, células de carcinoma neuroendocrino, células de cáncer de colon, células de cáncer de testicular y células de melanoma.

Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un kit que comprende el compuesto anteriormente mencionado.

15 La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden dicho compuesto anterior y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Dichos compuestos y composiciones anteriores se usan en el diagnóstico de una enfermedad asociada con células que expresan CA IX, en los que las células se eligen del grupo que consiste en células de cáncer de vejiga, células de cáncer pancreático, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de riñón, células de sarcoma, células de cáncer de mama, células de cáncer de cerebro, células de carcinoma neuroendocrino, células de cáncer de colon, células de cáncer de próstata, células de cáncer de testicular o células de melanoma.

25 Breve descripción de los dibujos

Las características anteriormente mencionadas y otras de esta divulgación, y la manera de obtenerlas, resultarán más evidentes, y la propia divulgación se entenderá mejor, mediante referencia a la siguiente descripción de realizaciones de la divulgación tomadas junto con los dibujos adjuntos.

30 La figura 1 muestra la estructura química de ligandos de CA IX no convencionales con residuos de unión extendidos (n, m, p = 0, 1, 2, 3,...).

La figura 2 muestra (a) una imagen estereoscópica del sitio activo de la proteína CA IX humana en complejo con azetazolamida.¹ (b) Ligando de CA IX unido a proteína CA IX tal como se determina mediante la estructura cristalina.² (c) Fórmula general de ligando de CA IX recién diseñado.

La figura 3 muestra las estructuras químicas de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 1 y 2. La figura 3 muestra las estructuras químicas de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 1 y .

40 La figura 4 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 54 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

45 La figura 5 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 55 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

50 La figura 6 muestra la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 3 y 4.

La figura 7 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 60 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 8 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 61 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 9 muestra la afinidad de unión del compuesto 61 a células de SKRC52 positivas para CA IX usando microscopía confocal. Biodistribución tisular y razón de tumor con respecto a fondo del compuesto 61 en modelo de ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52. A los ratones se les inyectaron 10 nmol de compuesto 61, se recogió el tejido seleccionado y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

- 5 La figura 10 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor HT29 (una línea celular de cáncer de colon humana) y HCC827 (una línea celular de cáncer de pulmón humana) se le inyectaron 10 nmol de compuesto 61 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 10 La figura 11 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 62 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 15 La figura 12 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 65 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 20 La figura 13 muestra la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 5 y 6.
- La figura 14 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 69 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 25 La figura 15 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 70 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 30 La figura 16 muestra la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 7 - 8.
- La figura 17 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol del compuesto 72 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 35 La figura 18 muestra la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 17 - 20.
- La figura 19 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 76 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 40 La figura 20 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 77 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 45 La figura 21: la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 21 - 24.
- 50 La figura 22 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 80 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 55 La figura 23 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 81 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 60 La figura 24: la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 25 y 26.
- 65 La figura 25 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 85 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 26 muestra la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 27 y 28.

5 La figura 27 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 86 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

10 La figura 28 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 87 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

15 La figura 29 muestra la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 29.

La figura 30 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 88 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

20 La figura 31 muestra la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 30 - 33.

La figura 32 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 89 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

30 La figura 33 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 90 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 34: la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 34 - 36.

35 La figura 35 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 93 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

40 La figura 36 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 94 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

45 La figura 37 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 95 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

50 La figura 38 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 96 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

55 La figura 39 muestra la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 39 - 45.

La figura 40 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 99 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

60 La figura 41 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 102 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

65

La figura 42: la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 47.

La figura 43 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 104 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 44 muestra la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 3 - 4.

La figura 45 muestra la afinidad de unión del compuesto 105 a células de SCRC52 positivas para CA IX usando análisis por citometría de flujo.

La figura 46 muestra la afinidad de unión de los compuestos 105 - 107 a células de SCRC52 positivas para CA IX usando microscopía confocal.

Caracteres de referencia correspondientes indican partes correspondientes en la totalidad de las diversas vistas. Aunque los dibujos representan realizaciones de la presente divulgación, los dibujos no están necesariamente a escala y algunas características pueden exagerarse con el fin de ilustrar y explicar mejor la presente divulgación.

Definiciones

Tal como se usan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a un "ligando de anhídrido carbónico IX", "ligando de CA IX", es una referencia a uno o más de tales ligandos e incluye equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado habitualmente entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o pruebas de la invención, ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales preferidos.

Con respecto a conjugados de NIR dirigidos a CA IX de la presente invención, el término "específico de manera antigénica" o "se une específicamente" se refiere a compuestos que seleccionan como diana CA IX que se unen a uno o más epítopos de proteína CA IX, pero que no reconocen sustancialmente y se unen a otras moléculas en una muestra que contiene una población mixta de antígenos.

El término "epítipo" tal como se usa en el presente documento se refiere a un sitio en una CA IX que se reconoce por un ligando. Un epítipo puede ser una secuencia lineal o formada de manera conformacional o la forma de aminoácidos.

Tal como se usa en el presente documento, "compuesto que selecciona como diana CA IX" o "compuesto dirigido a CA IX" incluirá todas las pequeñas moléculas, ligandos, polipéptidos y proteínas que tengan al menos la actividad biológica de unión específica a CA IX o a un epítipo de CA IX. Estos compuestos incluyen ligandos, receptores, péptidos o cualquier secuencia de aminoácidos que se una a CA IX o a al menos un epítipo de CA IX.

Los compuestos de la presente invención comprenden un compuesto que selecciona como diana CA IX, pueden unirse a una porción de la propia CA IX, o pueden unirse a una proteína o receptor de superficie celular que está asociado con CA IX.

Tal como se usa en el presente documento, "residuo hidrófobo extendido" incluirá restos o aminoácidos hidrófobos, tales como aminoácidos no polares neutros (hidrófobos) aminoácidos, tales como alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina o grupo aromático, grupo ciclohexilo, tirosina y derivados de los mismos; aminoácidos básicos (con carga positiva) tales como arginina, histidina y lisina y derivados de los mismos; aminoácidos polares neutros, tales como glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina y derivados de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento "espaciador hidrófobo" incluirá ácido seis-aminohectanoico (SAHA), ácido ocho-amino-octanoico (EAOA), polietilenglicol (PEG), unidad de polietilenamina (PEA), ácido N-amino-dPEG₂, una cadena de 6 átomos, un espaciador de 6 átomos de longitud, una cadena de desde 6 hasta 20 átomos de longitud; un péptido que comprende grupos arilo o aril-alquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido, y en el que un grupo arilo o aril-alquilo tiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos, y el otro grupo arilo o aril-alquilo tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 14, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 átomos.

Los términos "grupo funcional", "resto activo", "grupo de activación", "grupo saliente", "sitios reactivos", "grupo químicamente reactivo" y "resto químicamente reactivo" se usan en la técnica y en el presente documento para hacer

referencia a unidades o porciones definibles diferenciadas de una molécula. Los términos son en cierta medida sinónimos en las técnicas químicas y se usan en el presente documento para indicar las porciones de moléculas que realizan alguna función o actividad y son reactivas con otras moléculas.

5 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos que se producen de manera natural y que no se producen de manera natural, así como a análogos de aminoácido y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos que se producen de manera natural. Los aminoácidos codificados de manera natural son los 20 aminoácidos comunes (alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina) y pirolisina y selenocisteína. Los análogos de aminoácido se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural, es decir, un α -carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, tal como, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil-sulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (tales como norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce de manera natural.

Los aminoácidos pueden denominarse en el presente documento o bien mediante sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la comisión de nomenclatura bioquímica de IUPAC-IUB.

La presente invención aborda, entre otras cosas, problemas asociados con el diagnóstico temprano y el tratamiento quirúrgico de células que expresan CA IX implicadas en enfermedad y/o cáncer, y en particular conjugados de colorantes dirigidos a CA IX con propiedades mejoradas de obtención de imágenes, diagnóstico o biológicas incluyendo, como ejemplos no limitativos, especificidad superior, señal de fondo reducida y fluorescencia tumoral aumentada.

Descripción detallada

La cirugía cura al 50 % de los pacientes con tumores sólidos en los EE. UU., mientras que la quimioterapia y la radioterapia curan a menos del 5 % de todos los pacientes con cáncer. Más de 700.000 pacientes se someten a cirugía por cáncer cada año en los EE. UU. y el 40 % de los pacientes de cirugía presentan una recidiva de enfermedad local dentro del plazo de 5 años. A pesar de grandes avances en el campo de la oncología, sigue existiendo una necesidad de métodos de detección temprana para superar obstáculos para una resección quirúrgica completa del tumor primario con márgenes negativos, y extirpación de células cancerosas metastásicas e identificación de enfermedad satélite. Lograr estos tres objetivos no sólo mejora el aclaramiento de la enfermedad sino que también guía las decisiones referentes a quimioterapia y radiación posoperatoria. Aunque se ha mostrado que colorantes fluorescentes no dirigidos se acumulan de manera pasiva en algunos tumores, las razones de tumor con respecto a fondo resultantes son con frecuencia escasas y los límites entre tejidos maligno y sano pueden ser difíciles de definir. Aunque se han usado colorantes de fluorescencia dirigidos a ligando (por ejemplo, EC17: folato-EDA-FITC) para obtener imágenes de un tejido, estos colorantes han sido ineficaces ya que no penetran en profundidad en el tejido y, por tanto, sólo identifican las células específicas en la superficie de un tejido en vez de en profundidad dentro de la muestra tisular. Además, los colorantes basados en fluoresceína tienen las desventajas de una baja estabilidad de vida útil de almacenamiento. El puente de tiourea formado por compuestos de isotiocianato de fluorescencia (FITC) se descompone fácilmente haciendo que el compuesto sea inestable. Además, dado que EC17 usa fluoresceína, que tiene el inconveniente de un nivel relativamente alto de ruido de fondo no específico debido a colágeno en los tejidos que rodean al sitio de obtención de imágenes. Además, la absorción de luz visible por cromóforos biológicos, en particular hemoglobina, limita adicionalmente la utilidad de colorantes que incorporan fluoresceína. Por tanto, los colorantes convencionales no pueden detectar fácilmente tumores que pueden estar enterrados de manera más profunda que unos pocos milímetros en el tejido. Además, la fluorescencia debida a fluoresceína se extingue a pH bajo (por debajo de pH 5).

Para que un material colorante sea útil en la detección y el guiado de cirugía o proporcione detección de obtención de imágenes de tejido temprano, metastásico y otro, es importante superar estos inconvenientes. La presente invención proporciona el diseño y desarrollo de ligando dirigido a CA IX con resto hidrófobo extendido que usa una estructura cristalina de CA IX para aumentar la afinidad de unión y especificidad por CA IX. La presente invención proporciona conjugados dirigidos a CA IX de colorantes de infrarrojo cercano que son estables, emiten fluorescencia en el intervalo infrarrojo, penetran en profundidad dentro del tejido seleccionado como diana para producir una identificación específica y brillante de zonas de tejido que expresan CA IX, rápido aclaramiento de tejidos que no expresan CA IX para obtener una alta razón de tumor con respecto a fondo, y rápido aclaramiento de la piel. Más específicamente, los conjugados dirigidos a CA IX están vinculados a los colorantes de infrarrojo cercano a través de un grupo de unión que consiste en uno o más espaciadores atómicos, aminoácidos, derivados de aminoácidos y/o residuos hidrófobos. Incluso más específicamente, se ha encontrado que, cuando el espaciador atómico es un espaciador hidrófobo de 6 átomos con átomos neutros, hidrófobos o cargados y un espaciador de aminoácidos es un aminoácido aromático o un derivado de aminoácido aromático, o aminoácido con carga negativa o positiva y tirosina o un derivado de tirosina. La carga del grupo de unión puede hacerse variar para obtener un rápido aclaramiento de la piel y rápida acumulación en tumor para obtener una razón de tumor con respecto a fondo superior. Además, la intensidad de fluorescencia del

colorante de NIR se mantiene o incluso se potencia al tener el aminoácido aromático o tirosina o derivado de tirosina y la carga del colorante de NIR puede hacerse variar para lograr un rápido aclaramiento de la piel.

5 Esta divulgación proporciona ligandos dirigidos a CA IX unidos a colorantes de NIR y métodos para sintetizar los mismos. Esta divulgación también proporciona compuestos para su uso en la obtención de imágenes dirigida de tumores que expresan CA IX, incluyendo, pero sin limitarse a, riñón, endometrial, urinario, colorrectal, ovarios, mama, pancreático y esófago, y regiones hipóxicas de muchos tumores sólidos, y enfermedades relacionadas, y métodos de uso, por ejemplo, en la obtención de imágenes y cirugía que implica tumores y tejidos positivos para CA IX.

10 De esta manera, los compuestos de la presente divulgación pueden usarse para la identificación *in vivo* de tejido enfermo en un sujeto que lo necesita. El método de la divulgación incluye irradiar una parte del cuerpo *in vivo* del sujeto que contiene tejido enfermo con luz que tiene al menos una longitud de onda de excitación en el intervalo de infrarrojo cercano de desde aproximadamente 600 nm hasta aproximadamente 1000 nm. La fluorescencia que surge de un compuesto de la presente divulgación administrado al sujeto y que se ha unido específicamente a y/o se ha
15 captado por el tejido enfermo en la parte del cuerpo, en respuesta a la al menos una longitud de onda de excitación, se observa directamente para determinar la ubicación y/o área de superficie del tejido enfermo en el sujeto.

La luz que tiene un intervalo de longitud de onda de desde 600 nm hasta 850 nm se encuentra dentro del intervalo de infrarrojo cercano del espectro, a diferencia de la luz visible, que se encuentra dentro del intervalo de desde
20 aproximadamente 400 nm hasta aproximadamente 500 nm. Por tanto, la luz de excitación usada en la práctica de los métodos de diagnóstico de la divulgación contendrá al menos una longitud de onda de luz para iluminar el tejido a la longitud de onda de infrarrojo para excitar los compuestos con el fin de que la fluorescencia obtenida a partir de la zona que ha captado los compuestos de la presente divulgación sea claramente visible y distinta de la autofluorescencia del tejido circundante. La luz de excitación puede ser monocromática o policromática. De esta
25 manera, los compuestos de la presente divulgación son ventajosos ya que eliminan la necesidad de usar mecanismos de filtrado que se usarán para obtener una imagen de diagnóstico deseada si la sonda fluorescente es una que emite fluorescencia a longitudes de onda por debajo de aproximadamente 600 nm. De esta manera, los compuestos de la presente divulgación evitan imágenes de diagnóstico oscurecidas que se producen como resultado de luz de excitación de longitudes de onda que se reflejarán a partir de tejido sano y provocan pérdida de resolución de la imagen
30 fluorescente.

Los laboratorios de diagnóstico, consultas de médicos y quirófanos para procedimientos quirúrgicos pueden estar equipados con una luz superior que produce longitudes de onda de luz en el espectro de emisión óptico útil en la
35 práctica de los métodos de diagnóstico de la divulgación, tales como lámparas que producen luz en la longitud de onda apropiada. Una luz de este tipo puede usarse en la práctica de los métodos de diagnóstico de la divulgación simplemente apagando las demás luces del quirófano (para eliminar luz externa que se reflejará de manera visible a partir de tejido en la parte del cuerpo que está investigándose) e iluminando la luz de excitación de longitud de onda de infrarrojo cercano en la cavidad corporal o abertura quirúrgicamente creada de modo que la imagen fluorescente recibida directamente a simple vista por el observador (por ejemplo, el cirujano) es predominantemente la imagen
40 fluorescente que surge del/de los fluoróforo(s) en el campo de visión. La luz que surge de una fuente en el intervalo de 600 nm y 850 nm, preferiblemente el intervalo de 750 nm-850 nm, se usará para lograr el objetivo de visualización directa por el observador de modo que se minimiza o elimina la luz que refleja a partir de la parte del cuerpo, distinta de la del/de los resto(s) fluorescente(s).

45 Por consiguiente, el tejido enfermo (y el constructo de direccionamiento unido o captado) se “expone” a la luz de excitación (por ejemplo, mediante una abertura quirúrgicamente creada o administración endoscópica de la luz a una ubicación interior). La divulgación de estos métodos de obtención de imágenes es particularmente adecuada para la detección *in vivo* de tejido enfermo ubicado en un sitio interior en el sujeto, tal como dentro de una cavidad corporal natural o una abertura quirúrgicamente creada, en la que el tejido enfermo está “a la vista” (es decir, expuesto al ojo humano) para facilitar un procedimiento de biopsia o una escisión quirúrgica de la zona que se ha destacado por la
50 captación de los compuestos de la presente divulgación. Dado que la ubicación precisa y/o área de superficie del tejido enfermo o inflamado se determinan fácilmente mediante la captación de los compuestos de la presente divulgación, los métodos que emplean los compuestos de la presente divulgación proporcionan una guía valiosa para patólogos, inmunólogos, técnicos y cirujanos por igual, que necesitan “ver” en tiempo real los contornos exactos, tamaño, etc., de la masa de las zonas inflamadas para el diagnóstico y la obtención de imágenes y, si es necesario, cirugía.

Por tanto, la presente divulgación conlleva la obtención de imágenes ópticas de un tejido biológico que expresa una CA IX mediante administración a un paciente que tiene cáncer poniendo en contacto el tejido con una composición que comprende una cantidad eficaz de compuestos de la presente divulgación (por ejemplo, compuestos de los
60 ejemplos en el presente documento) y dejando tiempo para que el compuesto en la composición se distribuya dentro del tejido e interaccione con el sitio de receptor de folato. Tras haber transcurrido un tiempo suficiente para tal interacción, se ilumina el tejido con una luz de excitación para hacer que el compuesto en la composición emita fluorescencia. Después se detecta la fluorescencia y donde se observa tal fluorescencia es una zona que contiene CA IX.

65

De manera similar, los compuestos de la presente divulgación se usan para identificar un tipo de célula diana en una muestra biológica poniendo en contacto la muestra biológica con tales compuestos durante un tiempo y en condiciones que permiten la unión del compuesto a al menos una célula del tipo de célula diana. Después se detecta ópticamente el compuesto unido de tal manera que la presencia de fluorescencia de la longitud de onda de infrarrojo cercano que surge del compuesto dirigido unido de la presente divulgación indica que el tipo de célula diana está presente en la muestra biológica. Por tanto, este método proporciona una imagen del tipo de célula seleccionado como diana en el tejido que está evaluándose. Lo más preferiblemente, el tipo de célula seleccionado como diana es una célula cancerosa, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer de cerebro, mama, cuello uterino, rectal o de pulmón que también presentan altos niveles de CA IX.

La vía de administración más adecuada de una cantidad eficaz de los compuestos conjugados dados a conocer en el presente documento variará dependiendo del estado patológico que va a tratarse, o la ubicación del estado sospechado que va a diagnosticarse. Esto incluye, pero no se limita a, por vía parental, por ejemplo, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa. En otras realizaciones, el conjugado puede administrarse al paciente mediante otros procedimientos médicamente útiles, y puede usarse cualquier dosis eficaz y forma de dosificación terapéutica adecuada, incluyendo formas de dosificación de liberación prolongada. De manera ilustrativa, el método descrito en el presente documento puede usarse en combinación con terapias biológicas tales como otras terapias o estrategias terapéuticas tales como cirugía, radioterapia y/o quimioterapias. Por ejemplo, para el tratamiento de estados cancerosos, la administración local, incluyendo administración mediante inyección directamente en la parte del cuerpo que va a irradiarse con la luz de excitación (por ejemplo, de manera intracavitaria) proporciona la ventaja de que el constructo de direccionamiento (por ejemplo, anticuerpos marcados de manera fluorescente) puede administrarse en una alta concentración sin riesgo de las complicaciones que pueden acompañar a la administración sistémica del mismo. Sin embargo, también pueden preverse aplicaciones oral, tópica y parenteral.

Estos métodos proporcionan ventajosamente un método mejorado de realización de diagnóstico y tratamiento guiado por imágenes de cáncer en un sujeto ya que la administración de una composición que comprende el compuesto de la divulgación, en condiciones y durante un tiempo suficiente para que se acumule dicho compuesto en un sitio de tejido dado, ayudarán a un médico a visualizar el tejido que va a tratarse.

Si el sitio enfermo supuesto es una cavidad corporal natural o un sitio interior quirúrgicamente producido, opcionalmente puede usarse un dispositivo endoscópico para suministrar la luz de excitación al sitio, para recibir fluorescencia que surge del sitio dentro de la cavidad corporal, y para ayudar en la formación de una imagen directa de la fluorescencia a partir del tejido enfermo. Por ejemplo, puede usarse una lente en el dispositivo endoscópico para enfocar la fluorescencia detectada como ayuda en la formación de la imagen. Tal como se usa en el presente documento, se dice que tal fluorescencia suministrada por endoscopio se "observa directamente" por el profesional y el tejido al que se une el constructo de direccionamiento o en el que se capta debe estar "a la vista" para el endoscopio dado que la luz usada en el procedimiento de diagnóstico de la divulgación no contendrá longitudes de onda de luz que penetran en el tejido, tales como longitudes de onda en el intervalo de infrarrojo cercano. Alternativamente, la luz de excitación puede dirigirse mediante cualquier medio conveniente al interior de una cavidad corporal o abertura quirúrgica que contiene un constructo de direccionamiento administrado tal como se describe en el presente documento y la imagen fluorescente así producida puede visualizarse directamente a simple vista por el observador sin ayuda de un endoscopio. Con o sin ayuda de ningún tipo de dispositivo endoscópico, la imagen fluorescente producida por el método de la divulgación es de tal manera que puede observarse sin ayuda de un dispositivo de procesamiento de imágenes, tal como una cámara de CCD, monitor de TV, dispositivo de recogida de fotones y similares.

Se contempla que los métodos de diagnóstico u obtención de imágenes de la presente divulgación permiten al cirujano/profesional observar/ver/visualizar simultáneamente tejido enfermo o anómalo a través de una abertura quirúrgica para facilitar un procedimiento de biopsia o escisión quirúrgica. Dado que la ubicación y/o área de superficie del tejido enfermo se determinan fácilmente mediante el procedimiento de diagnóstico de la divulgación que emplea los compuestos descritos en el presente documento, el método de la divulgación es una guía valiosa para el cirujano, que necesita conocer los contornos exactos, tamaño, etc., de la masa, por ejemplo, para la resección a medida que avanza la cirugía. En particular, se observa que los compuestos de la divulgación emiten fluorescencia en el intervalo de infrarrojo cercano hasta una intensidad mayor que los anteriormente descritos. Como tal, ventajosamente, se contempla que se necesitará menos cantidad del compuesto para lograr una obtención de imágenes de diagnóstico. Además, los compuestos de la presente divulgación penetran en profundidad en el tejido y, por tanto, la divulgación permite ventajosamente una mayor precisión de que se toma el transcurso apropiado de tratamiento del cáncer.

En algunos casos, se usa un único tipo de resto fluorescente para generar fluorescencia que surge de la parte del cuerpo irradiada (es decir, del constructo de direccionamiento fluorescente que se une a, o se capta por, tejido enfermo) y someter el constructo de direccionamiento a una fuente de luz del espectro de infrarrojo cercano.

En otros casos, se contempla que se usa una pluralidad de (es decir, dos, tres, cuatro o más) constructos de direccionamiento para obtener una imagen de diagnóstico. Tales constructos de direccionamiento adicionales pueden ser compuestos adicionales de la presente divulgación distintos del primer compuesto de este tipo. Alternativamente, los constructos de direccionamiento adicionales pueden comprender los colorantes descritos en el presente

documento pero sustituyéndose el derivado de acetoazolamida por un ligando para otro receptor distinto de CA IX. En todavía otras realizaciones, los restos de direccionamiento adicionales pueden ser otros constructos de direccionamiento que emiten fluorescencia (por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos biológicamente activos de los mismos, que tienen fluoróforos unidos) que se unen a otros receptores o antígenos en el tumor o tejido del que van a obtenerse imágenes. Puede usarse cualquier resto de direccionamiento adicional que selecciona específicamente como diana el tumor o sitio específico en el tejido, siempre que sea específico para el sitio que va a monitorizarse. El propósito del constructo de direccionamiento que emite fluorescencia adicional es aumentar la intensidad de fluorescencia en el sitio que va a monitorizarse ayudando de ese modo a la detección de tejido enfermo o anómalo en la parte del cuerpo. Por ejemplo, un tejido enfermo dado puede tener numerosos marcadores y, además de los compuestos de la presente divulgación, se proporciona un cóctel de restos fluorescentes que son específicos para ese sitio dado de tal manera que la señal que surge del tejido se genera por más de un compuesto o resto fluorescente que ha seleccionado como diana, y se ha localizado en, el sitio de tejido de interés.

En la práctica, el experto administrará un compuesto de la presente divulgación o bien solo o bien como parte de un cóctel de restos detectables de direccionamiento y dejará que estos compuestos y restos de direccionamiento se unan a, y/o se capten por, cualquier tejido seleccionado como diana que pueda estar presente en el sitio que está investigándose y después proporcionará un suministro de la fuente de luz. Normalmente, los compuestos de la presente divulgación y cualquier resto de direccionamiento adicional se administrará antes de la cirugía durante un tiempo y en composiciones que permiten que los compuestos fluorescentes de la presente divulgación así como cualquier constructo fluorescente adicional se capten por el tejido diana.

Los expertos en la técnica podrán diseñar combinaciones de constructos de direccionamiento que emiten fluorescencia administrados de manera sucesiva, cada uno de los cuales se une específicamente al sitio diana. Es preferible que todos los constructos de direccionamiento que emiten fluorescencia usados en tales cócteles para identificar el tejido diana comprendan fluoróforos que emiten fluorescencia dentro de la misma banda de longitud de onda o a la misma wave longitud que el compuesto de la presente divulgación (por ejemplo, una fluorescencia sensible a la longitud de onda de luz de infrarrojo cercano en los compuestos de la presente divulgación) para minimizar el número de fuentes de luz diferentes que se necesita emplear para excitar fluorescencia simultánea a partir de la totalidad de los diferentes constructos de direccionamiento usados en la práctica del método de la divulgación. Sin embargo, se contempla que los restos de direccionamiento adicionales distintos de los compuestos de la presente divulgación pueden emitir fluorescencia en respuesta a la luz de irradiación a un color diferente (es decir, tienen una longitud de onda diferente) del de los compuestos fluorescentes de la presente divulgación. La diferencia en los colores de la fluorescencia que surge de los compuestos de la presente divulgación y la de los compuestos de direccionamiento adicionales puede ayudar al observador a determinar la ubicación y el tamaño del tejido enfermo. En algunos ejemplos, puede ser deseable incluir fluoróforos en constructos de direccionamiento dirigidos para seleccionar como diana tejido normal y los compuestos de la presente divulgación para seleccionar como diana tejido enfermo de tal manera que se potencia adicionalmente el contraste entre el tejido enfermo y el tejido normal para ayudar adicionalmente al observador a determinar la ubicación y el tamaño del tejido diana. El uso de tales fluoróforos adicionales y agentes de direccionamiento además de los compuestos de la presente divulgación proporciona la ventaja de que cualquier fluorescencia natural que surge de tejido normal se oculta por la fluorescencia que surge del/de los fluoróforo(s) en constructos de direccionamiento complementarios dirigidos al tejido normal en la parte del cuerpo. Cuanto mayor es la diferencia en el color entre la fluorescencia que surge de tejido normal y diana, más fácil es para el observador visualizar los contornos y el tamaño del tejido diana. Por ejemplo, dirigir un constructo de direccionamiento que emite fluorescencia que comprende un fluoróforo que produce luz infrarroja a partir de los compuestos de la presente divulgación al tejido diana (es decir, tejido anómalo) y un fluoróforo que produce luz verde a tejido sano ayuda al observador a distinguir el tejido diana del tejido normal. Los expertos en la técnica pueden seleccionar fácilmente una combinación de fluoróforos que presentan un contraste de color visual marcado.

El espectro de luz usado en la práctica del método de la divulgación se selecciona para contener al menos una longitud de onda que corresponde a la longitud de onda de excitación predominante del constructo de direccionamiento, o de un resto que emite fluorescencia biológicamente compatible contenido dentro del constructo de direccionamiento. Generalmente, la luz de excitación usada en la práctica del método de la divulgación comprende al menos una longitud de onda de excitación de luz en el intervalo de longitud de onda de infrarrojo cercano de desde aproximadamente 600 nm hasta aproximadamente 850 nm.

Sin embargo, cuando se usa una combinación de ligandos de direccionamiento que emiten fluorescencia a longitudes de onda diferentes en la práctica de la divulgación, el espectro de la luz de excitación debe ser lo suficientemente amplio como para proporcionar al menos una longitud de onda de excitación para cada uno de los fluoróforos usados. Por ejemplo, resulta particularmente beneficioso cuando se seleccionan fluoróforos de colores diferentes para distinguir tejido normal de enfermo, que el espectro de excitación de la(s) luz/luces incluya longitudes de onda de excitación para los fluoróforos dirigidos a tejido normal y diana.

Tal como se indica en el presente documento, los compuestos de la presente divulgación se dirigen específicamente a CA IX mediante un derivado de acetoazolamida que forma parte de los compuestos de la presente divulgación. En realizaciones en las que se usa un resto de direccionamiento adicional, el constructo de direccionamiento de un resto de direccionamiento adicional de este tipo se selecciona para unirse a, y/o captarse específicamente por, el tejido de

interés diana, por ejemplo a un antígeno u otra característica de superficie contenida sobre o dentro de una célula que caracteriza a un estado patológico o anómalo en el tejido diana. Como en otros ensayos de diagnóstico, es deseable que el constructo de direccionamiento se una a, o se capte por, el tejido diana de manera selectiva o a un antígeno asociado con el estado patológico o anómalo; sin embargo, pueden usarse constructos de direccionamiento que contienen restos de ligando que también se unen a, o se captan por, estructuras de tejidos o células sanas en la práctica del método de la divulgación siempre que la concentración del antígeno en el tejido diana o la afinidad del constructo de direccionamiento por el tejido diana sea suficientemente mayor que para tejido sano en el campo de visión, de modo que pueda visualizarse claramente una imagen fluorescente que representa el tejido diana como distinta de cualquier fluorescencia procedente de tejido o estructuras sanas en el campo de visión.

El estado patológico o anómalo detectado por el método de la divulgación puede ser cualquier tipo caracterizado por la presencia de un tejido diana conocido para el que se conoce un ligando de unión específico. Se contempla que el tejido diana puede estar caracterizado por células que producen o bien un antígeno de superficie para el que se conoce un ligando de unión, o bien un marcador intracelular (es decir, antígeno), dado que muchos constructos de direccionamiento penetran en la membrana celular. Los estados patológicos representativos que pueden identificarse usando el método de la divulgación incluyen diversos estados tales como diferentes tipos de tumores, infecciones bacterianas, fúngicas y virales, y similares. Tal como se usa en el presente documento, el tejido "anómalo" incluye estados precancerosos, tejido necrótico o isquémico, y tejido asociado con estados precancerosos así como cáncer, y similares. Además, los ejemplos de los tipos de tejido diana adecuado para el diagnóstico o examen usando el método de la divulgación incluyen cerebro, mama, cuello uterino, rectal, pulmón y similares, así como combinaciones de dos o más cualesquiera de los mismos.

Simplemente a modo de ejemplo, los expertos en la técnica conocen antígenos para algunos tumores malignos comunes y las ubicaciones del cuerpo en las que se encuentran habitualmente, y en la técnica se conocen ligandos de direccionamiento, tales como anticuerpos o para esos antígenos o de hecho ligandos en los que los antígenos son receptores.

Los constructos de direccionamiento y constructos de direccionamiento complementarios usados en la práctica del método de la divulgación pueden administrarse mediante cualquier vía conocida por los expertos en la técnica, tal como por vía tópica, intraarticular, intracisternal, intraocular, intraventricular, intratecal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, intratraqueal, intracavitaria y similares, así como mediante cualquier combinación de dos o más cualesquiera de las mismas.

La vía de administración más adecuada variará dependiendo del estado patológico que va a tratarse, o la ubicación del estado o tumor sospechado que va a diagnosticarse. Por ejemplo, para obtener imágenes de estados inflamatorios y diversos tumores, la administración local, incluyendo administración mediante inyección directamente en la parte del cuerpo que va a irradiarse con la luz de excitación (por ejemplo, de manera intracavitaria) proporciona la ventaja de que el constructo de direccionamiento (por ejemplo, anticuerpos marcados de manera fluorescente) puede administrarse en una alta concentración sin riesgo de las complicaciones que pueden acompañar a la administración sistémica del mismo.

Los compuestos de la presente divulgación, así como cualquier constructo de direccionamiento adicional usado en cócteles de diagnóstico que comprenden los compuestos de la presente divulgación, se administran en una "cantidad eficaz" para el diagnóstico. Una cantidad eficaz es la cantidad de un constructo de direccionamiento necesaria para ayudar a la visualización directa de cualquier tejido diana ubicado en la parte del cuerpo que está investigándose en un sujeto. Se contempla que un "sujeto", tal como se usa el término en el presente documento, incluye cualquier mamífero, tal como una mascota domesticada, animal de granja o animal de zoológico, pero preferiblemente es un ser humano. Evidentemente, las cantidades eficaces para el diagnóstico dependerán del tamaño y la ubicación de la parte del cuerpo que va a investigarse, la afinidad del constructo de direccionamiento por el tejido diana, el tipo de tejido diana, así como la vía de administración. La administración local del constructo de direccionamiento requerirá normalmente una dosificación menor que cualquier modo de administración sistémica, aunque, en algunos casos, la concentración local del constructo de direccionamiento puede ser superior tras la administración local de lo que puede lograrse con seguridad tras la administración sistémica.

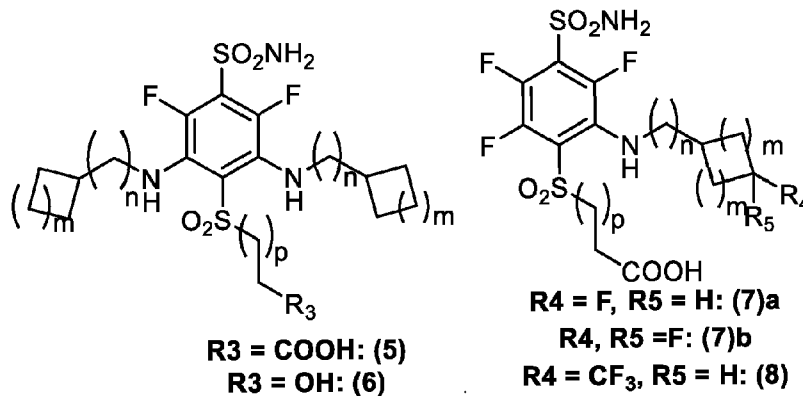
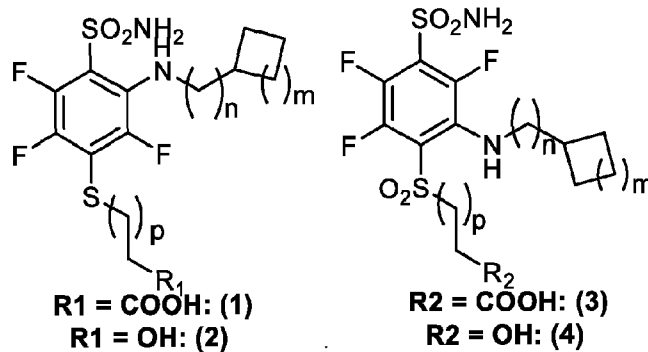
Una cantidad eficaz del compuesto conjugado que va a administrarse dependerá del estado del paciente, incluyendo estados quirúrgicos tales como pérdida de sangre, el estado patológico que está tratándose, el peso molecular del conjugado, su vía de administración y distribución tisular, y la posibilidad de uso conjunto con tratamientos terapéuticos tales como radioterapia, o radioterapia con quimioterapias. La cantidad eficaz que va a administrarse a un paciente se basa en el área de superficie corporal, peso del paciente y evaluación por parte del médico del estado del paciente. En diversas realizaciones a modo de ejemplo, una cantidad de dosis eficaz puede realizarse con o sin un excipiente/portador, incluyendo, pero sin limitarse a, solución salina. Dado que los sujetos individuales pueden presentar una amplia variación en cuanto a la intensidad de los síntomas y cada constructo de direccionamiento tiene sus características de diagnóstico únicas, incluyendo afinidad del constructo de direccionamiento por la diana, tasa de aclaramiento del constructo de direccionamiento mediante procesos corporales, las propiedades del fluoróforo contenido en el mismo y similares, el experto sopesará los factores y hará variar las dosificaciones en consecuencia.

Los compuestos de la presente divulgación, así como cócteles que comprenden estos compuestos, pueden formularse como una suspensión inyectable estéril según métodos conocidos usando agentes de suspensión y agentes de dispersión o humectación adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como disolución en 1,4-butanodiol. Los aceites estériles, fijos, se emplean convencionalmente como medio disolvente o de suspensión. Con este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo insípido, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos, ácidos grasos (incluyendo ácido oleico), aceites vegetales que se producen de manera natural tales como aceite de sésamo, aceite de coco, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, etc., o vehículos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, o similares. Pueden incorporarse tampones, conservantes, antioxidantes y similares según se requiera o, alternativamente, pueden comprender la he formulación.

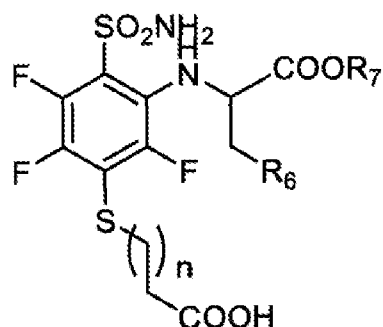
Los siguientes ejemplos simplemente se proporcionan con el fin de ilustrar realizaciones particulares de la divulgación y no se pretende que limiten el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Tal como se comenta en el presente documento, características particulares de los compuestos y métodos dados a conocer pueden modificarse de diversas maneras que no son necesarias para el funcionamiento o las ventajas que proporcionan. Por ejemplo, los compuestos pueden incorporar una variedad de aminoácidos y derivados de aminoácidos así como ligandos de direccionamiento dependiendo del uso particular para el que se empleará el compuesto. Un experto en la técnica apreciará que tales modificaciones quedan abarcadas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Los compuestos de la presente invención tienen la forma: B-W-X-Y-Z

en la que B es una molécula dirigida a CA IX seleccionada del grupo que consiste en una molécula pequeña, ligando, inhibidor, agonista, ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sufonil)propiónico (C-SPA),



25



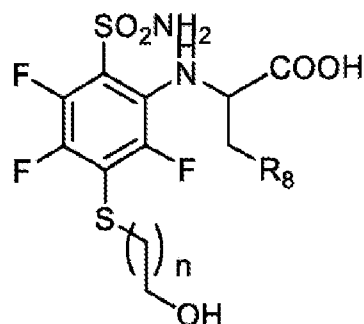
R6 = p-Ph, R7 = Bz: (9)

R6 = CH(CH₃)₂, R7 = Bz: (10a)

R6 = CH(CH₃)₂, R7 = H: (10b)

R6 = Imidazol, R7 = Bz: (11)

R6 = Indol, R7 = Bz: (12)

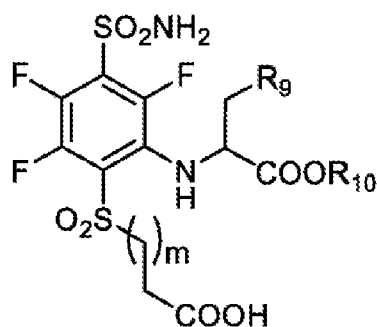


R8 = p-Ph: (13)

R8 = CH(CH₃)₂: (14)

R8 = Imidazol: (15)

R8 = Indol: (16)



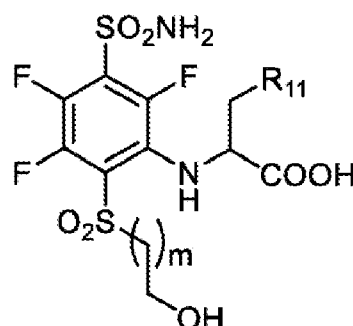
R9 = p-Ph, R10 = H: (17)

R9 = CH(CH₃)₂, R10 = H: (18a)

R9 = CH(CH₃)₂, R10 = Bz: (18b)

R9 = Imidazol, R10 = H: (19)

R9 = Indol, R = H: (20)

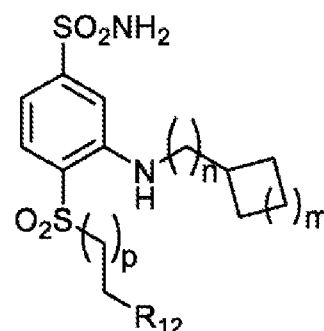


R11 = p-Ph: (21)

R11 = CH(CH₃)₂: (22)

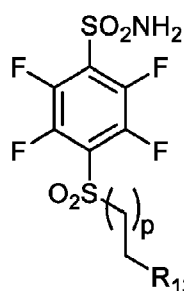
R11 = Imidazol: (23)

R11 = Indol: (24)



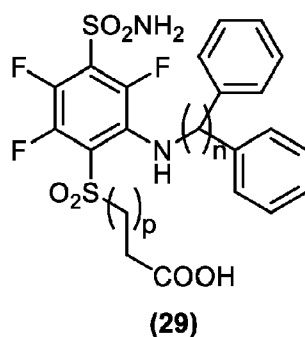
R12 = COOH: (25)

R12 = OH: (26)

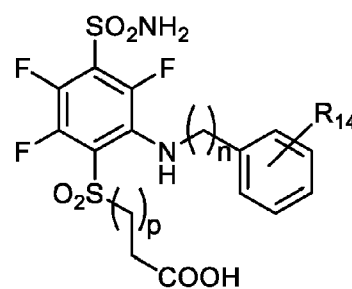


R13 = COOH: (27)

R13 = OH: (28)



(29)

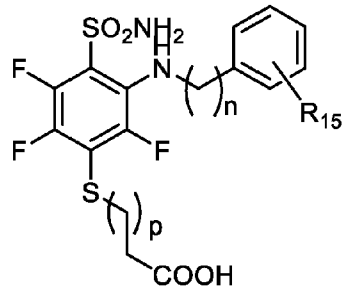


R14 = H: (30)

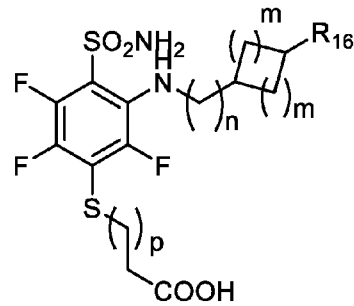
R14 = F: (31)

R14 = CF₃: (32)

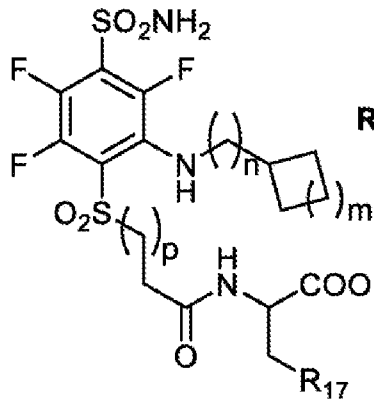
R14 = p-Ph: (33)



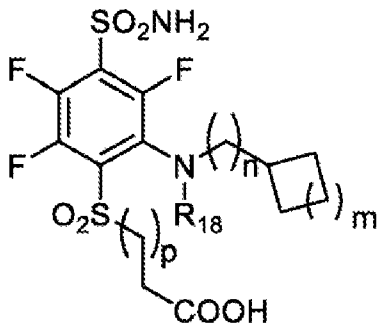
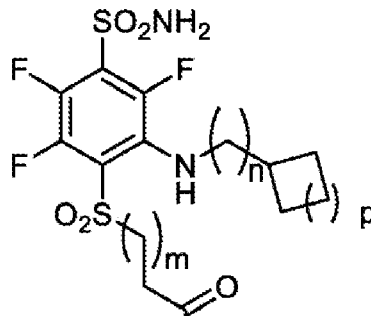
- R15 = F: (34)**
- R15 = CF₃: (35)**
- R15 = p-Ph: (36)a**
- R15 = H: (36)b**



- R16 = F: (37)**
- R16 = CF₃: (38)**



- R17 = COOH: (39)**
- R17 = (CH₂)₂Guanidinio: (40)**
- R17 = p-Ph: (41)**
- R17 = Imidazol: (42)**
- R17 = Indol: (43)**
- R17 = CH(CH₃)₂: (44)**
- R17 = CH(CH₂CH₃)CH₃: (45)**



- R18 = Guanidinio: (47) ; y**

5

en las que n es 1, 2 o 3, m es 0, 1, 2 o 3, y p es 0, 1, 2 o 3;

W es un residuo hidrófobo extendido;

10

X es un espaciador hidrófobo;

Y es un espaciador de aminoácidos; y

Z es un colorante de NIR.

W es preferiblemente un aminoácido hidrófobo, seleccionado del grupo que consiste en Phe, Val, Leu, Ile, Trp, His, Arg, Lys, Asp, Glu, aminoácidos no polares neutros incluyendo alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina o grupo aromático, grupo ciclohexilo, tirosina, aminoácidos básicos (con carga positiva) tales como arginina, histidina y lisina; aminoácidos polares neutros, tales como glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; o un aminoácido aromático, o un resto hidrófobo.

X se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un grupo de unión hidrófobo, ácido ocho-aminooctonoico (EAOA), polietilenglicol (PEG), polietilenamina (PEA) y ácido N-amino-dPEG₂, ácido seis-aminohectanoico (SAHA), ácido ocho-aminooctonoico (EAOA), polietilenglicol (PEG), unidad de polietilenamina (PEA), un péptido que comprende aminoácidos con carga positiva (por ejemplo Arg, Lys, Orn) o aminoácido que contiene amina cuaternaria, una cadena de 6 átomos, un espaciador de 6 átomos de longitud, una cadena de desde 6 hasta 20 átomos de longitud, y un péptido que comprende grupos arilo o aril-alquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido, y en el que un grupo arilo o aril-alquilo tiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos, y el otro grupo arilo o aril-alquilo tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 14, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 átomos, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos.

Y se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en:

aminoácidos aromáticos;

un espaciador de aminoácidos con un grupo de cadena lateral que contiene calcógeno o un grupo de cadena lateral que contiene azufre;

un espaciador de aminoácidos con un resto tiofenol que contiene azufre;

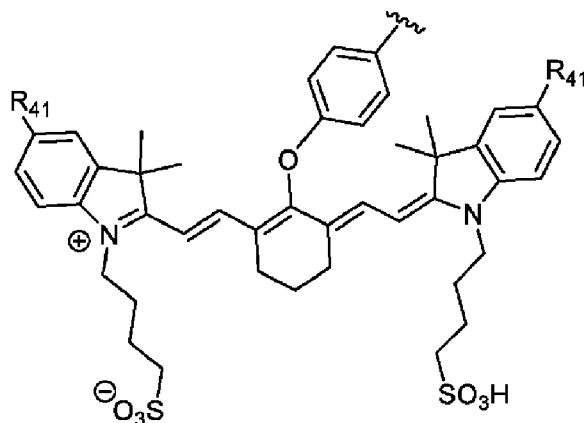
aminoácidos ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido aspártico y ácido glutámico;

aminoácidos básicos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina y lisina;

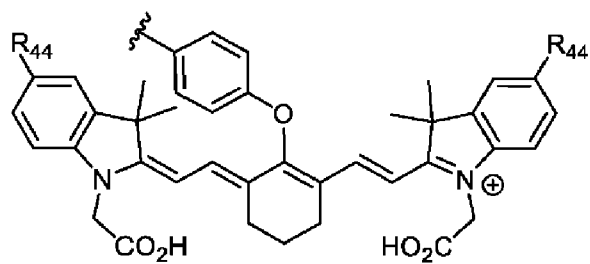
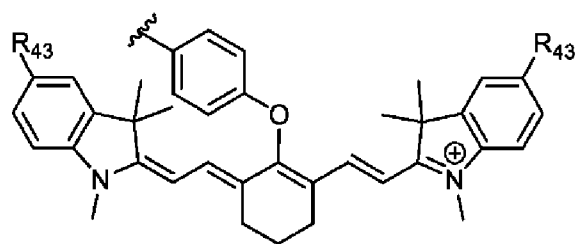
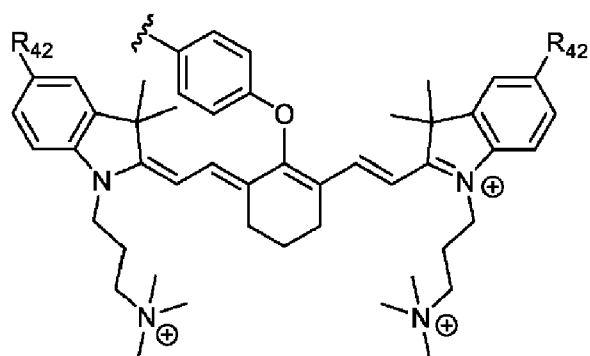
aminoácidos polares neutros seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; y

aminoácidos no polares neutros seleccionados del grupo que consiste en alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina.

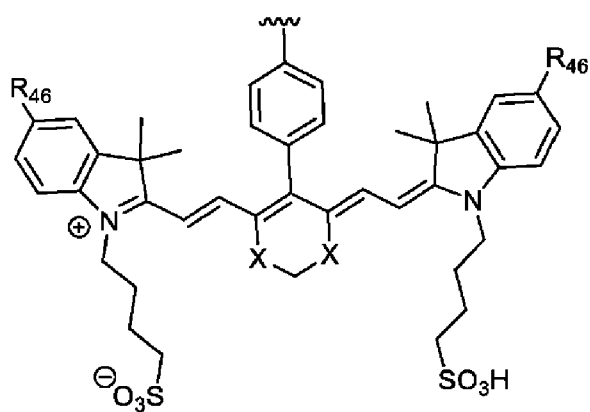
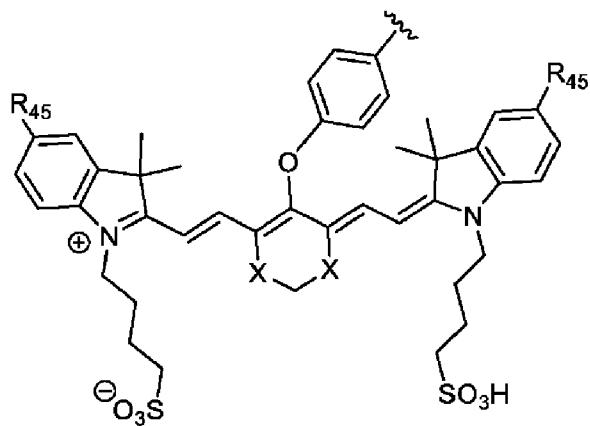
En algunas realizaciones, Z se selecciona del grupo que consiste en LS288, IR800, SP054, S0121, KODAK, S2076, S0456,

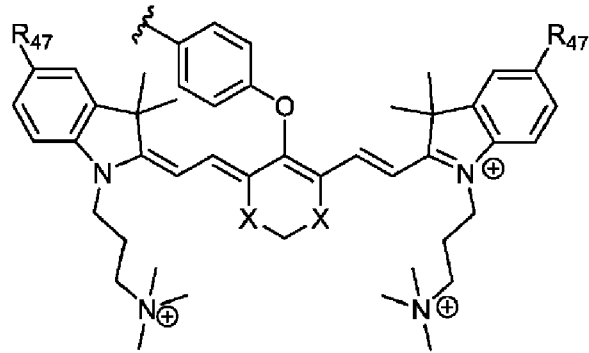


45

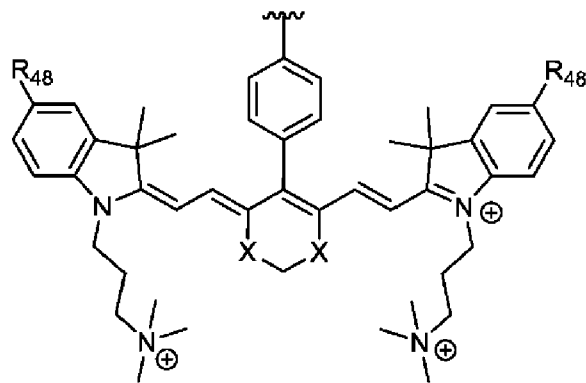


5





y



5

en los que R₄₁, R₄₂, R₄₃, R₄₄, R₄₅, R₄₆, R₄₇, R₄₈, = H o SO₃H; X = O, S o N.

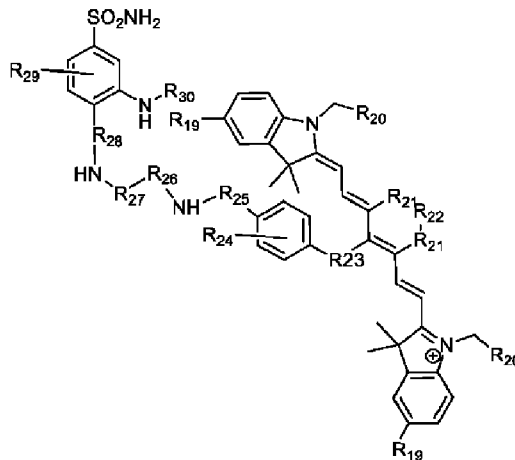
Preferiblemente, B comprende ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sufonil)propiónico (C-SPA);

10 X se selecciona del grupo que consiste en EAOA, PEG y PEA;

Y se selecciona del grupo que consiste en tirosina, fenilalanina-tirosina, fenilalanina-arginina-tirosina e histidina-tirosina;

15 y Z comprende S0456.

La presente invención también se refiere a un compuesto que tiene la fórmula estructural:



20

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o isótopos del mismo, en la que:

R₁₉ representa un hidrógeno o SO₃H;

25 R₂₀ representa un hidrógeno, CH₃, C₃H₆SO₃⁻, C₃H₆SO₃H o C₄H₈SO₃⁻, o C₄H₈SO₃H o C₃H₆N⁺(CH₃)₃;

R₂₁ representa un carbono, opcionalmente uno o más enlaces compartidos,

R₂₂ representa un carbono con opcionalmente uno o más enlaces compartidos;

R₂₃ representa nitrógeno, oxígeno o azufre o ningún átomo (enlace C-C directo entre el anillo aromático y el anillo de vinilo);

R₂₄ es opcional y, cuando está presente, representa un grupo de sustitución aromático para potenciar las propiedades espectrales tal como aumentar el brillo y la estabilidad del puente de vinil éter;

R₂₅ es opcional y, cuando está presente, representa grupos de unión con aminoácidos aromáticos tales como Phe, Trp, His, aminoácidos catiónicos tales como Arg, Lys, aminoácidos aniónicos tales como Asp, Glu, aminoácidos no naturales de ácidos aromáticos/catiónicos/aniónicos;

R₂₆ es opcional y, cuando está presente, representa una cadena de carbono lineal, o grupo de unión de polietilenglicol, grupo de unión catiónico;

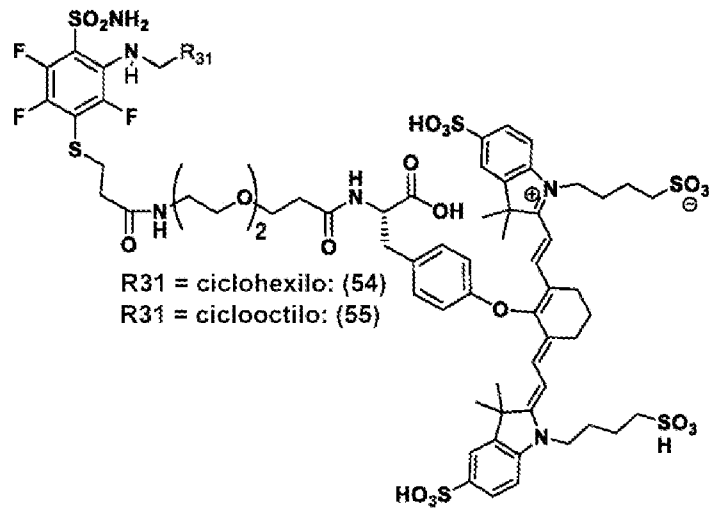
R₂₇ es opcional y, cuando está presente, representa un resto hidrófobo tal como Phe, Val, Leu, Ile, Trp, His, Arg, Lys, Asp, Glu;

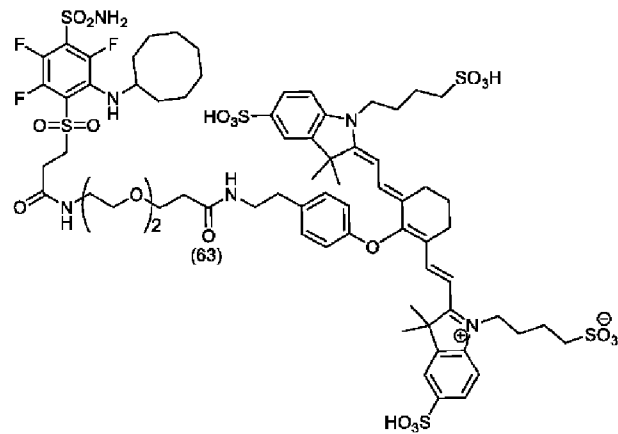
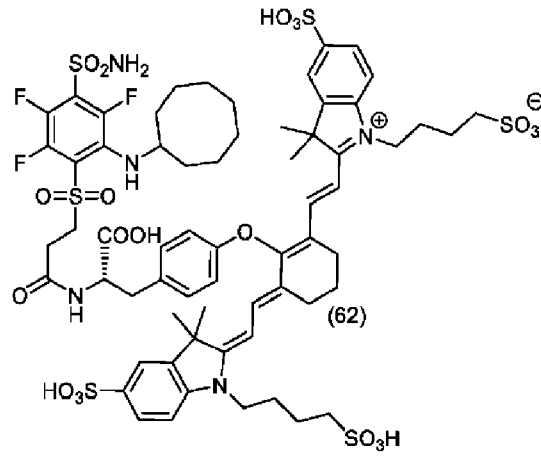
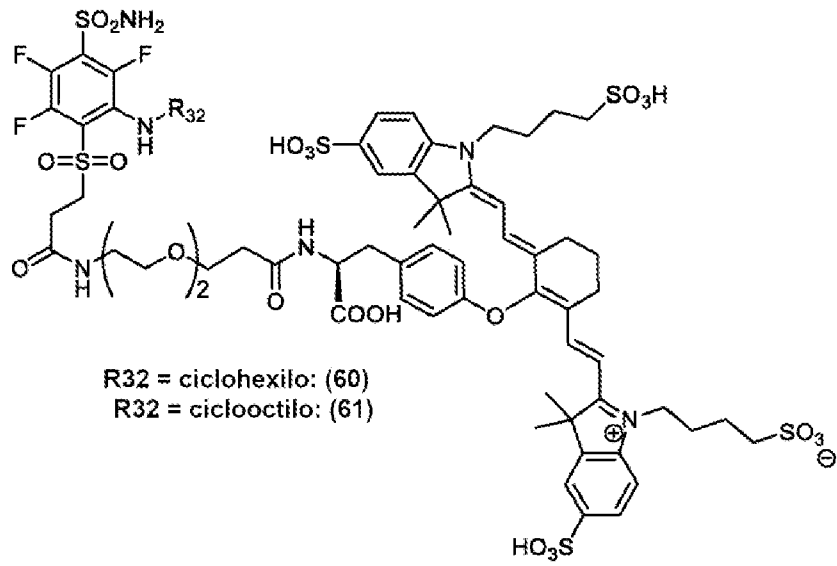
R₂₈ representa un grupo de unión hidrófobo; y

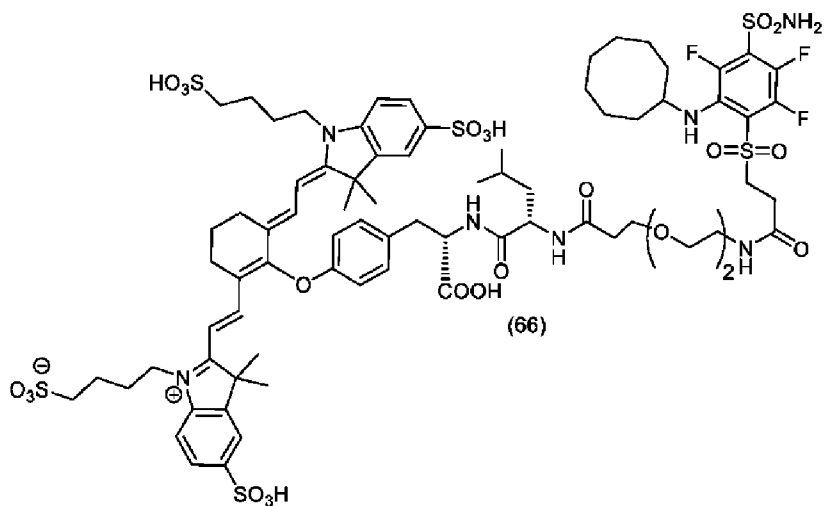
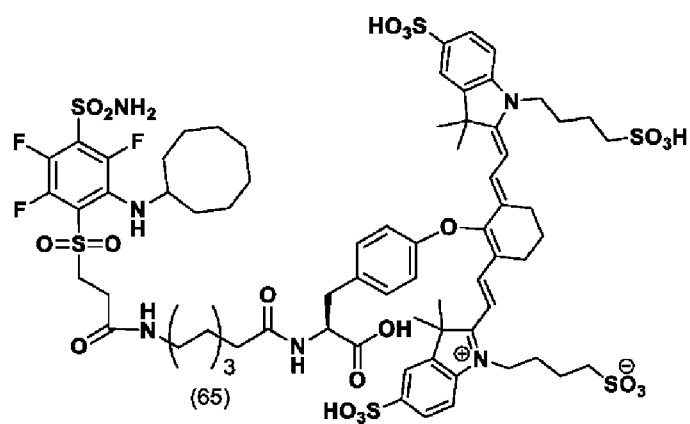
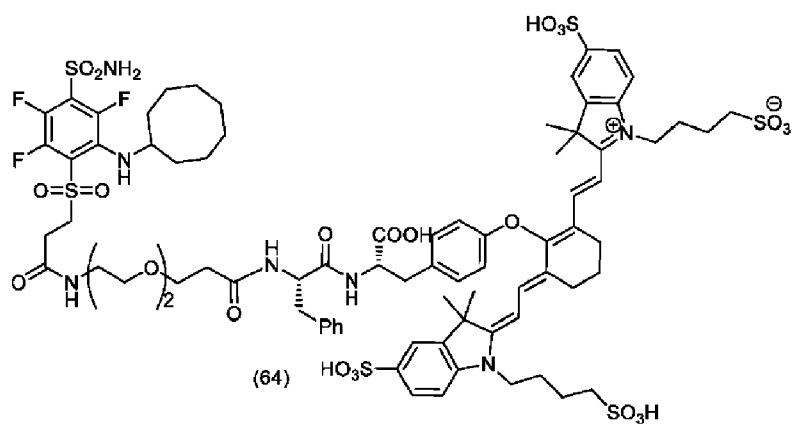
R₂₉ es opcional y, cuando está presente, representa un grupo de sustitución aromático para potenciar la afinidad de unión, estabilidad, hidrofobia de la molécula tal como F, NO₂ o de los mismos,

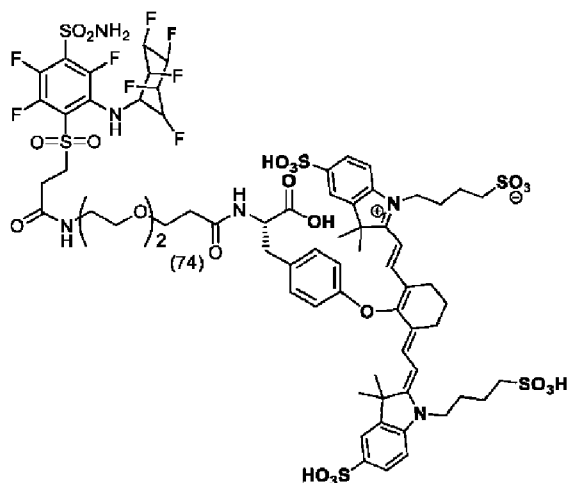
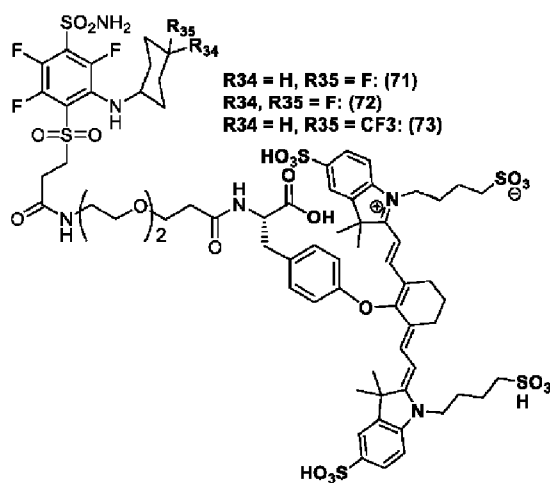
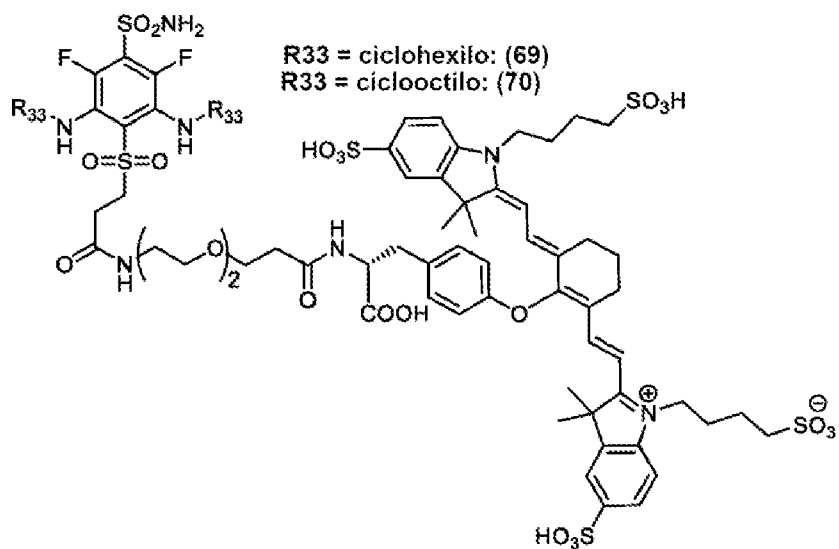
R₃₀ es opcional y, cuando está presente, representa un resto hidrófobo tal como Phe, Val, Leu, Ile, Trp, His, o resto cíclico tal como ciclohexilo, ciclooctilo.

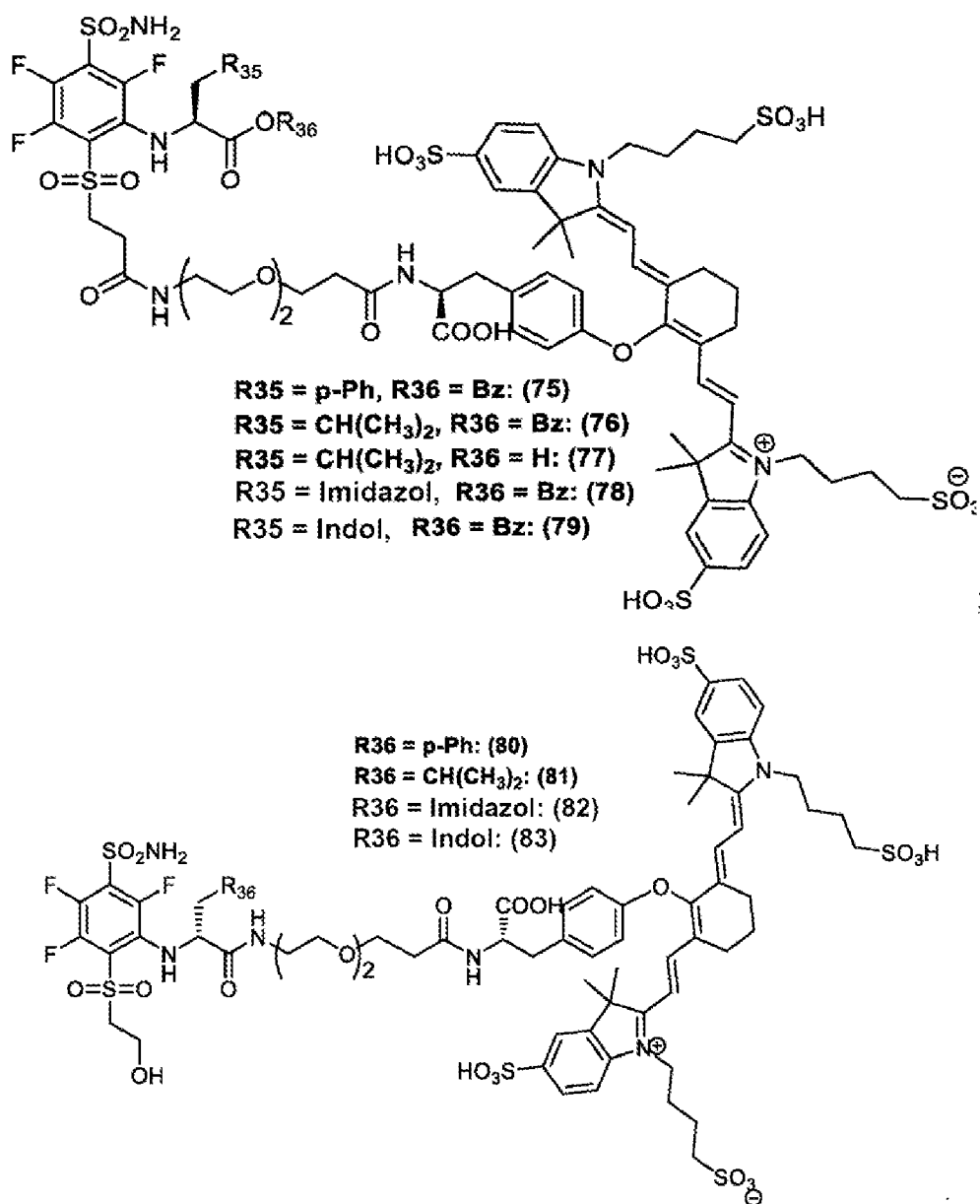
Preferiblemente, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

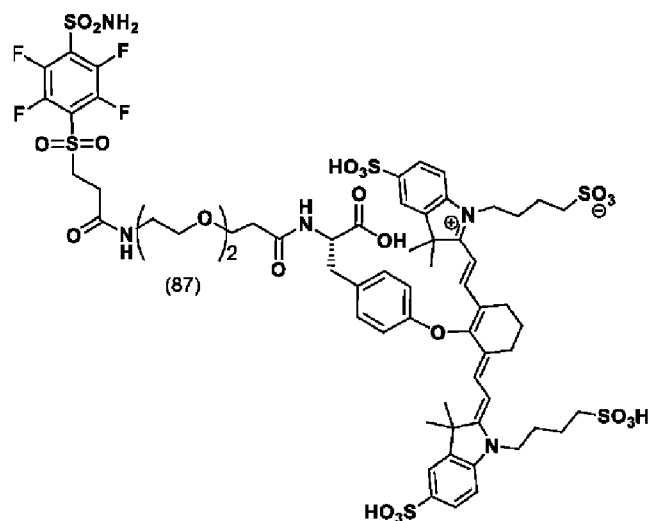
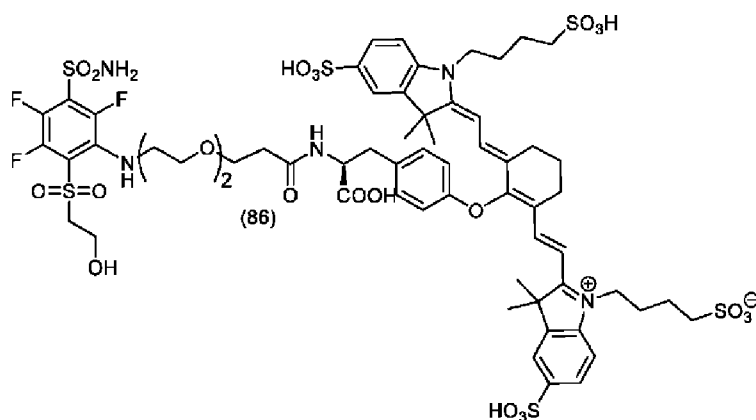
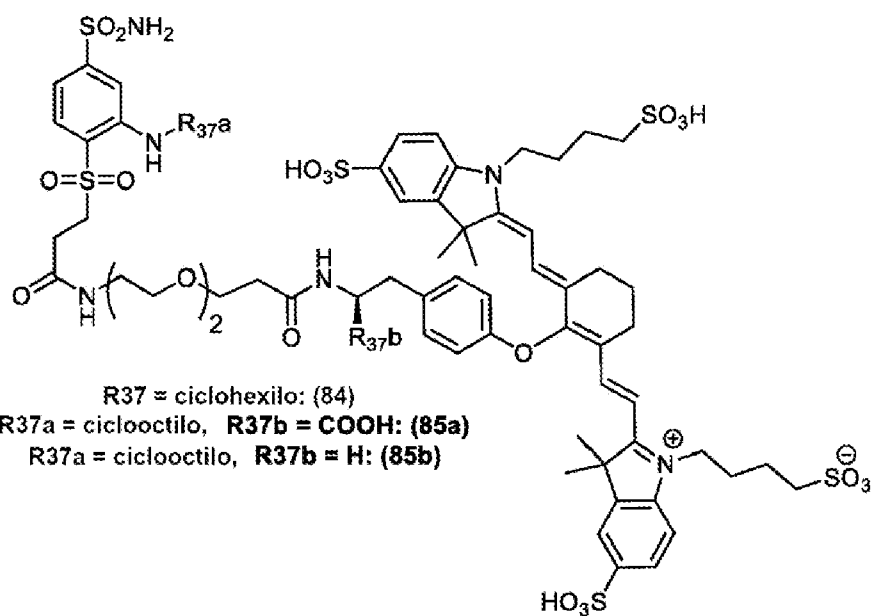


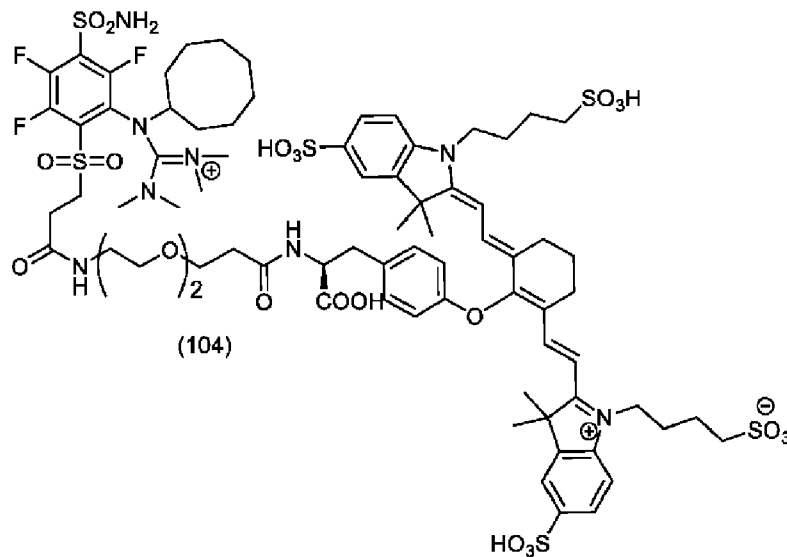
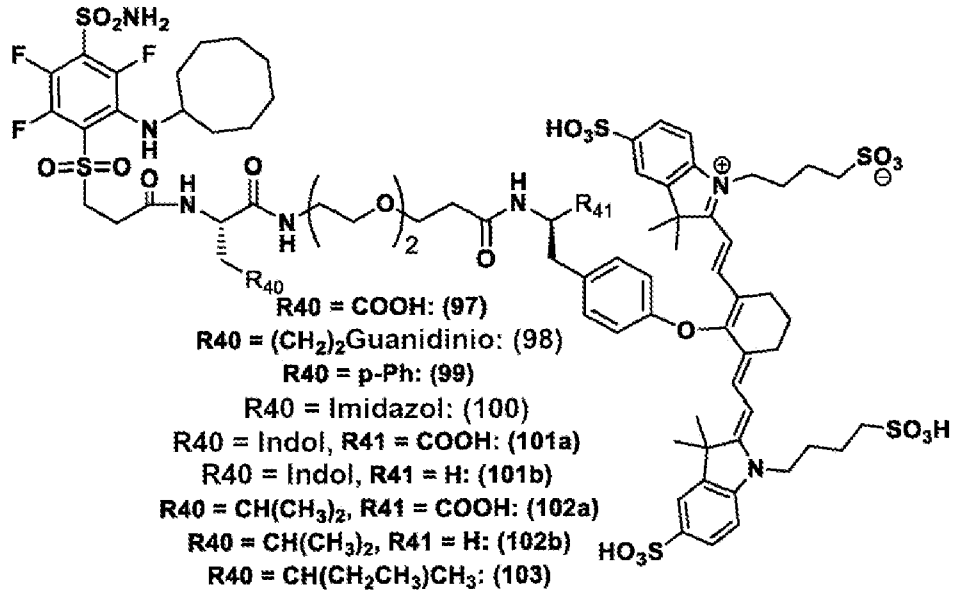
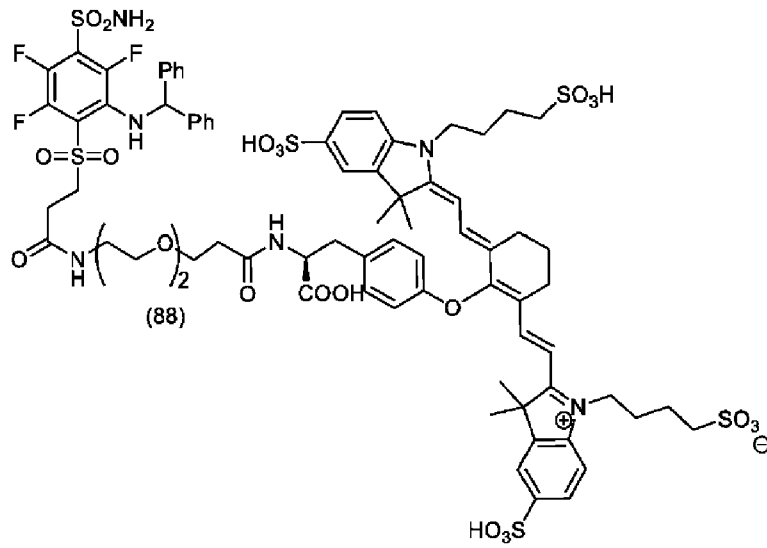


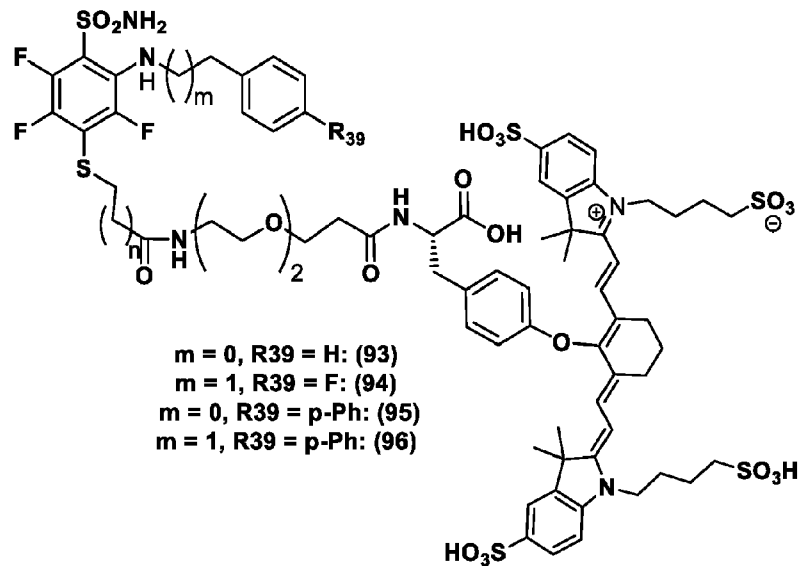
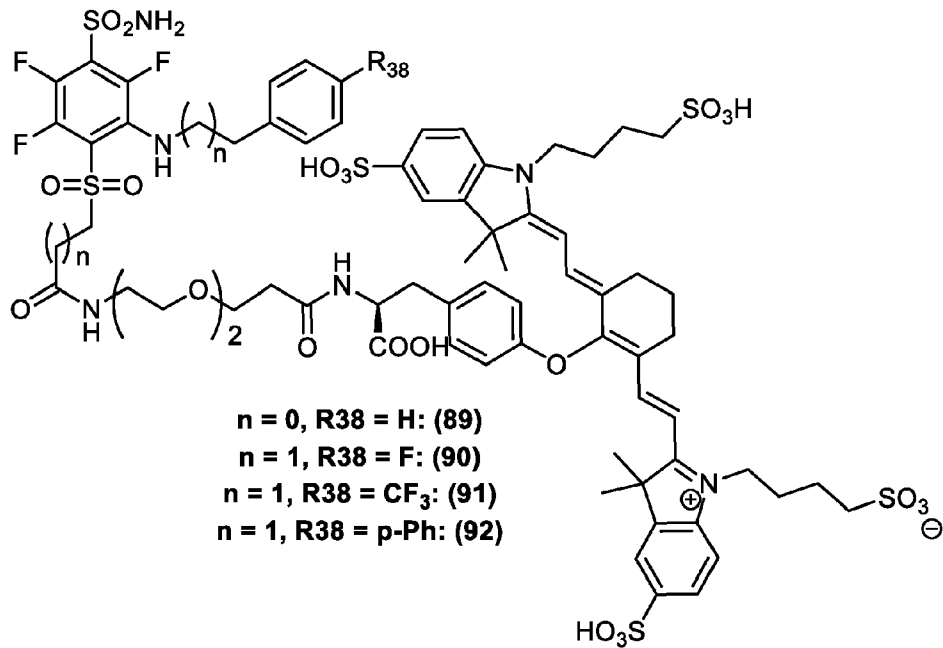












5 En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen unos máximos de absorción y emisión entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 900 nm. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen unos máximos de absorción y emisión entre aproximadamente 600 nm y 800 nm.

10 Algunas realizaciones de la presente invención proporcionan un kit que comprende el compuesto anteriormente mencionado.

La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden dicho compuesto anterior y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 Dichos compuestos y composiciones anteriores se usan en el diagnóstico de una enfermedad. La enfermedad está preferiblemente asociada con células que expresan CA IX, en la que las células se eligen del grupo que consiste en células de cáncer de vejiga, células de cáncer pancreático, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de riñón, células de sarcoma, células de cáncer de mama, células de cáncer de cerebro, células de carcinoma neuroendocrino, células de cáncer de colon, células de cáncer de próstata, células de cáncer de testicular o células de melanoma.

20 Estos compuestos se usan en la detección de enfermedades asociadas con alta expresión de CA IX. En otras realizaciones, se usan compuestos de la presente invención para diagnosticar o detectar células que expresan CA IX elegidas del grupo que consiste en células de cáncer de vejiga, células de cáncer pancreático, células de cáncer de

5 hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de riñón, células de sarcoma, células de cáncer de mama, células de cáncer de cerebro, células de carcinoma neuroendocrino, células de cáncer de colon, células de cáncer de testicular o células de melanoma. En otras realizaciones, las células que están detectándose están a más de 5 mm por debajo de la piel. En algunas realizaciones, el tejido que está detectándose está a más de 5 mm por debajo de la piel. En otras realizaciones, el tumor que está detectándose está a más de 5 mm por debajo de la piel. En algunas realizaciones, las células que están detectándose están a más de 6 mm, 7 mm, 8 mm, 9 mm o 10 mm por debajo de la piel del sujeto. En algunas realizaciones de la presente invención, las sondas de colorante pueden detectarse fuera del espectro de luz visible. En algunas realizaciones, se usan sondas de colorante a más que el espectro de luz visible. En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención comprenden sondas de colorante sensibles a longitudes de onda de entre 650 nm y 900 nm. En algunas realizaciones, los compuestos de colorante de NIR dirigidos a CA IX de la presente invención tienen longitudes de onda de absorción de luz máximas en la región del infrarrojo cercano de entre aproximadamente 650 nm y 1000 nm, por ejemplo, y en una realización, a aproximadamente 800 nm.

15 En una realización adicional, las células cancerosas que expresan CA IX son de un tumor. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de al menos 1000 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 1000 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 950 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 900 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 850 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 800 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 750 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 700 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 650 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 600 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 550 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 500 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 450 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 400 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 350 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 300 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 250 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 200 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 150 mm³. En algunas realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 100 mm³. En una realización, el volumen del tumor es de al menos 75 mm³. En otra realización, el volumen del tumor es de menos de 75 mm³. En otra realización, el volumen del tumor es de menos de 70 mm³. En otra realización, el volumen del tumor es de menos de 65 mm³. En otra realización, el volumen del tumor es de menos de 60 mm³. En otra realización, el volumen del tumor es de menos de 55 mm³. En una realización, el volumen del tumor es de al menos 50 mm³. En otras realizaciones, el tumor es de menos de 50 mm³. En otra realización, el volumen del tumor es de menos de 45 mm³. En otras realizaciones, el volumen del tumor es de menos de 40 mm³. En otra realización, el volumen del tumor es de menos de 35 mm³. En todavía otra realización, el volumen del tumor es de menos de 30 mm³. En otra realización, el volumen del tumor es de menos de 25 mm³. En todavía otra realización, el volumen del tumor es de menos de 20 mm³. En otra realización, el volumen del tumor es de menos de 15 mm³. En todavía otra realización, el volumen del tumor es de menos de 10 mm³. En todavía otra realización, el volumen del tumor es de menos de 12 mm³. En todavía otra realización, el volumen del tumor es de menos de 9 mm³. En todavía otra realización, el volumen del tumor es de menos de 8 mm³. En todavía otra realización, el volumen del tumor es de menos de 7 mm³. En todavía otra realización, el volumen del tumor es de menos de 6 mm³. En todavía otra realización, el volumen del tumor es de menos de 5 mm³.

45 En una realización, el tumor tiene una longitud de al menos 5 mm antes de la resección quirúrgica usando un compuesto de colorante de NIR dirigido a CA IX de la presente invención. En una realización, estos métodos detectan tumores de menos de 5 mm. En otras realizaciones, los métodos en el presente documento detectan tumores de menos de 4 mm. En algunas realizaciones, los métodos en el presente documento detectan tumores de menos de 3 mm. En otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 6 mm. En todavía otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 7 mm. En aún otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 8 mm. En otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 9 mm. En todavía otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 10 mm. En aún otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 11 mm. En una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 12 mm. En todavía una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 13 mm. En todavía una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 14 mm. En otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 15 mm. En aún otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 16 mm. En todavía otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 17 mm. En una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 18 mm. En aún una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 19 mm. En todavía una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 20 mm. En otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 21 mm. En todavía otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 22 mm. En aún otra realización, el tumor tiene una longitud de al menos 23 mm. En una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 24 mm. En todavía una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 25 mm. En aún una realización adicional, el tumor tiene una longitud de al menos 30 mm.

65 Los compuestos pueden usarse con sistemas de obtención de imágenes de tomografía molecular mediados por fluorescencia, tales como los diseñados para detectar activación de fluorescencia de infrarrojo cercano en tejidos profundos. Los compuestos proporcionan especificidad molecular y tisular, proporcionan un alto contraste de fluorescencia, señal de fluorescencia más brillante, y reducen la autofluorescencia de fondo, permitiendo una detección

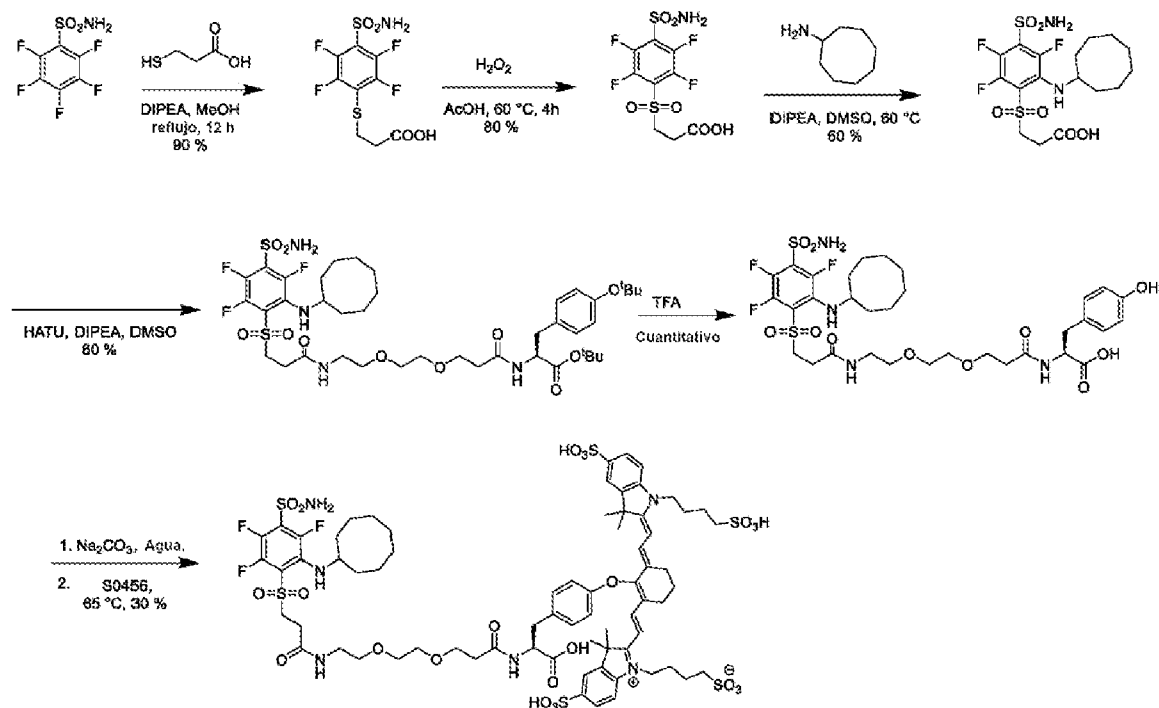
temprana mejorada y evaluación de diana molecular de tejido enfermo *in vivo* (por ejemplo, cánceres). Los compuestos pueden usarse para obtención de imágenes tridimensionales de tejido profundo, cirugía dirigida y métodos para cuantificar la cantidad de un tipo de célula diana en una muestra biológica.

- 5 No se pretende que las realizaciones dadas a conocer a continuación sean exhaustivas o limiten la divulgación a las formas precisas dadas a conocer en la siguiente descripción detallada. En vez de eso, las realizaciones se eligen y se describen para que otros expertos en la técnica puedan usar sus enseñanzas.

Conjugados de colorante de NIR dirigidos a CA IX y su síntesis

10

Esquema para el compuesto 61:



15 Procedimientos experimentales para el compuesto 61

Síntesis de ácido 3-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico: a pentafluorobencenosulfonamida (5,0 g, 20,23 mmol, 1,0 equiv) en MeOH (200 ml) se le añadió DIPEA (4,2 ml, 24,24 mmol, 1,2 equiv), seguido por ácido 3-mercaptopropiónico (2, 1,76 ml, 20,23 mmol, 1,0 equiv) bajo argón. Se sometió la mezcla de reacción a reflujo durante 6 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante cromatografía en capa fina. Tras completarse la reacción, se evaporó el MeOH usando un evaporador rotatorio y se filtró el sólido resultante y se lavó con agua y se secó con liofilización. Se confirmó el producto mediante CL-EM y se usó para la siguiente etapa, rendimiento del 90 %.

Síntesis de ácido 3-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico: al ácido 3-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico (5,75 g, 17,25 mmol) en ácido acético (34 ml) se le añadió peróxido de hidrógeno (30 % v/v, 15 ml) lentamente a t. a.. Se agitó la mezcla de reacción a 60°C durante 4 h. Tras confirmarse que se completó la reacción mediante CL-EM, se extinguió la reacción mediante adición de agua. Se extrajo la mezcla de reacción con EtOAc (3x150 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con H₂O (1x200 ml), salmuera (1x100 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron. Se aisló un producto sólido blanco con un rendimiento del 80 % y se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis de ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico: a ácido 3-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico (1,0 g, 2,74 mmol, 1,0 equiv) en DMSO (5 ml), se le añadió DIPEA (0,96 ml, 5,48 mmol, 2,0 equiv) seguido por ciclooctilamina (0,413 ml, 3,01 mmol, 1,1 equiv) bajo argón. Se agitó la mezcla de reacción a 60°C durante 6 h. Después se diluyó la mezcla con H₂O (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (1x50 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a presión reducida. Se purificó la masa en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando DCM:EtOAc. Se aisló el producto deseado con un rendimiento del 60 %.

40 Síntesis de ligandos sustituidos en *meta*

Se usó un procedimiento similar al de la síntesis de ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)propanoico para la síntesis de los siguientes ligandos

Compuesto 3: n =0, p=0, m=3/5

Compuesto 7: n =2, p=0, m=0

Compuesto 17: m=0

Compuesto 18: m=0

Compuesto 29: n =0, p=0

Compuesto 30: n =1, p=0

Compuesto 32: n =2, p=0

Además, se preparó el compuesto 25 (n=0, p=0, m=5) a partir de ácido 3-((2-fluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)propanoico usando un procedimiento similar al de la síntesis de ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)propanoico.

Síntesis de (S)-2-(4-(terc-butoxi)bencil)-16-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)-4,14-dioxo-7,10-dioxa-3,13-diazahexadecanoato de terc-butilo: se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra de agitación, ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)propanoico (60 mg, 0,126 mmol, 1 equiv), (S)-2-(3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propanamido)-3-(4-(terc-butoxi)fenil)propanoato de terc-butilo (63,2 mg, 0,139 mmol, 1,1 equiv) y HATU (48,28 mg, 0,139 mmol, 1,1 equiv), después se añadió DMSO (1,3 ml) para proporcionar una disolución transparente. Se añadió lentamente DIPEA (88 µl, 0,508 mmol, 4,0 equiv) a la mezcla de reacción a 23°C. Se agitó la reacción a 23°C durante 1,5 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante CL/EM. Se extinguió la mezcla de reacción mediante adición de agua (3 ml) gota a gota y se extrajo con EtOAc (3x10 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (10 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron y se concentraron. Se purificó la masa en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando DCM-EtOAc para proporcionar el compuesto deseado, 92 mg, rendimiento del 80 %.

Síntesis de (3-(2-(2-(3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)propanamido)etoxi)etoxi)propanoil)-L-tirosina: se cargó un matraz de fondo redondo de 5 ml con una barra de agitación y compuesto (S)-2-(4-(terc-butoxi)bencil)-16-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)-4,14-dioxo-7,10-dioxa-3,13-diazahexadecanoato de terc-butilo (52 mg, 0,057 mmol) y se añadió ácido trifluoroacético (TFA, 1 ml) al matraz de reacción a t. a.. Se agitó la mezcla de reacción a t. a. durante 1 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante CL/EM. Se evaporó el disolvente a vacío (evaporador rotatorio) y se añadió la mezcla de reacción concentrada gota a gota a éter frío con agitación (5 ml) para dar un precipitado blanco que se centrifugó, se lavó con éter frío (2 x 5 ml) y se secó a alto vacío para proporcionar el producto deseado como un sólido blanco en rendimiento cuantitativo.

Acoplamiento de grupo de unión-ligando

Se acoplaron diversos grupos de unión modificados al ligando de CA-IX usando un protocolo similar al de la síntesis de (3-(2-(2-(3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)propanamido)etoxi)etoxi)propanoil)-L-tirosina tal como se indica a continuación

Compuesto 39: n=0, m=5, p=0

Compuesto 40: n=0, m=5, p=0

Compuesto 41: n=0, m=5, p=0

Compuesto 42: n=0, m=5, p=0

Compuesto 43: n=0, m=5, p=0

Compuesto 44: n=0, m=5, p=0

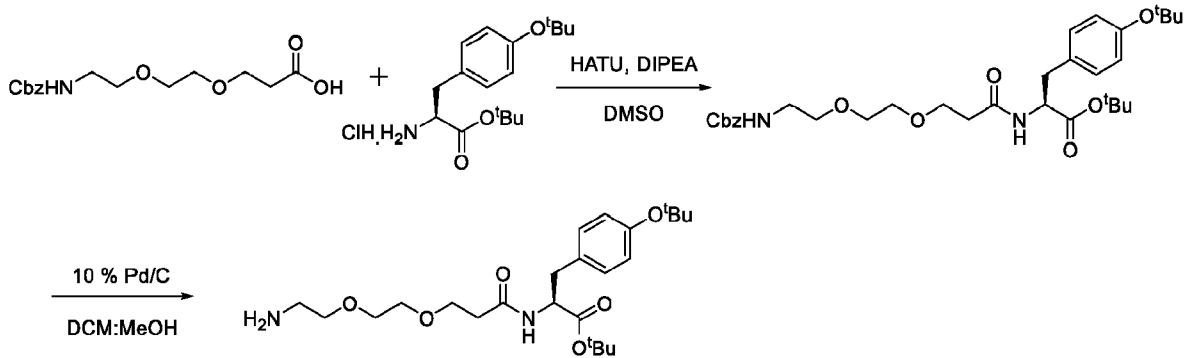
Síntesis de 4-(2-((E)-2-((E)-2-(4-((S)-2-carboxi-16-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)-4,14-dioxo-7,10-dioxa-3,13-diazahexadecil)fenoxi)-3-(2-((E)-3,3-dimetil-5-sulfo-1-(4-sulfobutil)indolin-2-iliden)etiliden)ciclohex-1-en-1-il)vinil)-3,3-dimetil-5-sulfo-3H-indol-1-ium-1-il)butano-1-sulfonato: se cargó un matraz de fondo redondo de 5 ml con una barra de agitación y compuesto (3-(2-(2-(3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonil)propanamido)etoxi)etoxi)propanoil)-L-tirosina (11 mg, 0,014 mmol, 1 equiv) y después se disolvió en THF:agua (razón de 1:2, 0,4 ml). Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a ~9,5-10 (usando papel indicador de

pH húmedo) usando una disolución de Na₂CO₃ 1 M acuoso a temperatura ambiente. Después se añadió S0456 (13,2 mg, 0,014 mmol, 1 equiv) para dar una disolución verde opaca y se agitó a 60°C durante 4 horas. Se monitorizó el avance de la reacción mediante HRMS y habitualmente la reacción se completó en 4 horas. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante RP-HPLC. Se combinaron fracciones puras de la HPLC, se evaporó el disolvente y se liofilizan las muestras congeladas para obtener el producto deseado (8 mg) como un sólido verde.

Síntesis de conjugados de colorante de CA-IX:

Se usó un procedimiento similar al de la síntesis de 4-(2-((E)-2-((E)-2-(4-((S)-2-carboxi-16-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)-4,14-dioxo-7,10-dioxa-3,13-diazahexadecil)fenoxi)-3-(2-((E)-3,3-dimetil-5-sulfo-1-(4-sulfobutil)indolin-2-iliden)etiliden)ciclohex-1-en-1-il)vinil)-3,3-dimetil-5-sulfo-3H-indol-1-ium-1-il)butano-1-sulfonato para la preparación de todos los demás conjugados de colorante de CA-IX.

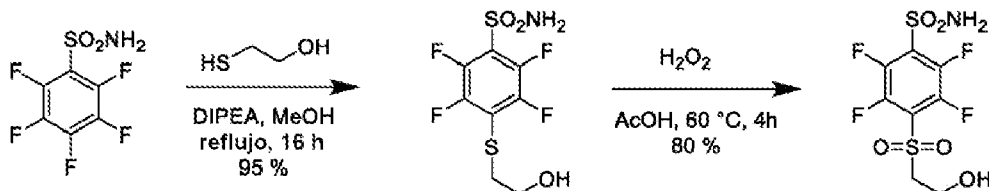
Síntesis de NH₂-PEG₂-Tyr(^tBu)-grupo de unión:



Síntesis de (S)-15-(4-(terc-butoxi)bencil)-3,13-dioxo-1-fenil-2,7,10-trioxa-4,14-diazahexadecan-16-oato de terc-butilo: se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra de agitación, 12 (5,0 g, 16,05 mmol, 1 equiv), (L)-H-Tyr(-O^tBu)-O^tBu.HCl (5,3 g, 16,05 mmol, 1,0 equiv) y HATU (6,41 g, 16,85 mmol, 1,05 equiv), después se añadió DMSO (29 ml) para proporcionar una disolución transparente. Se añadió DIPEA (7,01 ml, 40,13 mmol, 2,5 equiv) lentamente a la mezcla de reacción a 23°C, a lo largo de 5 minutos. Se agitó la reacción a 23°C durante 1,5 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante CL/EM. Se extinguió la mezcla de reacción mediante adición de agua (100 ml) gota a gota y se extrajo con EtOAc (3x150 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (100 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron y se concentraron. Se purificó la masa en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando n-hexano-EtOAc para aislar el compuesto deseado con un rendimiento del 95 %.

Síntesis del compuesto (S)-2-(3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propanamido)-3-(4-(terc-butoxi)fenil)propanoato de terc-butilo: se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra de agitación, CbzNH-PEG₂-Tyr(-O^tBu)-O^tBu (1,10 g, 1,87 mmol) y DCM (10 ml). Tras disolver la mezcla de reacción, se añadió Pd/C (base de Pd al 10 %, 10 % p/p, 110 mg) en porciones al matraz de fondo redondo seguido por MeOH anhidro (10 ml). Se desgasificó la mezcla de reacción (3x) y se burbujeó gas H₂ a través de la mezcla de reacción durante 3 h con agitación a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción a través de un lecho de Celite, se lavó con MeOH y se concentró el filtrado a vacío para proporcionar el producto deseado en bruto (92 %) que se analizó mediante CL/EM y se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

Esquema para la síntesis de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-hidroxietil)sulfonyl)benzenosulfonamida:



Síntesis de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-hidroxietil)sulfonyl)benzenosulfonamida: a pentafluorobenzenosulfonamida (2,0 g, 8,098 mmol, 1,0 equiv) en MeOH (81 ml) se le añadió DIPEA (1,55 ml, 8,908 mmol, 1,1 equiv), seguido por 2-mercaptoetan-1-ol (0,63 ml, 8,908 mmol, 1,1 equiv) bajo argón. Se sometió la mezcla de reacción a reflujo durante 16 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante cromatografía en capa fina. Tras completarse la reacción, se evaporó el MeOH usando un evaporador rotatorio y se filtró el sólido resultante y se lavó con agua y se secó con liofilización. Se confirmó el compuesto sólido aislado (1,59 g, rendimiento del 95 %) mediante CL-EM y se usó para la siguiente etapa.

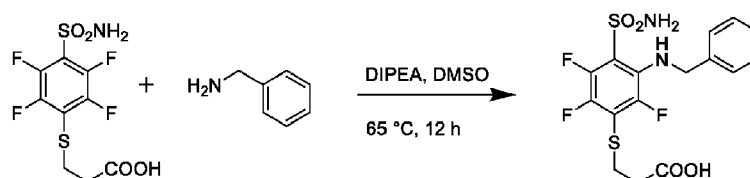
Oxidación de sulfuro para dar sulfona: al compuesto de alcohol (1,50 g, 4,913 mmol, 1,0 equiv) en MeOH:H₂O (1:1, 50 ml) se le añadió oxona (3,02 g, 9,826 mmol, 2,0 equiv) lentamente a t. a.. Se agitó la mezcla de reacción a 55°C durante 16 h. Tras confirmarse que se completó la reacción mediante CL-EM, se filtró la reacción y se extrajo con EtOAc (3x150 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con H₂O (1x100 ml), salmuera (1x100 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron. Se usó un compuesto sólido blanco aislado (1,65 g, rendimiento cuantitativo) para la siguiente etapa sin purificación adicional.

Se usó un procedimiento similar al de la síntesis de ácido 3-((3-(bencilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico para sintetizar los siguientes ligandos empezando a partir de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-hidroxietil)sulfonil)benzenosulfonamida

Compuesto 21: m=0

Compuesto 22: m=0

Síntesis de ácido 3-((3-(bencilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico:



A ácido 3-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico (50 mg, 0,15 mmol, 1,0 equiv) en DMSO (0,3 ml), se le añadió DIPEA (53 µl, 0,3 mmol, 2,0 equiv) seguido por bencilamina (16 µl, 0,15 mmol, 1,0 equiv) bajo argón. Se agitó la mezcla de reacción a 65°C durante 12 h. Después se diluyó la mezcla con H₂O (2 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (1x10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a presión reducida. Se purificó la masa en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando DCM:EtOAc. Se aisló el producto de acoplamiento de amina deseado (15 mg) con un rendimiento del 24 %.

Síntesis de ligandos sustituidos en *orto*

Se usó un procedimiento similar al de la síntesis de ácido 3-((3-(bencilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico para la síntesis de los siguientes ligandos

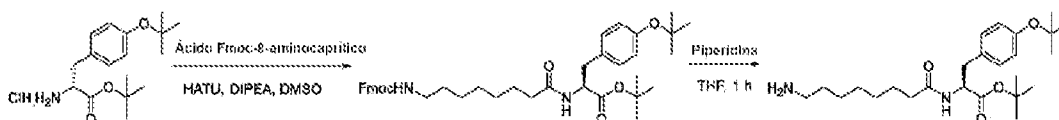
Compuesto 1: n=0, p=0, m=3/5

Compuesto 34: n=2, p=0

Compuesto 36: n=2, p=0

Compuesto 36b: n=0, p=0

Esquema para grupo de unión de ácido 8-aminooctanoico_ tyr(O^tBu)-(O^tBu):

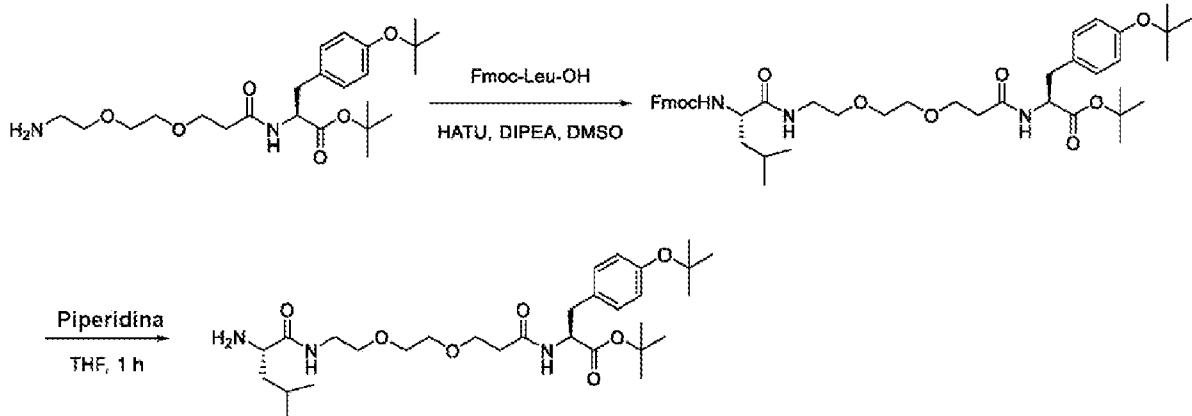


Síntesis de ácido Fmoc-8-aminooctanoico_ tyr(O^tBu)-O^tBu: se cargó un matraz de fondo redondo de 5 ml con una barra de agitación, ácido 8-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)octanoico (116 mg, 0,303 mmol, 1 equiv), (L)-H-Tyr-(O^tBu)-O^tBu.HCl (100 mg, 0,303 mmol, 1,0 equiv) y HATU (138 mg, 0,364 mmol, 1,2 equiv), después se añadió DMSO (0,6 ml) para proporcionar una disolución transparente. Se añadió DIPEA (133 µl, 0,756 mmol, 2,5 equiv) lentamente a la mezcla de reacción a 23°C. Se agitó la reacción a 23°C durante 1,5 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante CL/EM. Se extinguió la mezcla de reacción mediante adición de agua (3 ml) gota a gota y se extrajo con EtOAc (3x5 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (5 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron y se concentraron. Se purificó la masa en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando n-hexano-EtOAc y se aisló el producto con un rendimiento del 96 %.

Síntesis de ácido 8-aminooctanoico_ tyr(O^tBu)-O^tBu: se cargó un matraz de fondo redondo de 5 ml con una barra de agitación y ácido Fmoc-8-aminooctanoico_ tyr(O^tBu)-O^tBu (200 mg, 0,303 mmol) en tetrahidrofurano (THF, 2 ml) y se añadió piperidina (0,2 ml) al matraz de reacción a t. a.. Se agitó la mezcla de reacción a t. a. durante 1 h y se monitorizó

el avance de la reacción mediante CL/EM. Se evaporó el disolvente a vacío (evaporador rotatorio) y se secó el producto en bruto a alto vacío para proporcionar ácido 8-aminooctoico_tyr(O^tBu)-O^tBu como un sólido blanco, rendimiento del 96 %.

5 Esquema para la síntesis de grupo de unión de H-Leu-PEG₂-Tyr(O^tBu)-O^tBu:



10 Síntesis de Fmoc-Leu_PEG₂_tyr(O^tBu)-O^tBu: se cargó un matraz de fondo redondo de 5 ml con una barra de agitación, Fmoc-Leu-OH (16 mg, 0,044 mmol, 1 equiv), H₂N-PEG₂-Tyr(-O^tBu)-O^tBu (20 mg, 0,044 mmol, 1,0 equiv) y HATU (20 mg, 0,053 mmol, 1,2 equiv), después se añadió DMSO (0,15 ml) para proporcionar una disolución transparente. Se añadió DIPEA (20 μl, 0,11 mmol, 2,5 equiv) lentamente a la mezcla de reacción a 23°C. Se agitó la reacción a 23°C durante 1,5 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante CL/EM. Se extinguió la mezcla de reacción mediante adición de agua (3 ml) gota a gota y se extrajo con EtOAc (3x10 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (5 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron y se concentraron. Se purificó la masa en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando n-hexano-EtOAc y se aisló el producto, 32 mg, con un rendimiento del 93 %.

20 Síntesis de H-Leu_PEG₂_tyr(O^tBu)-O^tBu: se cargó un matraz de fondo redondo de 5 ml con una barra de agitación y Fmoc-Leu_PEG₂_tyr(O^tBu)-O^tBu (32 mg, 0,041 mmol) en tetrahidrofurano (THF, 1 ml) y se añadió piperidina (0,2 ml) al matraz de reacción a t. a.. Se agitó la mezcla de reacción a t. a. durante 1 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante CL/EM. Se evaporó el disolvente a vacío (evaporador rotatorio) y se secó el producto en bruto a alto vacío para proporcionar H-Leu_PEG₂_tyr(O^tBu)-O^tBu como un sólido blanco, en rendimiento cuantitativo.

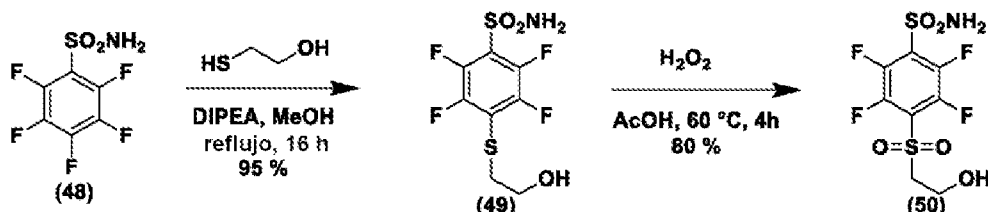
25 Se usó un protocolo similar de reacción de acoplamiento de formación de enlace peptídico seguida por desprotección de Fmoc para la preparación de diversos grupos de unión modificados.

Ejemplos

30 Ejemplo: (1) síntesis y evaluación preclínica de ligandos de CA IX con residuo de unión extendido

(Figura 1-2)

35 Síntesis de ligandos de CA IX novedosos



El esquema 1 muestra la síntesis de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-hidroxiethyl)sulfonyl)bencenosulfonamida

40 A pentafluorobencenosulfonamida (2,0 g, 8,098 mmol, 1,0 equiv) en MeOH (81 ml) se le añadió (1,55 ml, 8,908 mmol, 1,1 equiv), seguido por 2-mercaptoetan-1-ol (0,63 ml, 8,908 mmol, 1,1 equiv) bajo argón. Se sometió la mezcla de reacción a reflujo durante 16 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante cromatografía en capa fina. Tras completarse la reacción, se evaporó el MeOH usando un evaporador rotatorio y se filtró el sólido resultante y se lavó con agua y se secó con liofilización. Se confirmó el compuesto sólido aislado (1,59 g, rendimiento del 95 %) mediante CL-EM y se usó para la siguiente etapa.

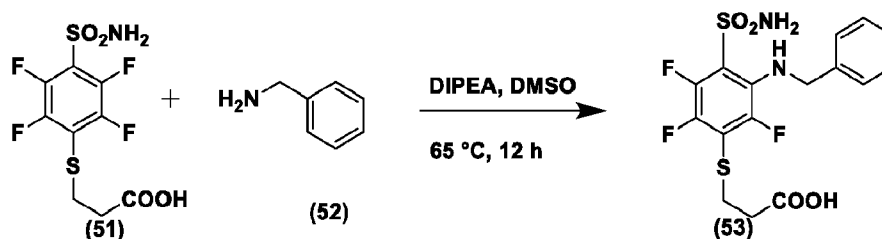
Oxidación de sulfuro para dar sulfona: al compuesto de alcohol (1,50 g, 4,913 mmol, 1,0 equiv) en MeOH:H₂O (1:1, 50 ml) se le añadió oxona (3,02 g, 9,826 mmol, 2,0 equiv) lentamente a t. a.. Se agitó la mezcla de reacción a 55°C durante 16 h. Tras confirmarse que se completó la reacción mediante CL-EM, se filtró la reacción y se extrajo con EtOAc (3x150 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con H₂O (1x100 ml), salmuera (1x100 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron. Se usó un compuesto sólido blanco aislado (1,65 g, rendimiento cuantitativo) para la siguiente etapa sin purificación adicional.

Se usó un procedimiento similar al de la síntesis de ácido 3-((3-(bencilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico para sintetizar los siguientes ligandos empezando a partir de 2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-hidroxiethyl)sulfonyl)benzenosulfonamida

Compuesto 21: m=0;

15 Compuesto 22: m=0

Síntesis de ácido 3-((3-(bencilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico:



20 El esquema 2 muestra la síntesis de ácido 3-((3-(bencilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico

A ácido 3-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico (50 mg, 0,15 mmol, 1,0 equiv) en DMSO (0,3 ml), se le añadió DIPEA (53 µl, 0,3 mmol, 2,0 equiv) seguido por bencilamina (16 µl, 0,15 mmol, 1,0 equiv) bajo argón. Se agitó la mezcla de reacción a 65°C durante 12 h. Después se diluyó la mezcla con H₂O (2 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 10 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (1x10 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a presión reducida. Se purificó la masa en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando DCM:EtOAc. Se aisló el producto de acoplamiento de amina deseado (15 mg) con un rendimiento del 24 %.

30 Síntesis de ligandos sustituidos en *orto*

Se usó un procedimiento similar al de la síntesis de ácido 3-((3-(bencilamino)-2,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico para la síntesis de los siguientes ligandos

35 Compuesto 1: n=0, p=0, m=3/5;

Compuesto 34: n=2, p=0;

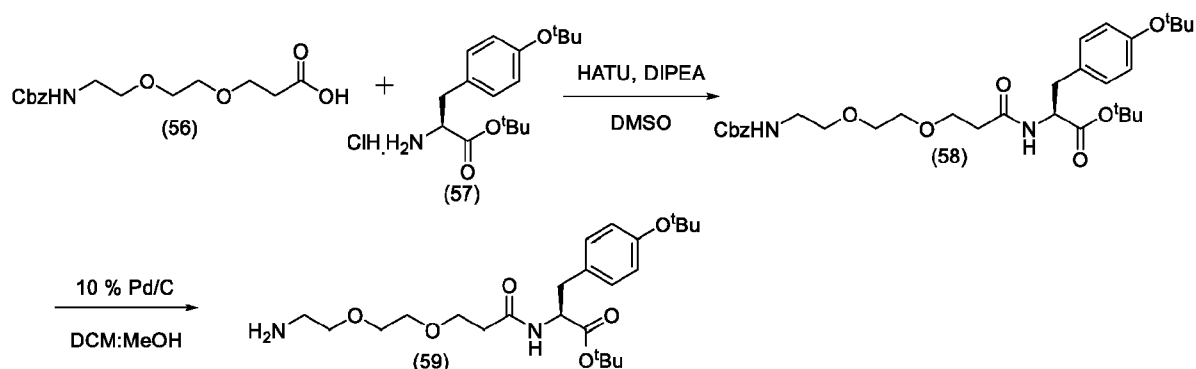
Compuesto 36: n=2, p=0;

40 Compuesto 36b: n=0, p=0

Ejemplo: (2) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de los ligandos 1 y 2 (figura 3)

45 Síntesis

Síntesis de NH₂-PEG₂-Tyr(^tBu)-grupo de unión:



5 Síntesis de (S)-15-(4-(terc-butoxi)bencil)-3,13-dioxo-1-fenil-2,7,10-trioxa-4,14-diazahexadecan-16-oato de terc-butilo: se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra de agitación, 12 (5,0 g, 16,05 mmol, 1 equiv), (L)-H-Tyr-(O^tBu)-O^tBu·HCl (5,3 g, 16,05 mmol, 1,0 equiv) y HATU (6,41 g, 16,85 mmol, 1,05 equiv), después se añadió DMSO (29 ml) para proporcionar una disolución transparente. Se añadió DIPEA (7,01 ml, 40,13 mmol, 2,5 equiv) lentamente a la mezcla de reacción a 23°C, a lo largo de 5 minutos. Se agitó la reacción a 23°C durante 1,5 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante CL/EM. Se extinguió la mezcla de reacción mediante adición de agua (100 ml) gota a gota y se extrajo con EtOAc (3x150 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (100 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron y se concentraron. Se purificó la masa en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando n-hexano-EtOAc para aislar el compuesto deseado con un rendimiento del 95 %.

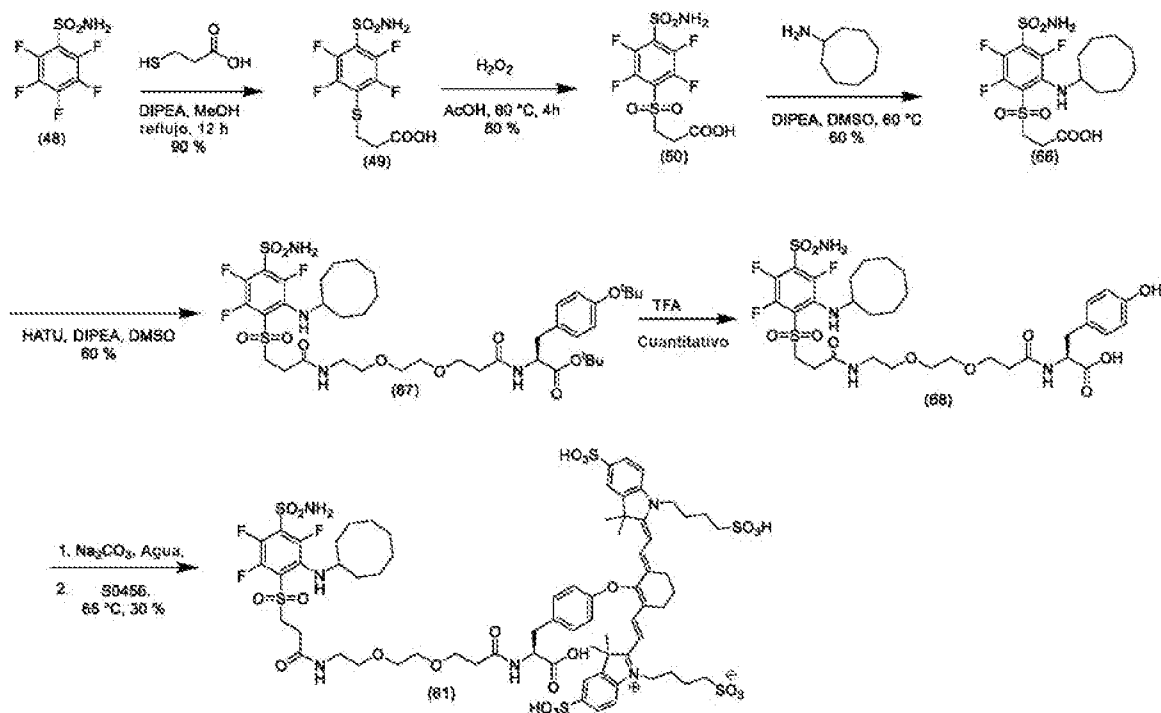
15 Síntesis del compuesto (S)-2-(3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propanamido)-3-(4-(terc-butoxi)fenil)propanoato de terc-butilo: se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra de agitación, CbzNH-PEG₂-Tyr-(O^tBu)-O^tBu (1,10 g, 1,87 mmol) y DCM (10 ml). Tras disolver la mezcla de reacción, se añadió Pd/C (base de Pd al 10 %, 10 % p/p, 110 mg) en porciones al matraz de fondo redondo seguido por MeOH anhidro (10 ml). Se desgasificó la mezcla de reacción (3x) y se burbujeó gas H₂ a través de la mezcla de reacción durante 3 h con agitación a temperatura ambiente. Se filtró la mezcla de reacción a través de un lecho de Celite, se lavó con MeOH y se concentró el filtrado a vacío para proporcionar el producto deseado en bruto (92 %) que se analizó mediante CL/EM y se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

Conclusión: estos estudios *in vivo* demuestran que los compuestos 54 y 55 se acumularon y retuvieron en xenoinjertos de cáncer renal humano (figuras 4 y 5).

25 Ejemplo: (3) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de los ligandos 3 y 4 (figura 6)

Síntesis

30 Esquema de síntesis para el compuesto 61:



Procedimientos experimentales para el compuesto 61:

- 5 Síntesis de ácido 3-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico: a pentafluorobencenosulfonamida (5,0 g, 20,23 mmol, 1,0 equiv) en MeOH (200 ml) se le añadió DIPEA (4,2 ml, 24,24 mmol, 1,2 equiv), seguido por ácido 3-mercaptopropiónico (2, 1,76 ml, 20,23 mmol, 1,0 equiv) bajo argón. Se sometió la mezcla de reacción a reflujo durante 6 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante cromatografía en capa fina. Tras completarse la reacción, se evaporó el MeOH usando un evaporador rotatorio y se filtró el sólido resultante y se lavó con agua y se secó con liofilización. Se confirmó el producto mediante CL-EM y se usó para la siguiente etapa, rendimiento del 90 %.

- 15 Síntesis de ácido 3-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico: al ácido 3-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-sulfamoilfenil)tio)propanoico (5,75 g, 17,25 mmol) en ácido acético (34 ml) se le añadió peróxido de hidrógeno (30 % v/v, 15 ml) lentamente a t. a.. Se agitó la mezcla de reacción a 60°C durante 4 h. Tras confirmarse que se completó la reacción mediante CL-EM, se extinguió la reacción mediante adición de agua. Se extrajo la mezcla de reacción con EtOAc (3x150 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con H₂O (1x200 ml), salmuera (1x100 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentraron. Se aisló un producto sólido blanco con un rendimiento del 80 % y se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional.

- 20 Síntesis de ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico: a ácido 3-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico (1,0 g, 2,74 mmol, 1,0 equiv) en DMSO (5 ml), se le añadió DIPEA (0,96 ml, 5,48 mmol, 2,0 equiv) seguido por ciclooctilamina (0,413 ml, 3,01 mmol, 1,1 equiv) bajo argón. Se agitó la mezcla de reacción a 60°C durante 6 h. Después se diluyó la mezcla con H₂O (30 ml) y se extrajo con EtOAc (3 x 50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (1x50 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ y se evaporaron a presión reducida. Se purificó la masa en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando DCM:EtOAc. Se aisló el producto deseado con un rendimiento del 60 %.

Síntesis de ligandos sustituidos en *meta*

- 30 Se usó un procedimiento similar al de la síntesis de ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico para la síntesis de los siguientes ligandos

Compuesto 3: n = 0, p = 0, m = 3/5

- 35 Compuesto 7: n = 2, p = 0, m = 0

Compuesto 17: m = 0

Compuesto 18: m = 0

- 40 Compuesto 29: n = 0, p = 0

Compuesto 30: n =1, p=0

Compuesto 32: n =2, p=0

5

Además, se preparó el compuesto 25 (n=0, p=0, m=5) a partir de ácido 3-((2-fluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico usando un procedimiento similar al de la síntesis de ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico.

10 Síntesis de (S)-2-(4-(terc-butoxi)encil)-16-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)-4,14-dioxo-7,10-dioxa-3,13-diazahexadecanoato de terc-butilo: se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con una barra de agitación, ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanoico (60 mg, 0,126 mmol, 1 equiv), (S)-2-(3-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)propanamido)-3-(4-(terc-butoxi)encil)propanoato de terc-butilo (63,2 mg, 0,139 mmol, 1,1 equiv) y HATU (48,28 mg, 0,139 mmol, 1,1 equiv), después se añadió DMSO (1,3 ml) para proporcionar una disolución transparente. Se añadió DIPEA (88 µl, 0,508 mmol, 4,0 equiv) lentamente a la mezcla de reacción a 23°C. Se agitó la reacción a 23°C durante 1,5 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante CL/EM. Se extinguió la mezcla de reacción mediante adición de agua (3 ml) gota a gota y se extrajo con EtOAc (3x10 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera (10 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron y se concentraron. Se purificó la masa en bruto mediante cromatografía en columna de gel de sílice usando DCM-EtOAc para proporcionar el compuesto deseado, 92 mg, rendimiento del 80 %.

25 Síntesis de (3-(2-(2-(3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanamido)etoxi)etoxi)propanoil)-L-tirosina: se cargó un matraz de fondo redondo de 5 ml con una barra de agitación y compuesto (S)-2-(4-(terc-butoxi)encil)-16-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)-4,14-dioxo-7,10-dioxa-3,13-diazahexadecanoato de terc-butilo (52 mg, 0,057 mmol) y se añadió ácido trifluoroacético (TFA, 1 ml) al matraz de reacción a t. a.. Se agitó la mezcla de reacción a t. a. durante 1 h y se monitorizó el avance de la reacción mediante CL/EM. Se evaporó el disolvente a vacío (evaporador rotatorio) y se añadió la mezcla de reacción concentrada gota a gota a éter frío con agitación (5 ml) para dar un precipitado blanco que se centrifugó, se lavó con éter frío (2 x 5 ml) y se secó a alto vacío para proporcionar el producto deseado como un sólido blanco en rendimiento cuantitativo.

30

Acoplamiento de grupo de unión-ligando

Se acoplaron diversos grupos de unión modificados al ligando de CA-IX usando un protocolo similar al de la síntesis de (3-(2-(2-(3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanamido)etoxi)etoxi)propanoil)-L-tirosina tal como se indica a continuación

35

Compuesto 39: n=0, m=5, p=0

Compuesto 40: n=0, m=5, p=0

40

Compuesto 41: n=0, m=5, p=0

Compuesto 42: n=0, m=5, p=0

45 Compuesto 43: n=0, m=5, p=0

Compuesto 44: n=0, m=5, p=0

50 Síntesis de 4-(2-((E)-2-((E)-2-(4-((S)-2-carboxi-16-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)-4,14-dioxo-7,10-dioxa-3,13-diazahexadecil)fenoxi)-3-(2-((E)-3,3-dimetil-5-sulfo-1-(4-sulfobutil)indolin-2-iliden)etiliden)ciclohex-1-en-1-il)vinil)-3,3-dimetil-5-sulfo-3H-indol-1-ium-1-il)butano-1-sulfonato: se cargó un matraz de fondo redondo de 5 ml con una barra de agitación y compuesto (3-(2-(2-(3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)propanamido)etoxi)etoxi)propanoil)-L-tirosina (11 mg, 0,014 mmol, 1 equiv) y después se disolvió en THF:agua (razón de 1:2, 0,4 ml). Se ajustó el pH de la mezcla de reacción a ~9,5-10 (usando papel indicador de pH húmedo) usando una disolución de Na₂CO₃ 1 M acuoso a temperatura ambiente. Después se añadió S0456 (13,2 mg, 0,014 mmol, 1 equiv) para dar una disolución verde opaca y se agitó a 60°C durante 4 horas. Se monitorizó el avance de la reacción mediante HRMS y habitualmente la reacción se completó en 4 horas. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante RP-HPLC. Se combinaron fracciones puras de la HPLC, se evaporó el disolvente y se liofilizan las muestras congeladas para obtener el producto deseado (8 mg) como un sólido verde.

60

Síntesis de conjugados de colorante de CA-IX:

65 Se usó un procedimiento similar al de la síntesis de 4-(2-((E)-2-((E)-2-(4-((S)-2-carboxi-16-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sulfonyl)-4,14-dioxo-7,10-dioxa-3,13-diazahexadecil)fenoxi)-3-(2-((E)-3,3-dimetil-5-sulfo-1-(4-

sulfobutil)indolin-2-iliden)etiliden)ciclohex-1-en-1-il)vinil)-3,3-dimetil-5-sulfo-3H-indol-1-ium-1-il)butano-1-sulfonato para la preparación de todos los demás conjugados de colorante de CA-IX.

5 La figura 7 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 60 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

10 La figura 8 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 61 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

15 La figura 9 muestra la afinidad de unión del compuesto 61 a células de SKRC52 positivas para CA IX usando microscopía confocal. Biodistribución tisular y razón de tumor con respecto a fondo del compuesto 61 en modelo de ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52. A los ratones se les inyectaron 10 nmol de compuesto 61, se recogió el tejido seleccionado y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

20 La figura 10 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor HT29 (una línea celular de cáncer de colon humana) y HCC827 (una línea celular de cáncer de pulmón humana) se le inyectaron 10 nmol de compuesto 61 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

25 La figura 11 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 62 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

30 La figura 12 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 65 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

35 Conclusión: estos datos de acumulación en tumor *in vivo* demostraron que los compuestos 60, 61, 62 y 65 mostraron datos de obtención de imágenes de cuerpo completo muy buenos dentro del plazo de 2 - 24 horas tras la administración al animal. Además, los compuestos 60, 62 y 65 mostraron una excelente razón de tumor con respecto a fondo (TBR) y razón de tumor con respecto a piel con una acumulación muy alta. Además, los compuestos permanecieron en el tumor manteniendo una fluorescencia muy alta a lo largo de 24 horas. Además, el compuesto 61 se acumuló de manera selectiva en xenoinjertos de tumor negativo para CA IX de cáncer de colon y de pulmón pero no en los demás tejidos sanos. Aunque CA IX no se expresa de manera natural en NSCLC y células de cáncer de colon, la captación del compuesto 61 en esos tumores está mediada únicamente por CA IX, lo que indica la inducción de CA IX en condiciones de hipoxia tumoral. Tras considerar la afinidad y especificidad para células de cáncer de próstata y tejidos tumorales que expresan CA IX, la intensidad de fluorescencia en el tumor, la razón de tumor con respecto a fondo, la facilidad de síntesis y disponibilidad de materiales de partida con bajo coste, los compuestos 60, 40 61 y 65 pueden considerarse como excelentes candidatos clínicos, aunque los demás compuestos también pueden ser útiles como candidatos clínicos y/o experimentales (figuras 7 - 12).

50 Ejemplo: (4) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de ligandos 5 y 6 (figura 13)

Síntesis química:

55 Ambos compuestos 69 y 70 se sintetizaron usando métodos similares a los explicados en los ejemplos 1 - 3.

Estudios con animales:

60 La figura 14 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 69 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

65 La figura 15 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10

nmol de compuesto 70 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

Conclusión: estos datos de acumulación en tumor *in vivo* demostraron que los compuestos tanto 69 como 70 mostraron datos de obtención de imágenes de cuerpo completo muy buenos dentro del plazo de 2 - 24 horas tras la administración al animal. Además, el compuesto 69 mostró una excelente razón de tumor con respecto a fondo (TBR) y razón de tumor con respecto a piel con una acumulación muy alta retenida en el tumor, manteniendo una fluorescencia muy alta a lo largo de 24 horas. Estos compuestos también pueden ser útiles como candidatos clínicos y/o experimentales.

Ejemplo: (5) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de ligandos 7 - 8 (figura 16)

Síntesis química:

Ambos los compuestos 71 -74 se sintetizaron usando métodos similares a los explicados en los ejemplos 1 - 3.

La figura 17 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol del compuesto 72 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

Conclusión: estos datos de acumulación en tumor *in vivo* demostraron que el compuesto 72 mostró datos de obtención de imágenes de cuerpo completo muy buenos dentro del plazo de 2 - 24 horas tras la administración al animal. Además, el compuesto 72 mostró una excelente razón de tumor con respecto a fondo (TBR) y razón de tumor con respecto a piel con una acumulación muy alta retenida en el tumor, manteniendo una fluorescencia muy alta a lo largo de 24 horas. Estos compuestos también pueden ser útiles como candidatos clínicos y/o experimentales.

Ejemplo: (6) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de ligandos 17 - 20 (figura 18)

La figura 18 muestra la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 17-20.

Síntesis química:

Los compuestos 75 -79 se sintetizaron usando métodos similares a los explicados en los ejemplos 1 - 3.

La figura 19 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 76 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 20 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 77 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

Conclusión: estos datos de acumulación en tumor *in vivo* demostraron que los compuestos tanto 76 como 77 mostraron datos de obtención de imágenes de cuerpo completo muy buenos dentro del plazo de 2 - 24 horas tras la administración al animal. Además, ambos compuestos mostraron una excelente razón de tumor con respecto a fondo (TBR) y razón de tumor con respecto a piel con una acumulación muy alta retenida en el tumor, manteniendo una fluorescencia muy alta a lo largo de 24 horas. Estos compuestos también pueden ser útiles como candidatos clínicos y/o experimentales.

Ejemplo: (7) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de ligandos 21 - 24 (figura 21)

Síntesis química:

Ambos compuestos 80 - 83 se sintetizaron usando métodos similares a los explicados en los ejemplos 1 - 3.

La figura 22 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 80 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 23 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 81 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

Conclusión: estos datos de acumulación en tumor *in vivo* demostraron que los compuestos tanto 80 como 81 mostraron datos de obtención de imágenes de cuerpo completo muy buenos dentro del plazo de 2 - 24 horas tras la administración al animal. Además, el compuesto 80 mostró una excelente razón de tumor con respecto a fondo (TBR) y razón de tumor con respecto a piel con una acumulación muy alta retenida en el tumor, manteniendo una fluorescencia muy alta a lo largo de 24 horas. Estos compuestos también pueden ser útiles como candidatos clínicos y/o experimentales.

Ejemplo: (8) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de ligandos 25 y 26 (figura 24)

Síntesis química:

Ambos compuestos 84 - 85 se sintetizaron usando métodos similares a los explicados en los ejemplos 1 - 3.

La figura 25 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 85 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

Conclusión: estos datos de acumulación en tumor *in vivo* demostraron que el compuesto 85 mostró datos de obtención de imágenes de cuerpo completo muy buenos dentro del plazo de 2 - 24 horas tras la administración al animal. Además, el compuesto 85 mostró una excelente razón de tumor con respecto a fondo (TBR) y razón de tumor con respecto a piel con una acumulación muy alta retenida en el tumor, manteniendo una fluorescencia muy alta a lo largo de 24 horas. Sin embargo, el compuesto 85 mostró menos intensidad de fluorescencia tumoral y razón de tumor con respecto a fondo en comparación con el compuesto 61. La diferencia entre los dos compuestos es que el ligando del compuesto 61 tiene tres sustituciones de flúor en el anillo aromático mientras que el compuesto 85 no tiene ese flúor aromático, lo que sugiere la importancia de halógenos aromáticos para la unión. El compuesto 85 también puede ser útil como candidato clínico y/o experimental.

Ejemplo: (9) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de ligandos 27 y 28 (figura 26)

La figura 26 muestra la estructura química de agentes de NIR dirigidos a CA IX derivados de los ligandos 27 y 28.

Síntesis química:

Ambos compuestos 86 - 87 se sintetizaron usando métodos similares a los explicados en los ejemplos 1 - 3.

La figura 27 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 86 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 28 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 87 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

Conclusión: estos datos de acumulación en tumor *in vivo* demostraron que los compuestos tanto 86 como 87 mostraron datos de obtención de imágenes de cuerpo completo muy buenos dentro del plazo de 2 - 24 horas tras la administración al animal. Sin embargo, el compuesto 87 mostró una excelente razón de tumor con respecto a fondo (TBR) y razón de tumor con respecto a piel con una acumulación muy alta retenida en el tumor, manteniendo una fluorescencia muy alta a lo largo de 24 horas en comparación con el compuesto 86. Esto indica que la conjugación mediante sustitución en *meta* pierde la afinidad por CA XI y la unidad hidrófoba en la posición *meta* del anillo aromático es necesaria para la unión. Por otro lado, el compuesto 86 es menos brillante que los compuestos 60 y 61, lo que indica que tener un resto hidrófobo adicional aumenta la afinidad de unión y especificidad por el receptor. Estos compuestos también pueden ser útiles como candidatos clínicos y/o experimentales.

Ejemplo: (10) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de ligandos 29 (figura 29)

Síntesis química:

Se sintetizó el compuesto 88 usando métodos similares a los explicados en los Ejemplos 1-3.

5 La figura 30 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 88 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

10 Conclusión: estos datos de acumulación en tumor *in vivo* demostraron que el compuesto 88 mostró buenos datos de obtención de imágenes de cuerpo completo después de 8 horas tras la administración al animal. Además, el compuesto 88 mostró una excelente razón de tumor con respecto a fondo (TBR) y razón de tumor con respecto a piel en el punto de tiempo de 24 horas. El compuesto 88 también puede ser útil como candidato clínico y/o experimental.

15 Ejemplo: (11) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de ligandos 30 - 33 (figura 31)

Síntesis química:

20 Los compuestos 89 - 92 se sintetizaron usando métodos similares a los explicados en los ejemplos 1 - 3.

La figura 32 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 89 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 33 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 90 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

Conclusión: estos datos de acumulación en tumor *in vivo* demostraron que los compuestos tanto 89 como 90 mostraron datos de obtención de imágenes de cuerpo completo muy buenos dentro del plazo de 2 - 24 horas tras la administración al animal. Además, los compuestos mostraron una excelente razón de tumor con respecto a fondo (TBR) y razón de tumor con respecto a piel con una acumulación muy alta retenida en el tumor, manteniendo una fluorescencia muy alta a lo largo de 24 horas. Estos compuestos también pueden ser útiles como candidatos clínicos y/o experimentales.

40 Ejemplo: (12) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de ligandos 34 - 36 (figura 34)

Síntesis química:

45 Ambos compuestos 93 - 96 se sintetizaron usando métodos similares a los explicados en los ejemplos 1 - 3.

La figura 35 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 93 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 36 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 94 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 37 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 95 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

La figura 38 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 96 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.

65

- 5 Conclusión: estos datos de acumulación en tumor *in vivo* demostraron que los compuestos 93 y 95 mostraron datos de obtención de imágenes de cuerpo completo muy buenos dentro del plazo de 2 - 24 horas tras la administración al animal. Además, el compuesto 95 mostró una excelente razón de tumor con respecto a fondo (TBR) y razón de tumor con respecto a piel con una acumulación muy alta retenida en el tumor, manteniendo una fluorescencia muy alta a lo largo de 24 horas. Estos compuestos también pueden ser útiles como candidatos clínicos y/o experimentales.
- Ejemplo: (13) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de ligandos 39 - 45 (figura 39)
- 10 Síntesis química:
- Ambos compuestos 97 - 103 se sintetizaron usando métodos similares a los explicados en los ejemplos 1 - 3.
- 15 La figura 40 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 99 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 20 La figura 41 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 102 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 25 Conclusión: estos datos de acumulación en tumor *in vivo* demostraron que los compuestos tanto 99 como 102 mostraron datos de obtención de imágenes de cuerpo completo muy buenos dentro del plazo de 2 - 24 horas tras la administración al animal. Además, ambos compuestos mostraron una excelente razón de tumor con respecto a fondo (TBR) y razón de tumor con respecto a piel con una acumulación muy alta retenida en el tumor, manteniendo una fluorescencia muy alta a lo largo de 24 horas. Estos compuestos también pueden ser útiles como candidatos clínicos y/o experimentales.
- 30 Ejemplo: (14) evaluación preclínica de agentes de NIR dirigidos a CA IX novedosos derivados de ligando 47 (figura 42)
- 35 Síntesis química:
- El compuesto 104 se sintetizó usando métodos similares a los explicados en los ejemplos 1 - 3.
- 40 La figura 43 muestra una superposición de imagen de fluorescencia del cuerpo completo sobre imágenes de luz blanca después de ajustar el umbral. A un ratón portador de xenoinjerto de tumor renal humano SKRC52 se le inyectaron 10 nmol de compuesto 104 y se obtuvieron imágenes con dispositivo de obtención de imágenes IVIS (ex = 745 nm, em = ICG, tiempo de exposición = 1 s) a diferentes intervalos de tiempo.
- 45 Conclusión: estos datos de acumulación en tumor *in vivo* demostraron que el compuesto 104 mostró buenos datos de obtención de imágenes de cuerpo completo dentro del plazo de 2 - 24 horas tras la administración al animal. Además, el compuesto 104 mostró una excelente razón de tumor con respecto a fondo (TBR) y razón de tumor con respecto a piel con una acumulación muy alta retenida en el tumor, manteniendo una fluorescencia muy alta a lo largo de 24 horas. El compuesto también puede ser útil como candidato clínico y/o experimental.
- 50 Ejemplo: (15) evaluación preclínica de agentes de obtención de imágenes ópticas de CA IX novedosos derivados de ligando 4 (figura 44)
- La figura 45 muestra la afinidad de unión del compuesto 105 a células de SKRC52 positivas para CA IX usando análisis por citometría de flujo.
- 55 La figura 46 muestra la afinidad de unión de los compuestos 105 - 107 a células de SKRC52 positivas para CA IX usando microscopía confocal.
- 60 Conclusión: tanto la microscopía confocal como el análisis por citometría de flujo demostraron que los compuestos 105 - 107 se unen a células de SKRC52 positivas para CA IX (una línea celular de cáncer renal humana) con una afinidad muy alta. El compuesto también puede ser útil como candidato clínico y/o experimental.

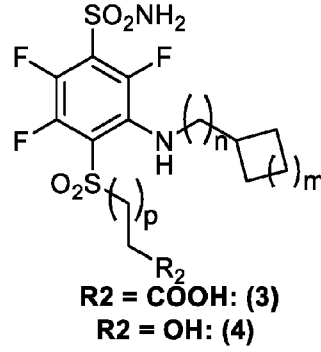
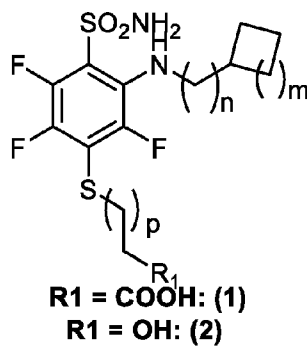
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:

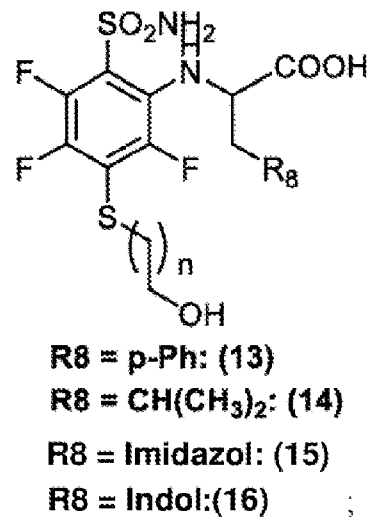
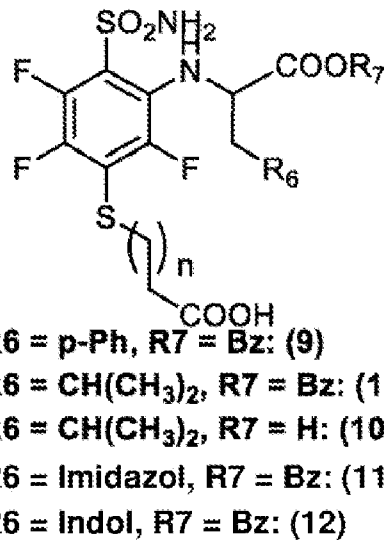
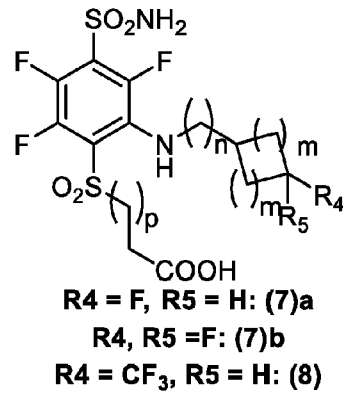
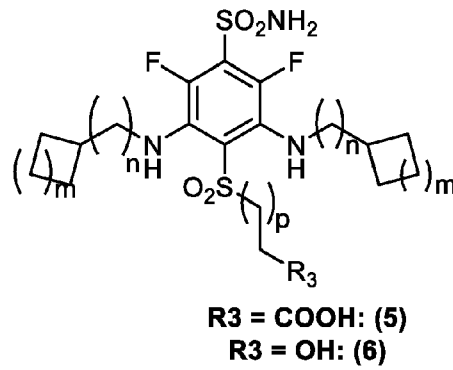
5

B-W-X-Y-Z

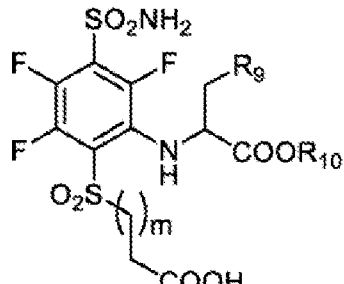
en la que B es una molécula dirigida a CA IX seleccionada del grupo que consiste en ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sufonil)propiónico (C-SPA),



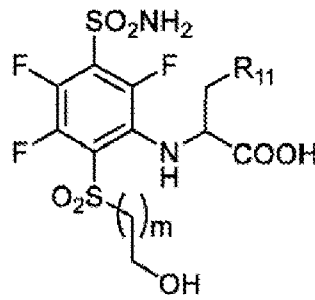
10



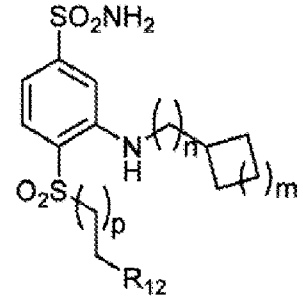
15



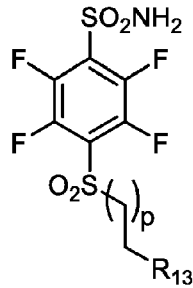
R9 = p-Ph, R10 = H: (17)
R9 = CH(CH₃)₂, R10 = H: (18a)
R9 = Imidazol, R10 = H: (19)
R9 = Indol, R10 = H: (20)



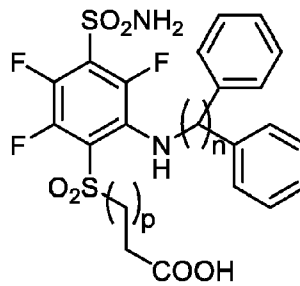
R11 = p-Ph: (21)
R11 = CH(CH₃)₂: (22)
R11 = Imidazol: (23)
R11 = Indol: (24)



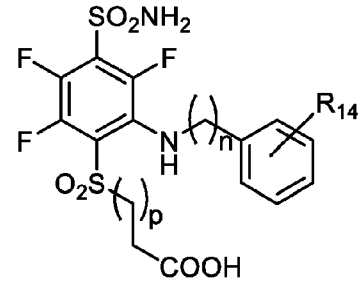
R12 = COOH: (25)
R12 = OH: (26)



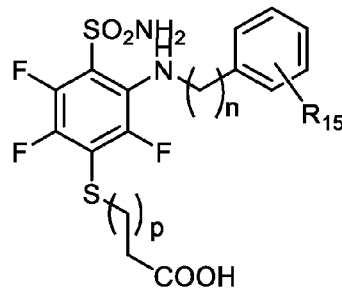
R13 = COOH: (27)
R13 = OH: (28)



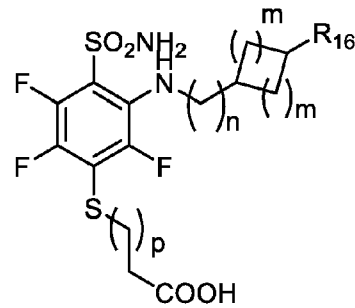
(29)



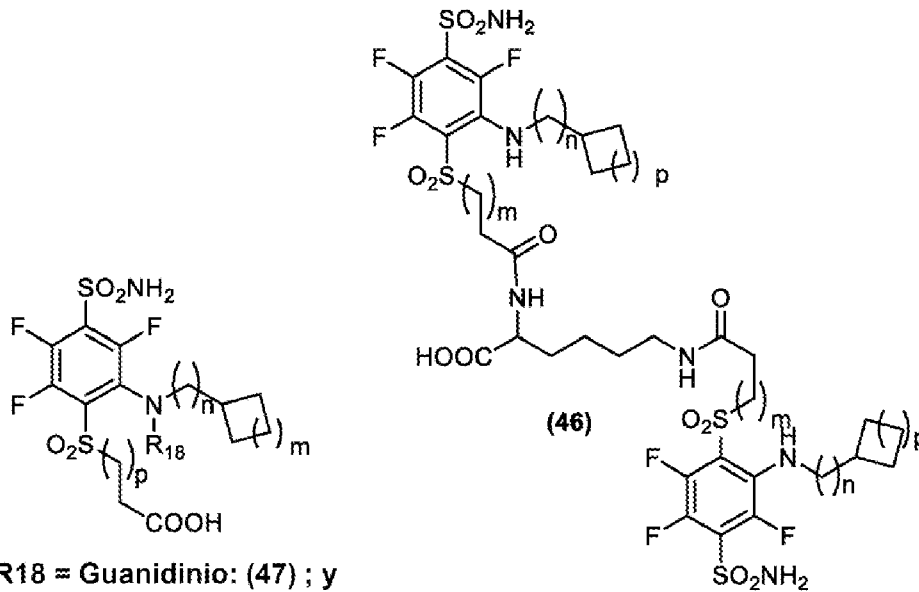
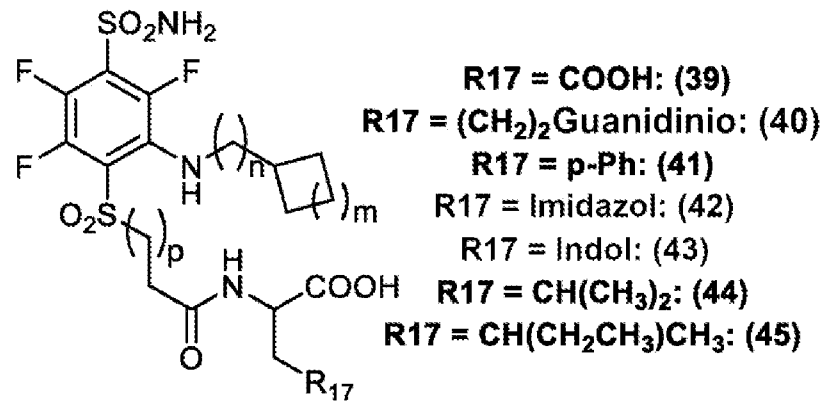
R14 = H: (30)
R14 = F: (31)
R14 = CF₃: (32)
R14 = p-Ph: (33)



R15 = F: (34)
R15 = CF₃: (35)
R15 = p-Ph: (36)a
R15 = H: (36)b



R16 = F: (37)
R16 = CF₃: (38)



5 en las que n es 0, 1, 2 o 3, m es 0, 1, 2 o 3, y p es 0, 1, 2 o 3;

W es un residuo hidrófobo extendido;

X es un espaciador hidrófobo;

10

Y es un espaciador de aminoácidos; y

Z es un colorante de NIR.

15 2. El compuesto según la reivindicación 1, en el que W es un aminoácido hidrófobo, seleccionado del grupo que consiste en Phe, Val, Leu, Ile, Trp, His, Arg, Lys, Asp, Glu, aminoácidos no polares neutros incluyendo alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina o grupo aromático, grupo ciclohexilo, tirosina, aminoácidos básicos (con carga positiva) tales como arginina, histidina y lisina; aminoácidos polares neutros, tales como glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; o un aminoácido aromático, o un resto hidrófobo.

20

3. El compuesto según la reivindicación 1 o 2, en el que X se selecciona del grupo que consiste en un grupo de unión hidrófobo, ácido ocho-aminooctoico (EAOA), polietilenglicol (PEG), polietilenamina (PEA) y ácido N-amino-dPEG₂, ácido seis-aminohectanoico (SAHA), ácido ocho-aminooctoico (EAOA), polietilenglicol (PEG), unidad de polietilenamina (PEA), un péptido que comprende aminoácidos con carga positiva (por ejemplo Arg, Lys, Orn) o aminoácido que contiene amina cuaternaria, una cadena de 6 átomos, un espaciador de 6 átomos de longitud, una cadena de desde 6 hasta 20 átomos de longitud, y un péptido que comprende grupos arilo o aril-alquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido, y en el que un grupo arilo o aril-alquilo tiene de aproximadamente 6 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 14 átomos, y el otro grupo arilo o aril-alquilo tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 14, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 átomos, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 20

30

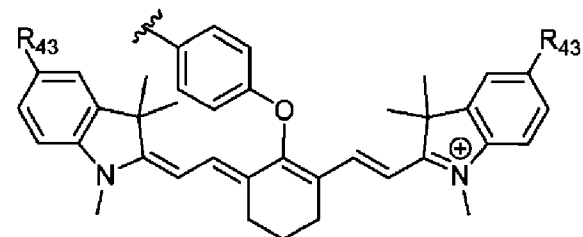
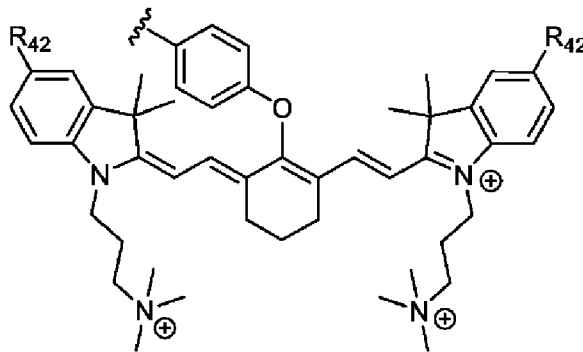
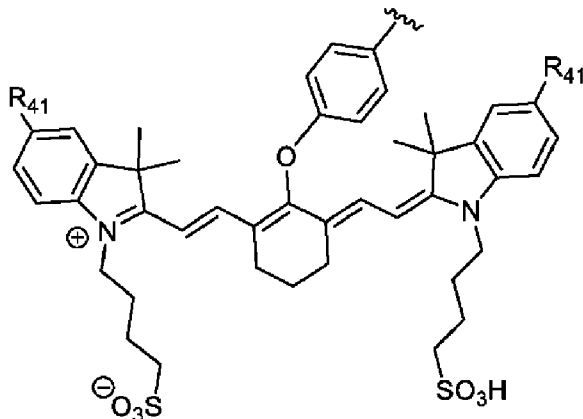
átomos.

4. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que Y se selecciona del grupo que consiste en:

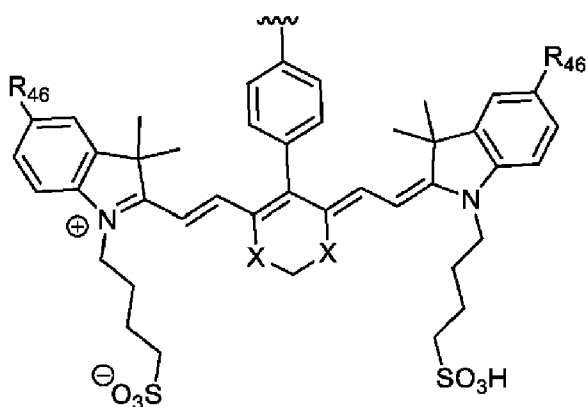
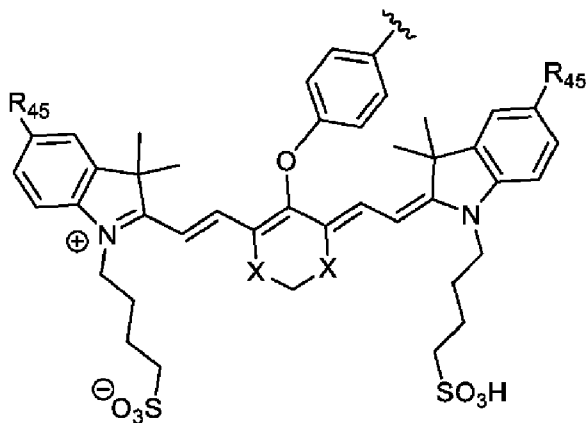
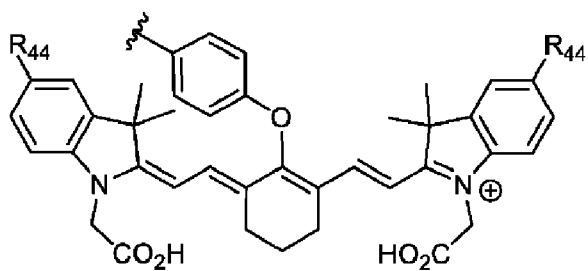
- 5 aminoácidos aromáticos;
- un espaciador de aminoácidos con un grupo de cadena lateral que contiene calcógeno o un grupo de cadena lateral que contiene azufre;
- 10 un espaciador de aminoácidos con un resto tiofenol que contiene azufre;
- aminoácidos ácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido aspártico y ácido glutámico;
- 15 aminoácidos básicos seleccionados del grupo que consiste en arginina, histidina y lisina;
- aminoácidos polares neutros seleccionados del grupo que consiste en glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; y
- 20 aminoácidos no polares neutros seleccionados del grupo que consiste en alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina.

5. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que Z se selecciona del grupo que consiste en LS288, IR800, SP054, S0121, KODAK, S2076, S0456,

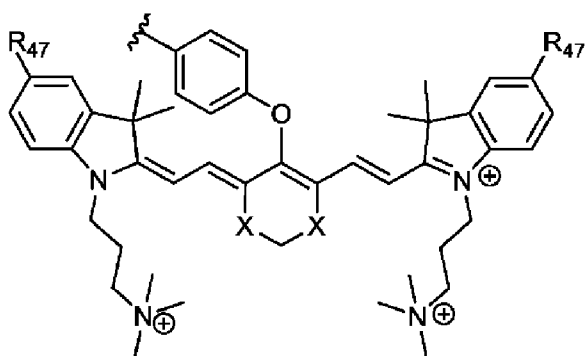
25



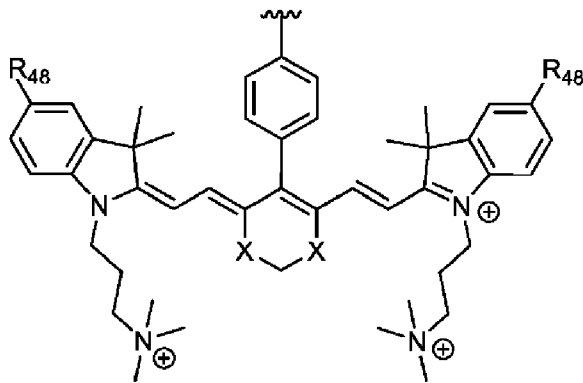
30



5



6 y



en los que R₄₁, R₄₂, R₄₃, R₄₄, R₄₅, R₄₆, R₄₇, R₄₈, =H o SO₃H; X = O, S o N.

5 6. El compuesto según la reivindicación 1, en el que:

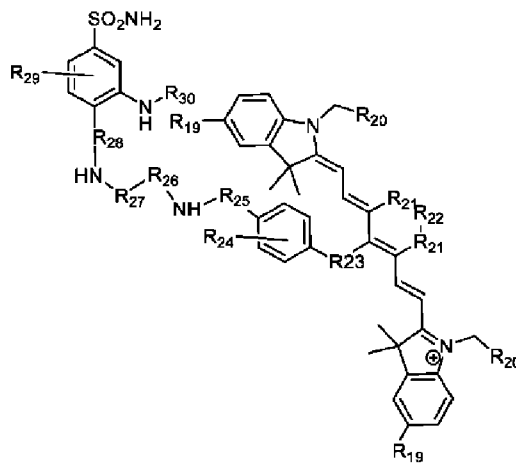
B comprende ácido 3-((2-(ciclooctilamino)-3,5,6-trifluoro-4-sulfamoilfenil)sufonil)propiónico (C-SPA);

X se selecciona del grupo que consiste en EAOA, PEG y PEA;

10 Y se selecciona del grupo que consiste en tirosina, fenilalanina-tirosina, fenilalanina-arginina-tirosina e histidina-tirosina;

y Z comprende S0456.

15 7. Un compuesto que tiene la fórmula estructural:



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o isótopos del mismo, en la que:

R₁₉ representa un hidrógeno o SO₃H;

25 R₂₀ representa un hidrógeno, CH₃, C₃H₆SO₃⁻, C₃H₆SO₃H o C₄H₈SO₃⁻, o C₄H₈SO₃H o C₃H₆N⁺(CH₃)₃;

R₂₁ representa un carbono, opcionalmente uno o más enlaces compartidos,

R₂₂ representa un carbono con opcionalmente uno o más enlaces compartidos;

30 R₂₃ representa nitrógeno, oxígeno o azufre o ningún átomo (enlace C-C directo entre el anillo aromático y el anillo de vinilo);

R₂₄ es opcional y, cuando está presente, representa un grupo de sustitución aromático para potenciar las propiedades espectrales tal como aumentar el brillo y la estabilidad del puente de vinil éter;

35 R₂₅ es opcional y, cuando está presente, representa grupos de unión con aminoácidos aromáticos tales como Phe, Trp, His, aminoácidos catiónicos tales como Arg, Lys, aminoácidos aniónicos tales como Asp, Glu, aminoácidos no naturales de ácidos aromáticos/catiónicos/aniónicos;

R₂₆ es opcional y, cuando está presente, representa una cadena de carbono lineal, o grupo de unión de polietilenglicol, grupo de unión catiónico;

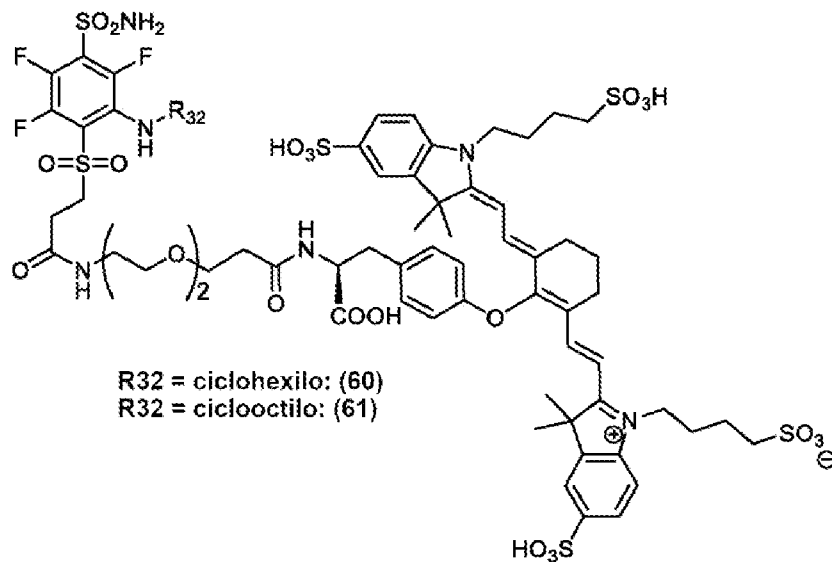
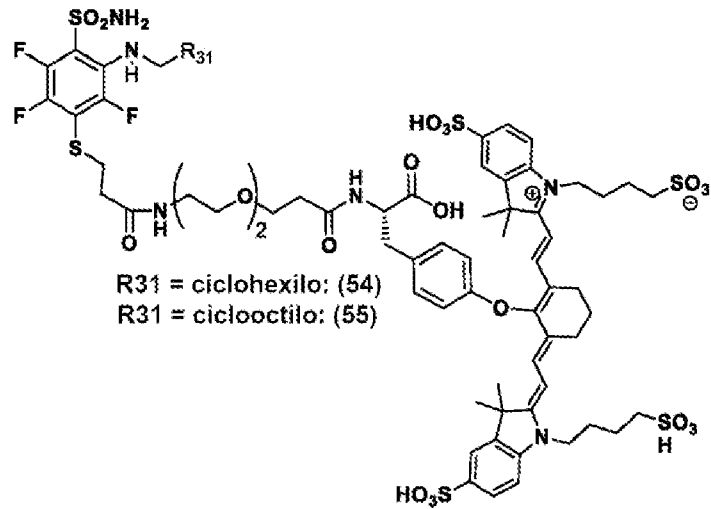
5 R₂₇ es opcional y, cuando está presente, representa un resto hidrófobo tal como Phe, Val, Leu, Ile, Trp, His, Arg, Lys, Asp, Glu;

R₂₈ representa un grupo de unión hidrófobo; y

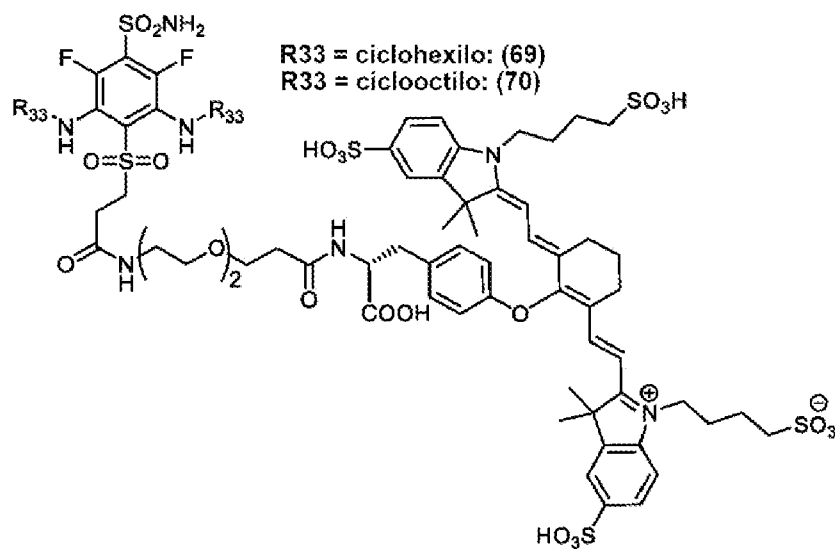
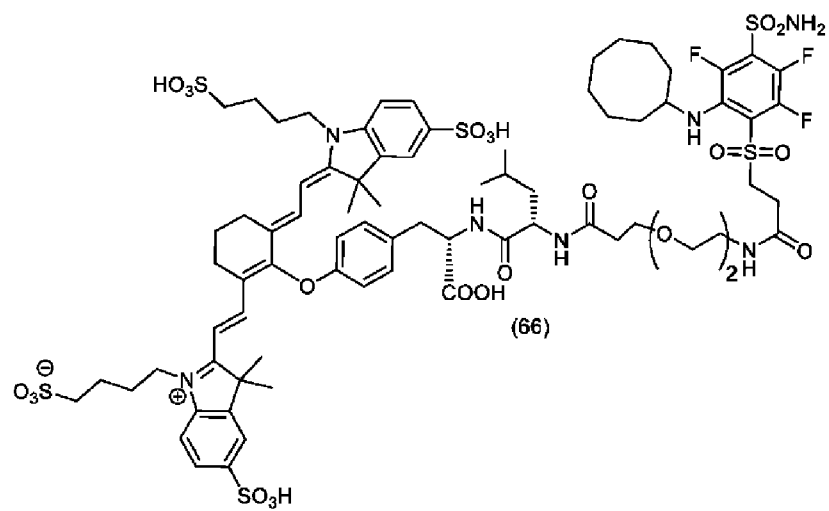
10 R₂₉ es opcional y, cuando está presente, representa un grupo de sustitución aromático para potenciar la afinidad de unión, estabilidad, hidrofobia de la molécula tal como F, NO₂ o de los mismos,

R₃₀ es opcional y, cuando está presente, representa un resto hidrófobo tal como Phe, Val, Leu, Ile, Trp, His, o resto cíclico tal como ciclohexilo, ciclooctilo.

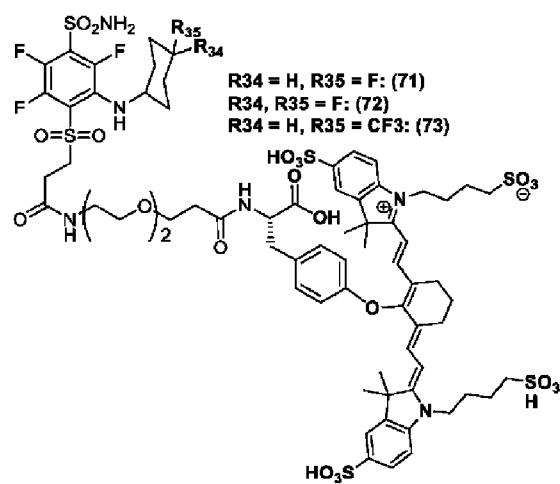
15 8. El compuesto según la reivindicación 7, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

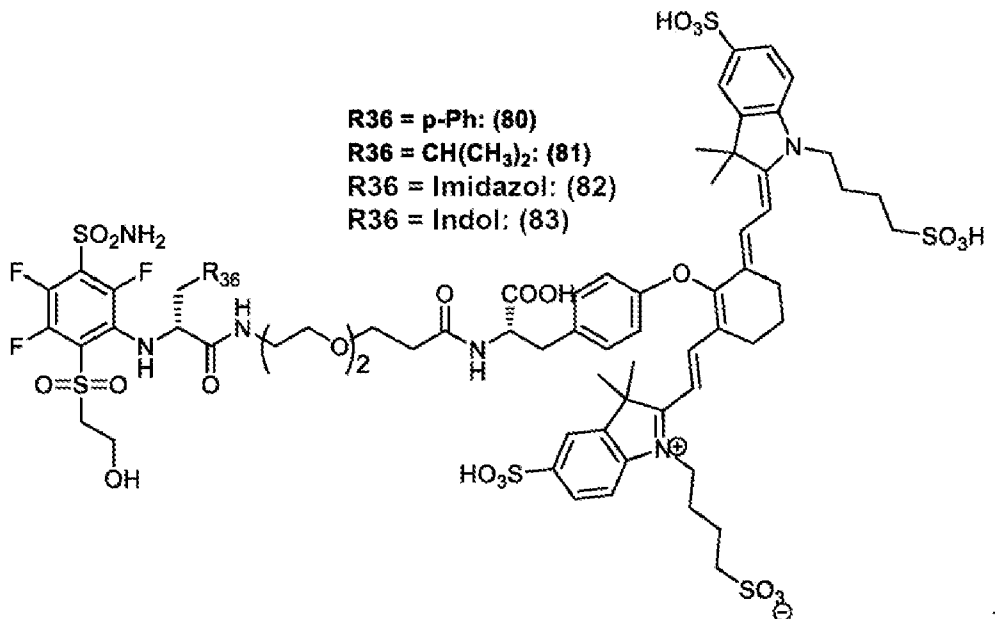
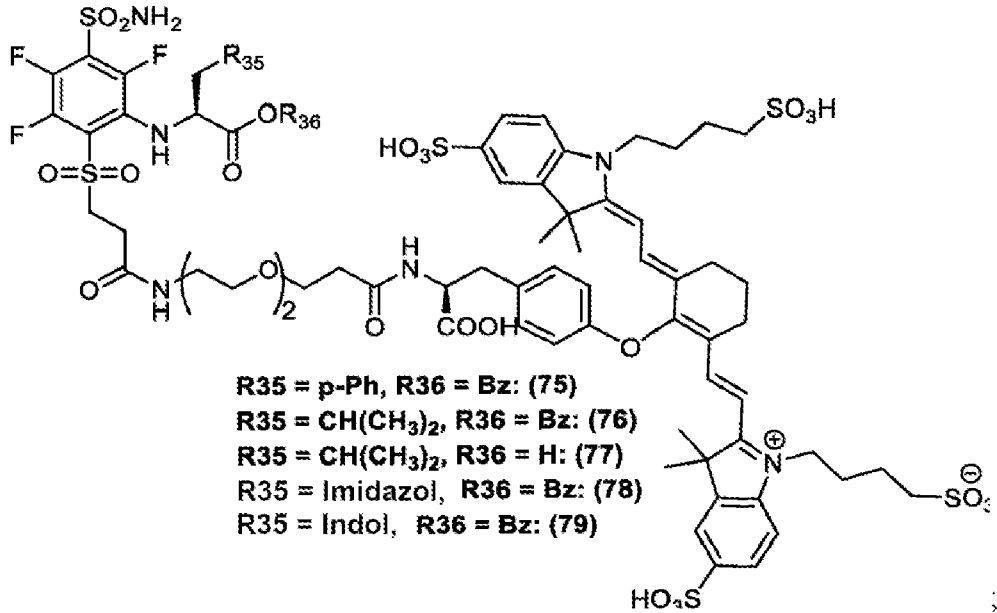
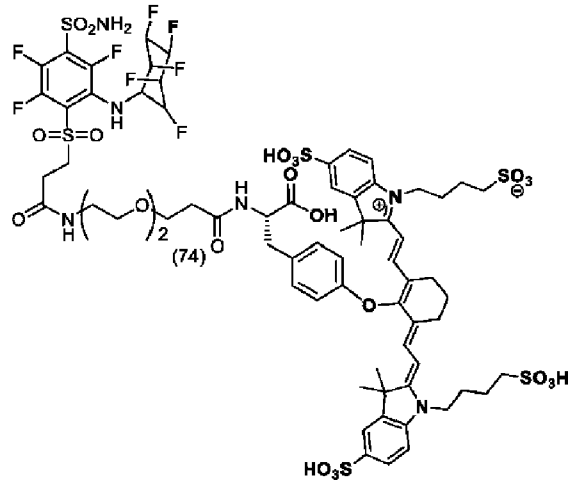


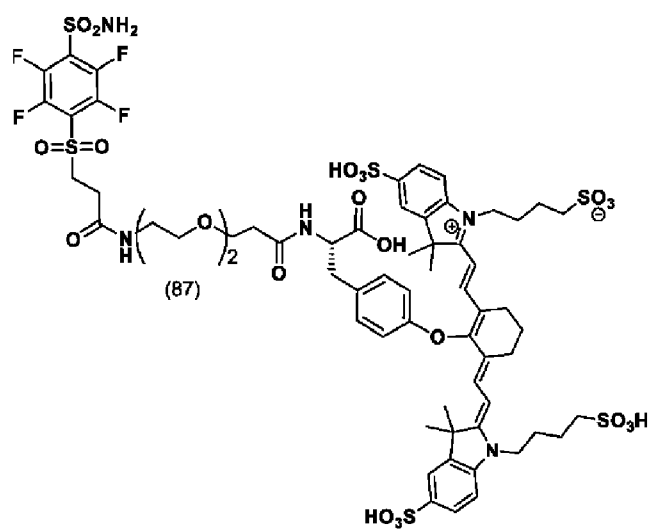
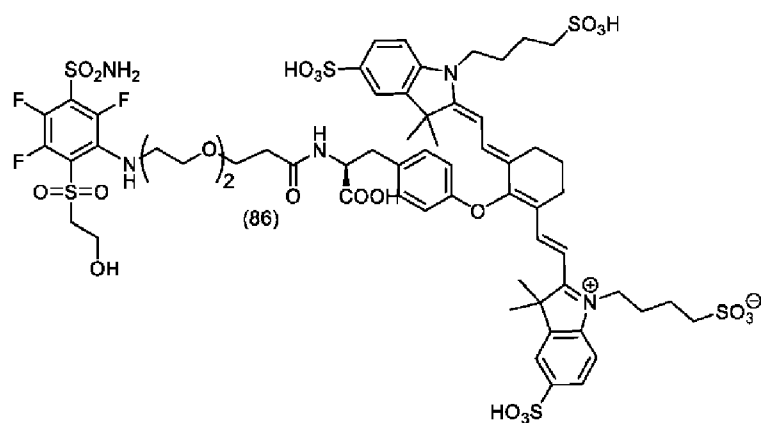
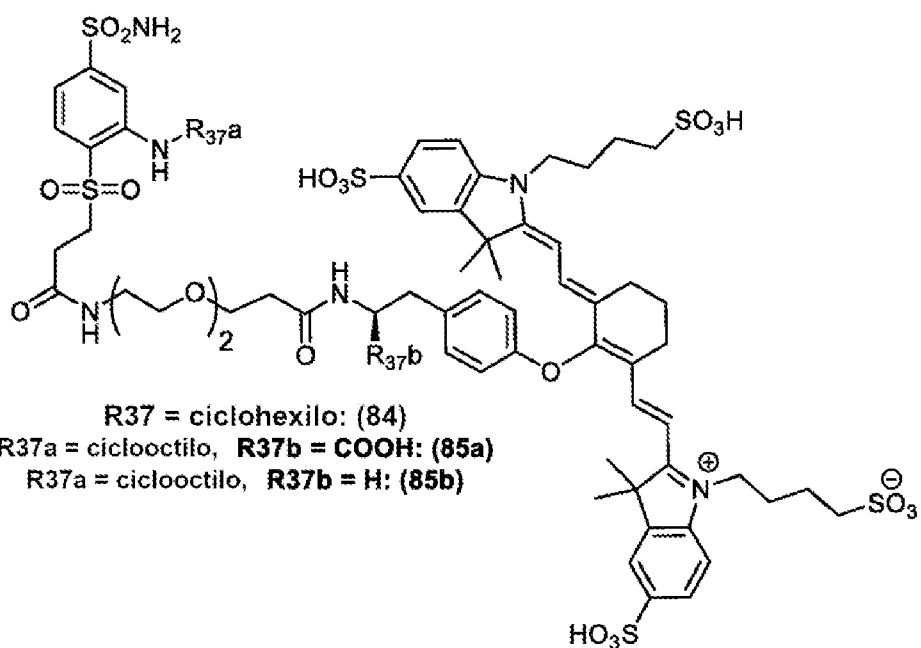
20

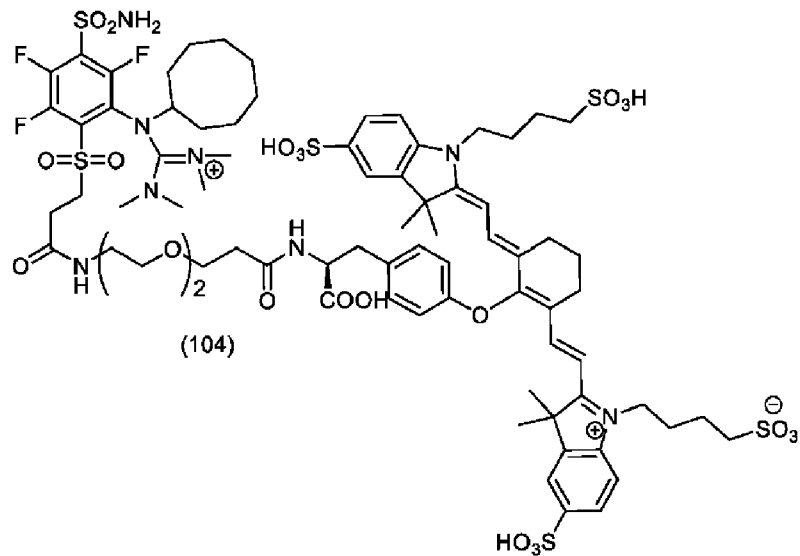
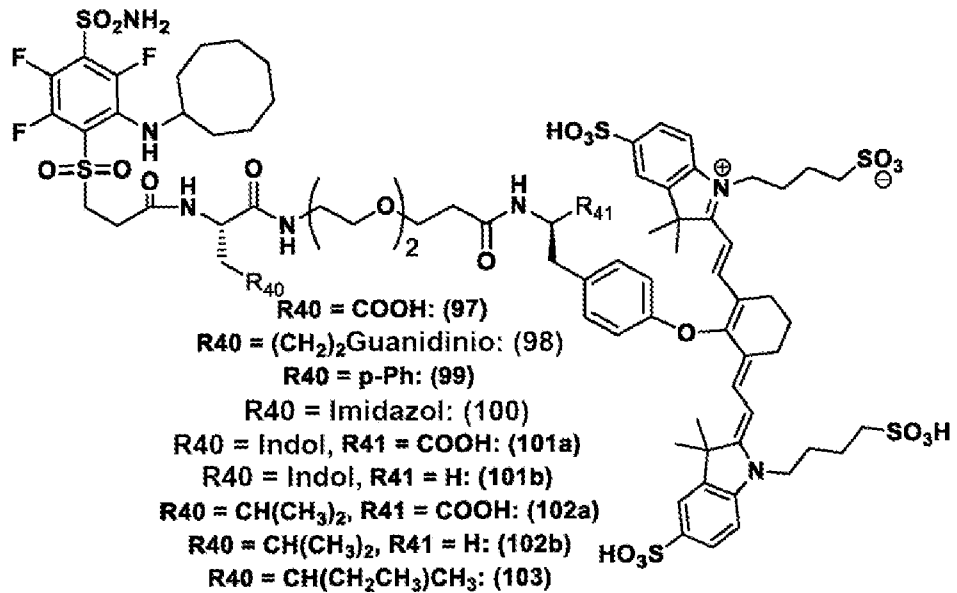
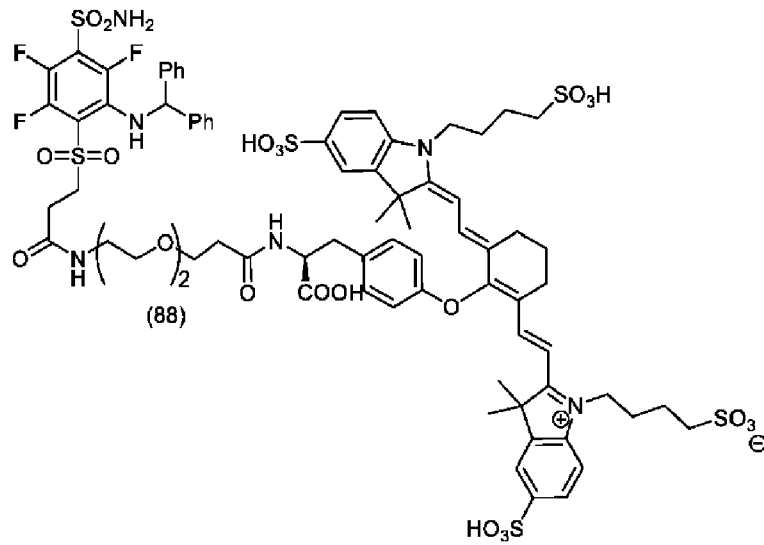


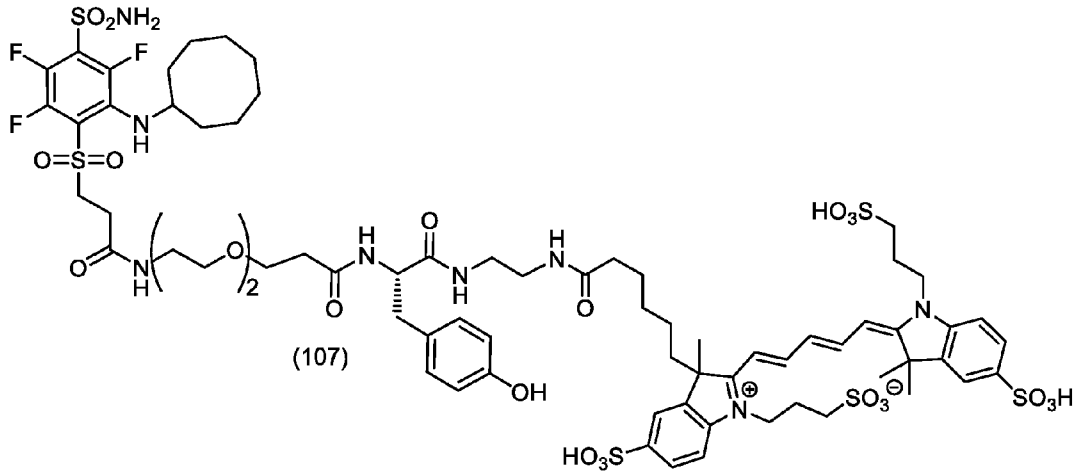
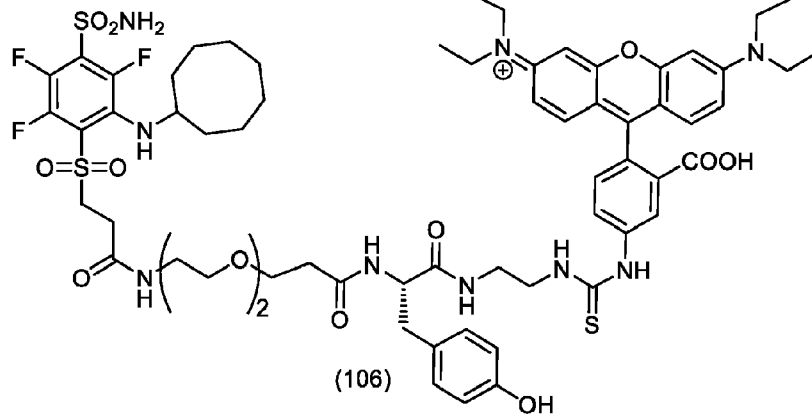
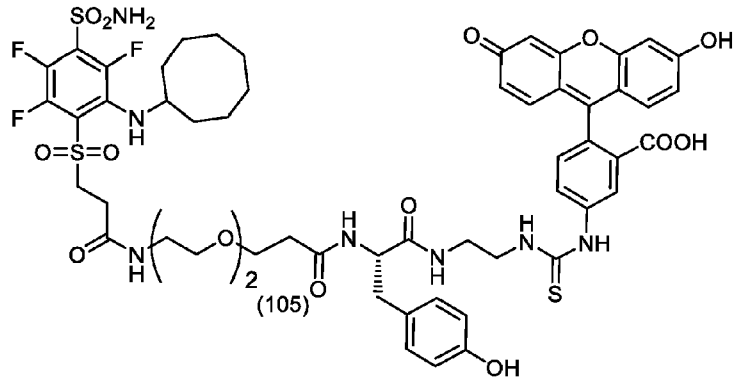
5





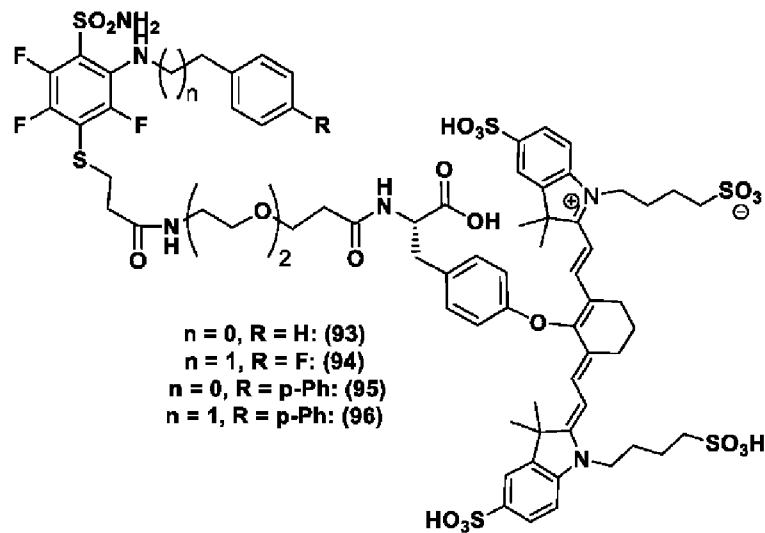
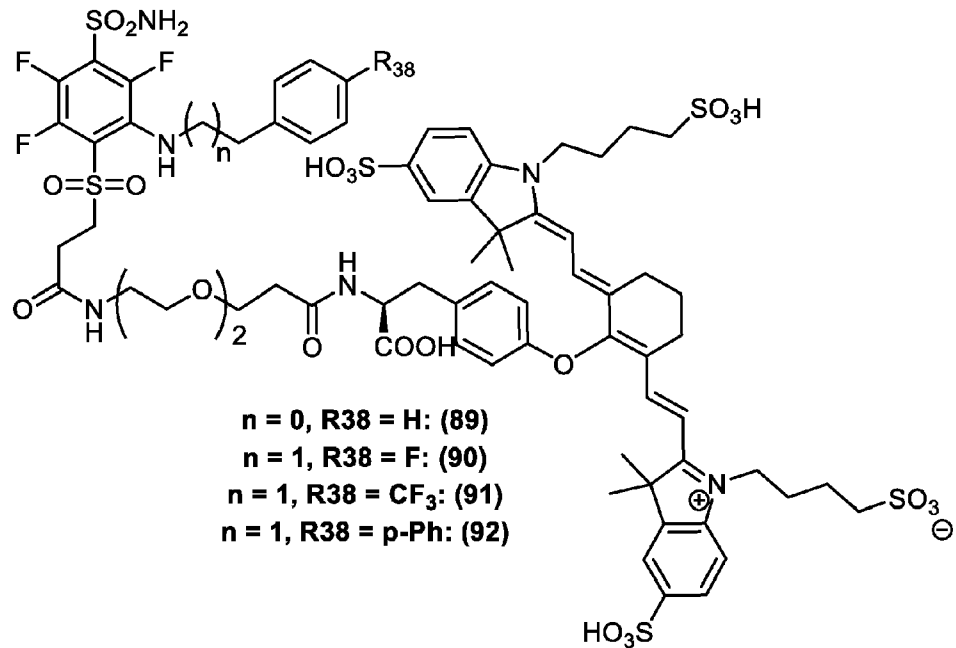






5

9. El compuesto según la reivindicación 7, en el que dicho compuesto tiene la fórmula:



- 5 10. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el compuesto tiene unos máximos de absorción y emisión entre aproximadamente 500 nm y aproximadamente 900 nm.
11. Un kit que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 10 12. Una composición que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
13. El compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o composición según la reivindicación 12, para su uso en el diagnóstico de una enfermedad en un sujeto.
- 15 14. El compuesto o composición para su uso según la reivindicación 13, en el que la enfermedad está asociada con células que expresan CA IX, en el que las células se eligen del grupo que consiste en células de cáncer de vejiga, células de cáncer pancreático, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de riñón, células de sarcoma, células de cáncer de mama, células de cáncer de cerebro, células de carcinoma neuroendocrino, células de cáncer de colon, células de cáncer de próstata, células de cáncer de testicular o células de melanoma.
- 20

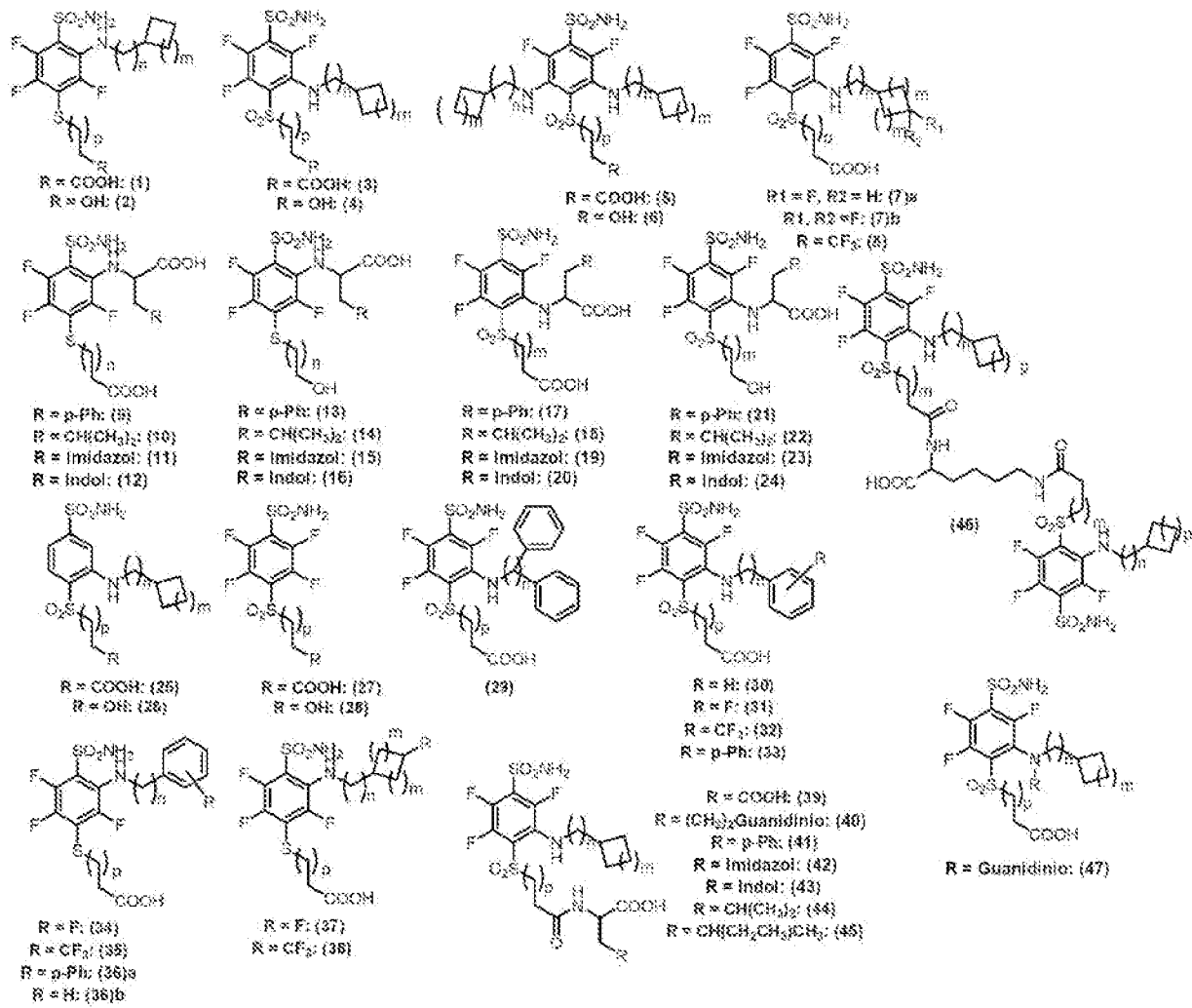
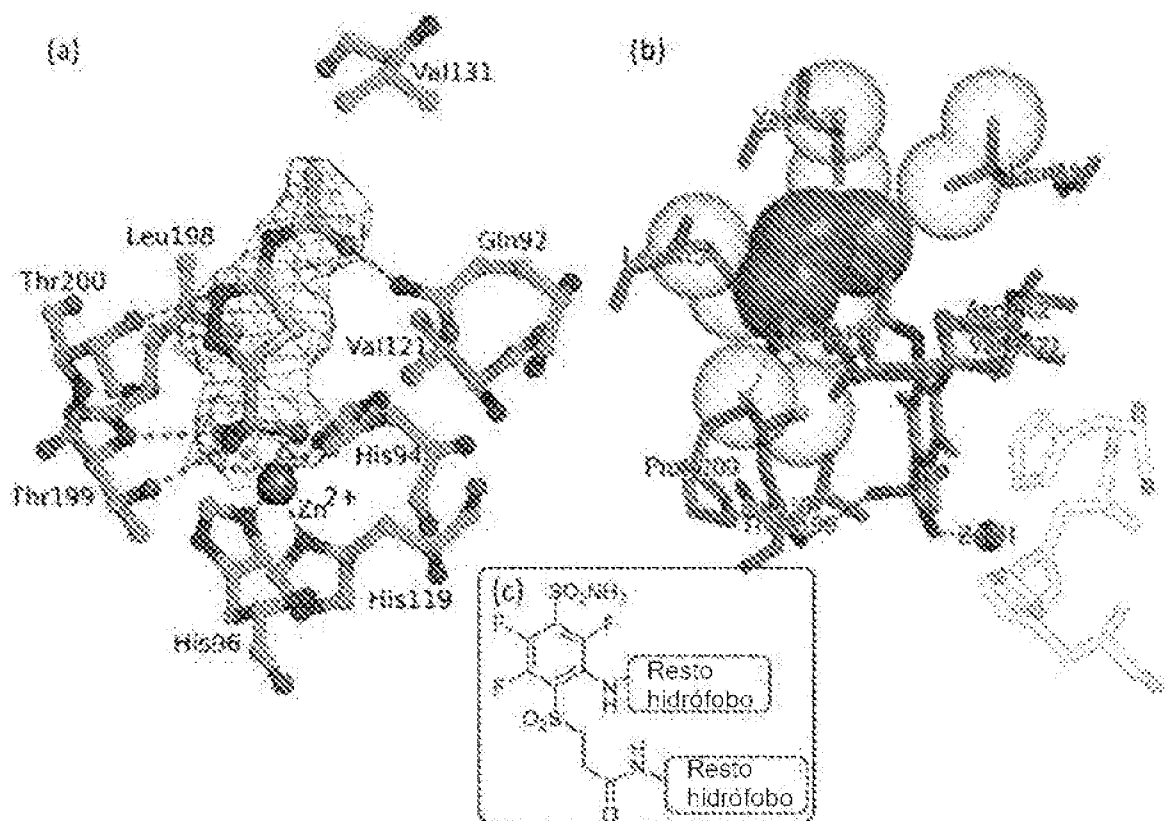


Figura 1.



Figuras 2 (a) - (c)

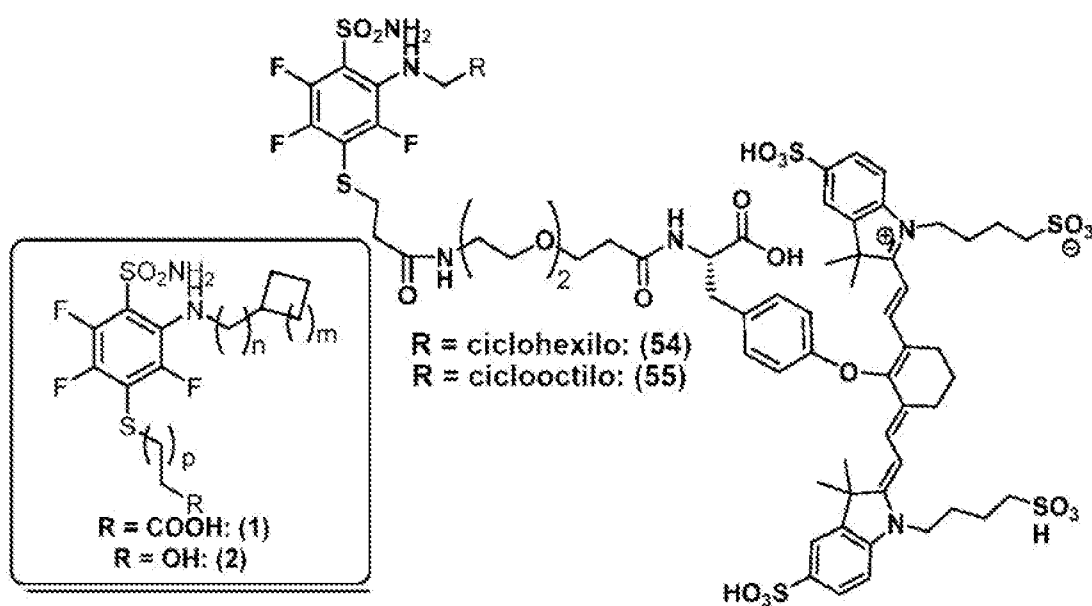


Figura 3

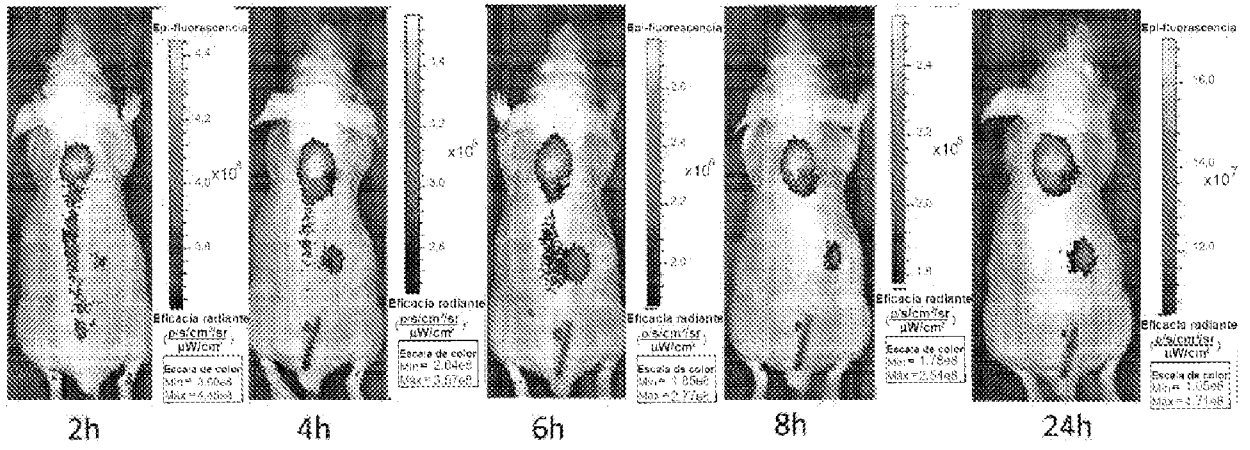


Figura 4

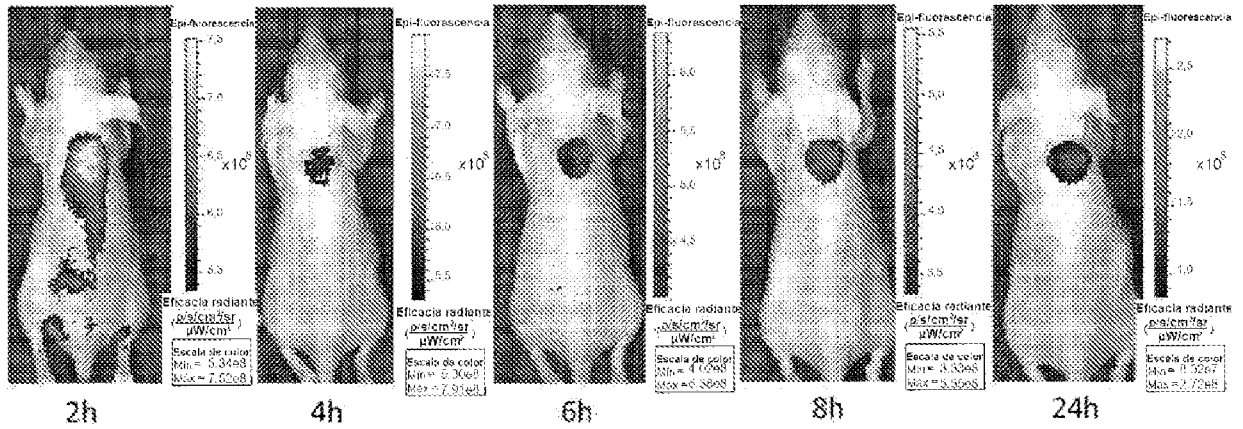


Figura 5

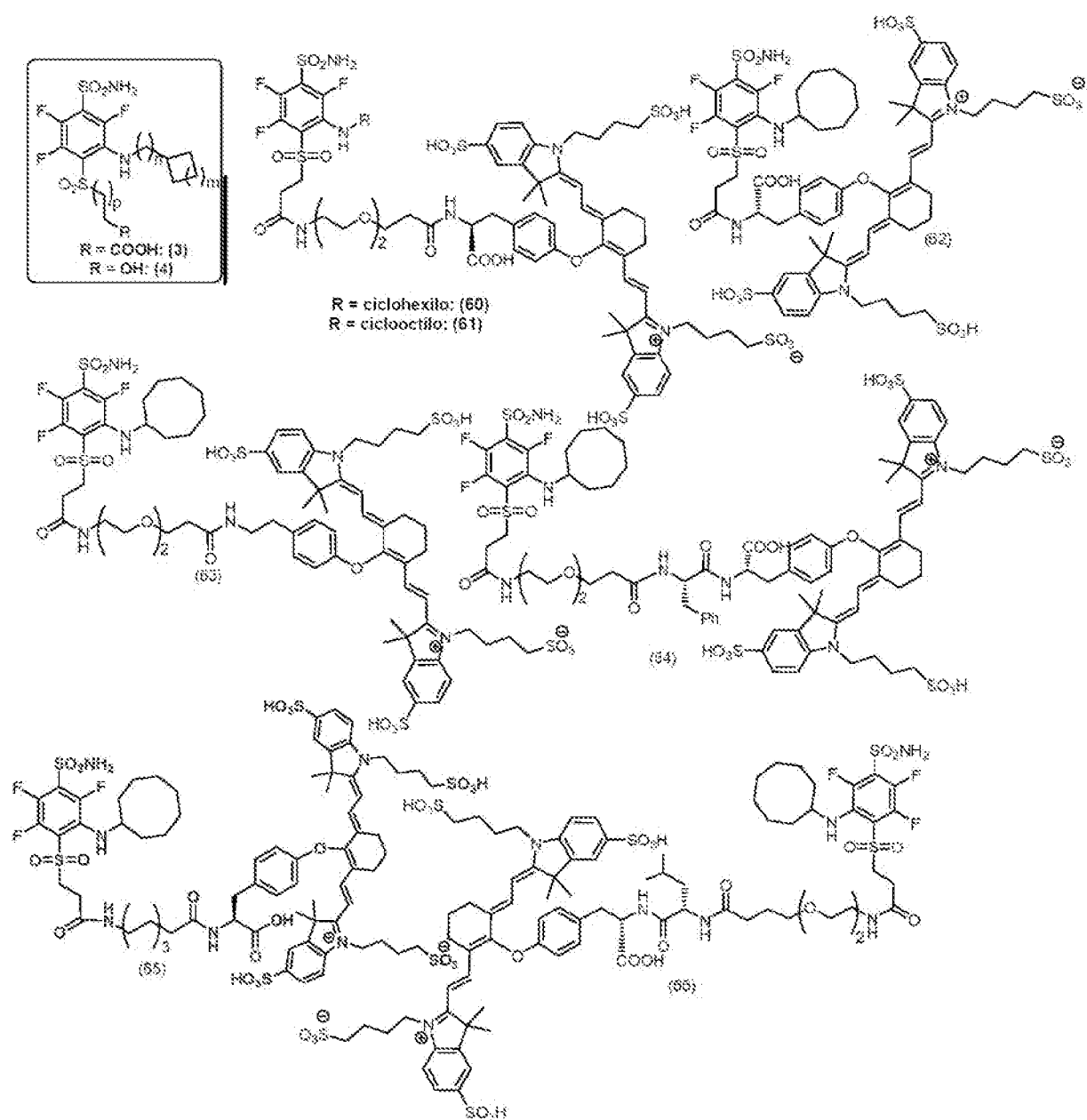


Figura 6

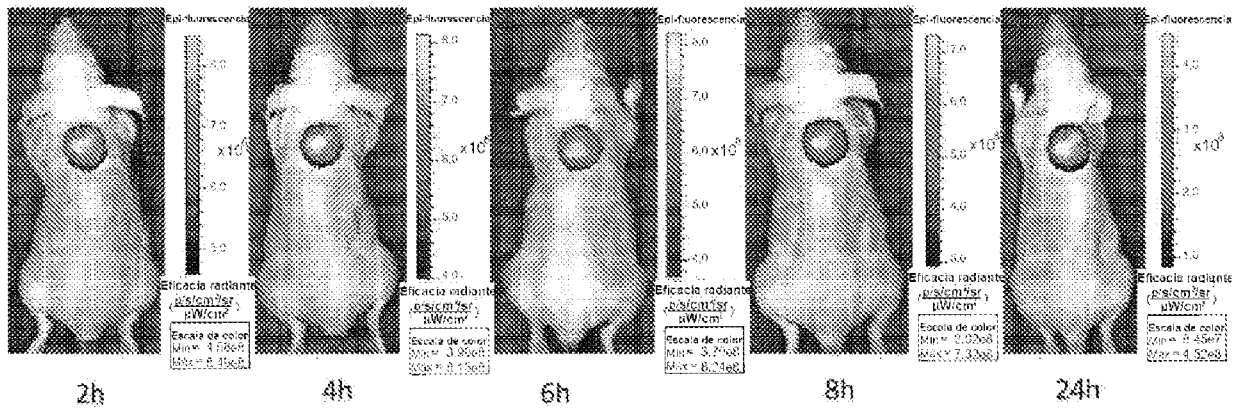
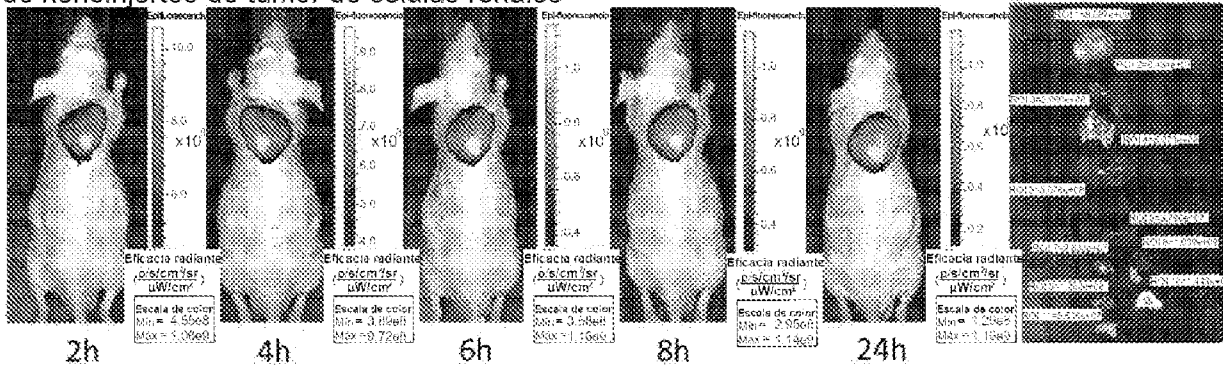


Figura 7

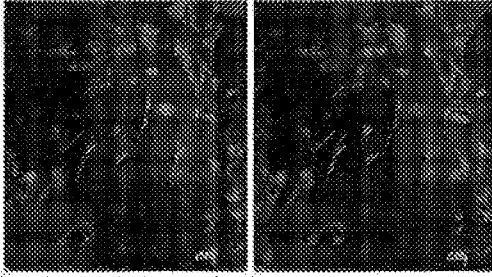
(a) Obtención de imágenes de cuerpo completo dependiente del tiempo de xenoinjertos de tumor de células renales

(b) Biodistribución

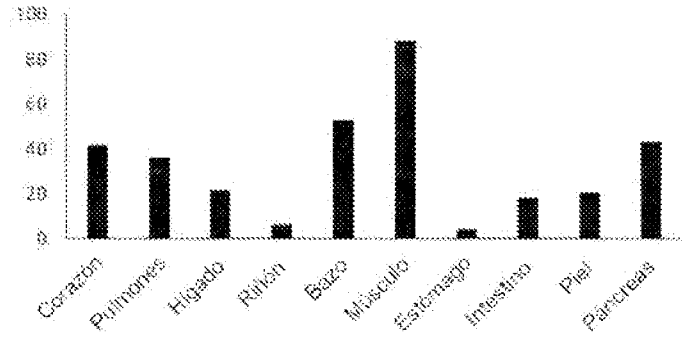


Figuras 8A-B

(a) Obtención de imágenes confocales

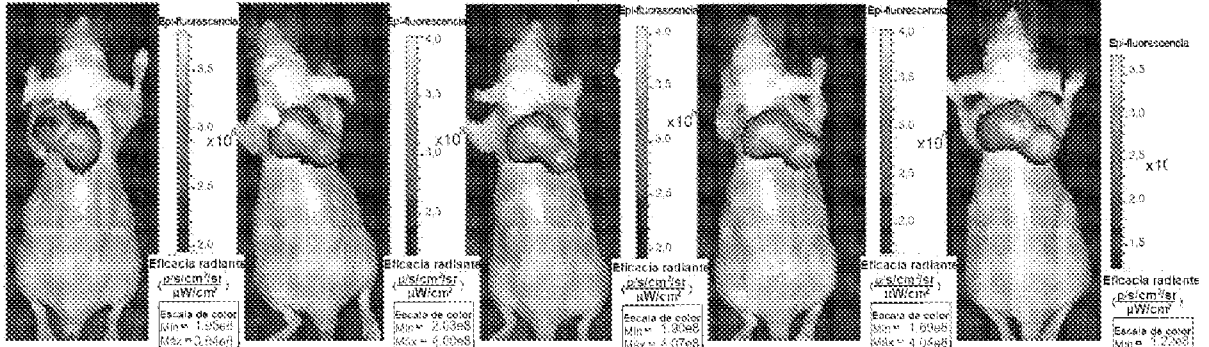


(b) Razones de tumor con respecto a fondo

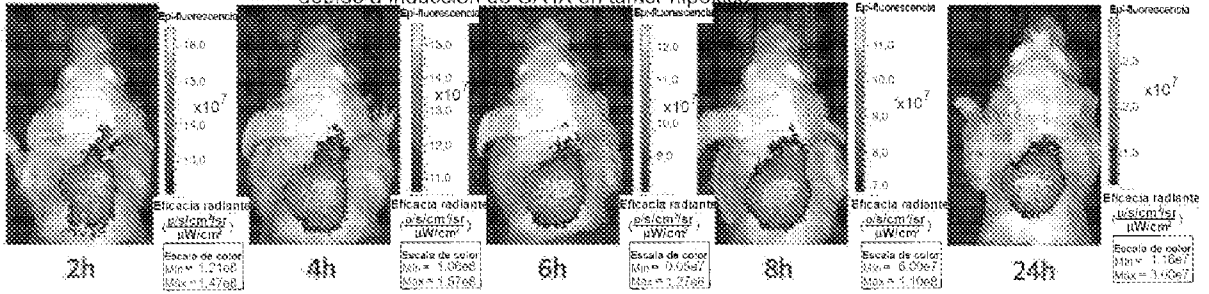


Figuras 9 (a) - (b)

(a) Captación de OTL338 en xenoinjertos de tumor de colon negativo para CA IX debido a inducción de CA IX en tumor hipóxico



(b) Captación de OTL338 en xenoinjertos de tumor de pulmón de células no pequeñas negativo para CA IX debido a inducción de CA IX en tumor hipóxico



Figuras 10A-B

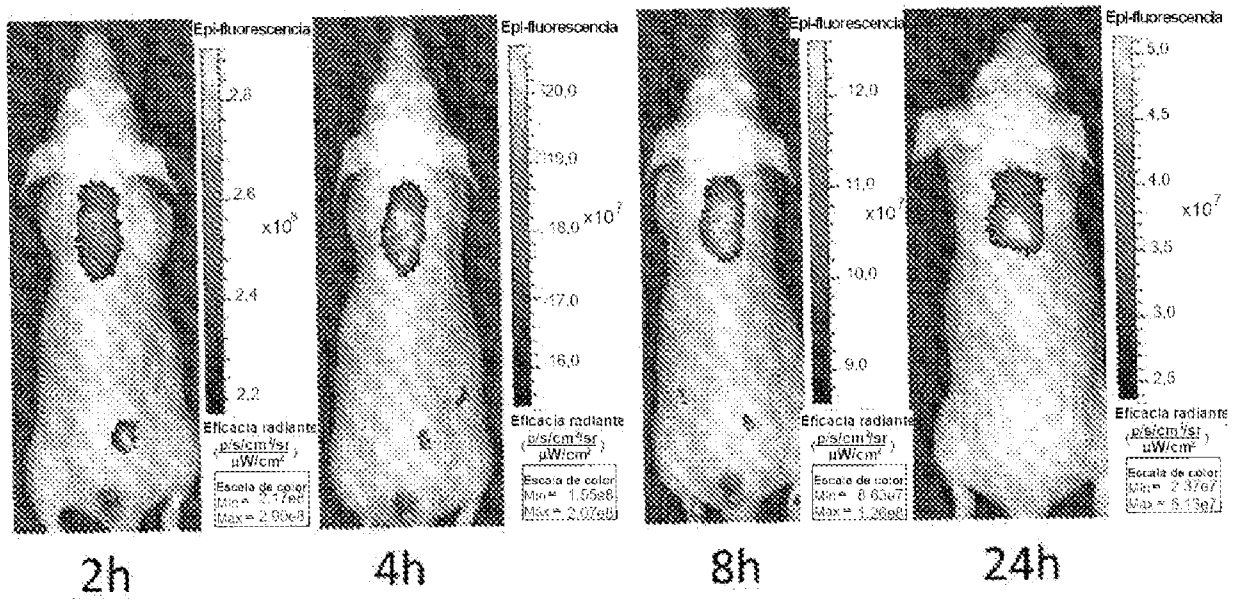


Figura 11

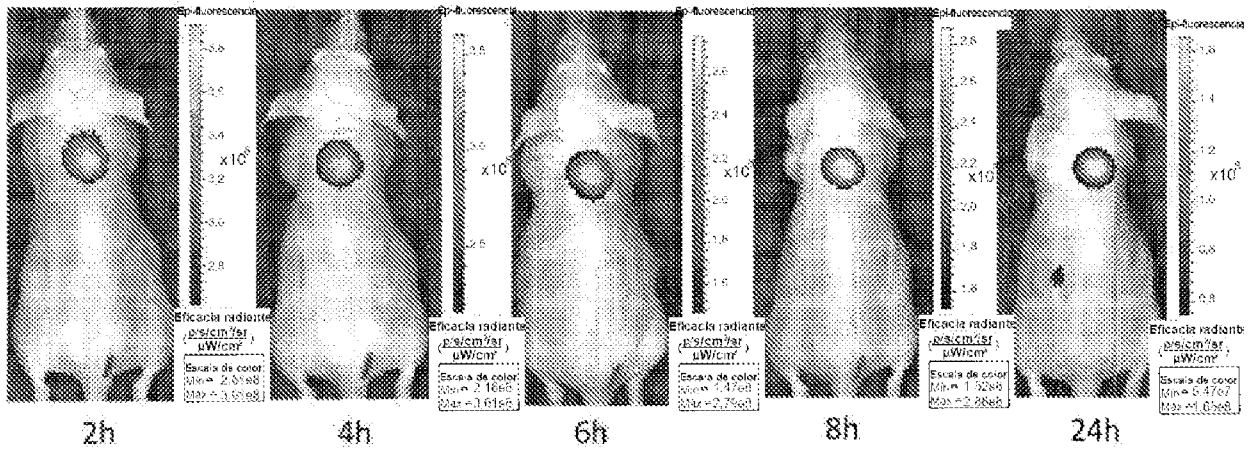


Figura 12

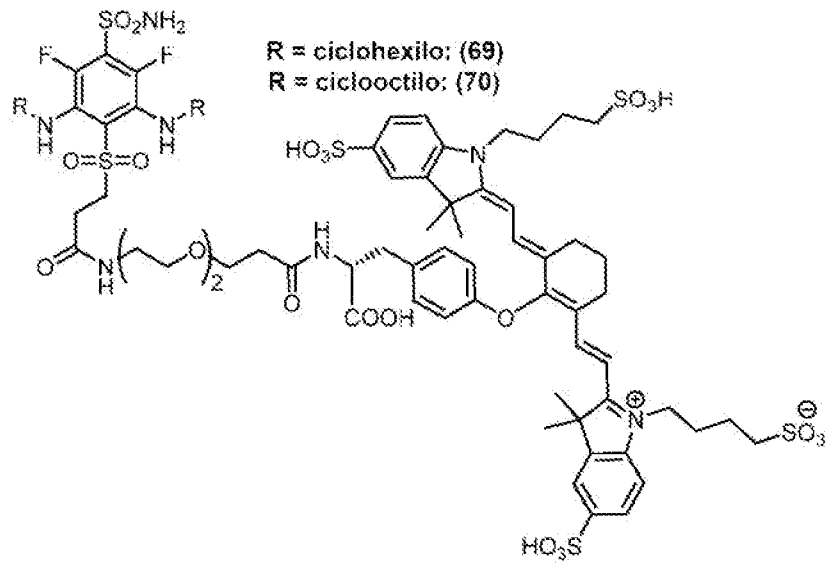
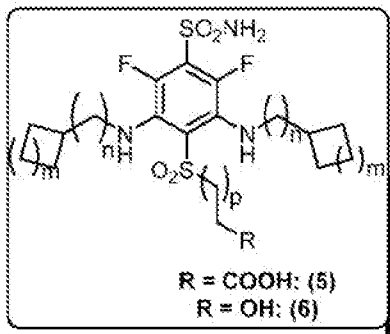


Figura 13

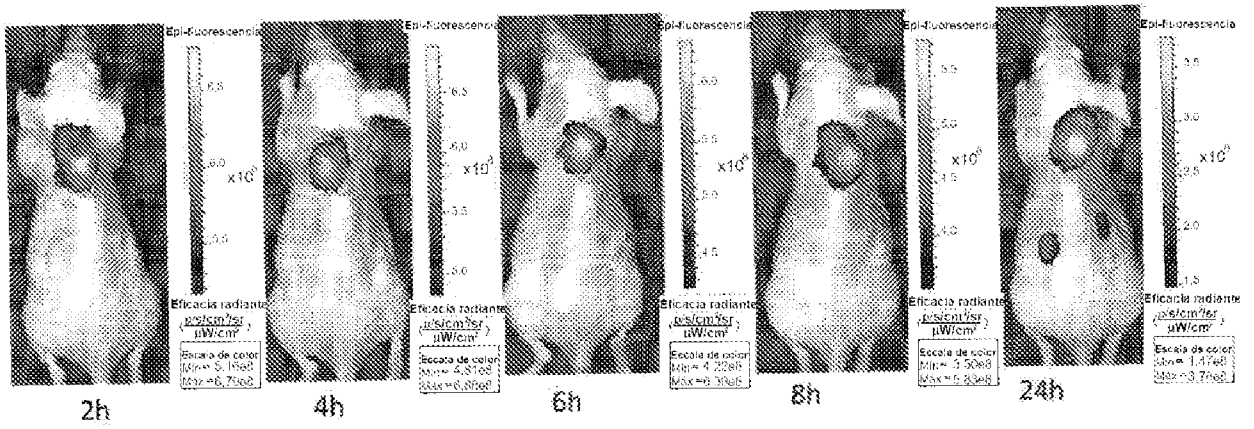


Figura 14

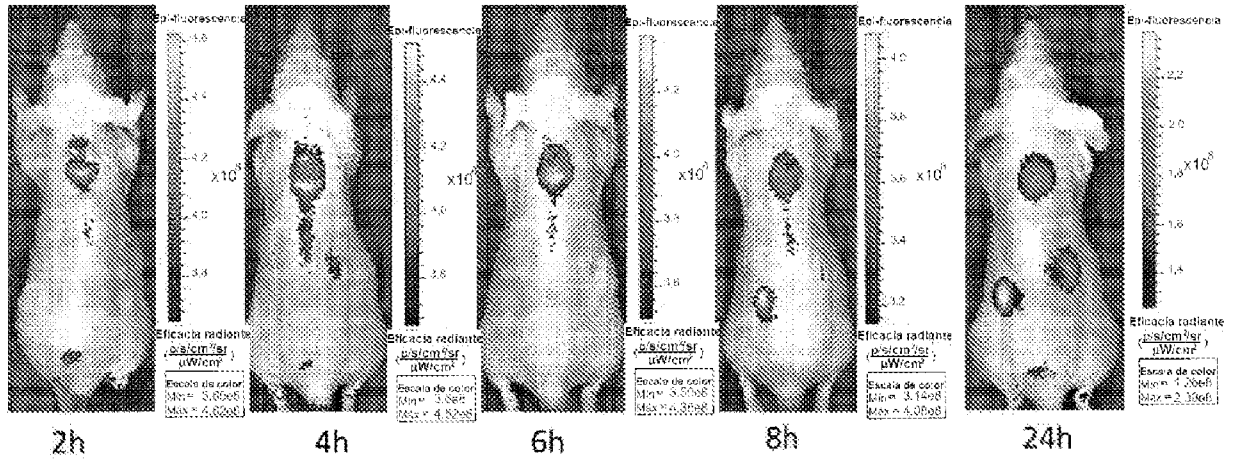


Figura 15

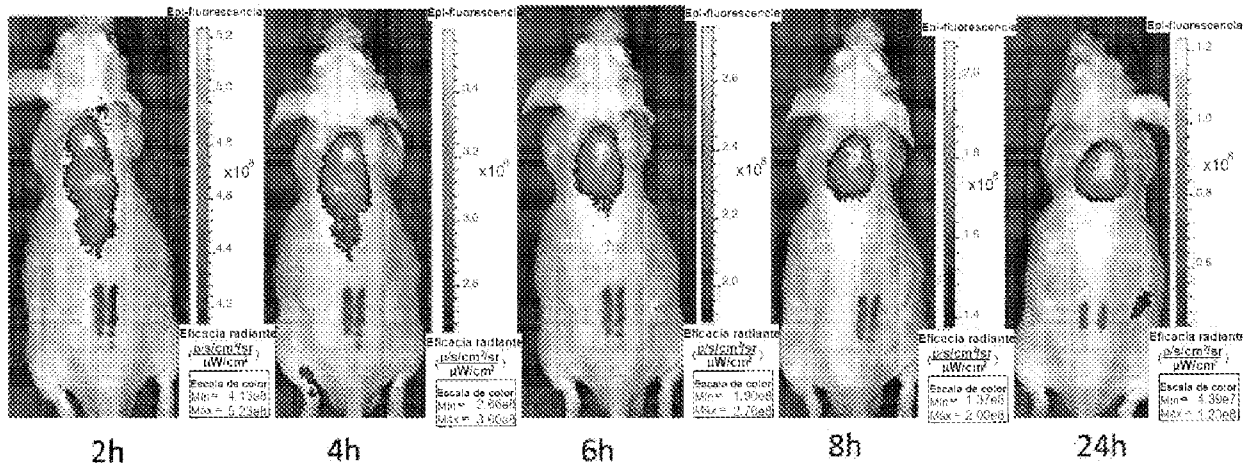


Figura 17

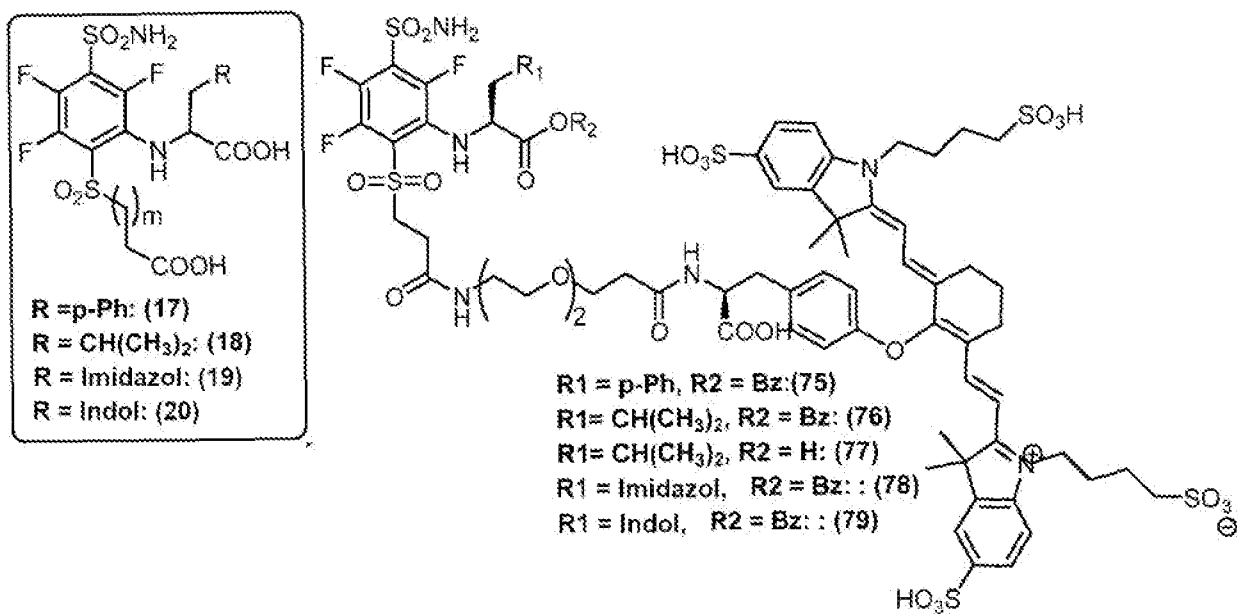


Figura 18

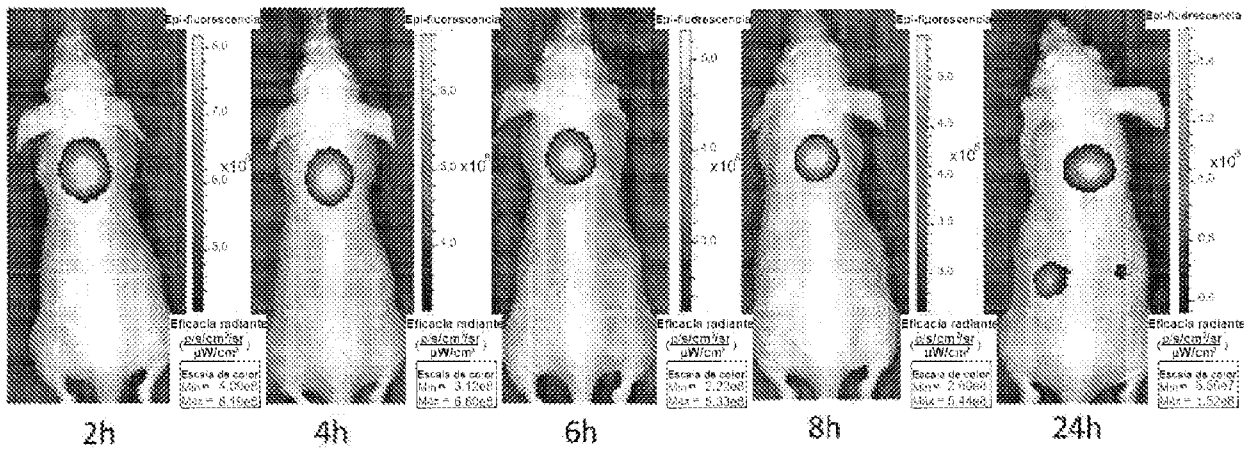


Figura 19

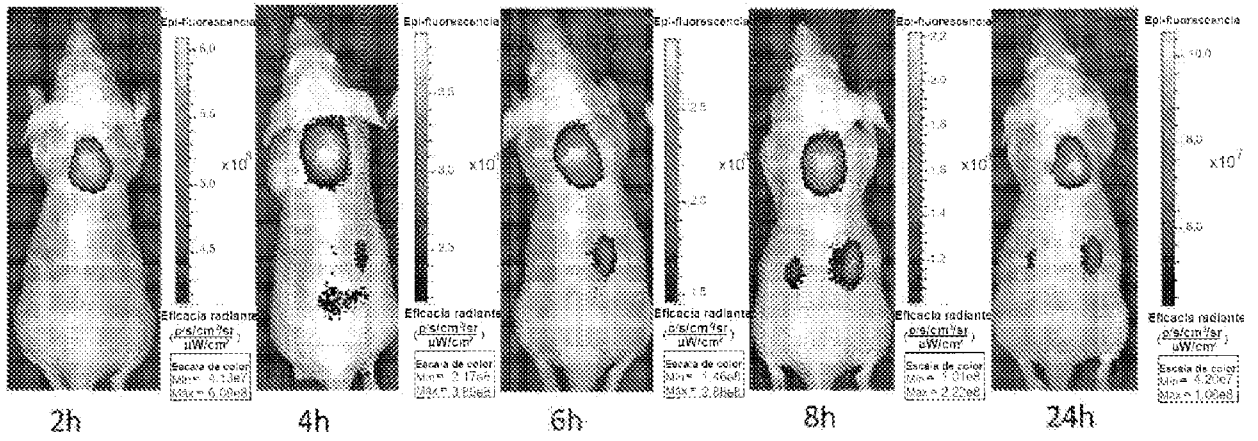


Figura 20

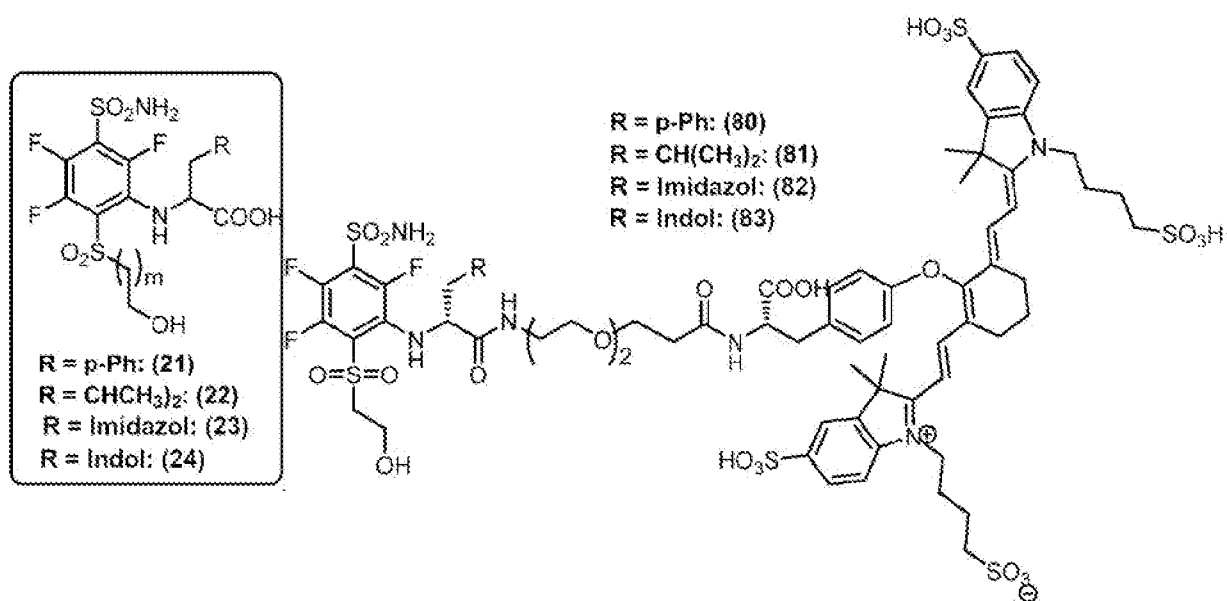


Figura 21

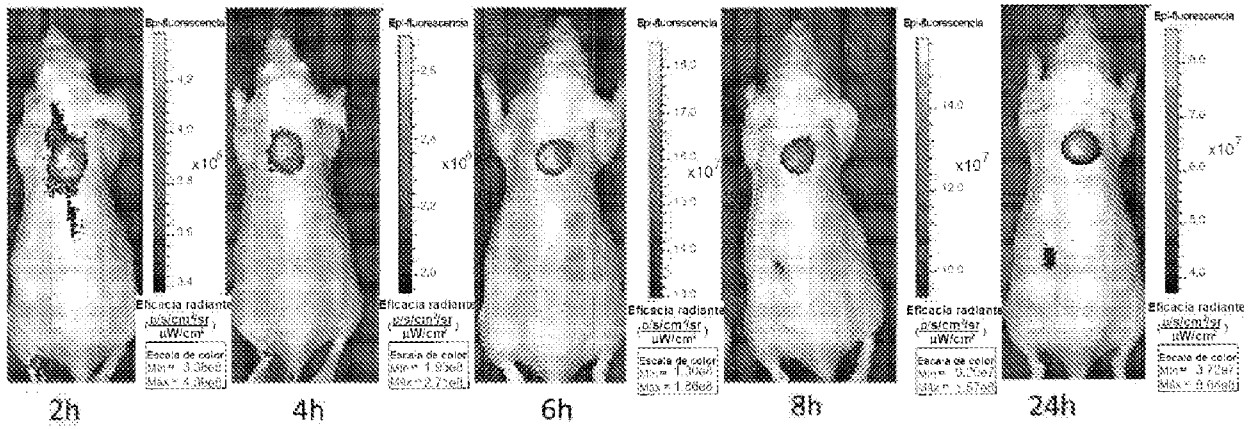


Figura 22

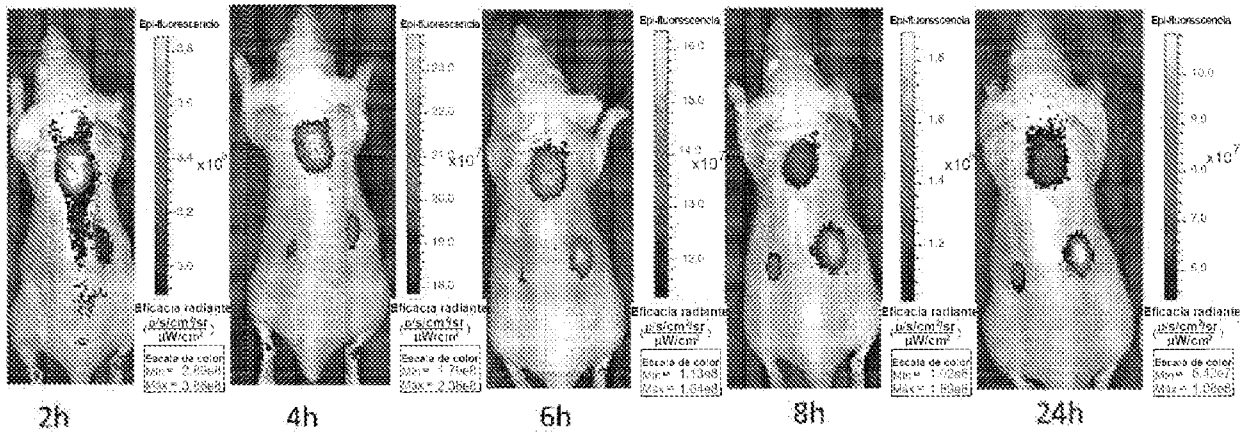


Figura 23

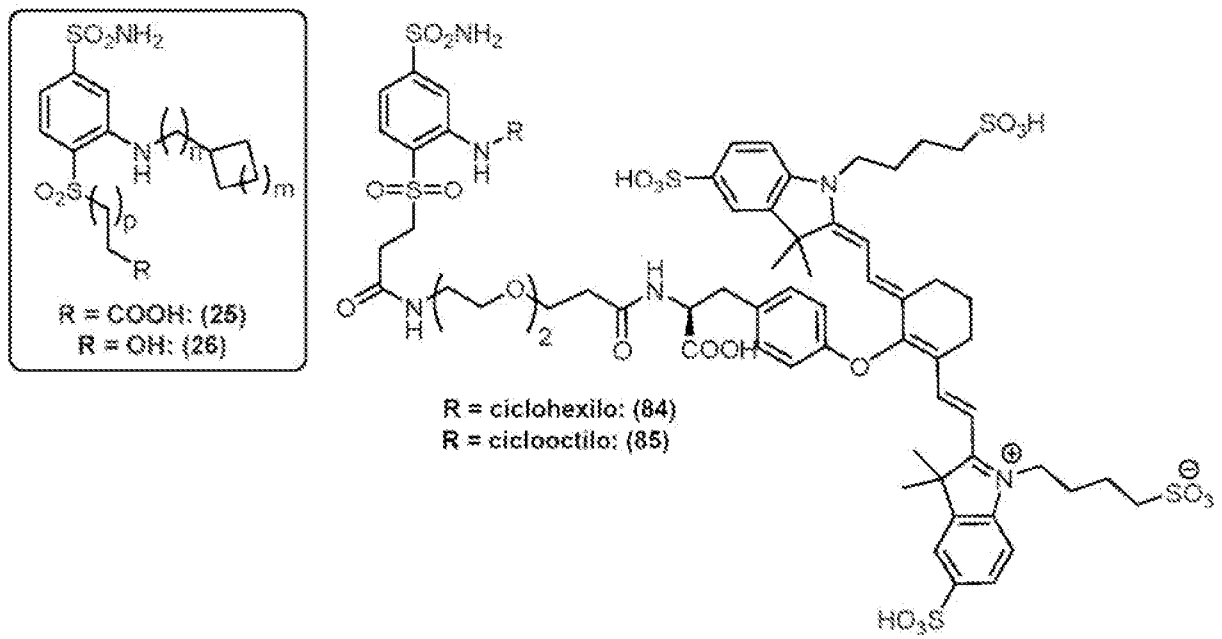


Figura 24:

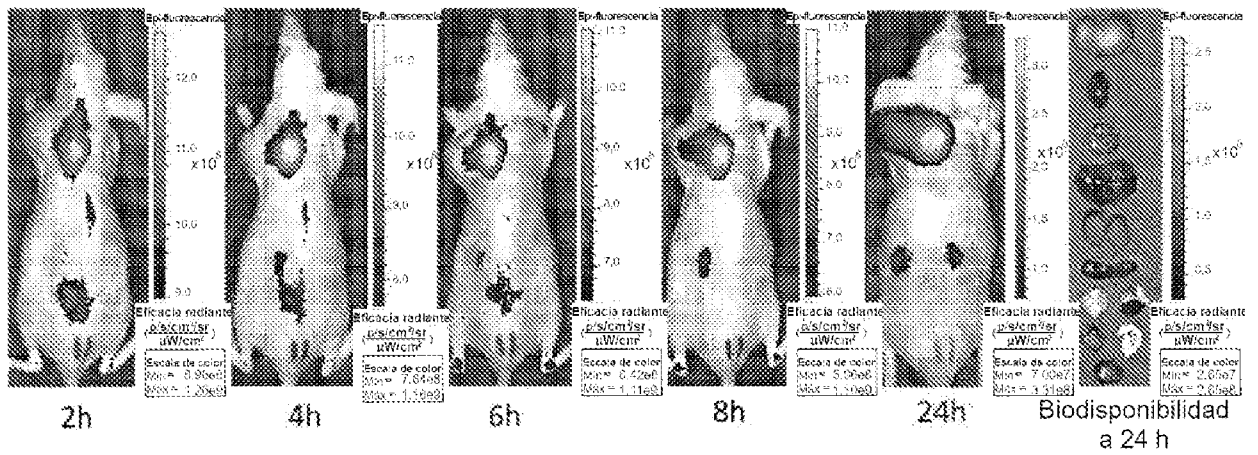


Figura 25

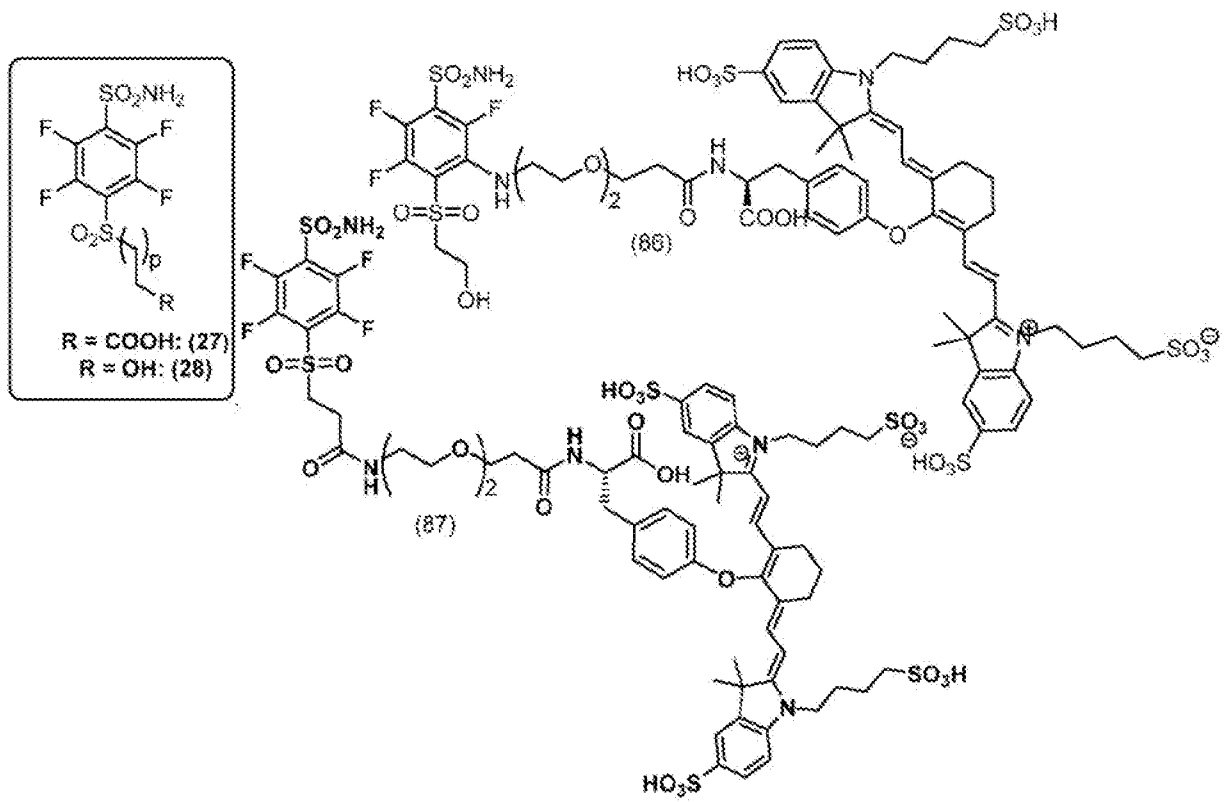


Figura 26

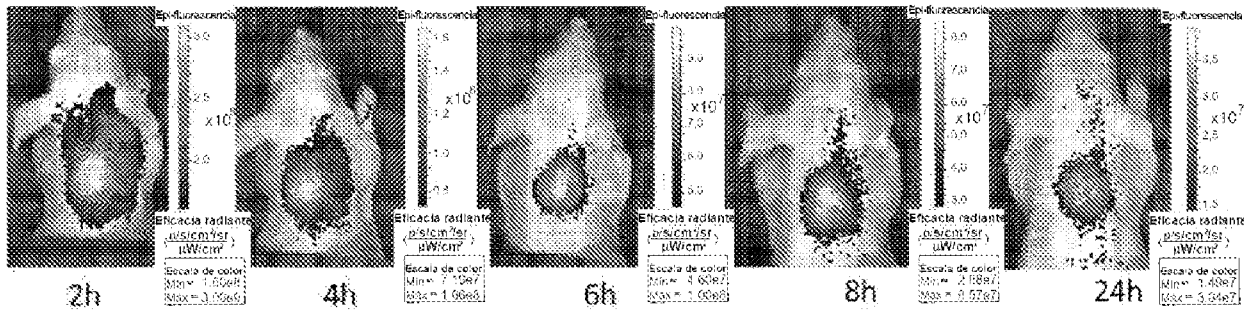


Figura 27

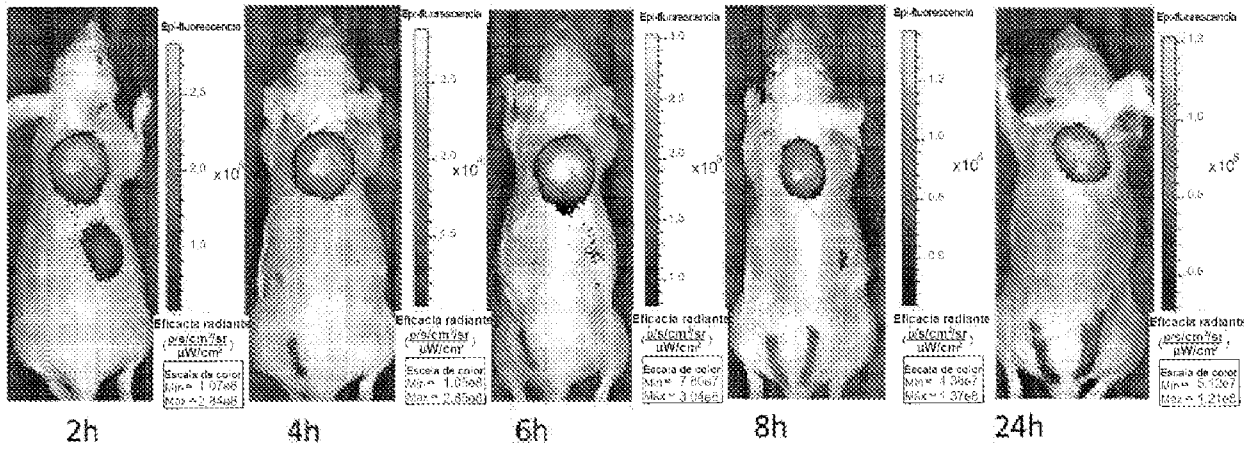


Figura 28

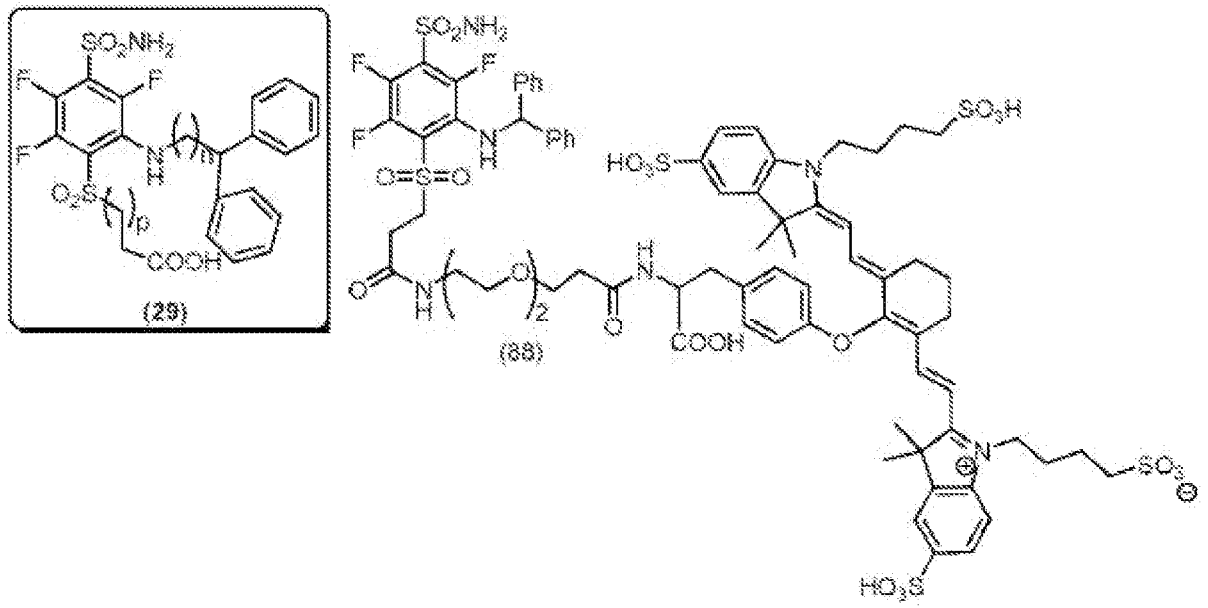


Figura 29

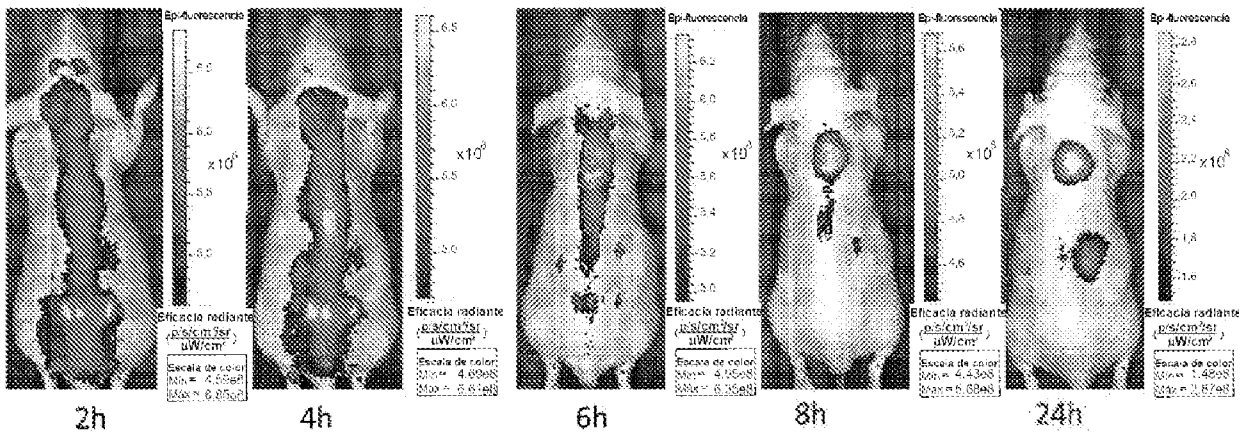


Figura 30

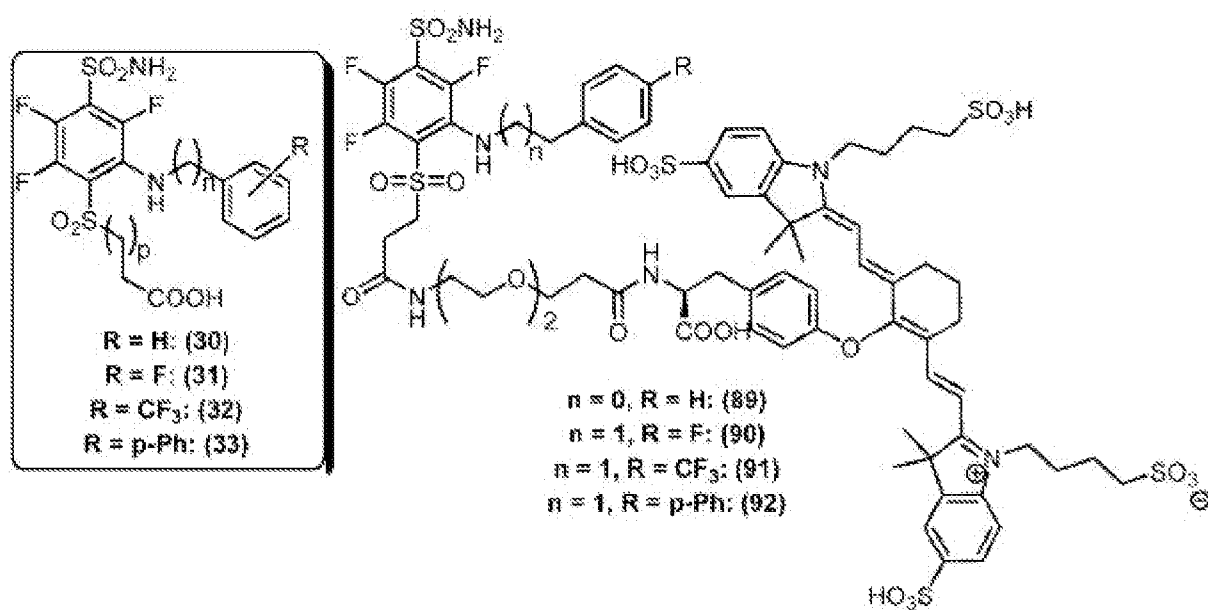


Figura 31

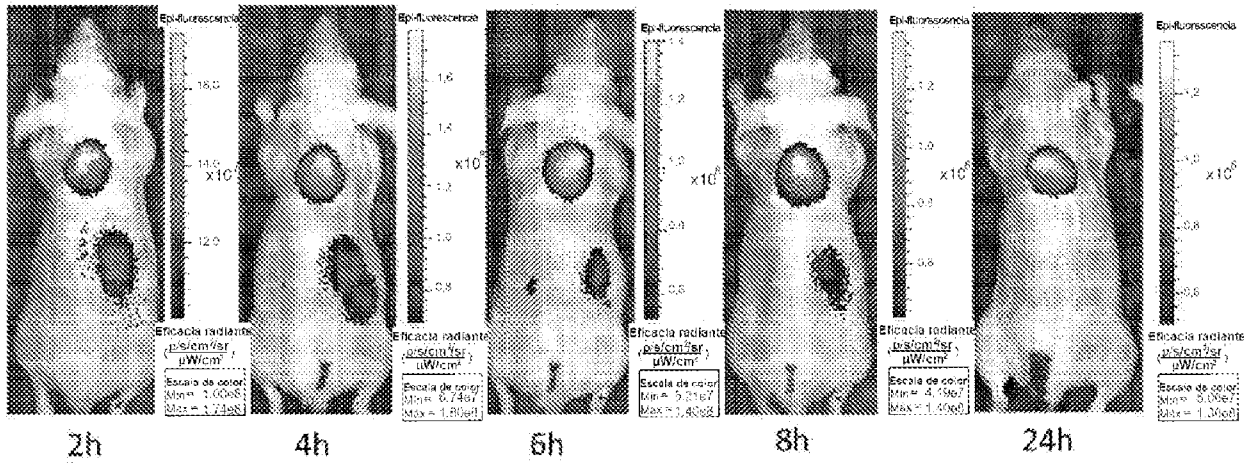


Figura 32

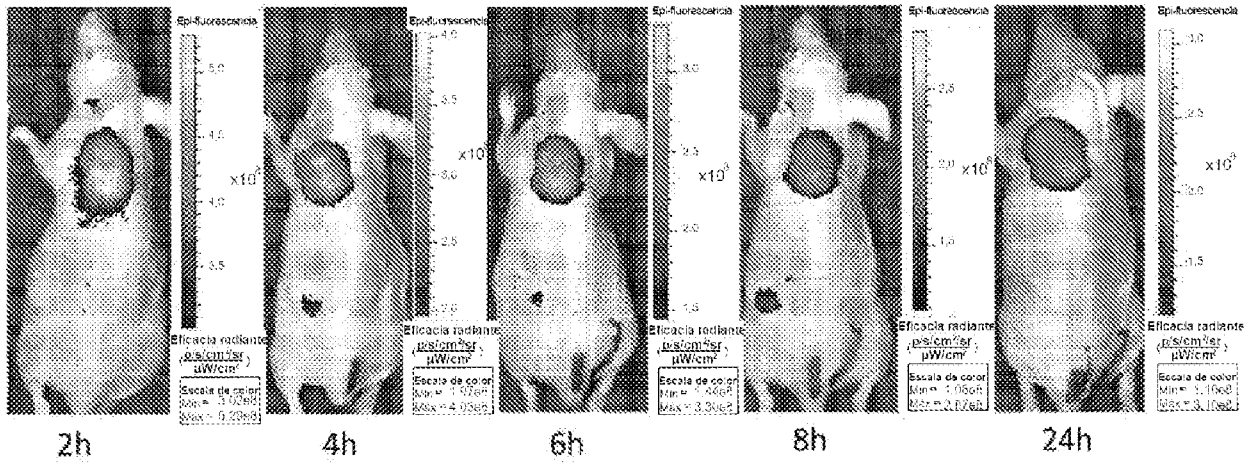


Figura 33

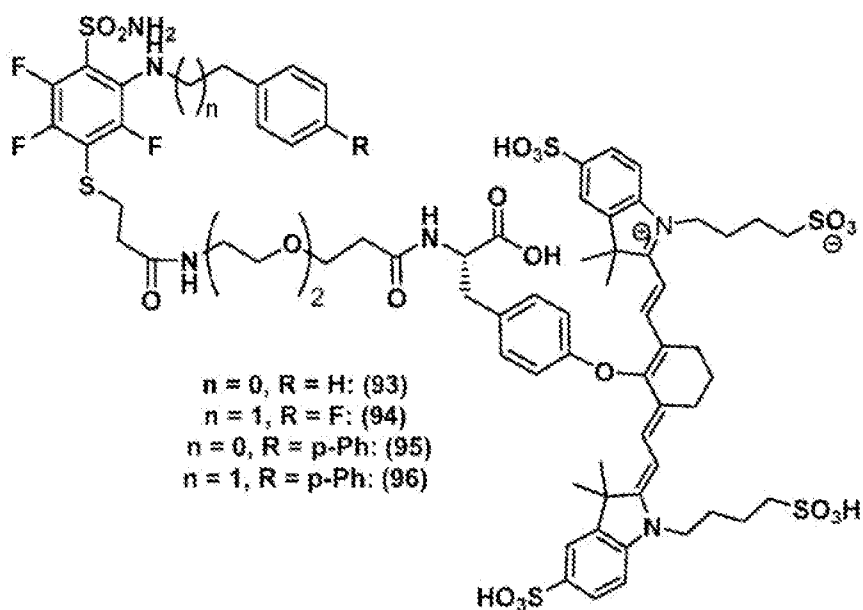
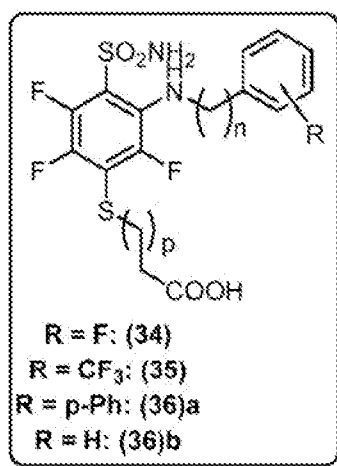


Figura 34

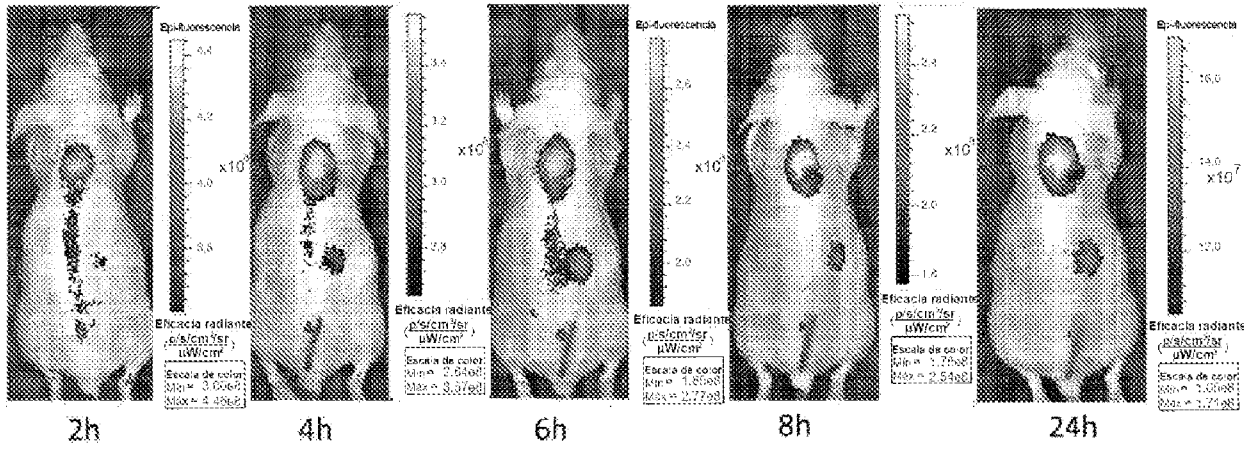


Figura 35

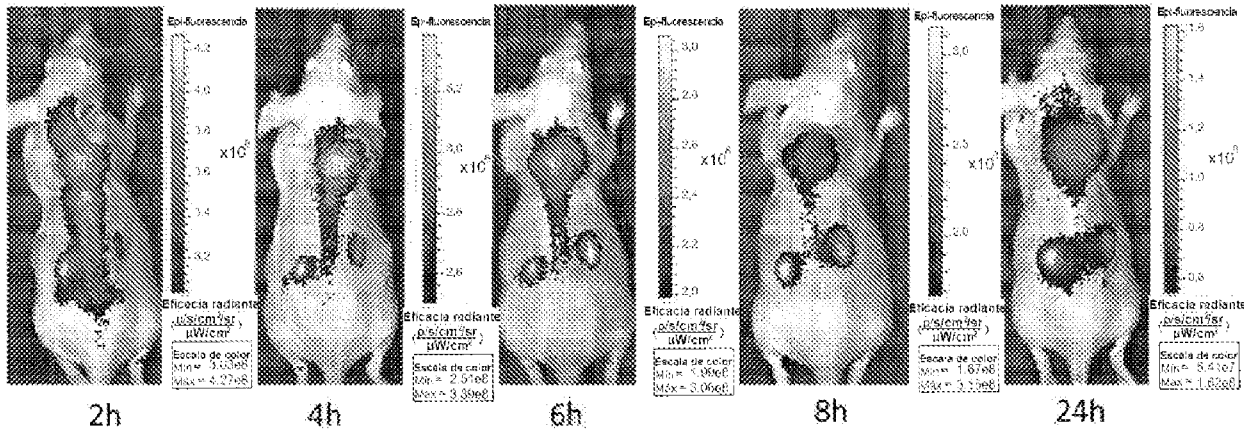


Figura 36

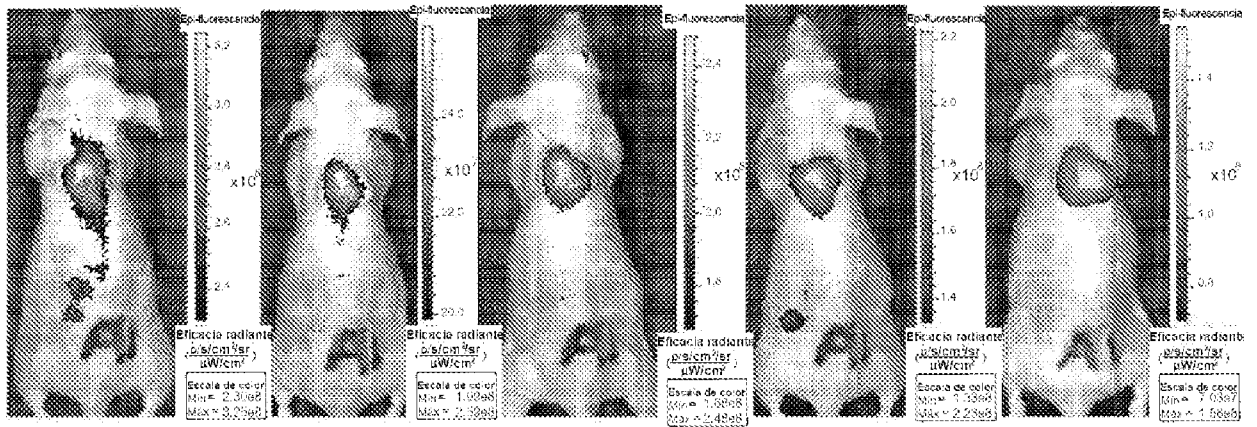


Figura 37

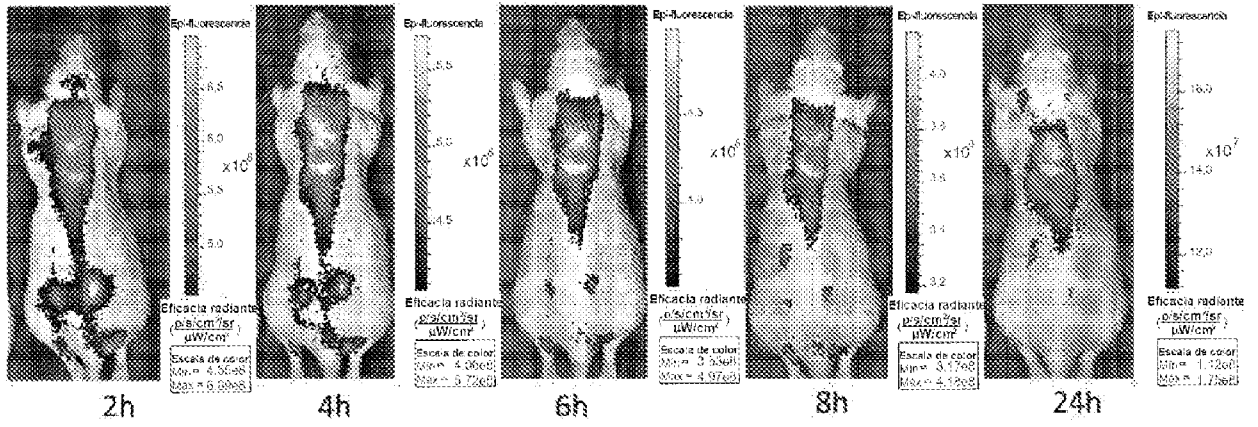


Figura 38

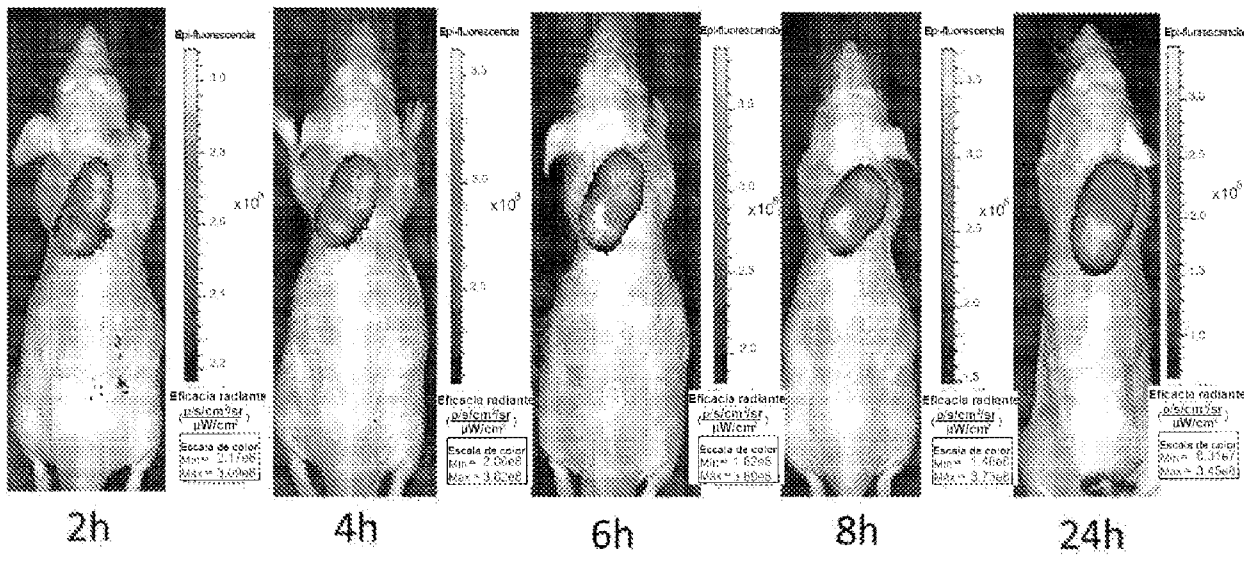


Figura 40

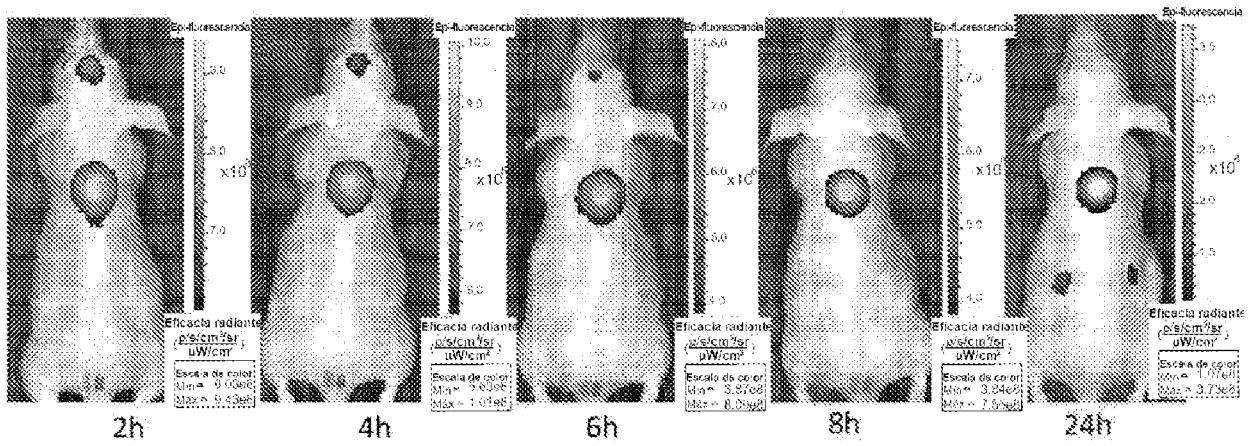


Figura 41

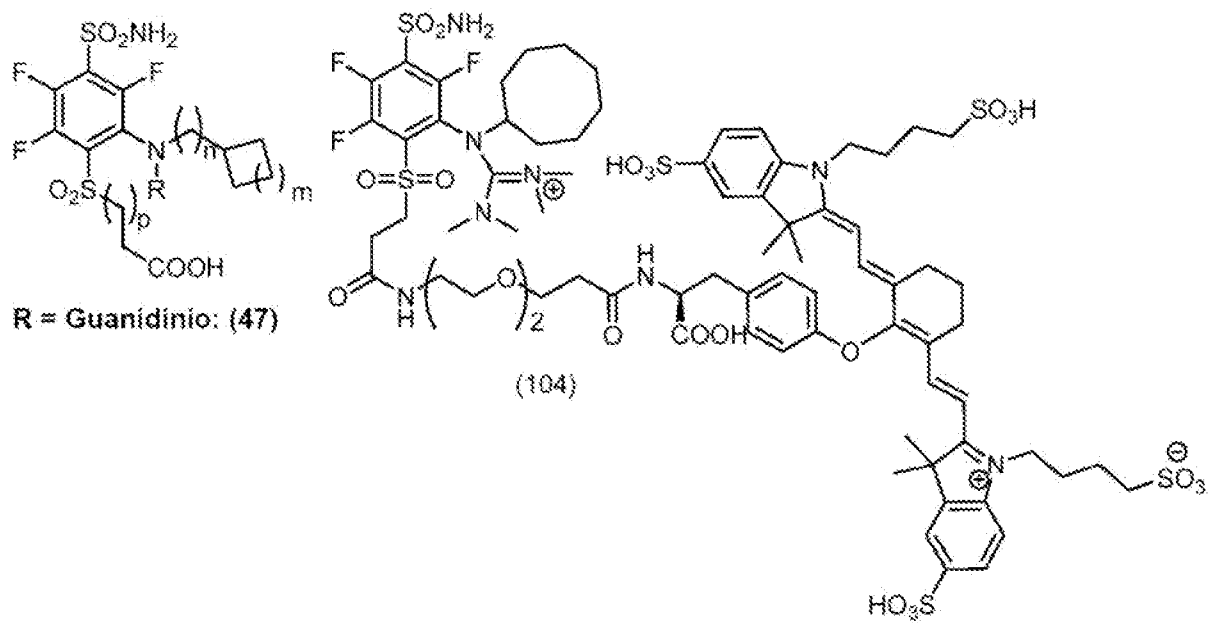


Figura 42

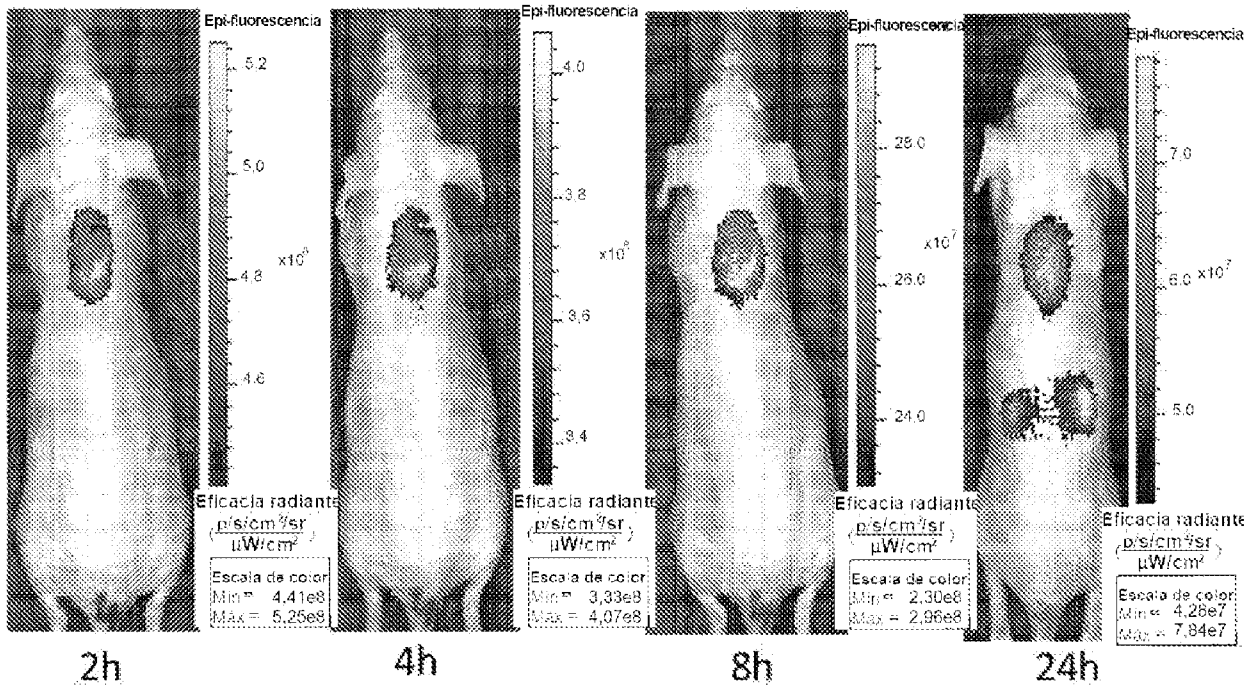


Figura 43

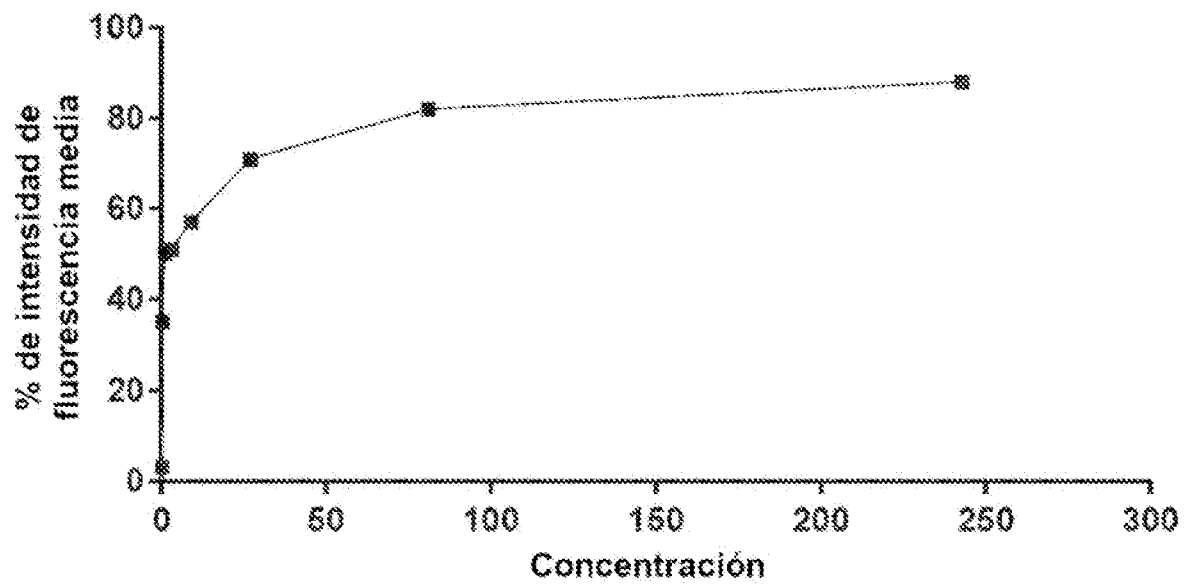


Figura 45

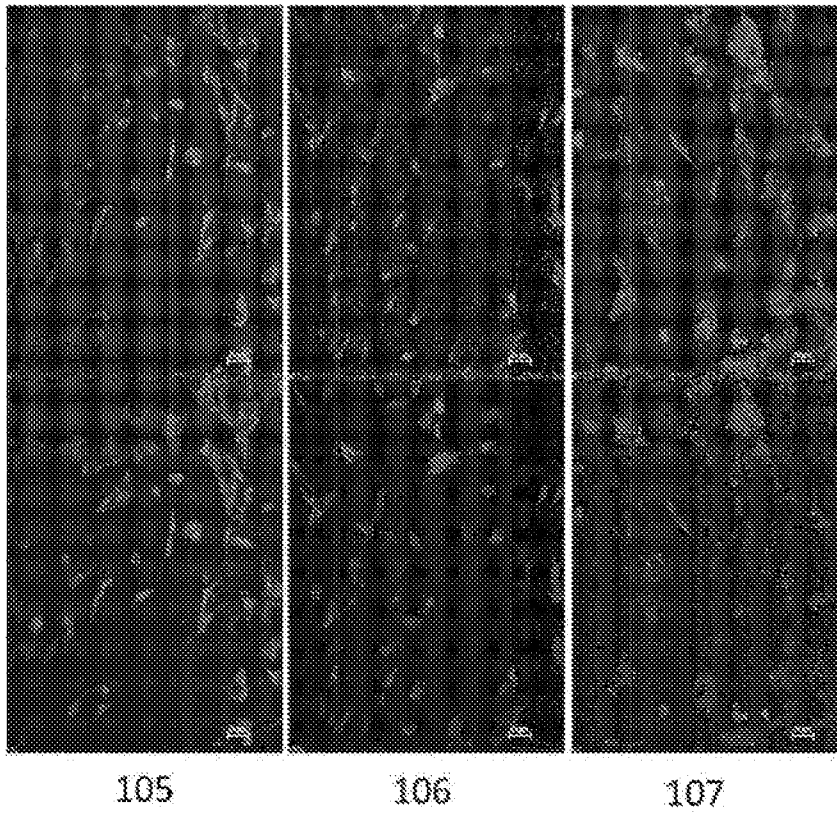


Figura 46