

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 914 927**

21 Número de solicitud: 202031262

51 Int. Cl.:

C07D 249/04 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

17.12.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.06.2022

Fecha de concesión:

23.01.2023

45 Fecha de publicación de la concesión:

30.01.2023

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca (Salamanca) ES**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ ROMERO, Marta;
GACHO TEMPRANO, Álvaro;
SÁNCHEZ DE BLAS, Beatriz;
PÉREZ MELERO, M^a Concepción;
BERMEJO GONZÁLEZ, Francisco y
GARCÍA MARÍN, José Juan**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **SONDAS PARA LA EVALUACIÓN NO INVASIVA DE LA FUNCIONALIDAD HEPÁTICA A TIEMPO REAL**

57 Resumen:

Sondas para la evaluación no invasiva de la funcionalidad hepática a tiempo real.

La presente invención se refiere a nuevas sondas con fluorescencia infrarroja y organotropismo hepatobiliar para la evaluación no invasiva de la funcionalidad hepática a tiempo real, que comprenden un compuesto de fórmula (1) como fluorocromo vectorizado.

ES 2 914 927 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Sondas para la evaluación no invasiva de la funcionalidad hepática a tiempo real

5 La presente invención se refiere a nuevas sondas con fluorescencia infrarroja y organotropismo hepatobiliar para la evaluación no invasiva de la funcionalidad hepática a tiempo real, que comprenden un compuesto de fórmula (I) como fluorocromo vectorizado.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Los ácidos biliares son moléculas sintetizadas por el hígado a partir del colesterol que presentan un marcado tropismo hacia los tejidos del circuito enterohepático debido a la presencia de transportadores específicos localizados en la membrana plasmática de las
15 células que componen estos órganos, como son las proteínas implicadas en la captación de aniones (NTCP, ASBT y OATPs) y cationes (OCTs) orgánicos y sistemas de exportación pasiva (OSTa/b) o activa (BSEP, MRP2, MRP3 y MRP4) de estos compuestos. Debido a este especial tropismo que les mantiene, en su mayor parte, recluidos en la circulación enterohepática han sido utilizadas como lanzaderas de
20 fármacos (clorambucilo, cisplatino, etc.) y otras moléculas con potencial actividad farmacológica (péptidos, nucleósidos y bases nitrogenadas), reduciendo así los efectos secundarios indeseables y aumentando su biodisponibilidad en el hígado y en el intestino.

25 En la actualidad, existe un número muy limitado de moléculas con la característica de poseer una marcada vectorialidad específica hacia los hepatocitos, colangiocitos e ileocitos que además puedan ser utilizadas como marcadores para el estudio de la funcionalidad hepática. Entre ellas se encuentran para su uso en investigación preclínica algunos derivados de ácidos biliares marcados radiactivamente con [¹⁴C] y [³H] y el ácido
30 [¹⁸F]-fluorocólico, o con fluorocromos como la colilglicilamidofluoresceína y derivados, colato de nitrobenzoxadiazolil-lisina y derivados, y colato de dansilo y derivados, entre otros (Holzinger F *et al.*, *Hepatology*, **1997** 26(5):1263-71; Monte MJ *et al.*, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, **2008**, 295(1):G54-G62; Blazquez AG *et al.*, *Mol Pharmacol.*, **2012**, 81(2):273-83; De Lombaerde S *et al.*, *PLoS One*, **2017**, 12(3):e0173529).

35

Sin embargo, debido a problemas derivados de la dificultad de su detección *in vivo*, su utilidad se encuentra limitada a su uso exclusivo en investigación en modelos *in vitro* e *in vivo* en laboratorio. Además, en el caso de los marcadores fluorescentes, la franja del espectro en el que se encuentra su longitud de onda de emisión los hace incompatibles para su uso simultáneo en ensayos multiparamétricos, por su solapamiento con los espectros de emisión con otros trazadores de uso común en inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, etc. Este hecho dificulta su utilidad en estudios de colocalización con otros marcadores empleados habitualmente en investigación básica y preclínica.

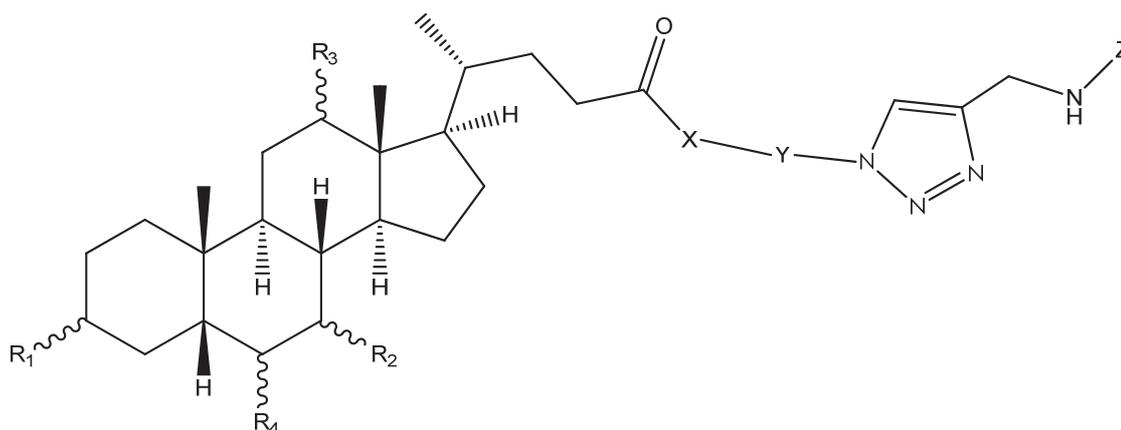
Por otro lado, en la práctica clínica actual, para el diagnóstico de enfermedades hepatobiliares (lesiones focalizadas, tumoraciones, colestasis, etc.) en el paciente se utiliza la resonancia magnética con gadoxetato y colescintigrafía con radiotrazadores derivados del ácido iminodiacético, compuestos que carecen de una estructura que les confiera vectorización enterohepática y por tanto especificidad de tejido (Zech CJ *et al.*, Eur Radiol., 2020, 30(1):370-382; Snyder E *et al.*, StatPearls [Internet], 2020).

Por tanto, existe un problema real en la carencia de pruebas funcionales y de imagen combinadas a tiempo real para el análisis de la función hepática.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Además de la problemática anterior, la presente invención también resuelve la incompatibilidad en el uso de los fluorocromos comerciales con los pocos derivados ácidos biliares fluorescentes disponibles actualmente para la realización de ensayos multiparamétricos de cinéticas de absorción *in vitro* e *in vivo*, colocalización en microscopía, citometría de flujo y captación de imagen, centrándose estas aplicaciones en el campo de investigación biomédica preclínica y clínica.

Particularmente, la nueva sonda de la invención consiste en un compuesto de fórmula (I):



Fórmula (I)

donde R_1 , R_2 y R_3 se seleccionan independientemente de entre H y OH;

5 R_4 se selecciona de entre H, OH y CH_2CH_3 ;

X se selecciona de entre O, S, NR' , O-CO, y HNSO_2 ;

Y es un espaciador que se selecciona de entre $-(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{SO}_2)\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_4-(\text{CH}_2)_n)$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}_6\text{H}_4-$

10 $(\text{CH}_2)_n-$, opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como CF_3 , alquilo C_1-C_6 , S-alquilo C_1-C_6 , halógeno, CN, O-alquilo C_1-C_6 , NO_2 , COO -alquilo C_1-C_6 , NHCO -alquilo C_1-C_6 , NH_2 y NH -alquilo C_1-C_6 .

Z es una unidad procedente de un fluorocromo que presenta un grupo alquino terminal; n es un valor de entre 1 y 6;

15 R' se selecciona de entre H y alquilo(C_1-C_6) opcionalmente sustituido por un grupo seleccionado de entre CF_3 , halógeno, CN, y NO_2 .

Dichos compuestos de fórmula (I) son capaces de emitir fluorescencia en el infrarrojo cercano y constan de dos partes estructurales unidas mediante una reacción de cicloadición 1,3-dipolar, denominada química "click", entre un derivado de ácido biliar y
 20 un fluorocromo que presente un grupo alquino terminal, como por ejemplo y sin que sirva de limitación la alquinocianina 718, la alquinocianina 7 (Cy7) o la alquinocianina 7.5 (Cy7.5).

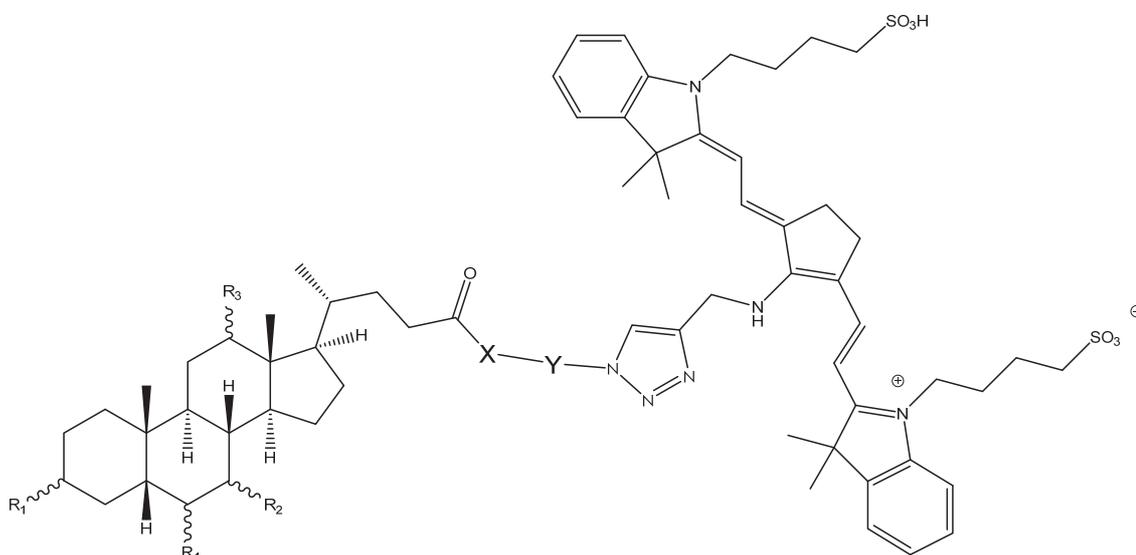
La ventaja de utilizar fluorescencia infrarroja es que es permeable a los tejidos, por lo
 25 que puede detectarse desde el exterior corporal, sin realizar ninguna intervención quirúrgica, con mínimas molestias y riesgo para el individuo y con muy escaso ruido de fondo. Esto podría permitir una evaluación funcional del hígado a tiempo real mediante

técnicas no invasivas, altamente selectivas y de gran resolución, de las que no se disponen y que podrían ser de una importante utilidad diagnóstica y pronóstica, en un gran número de patologías que afectan a una elevada proporción de la población.

- 5 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) tal y como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida el fluorocromo en el compuesto de fórmula (I) es la alquinocianina 718, y los compuestos presentan una fórmula (Ia):

10



Fórmula (Ia)

donde R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de entre H y OH;

- 15 R₄ se selecciona de entre H, OH y CH₂CH₃;

X se selecciona de entre O, S, NR', O-CO, y HNSO₂;

Y es un espaciador que se selecciona de entre -(CH₂)_n-, -CH₂CH₂OCH₂CH₂-, -CH₂CH₂(SO₂)CH₂CH₂-, -C₆H₄-(CH₂)_n-, -C₆H₄-C₆H₄-(CH₂)_n-, -CH₂CH₂O-C₆H₄-C₆H₄-(CH₂)_n-, opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como CF₃, alquilo C₁-C₆, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆.

20

Z es una unidad procedente de un fluorocromo que presenta un grupo alquino terminal; n es un valor de entre 1 y 6;

R' se selecciona de entre H y alquilo(C₁-C₆) opcionalmente sustituido por un grupo seleccionado de entre CF₃, halógeno, CN, y NO₂.

25

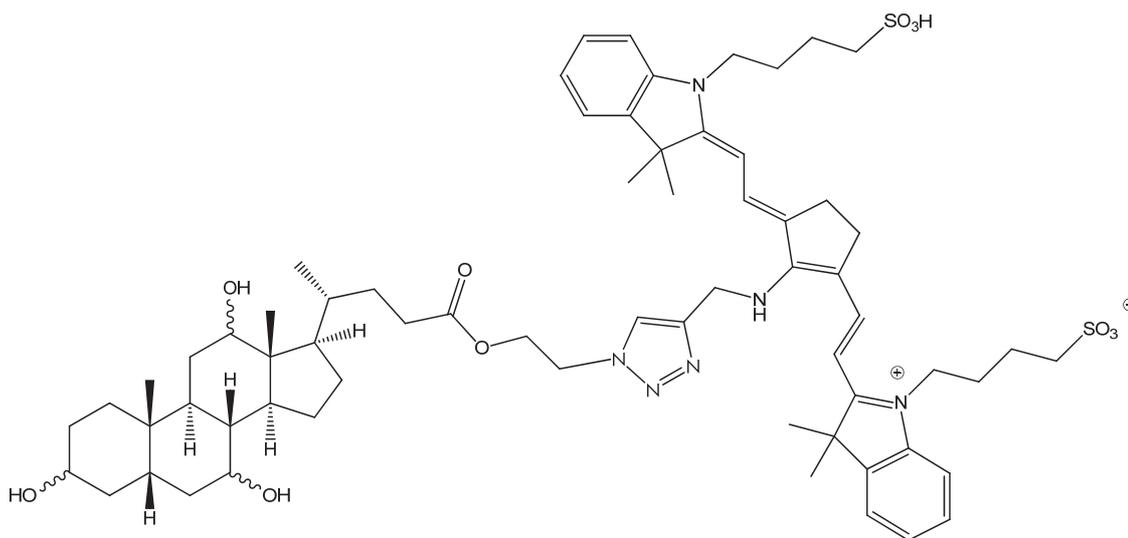
En una realización más preferida R_1 , R_2 y R_3 es OH, y más preferentemente esos grupos hidroxilo se encuentran en posición α .

5 En otra realización más preferida R_4 es H.

En otra realización más preferida X se selecciona de entre O, S, NR'; y más preferiblemente X es O.

10 En otra realización más preferida Y es $-(CH_2)_2-$.

En otra realización aún más preferida el compuesto de fórmula (Ia) es el compuesto 1 de fórmula:



15

Compuesto 1

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende los compuestos de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 En una realización más preferida, la composición es una composición farmacéutica.

En la presente invención el "vehículo" es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos y permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Por
25 tanto, el vehículo es una sustancia que es capaz de permitir una mejor dosificación y

administración o da consistencia y forma a la composición. El “vehículo farmacéuticamente aceptable” debe permitir la actividad del compuesto, ser compatible con él y no causar daño a los organismos a los que se administra.

5 La composición de la invención puede administrarse de cualquiera de las maneras conocidas de administración. En una realización preferida, la composición está configurada para poder administrarse de forma intravenosa, intraperitoneal u oral. En este último caso el compuesto puede recubrirse con un polímero que libere su contenido pasado el estómago. De manera aún más preferida, la composición está configurada
10 para ser inyectada por vía intravenosa o intraperitoneal.

En la presente invención se entiende por “unidad procedente de un fluorocromo que presenta un grupo alquino terminal” a la parte estructural que permanece de la reacción entre el fluorocromo que presenta un grupo alquino terminal y el grupo azida derivada
15 de ácido biliar, de tal forma que se genera el triazol-CH₂-NH-(Resto procedente del fluorocromo) o tal y como se representa en el compuesto de fórmula (I) triazol-CH₂-NH-Y.

En la presente invención el término “alquilo” se refiere a una cadena alifática, lineal o
20 ramificada, que tiene de 1 a 6 átomos de carbonos. Por ejemplo, este grupo puede ser metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *terc*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene 1, 2, 3, o 4, átomos de carbono.

En la presente invención el término “halógeno” representa un átomo de flúor, cloro,
25 bromo y yodo.

En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (I) y/o fórmula (Ia) de la invención, o de la composición que las comprende, como agente de imagen para la visualización de la funcionalidad hepática.

30

En un cuarto aspecto, la invención se refiere al uso del compuesto de fórmula (I) y/o fórmula (Ia) de la invención, o de la composición que las comprende, como sonda fluorescente para la visualización de la funcionalidad hepática.

35 En una realización preferida, la visualización del compuesto usado como agente de

imagen o como sonda fluorescente se realiza por la técnica seleccionada de entre microscopía de fluorescencia, microscopía confocal, citometría de flujo y de reproducción de imagen por fluorescencia, mediante un equipo de análisis de imagen de alta resolución con capacidad de captar luz con longitudes de onda en el espectro del infrarrojo cercano (NIR).

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para proporcionar una imagen de la funcionalidad del hígado *in vivo* en un sujeto, que comprende: (i) administrar al sujeto el compuesto de la invención o la composición que lo contiene, y (ii) escanear al sujeto utilizando imágenes de emisión de fluorescencia infrarroja en el rango del espectro de infrarrojo cercano (longitudes de onda de emisión entre 750-2500 nm), para obtener una imagen visible.

Otro aspecto de la invención se refiere a una sonda que comprende el compuesto de fórmula (I) o (Ia) de la invención, actuando como fluorocromo vectorizado.

En un sexto aspecto, la invención se refiere al uso de la sonda de la invención para la evaluación no invasiva de la funcionalidad hepática a tiempo real.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Evolución temporal de la captación y eflujo hepáticos del compuesto NIRBAD1 y el fluoróforo sin vectorizar, alquinocianina 718. Imágenes tomadas durante los experimentos *in vivo* no invasivos en rata Wistar anestesiada utilizando la técnica de detección de fluorescencia del infrarrojo cercano mediante un equipo de análisis de imagen de alta resolución LAS-4000 (FujiFilm, TDI, Madrid).

Fig. 2. Representación gráfica de los valores de fluorescencia hepática monitorizada frente al tiempo en un equipo de análisis de imagen de alta resolución LAS-4000 (FujiFilm, TDI, Madrid), recogidos durante los experimentos *in vivo* no invasivos en rata anestesiada. Los resultados se expresan como la media de los porcentajes de fluorescencia (\pm EEM) respecto del valor máximo alcanzado en un grupo experimental que recibió NIRBAD1 (n=5) y otro control que recibió la molécula fluorescente no ligada al ácido biliar (alquinocianina 718; n=6).

Fig. 3. Perfil de flujo biliar tras la administración intravenosa de NIRBAD1, en ratas Wistar (n=5) anestesiadas con el conducto biliar canulado tras una laparotomía ventral media. Los datos se muestran como la media de los porcentajes (\pm EEM) respecto del flujo basal.

Fig. 4. Perfil de secreción de NIRBAD1 en bilis de rata tras su administración intravenosa en ratas Wistar (n=5) anestesiadas con el conducto biliar canulado tras una laparotomía ventral media. Los datos se muestran como media de los porcentajes (\pm EEM) respecto del máximo de fluorescencia registrada.

Fig. 5. Imágenes de infrarrojo a distintos tiempos en rata Wistar anestesiada. La primera corresponde a una imagen previa a la administración del compuesto NIRBAD1; La segunda corresponde a los 2,5 minutos tras la administración del compuesto 1, cuando alcanza la fluorescencia máxima; La tercera imagen corresponde a las 24 horas tras la administración del compuesto NIRBAD1.

Fig. 6. Espectro de RMN ^1H del compuesto NIRBAD1 en DMSO-d₆.

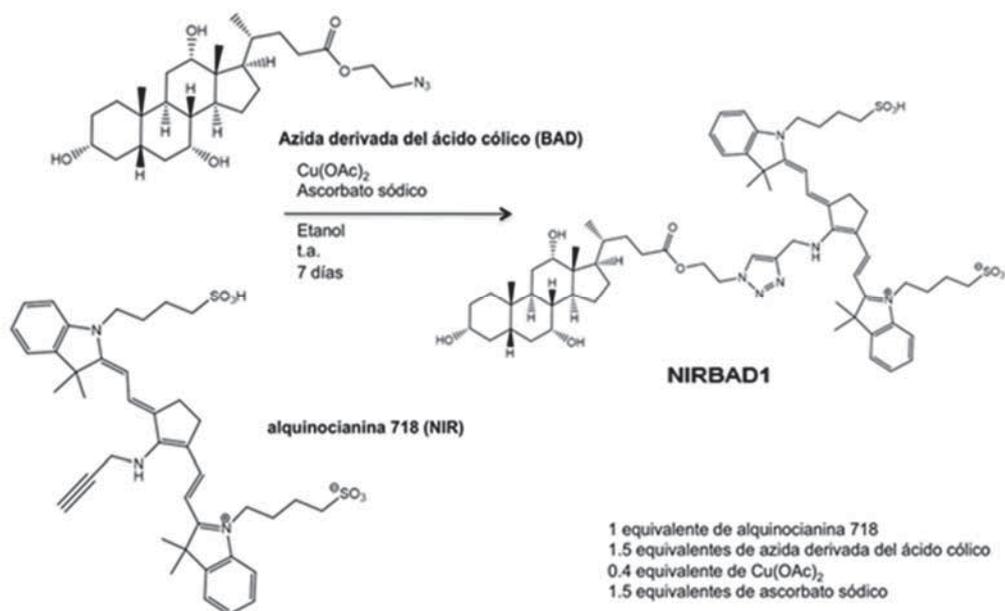
EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1. Síntesis del compuesto NIRBAD1

En la obtención del compuesto NIRBAD1 se utilizó una relación 1.5:1 de la azida derivada del ácido cólico que se presenta en el siguiente esquema y la alquinocianina

718, empleando etanol como solvente. Como catalizador de la reacción se utilizó Cu(I), obtenido gracias a la combinación de acetato de Cu(II) y ascorbato sódico en proporción 0.4:1.5 de equivalentes respecto de la alquinocianina 718, para la generación *in situ* de Cu(I).



5

Tras 7 días de reacción a temperatura ambiente se purificó el producto de la reacción mediante cromatografía en capa fina preparativa, obteniendo un compuesto distinto a los de partida. El RMN ¹H (Figura 6) y el análisis por espectrometría de masas en polaridad negativa calculando una masa para C₆₆H₉₂N₆O₁₁S₂ de 1208,6265 y encontrando una masa de 1207,6202 (M-H) confirmaron la presencia mayoritaria de un producto compatible con el compuesto 1. La reacción “click” entre el derivado azida del ácido biliar y la función alquino del fluoróforo conduce selectivamente al isómero triazólico 1,4-disustituido, en detrimento del isómero triazólico 1,5-disustituido, debido a la participación del cobre (I) como catalizador de la reacción (Tornøe CW et al., J. Org. Chem., **2002**, 67, 3057; Rostovtsev VV et al., Angew. Chem., Int. Ed., **2002**, 41, 2596).

20

Ejemplo 2. Actividad *in vivo* del compuesto NIRBAD1

Los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo utilizando como modelo animal la rata Wistar anestesiada.

El compuesto NIRBAD1 inyectado por vía intravenosa ha demostrado ser permeable a los tejidos, lo que es característico de la fluorescencia infrarroja, y lo que permite su detección desde el exterior corporal, sin realizar ninguna intervención quirúrgica, con mínimas molestias y riesgo para el sujeto de estudio y con muy escaso ruido de fondo.

5 Se observa cómo, tras la inyección del compuesto NIRBAD1 (fluorocromo vectorizado) y la alquinocianina 718 (fluorocromo sin vectorizar), ambas moléculas se acumulan en el hígado. Sin embargo, mientras que el compuesto NIRBAD1 a partir del minuto 2,5 empieza a eliminarse, el fluorocromo que se utilizó para sintetizarla al carecer de especificidad de tejido permanece en el hígado sin que éste pueda llegar a aclararlo
10 (Figuras 1 y 2).

En la siguiente tabla se resumen los principales resultados recogidos durante los experimentos *in vivo* no invasivos en rata anestesiada (Figuras 1 y 2). Tras la administración intravenosa, el compuesto NIRBAD1 es captado por el hígado, alcanza
15 el máximo de fluorescencia a los $2,43\pm 0,36$ min y es eliminado completamente de este tejido a los 21 minutos tras su inyección. Sin embargo, son necesarios $5,00\pm 0,45$ min para que se acumule la alquinocianina 718 a nivel hepático y, ésta no es eliminada completamente del hígado hasta que se alcanzan tiempos superiores a 150 minutos.

20 Tabla 1. Monitorización de la fluorescencia a tiempo real en ratas Wistar anestesiadas.

	NIRBAD1	Alquinocianina 718
Número de experimentos	5	6
Tiempo en alcanzar máxima fluorescencia	$2,43\pm 0,36$ min	$5,00\pm 0,45$ min
Tiempo máximo de vaciado de fluorescencia	$20,16\pm 1,89$ min	No detectado

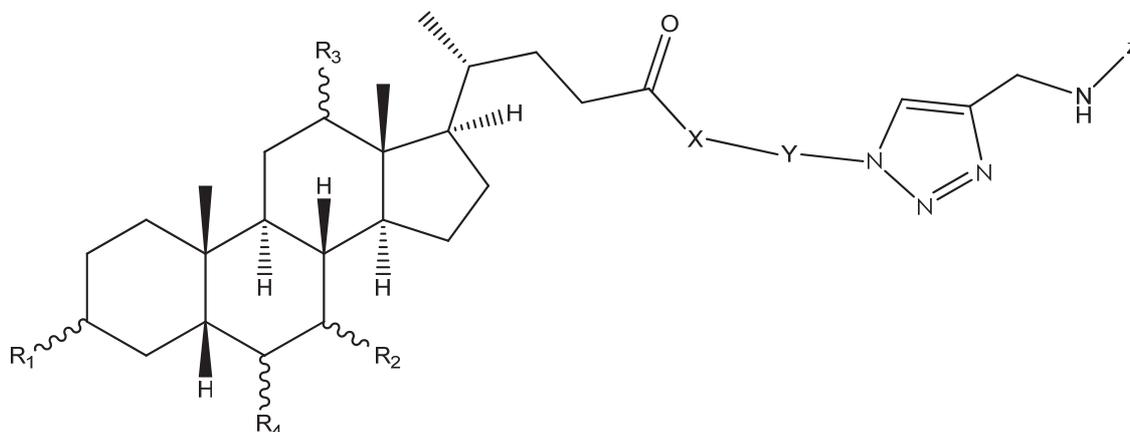
En otro grupo de experimentos realizados en rata Wistar (n=5) anestesiadas con el conducto biliar canulado tras una laparotomía ventral media, lo que permite la recogida
25 de bilis desde el hígado en intervalos de tiempo, se ha demostrado que la administración intravenosa del compuesto NIRBAD1, no altera el flujo de bilis (Figura 3). Además, la sonda fluorescente es secretada a bilis según el perfil de la Figura 4. Se observa un

máximo de secreción del compuesto 1 a bilis alrededor del minuto 10, y un decaimiento de la señal sobre el minuto 20 lo que es compatible con las imágenes registradas en los experimentos no invasivos (Figuras 1 y 2).

- 5 El compuesto NIRBAD1 no ha presentado toxicidad *in vivo* durante los ensayos de funcionalidad. En ratas Wistar se ha podido comprobar que, tras 24 h de la administración intravenosa del NIRBAD1, no se encuentran trazas de fluorescencia del compuesto (Figura 5), y los animales se encuentran en estado de bienestar, sin parámetros físicos ni de conducta asociados al dolor. Así mismo, los parámetros
- 10 bioquímicos en suero no muestran signos de toxicidad hepática o renal.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I)



5

Fórmula (I)

donde R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de entre H y OH;

R₄ se selecciona de entre H, OH y CH₂CH₃;

10 X se selecciona de entre O, S, NR', O-CO, y HNSO₂;

Y es un espaciador que se selecciona de entre -(CH₂)_n-, -CH₂CH₂OCH₂CH₂-, -CH₂CH₂(SO₂)CH₂CH₂-, -C₆H₄-(CH₂)_n-, -(C₆H₄-C₆H₄-(CH₂)_n), -CH₂CH₂O-C₆H₄-C₆H₄-(CH₂)_n-, opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como CF₃, alquilo C₁-C₆, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆.

15

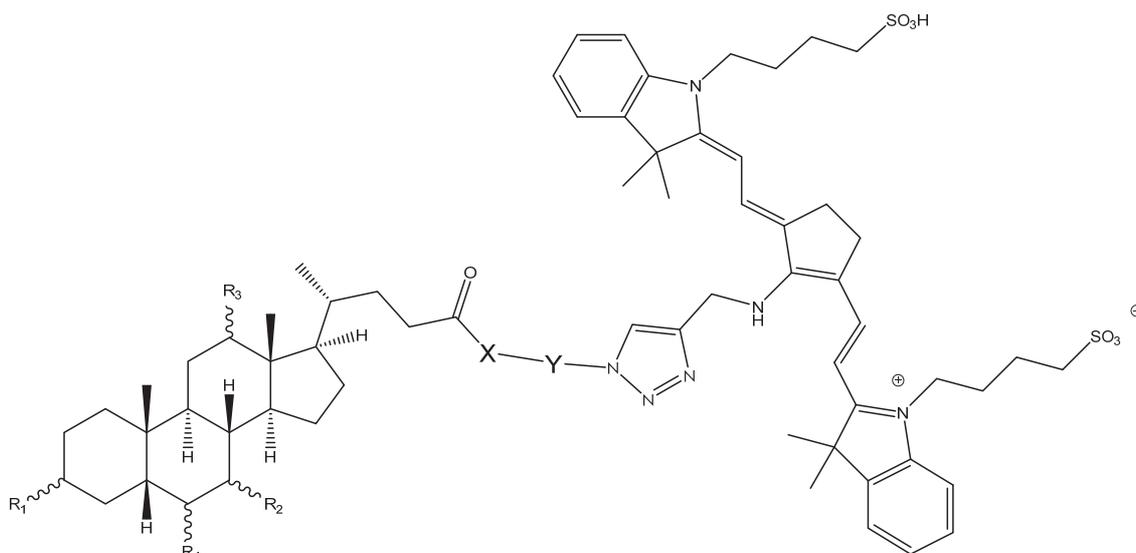
Z es una unidad procedente de un fluorocromo que presenta un grupo alquino terminal;

n es un valor de entre 1 y 6;

R' se selecciona de entre H y alquilo(C₁-C₆) opcionalmente sustituido por un grupo seleccionado de entre CF₃, halógeno, CN, y NO₂.

20

2. Compuesto según la reivindicación 1, de fórmula (Ia), donde el fluorocromo es la alquinocianina 718:



Fórmula (Ia)

donde R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente de entre H y OH;

5 R₄ se selecciona de entre H, OH y CH₂CH₃;

X se selecciona de entre O, S, NR', O-CO, y HNSO₂;

Y es un espaciador que se selecciona de entre -(CH₂)_n-, -CH₂CH₂OCH₂CH₂-, -
 CH₂CH₂(SO₂)CH₂CH₂-, -C₆H₄-(CH₂)_n-, -C₆H₄-C₆H₄-(CH₂)_n-, -CH₂CH₂O-C₆H₄-C₆H₄-
 (CH₂)_n-, opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como CF₃,
 10 alquilo C₁-C₆, S-alquilo C₁-C₆, halógeno, CN, O-alquilo C₁-C₆, NO₂, COO-alquilo C₁-
 C₆, NHCO-alquilo C₁-C₆, NH₂ y NH-alquilo C₁-C₆.

Z es una unidad procedente de un fluorocromo que presenta un grupo alquino terminal;

n es un valor de entre 1 y 6;

15 R' se selecciona de entre H y alquilo(C₁-C₆) opcionalmente sustituido por un grupo
 seleccionado de entre CF₃, halógeno, CN, y NO₂.

3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde R₁, R₂ y R₃ es
 OH.

20

4. Compuesto según la reivindicación anterior donde los grupos hidroxilo en las
 posiciones R₁, R₂ y R₃ se encuentran en posición α.

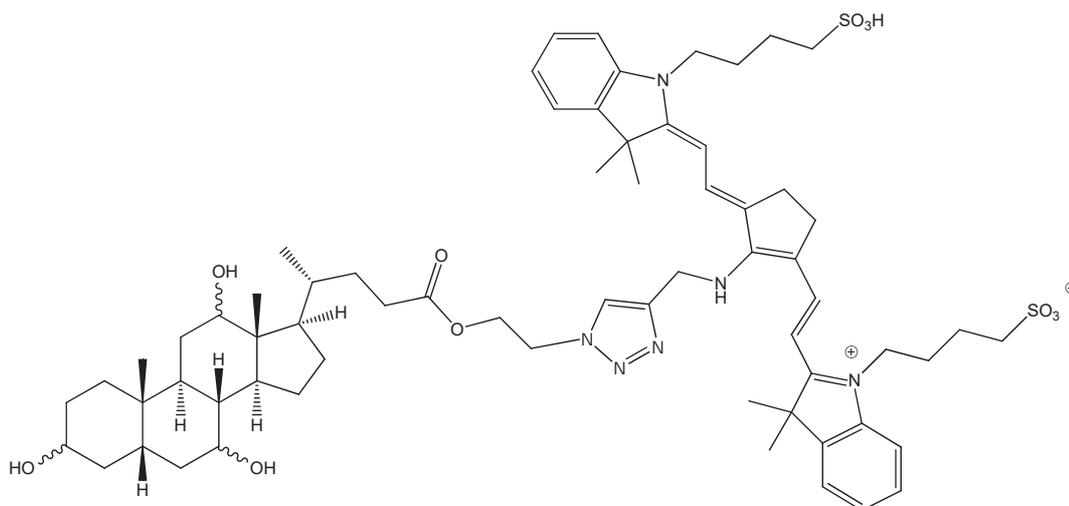
5. Compuesto cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde R₄ es H.

25

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde X es O.
7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde Y es $-(CH_2)_2-$

5

8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores de fórmula:



- 10 9. Composición que comprende el compuesto descrito según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Composición según reivindicación 9 caracterizada por estar configurada para poder administrarse de forma intravenosa, intraperitoneal u oral.
- 15 11. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o de la composición descrita según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, como agente de imagen para la visualización de la funcionalidad hepática.
- 20 12. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o de la composición descrita según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, como sonda fluorescente para la visualización de la funcionalidad hepática.
- 25 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12 donde la visualización se realiza por una técnica seleccionada de entre microscopía de fluorescencia, microscopía confocal, citometría de flujo y de reproducción de imagen por

fluorescencia, mediante un equipo de análisis de imagen de alta resolución con una luz con longitudes de onda en el espectro del infrarrojo cercano.

- 5 14. Método para proporcionar una imagen de la funcionalidad del hígado *in vivo* en un sujeto, que comprende (i) administrar al sujeto el compuesto descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición descrita según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, y (ii) escanear al sujeto utilizando imágenes de emisión de fluorescencia infrarroja en el rango del espectro de infrarrojo cercano para obtener una imagen visible.
- 10
15. Sonda fluorescente que comprende el compuesto descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición descrita según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10.
- 15 16. Uso de la sonda según la reivindicación anterior para la evaluación no invasiva de la funcionalidad hepática a tiempo real.

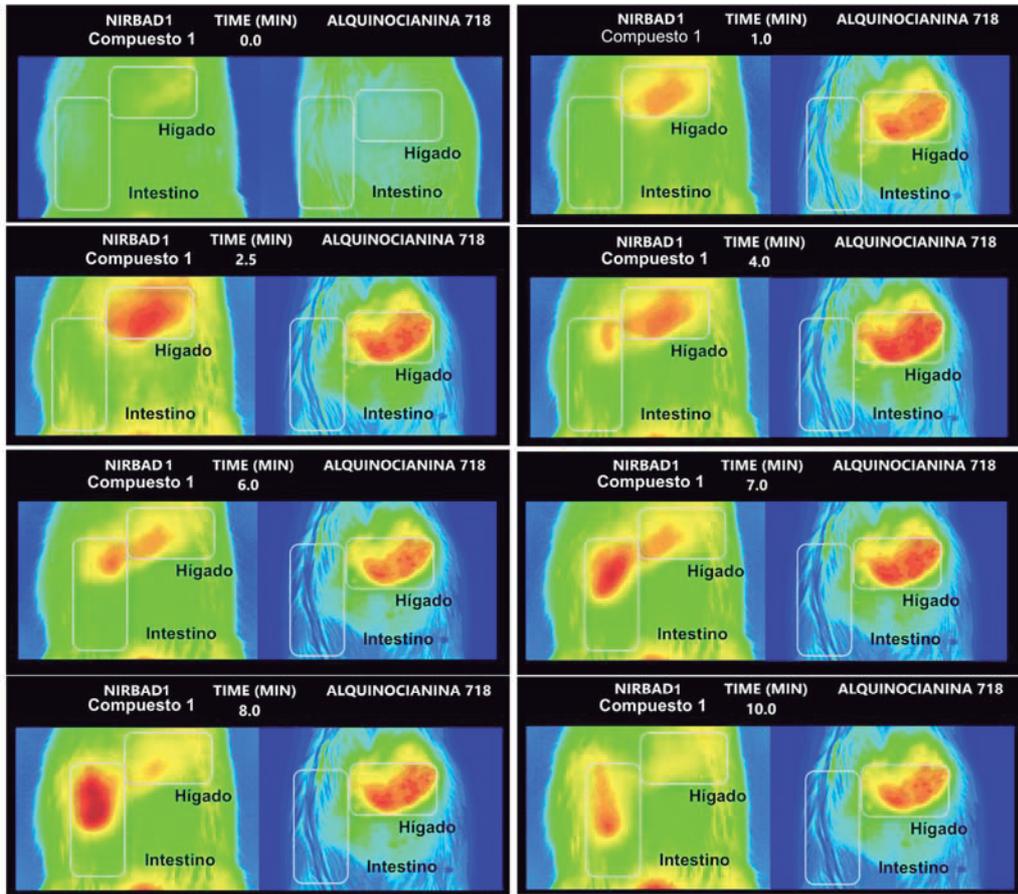


FIG. 1

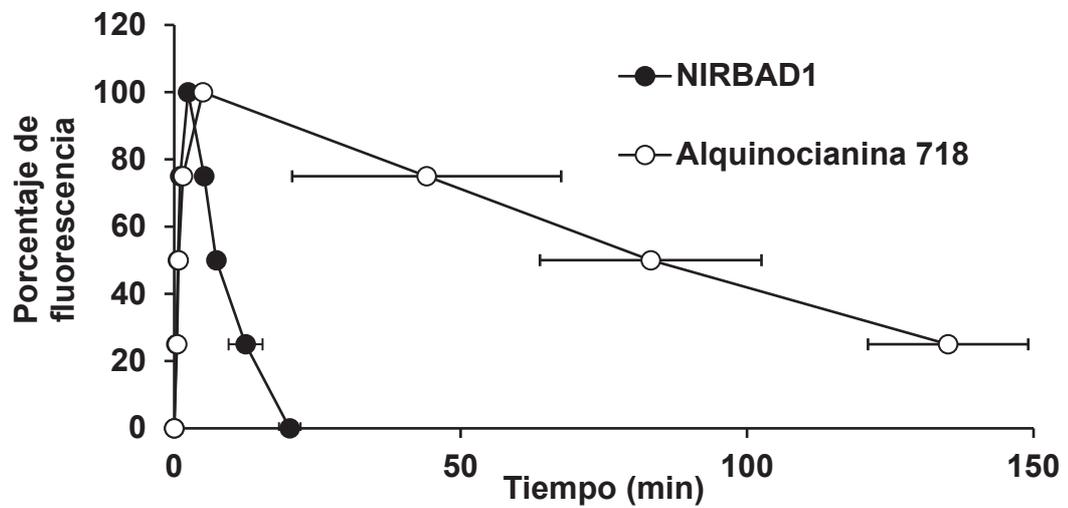


FIG. 2

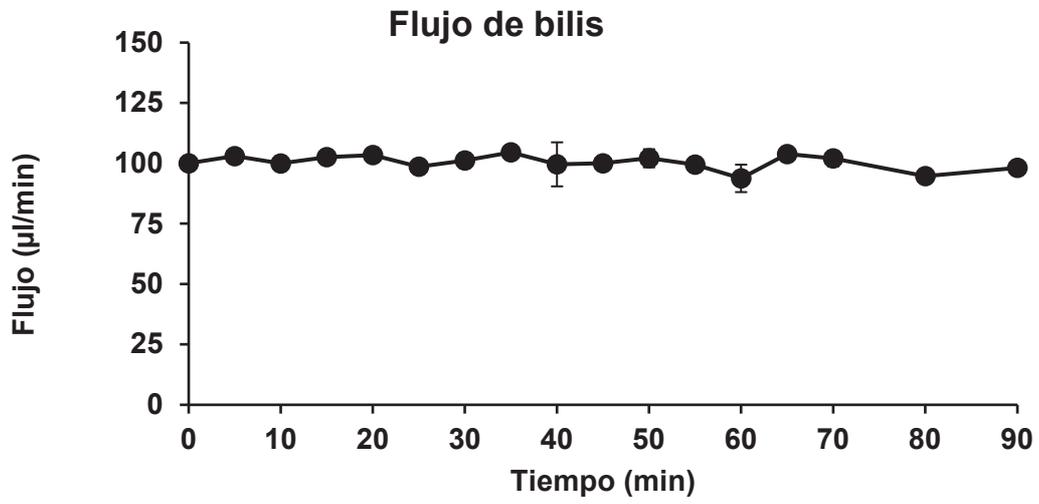


FIG. 3

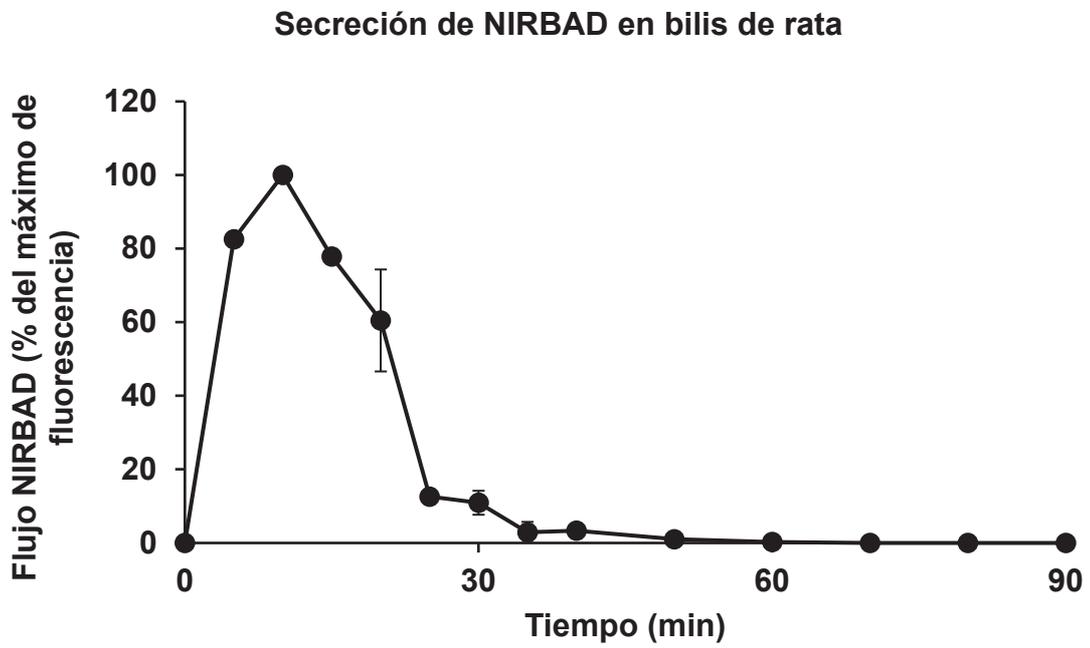


FIG. 4

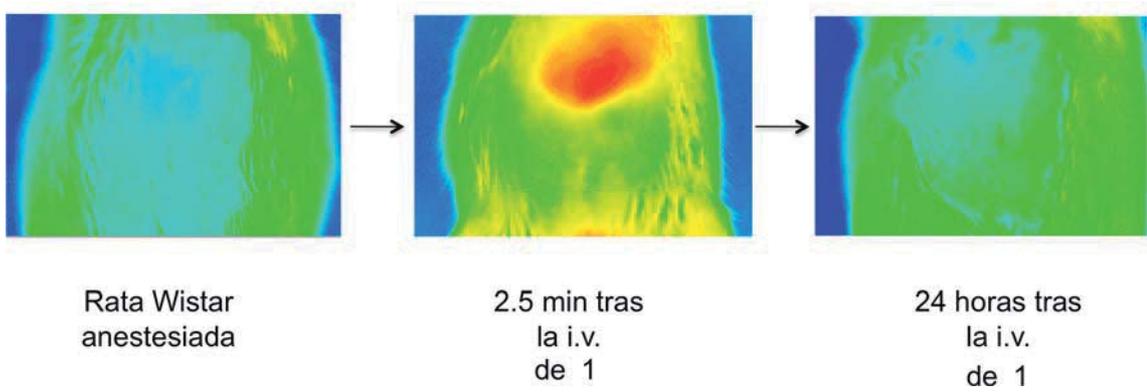


FIG. 5

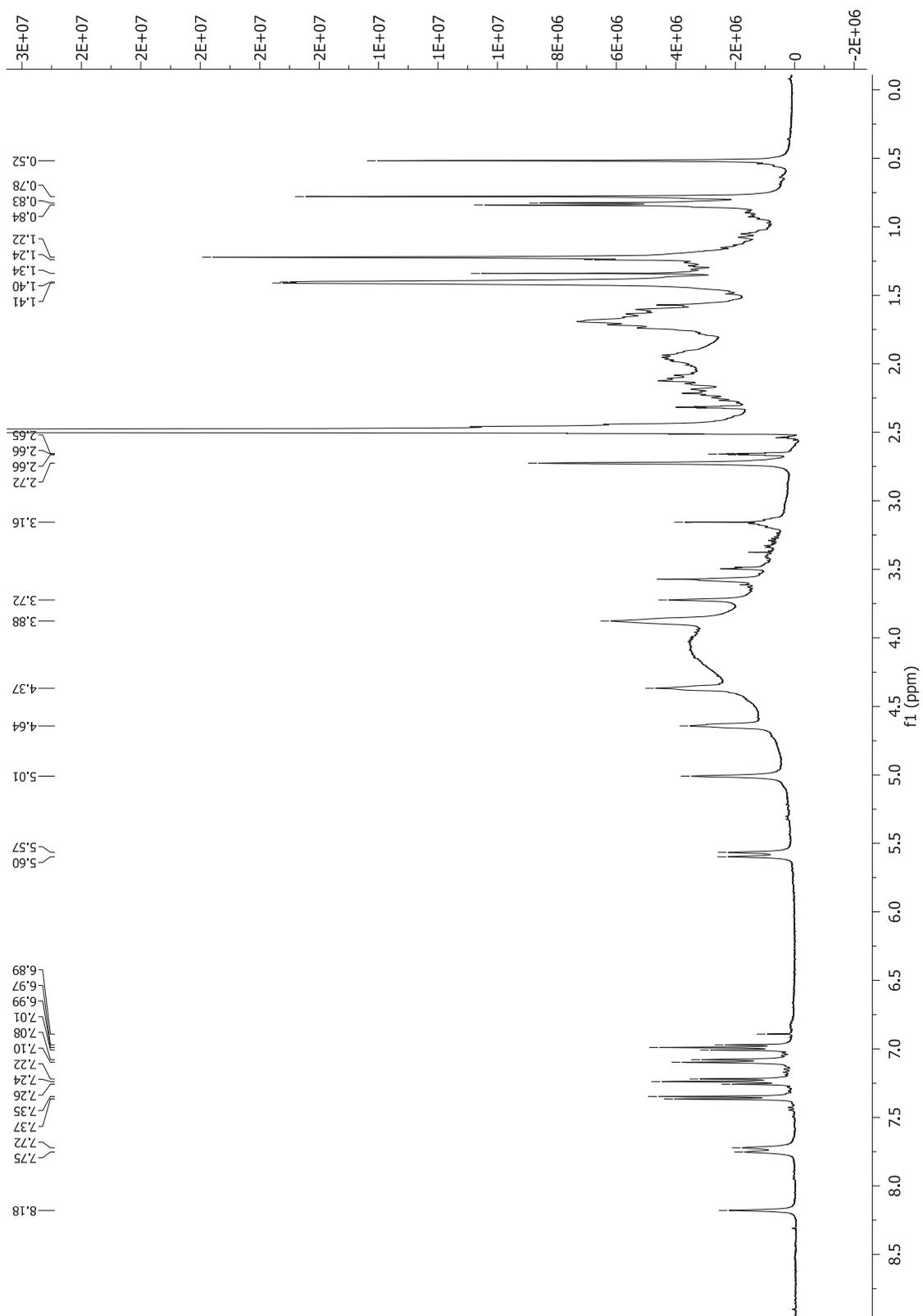


FIG. 6