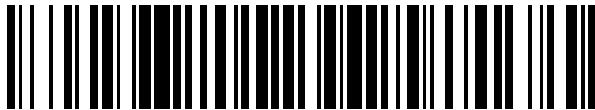


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 523 504**

(21) Número de solicitud: 201330607

(51) Int. Cl.:

**C07D 309/34** (2006.01)

(12)

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

**25.04.2013**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

**26.11.2014**

(56) Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2013/070755**

(71) Solicitantes:

**UNIVERSITAT JAUME I DE CASTELLÓ (100.0%)  
AVDA. DE VICENT SOS BAYNAT, S/N  
12006 CASTELLO DE LA PLANA (Castellón) ES**

(72) Inventor/es:

**GALINDO HONRUBIA, Francisco;  
BELTRÁN BELTRÁN, Alicia;  
LUIS LAFUENTE, Santiago Vicente y  
BURGUETE AZCÁRATE, María Isabel**

(74) Agente/Representante:

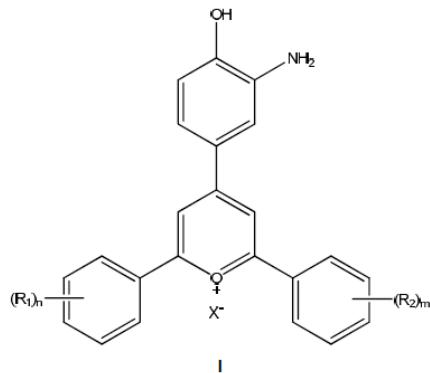
**PONS ARIÑO, Ángel**

(54) Título: **SENSORES FLUORESCENTES DE ÓXIDO NÍTRICO**

(57) Resumen:

Sensores fluorescentes de óxido nítrico.

Derivados de pirilio de fórmula I donde los sustituyentes tienen el significado definido en la descripción útiles como sensores fluorescentes de óxido nítrico.



**Sensores Fluorescentes de Óxido Nítrico****DESCRIPCIÓN**

- 5 La presente invención se refiere a derivados de triarilpirilio capaces de detectar óxido nítrico (NO) mediante cambios de fluorescencia. Por tanto, la invención se podría encuadrar en el campo de los sensores fluorescentes.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

10

El óxido nítrico (abreviado a partir de ahora NO) juega un importante papel dentro de la bioquímica celular. En la actualidad se conocen numerosas funciones del NO en los seres vivos, tanto en animales como en plantas. Se ha detectado NO en neuronas, macrófagos, hepatocitos, células de músculo liso, miocitos cardíacos, etc. La variedad 15 de funciones del NO en seres vivos va desde su papel como neurotransmisor y vasodilatador hasta su rol como agente antimicrobiano y antitumoral.

20

Para el análisis del NO se han desarrollado hasta la fecha una serie de sensores o sondas químicas de tipo fluorescente. Estas son de diferentes tipos atendiendo a su naturaleza química. Dichas sondas pertenecen a dos grupos principalmente. Por un lado se tienen las sondas basadas en complejos organometálicos, las cuales al reaccionar con NO dan lugar a la aparición de fluorescencia. Ejemplos de este tipo son los complejos desarrollados por los grupos de investigación de Lippard (Lim, M. H.; Lippard, S. J., J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 12170). Por otro lado, una segunda 25 estrategia consiste en la utilización de moléculas que contienen un anillo aromático con dos grupos amina en posición orto (de ahora en adelante orto-diamina). Este tipo de sondas reaccionan con NO en medio aeróbico para dar compuestos fluorescentes. Ejemplos de este tipo se pueden encontrar en los trabajos desarrollados por los grupos de Nagano (US5874590, EP1000941, EP1731898 y US2010029010).

30

En relación con las sondas de tipo orto-diamino arriba mencionadas, se ha encontrado que presentan una interferencia que no las hace totalmente selectivas a óxido nítrico en medio acuoso oxigenado. Concretamente se ha descrito que el ácido dehidroascórbico (a partir de ahora DHA) reacciona con sondas de tipo orto-diamino

para dar productos fluorescentes indistinguibles de los que resultan de reaccionar con NO en medio oxigenado (X. Zhang, W.Kim, N. Hatcher, K. Potgieter, L. L. Moroz, R. Gillette, and J. V. Sweedler, J. Biol. Chem. 2002, 277, 48472). Para solucionar este problema se han desarrollado diversas estrategias de corrección, que incluyen  
5 congelación del medio (Ye, X.; Kim, W.-S.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V., Analyst 2004, 129, 1200), uso de enzimas y electroforesis capilar (Kim, W.-S.; Ye, X.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V., Anal. Chem. 2006, 78, 1859), así como multiderivatización más análisis de imagen (Ye, X.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V., J. Neurosci. Meth. 2008, 168, 373).

10

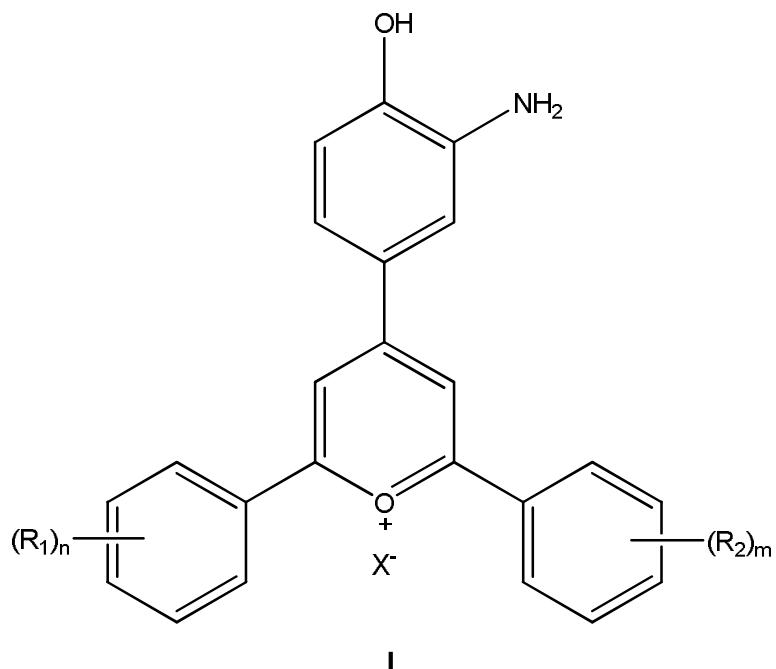
Por todo lo arriba mencionado sería deseable disponer de una sonda selectiva para NO, que no reaccionara con DHA en particular, ni con otros interferentes típicos que pueden encontrarse en el medio celular, evitándose de este modo los métodos de corrección antes señalados.

15

Además, sería deseable que la síntesis de la sonda se realizara en pocos pasos y con alto rendimiento mediante un método versátil que permitiera introducir modificaciones estructurales (sustituyentes) proporcionándole diferentes propiedades espectroscópicas, como por ejemplo: longitud de onda de excitación y de emisión de  
20 fluorescencia.

#### DESCRIPCION DE LA INVENCIÓN

Así pues, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I:



o cualquiera de sus sales, donde:

cada  $R_1$  y  $R_2$  independientemente representan H,  $C_{1-4}$ alquilo,  $-OC_{1-4}$ alquilo o fenilo,

5 donde  $C_{1-4}$ alquilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más  $R_4$  y donde fenilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más  $R_5$ ;

cada n y m independientemente representan de 0 a 3;

$X^-$  representa un contra ión; y

cada  $R_4$  y  $R_5$  independientemente representan H o  $-OC_{1-4}$ alquilo.

10

La presente invención también se refiere a las sales y los solvatos de los compuestos de fórmula I.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula I

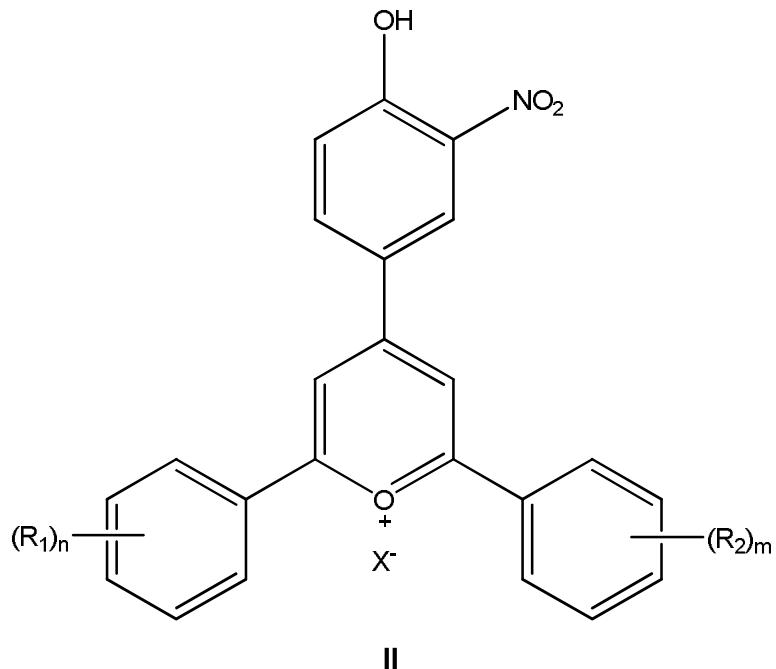
15 tal y como se ha definido anteriormente, para la detección de óxido nítrico.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de un

compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, que comprende la

etapa de reducción de un compuesto de fórmula II:

20



donde  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $X^-$ , n y m tienen el significado descrito para un compuesto de fórmula I, caracterizada por llevarla a cabo en presencia de un agente reductor, preferiblemente

5  $\text{SnCl}_2$ .

A lo largo de la invención, el término  $C_{1-4}\text{alquilo}$ , como grupo o parte de un grupo, significa una cadena alquílica lineal o ramificada que contiene de 1 a 4 átomos de carbono e incluye los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo

10 y *terc*-butilo.

Un grupo “ $-\text{OC}_{1-4}\text{alquilo}$ ”, como grupo o parte de un grupo, se refiere a un grupo  $C_{1-4}\text{alquilo}$  donde uno de sus átomos de H están sustituidos por un átomo de O y donde  $C_{1-4}\text{alquilo}$  tiene el significado descrito anteriormente. Ejemplos incluyen metoxi,

15 etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, *sec*-butoxi y *terc*-butoxi.

El término “contra ión” se refiere a un ión con carga eléctrica negativa. Ejemplos incluyen, entre otros,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{BF}_4^-$  y  $\text{HSO}_4^-$ .

20 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, donde  $X^-$  representa  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{BF}_4^-$  o  $\text{HSO}_4^-$ , preferiblemente donde  $X^-$  representa  $\text{Cl}^-$  o  $\text{BF}_4^-$ , y más preferiblemente donde  $X^-$  representa  $\text{Cl}^-$ .

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, donde cada n y m independientemente representan 1 ó 2.

5 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, donde n y m representan 1.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, donde cada R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo.

10

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, donde R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.

15

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, donde:

cada R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo;

cada n y m independientemente representan 1 a 3, preferiblemente 1 ó 2;

X<sup>–</sup> representa F<sup>–</sup>, Cl<sup>–</sup>, Br<sup>–</sup>, I<sup>–</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>–</sup>, BF<sub>4</sub><sup>–</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>–</sup>, preferiblemente Cl<sup>–</sup> o BF<sub>4</sub><sup>–</sup>; y

20

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, donde:

cada R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo;

cada n y m independientemente representan 1 a 3, preferiblemente 1 ó 2;

X<sup>–</sup> representa Cl<sup>–</sup>; y

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.

30

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, donde:

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo;

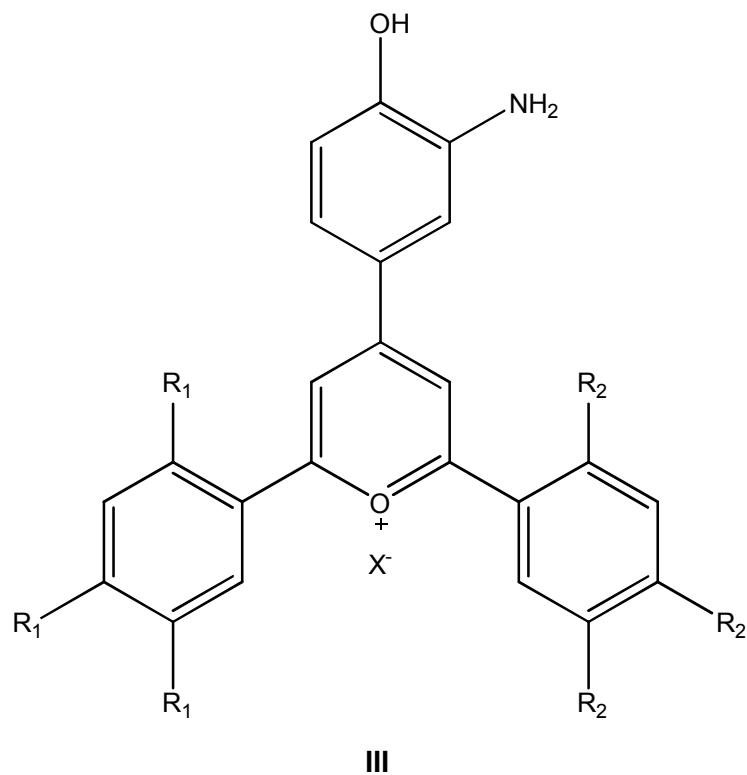
cada n y m independientemente representan 1 a 3, preferiblemente 1 ó 2;

X<sup>–</sup> representa F<sup>–</sup>, Cl<sup>–</sup>, Br<sup>–</sup>, I<sup>–</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>–</sup>, BF<sub>4</sub><sup>–</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>–</sup>, preferiblemente Cl<sup>–</sup> o BF<sub>4</sub><sup>–</sup>; y

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, donde:

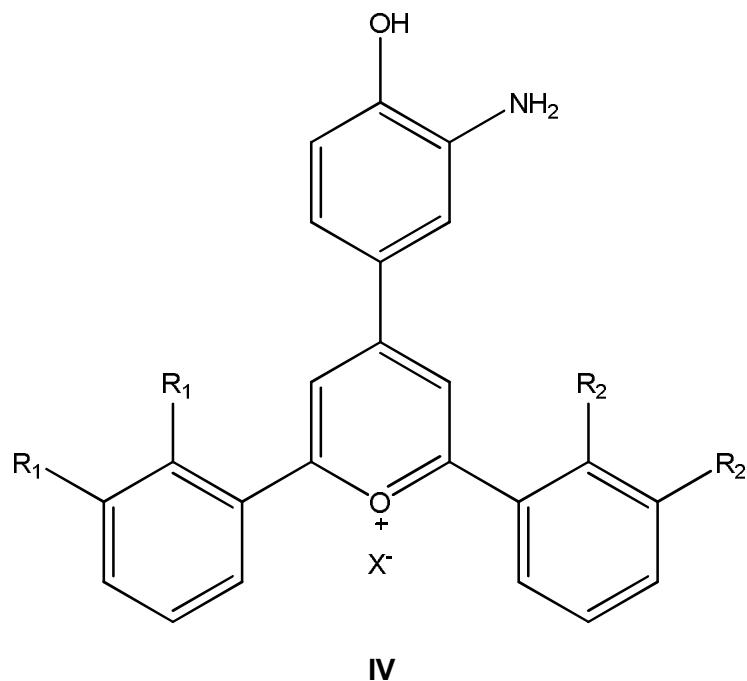
- 5 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo; cada n y m independientemente representan 1 a 3, preferiblemente 1 ó 2; X<sup>–</sup> representa Cl<sup>–</sup>; y  
R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.
- 10 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, donde:  
R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo; n y m representan 1;  
X<sup>–</sup> representa F<sup>–</sup>, Cl<sup>–</sup>, Br<sup>–</sup>, I<sup>–</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>–</sup>, BF<sub>4</sub><sup>–</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>–</sup>, preferiblemente Cl<sup>–</sup> o BF<sub>4</sub><sup>–</sup>; y  
15 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.
- En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, donde:  
R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo;  
20 n y m representan 1;  
X<sup>–</sup> representa Cl<sup>–</sup>; y  
R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.
- En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se  
25 ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula III:



En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se  
 5 ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula III donde:  
 cada R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 o fenilo, preferiblemente –OCH<sub>3</sub>; y  
 X<sup>-</sup> representa F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, preferiblemente Cl<sup>-</sup> o BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, y más  
 preferiblemente Cl<sup>-</sup>.

10

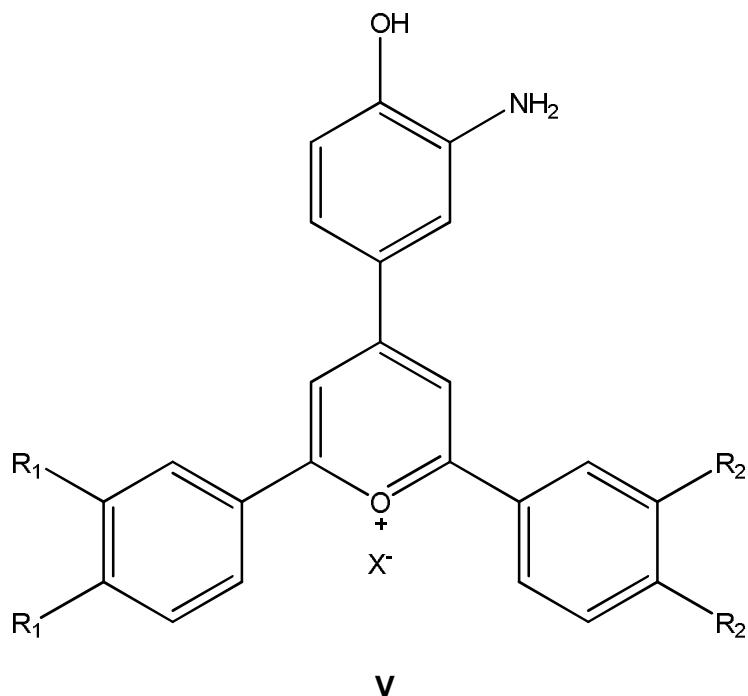
En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se  
 ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula IV:



- En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se
- 5 ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula IV donde:
- cada R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo, preferiblemente –OCH<sub>3</sub>; y
- X<sup>–</sup> representa F<sup>–</sup>, Cl<sup>–</sup>, Br<sup>–</sup>, I<sup>–</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>–</sup>, BF<sub>4</sub><sup>–</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>–</sup>, preferiblemente Cl<sup>–</sup> o BF<sub>4</sub><sup>–</sup>, y más preferiblemente Cl<sup>–</sup>.

10

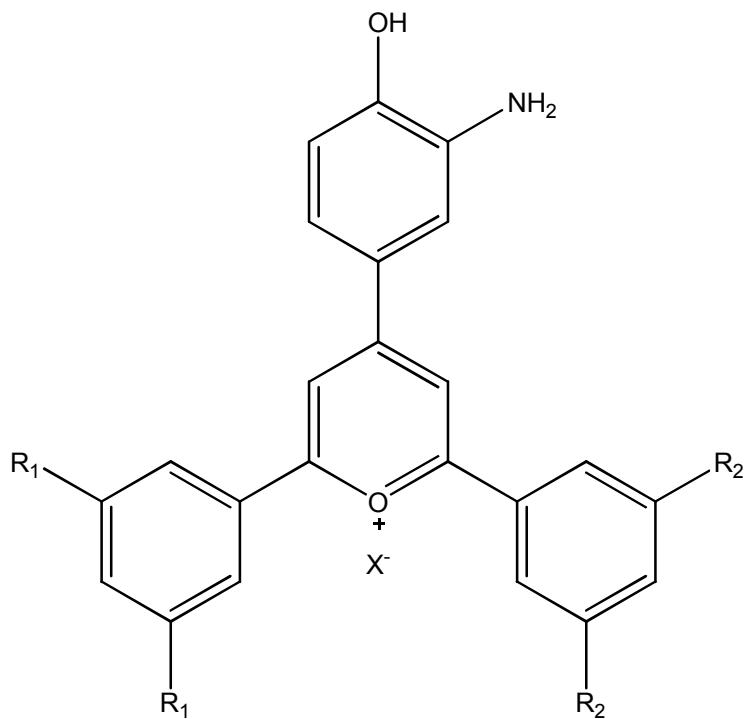
En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula V:



- En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se
- 5 ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula V donde:
- cada R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo, preferiblemente –OCH<sub>3</sub>; y
- X<sup>-</sup> representa F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, preferiblemente Cl<sup>-</sup> o BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, y más preferiblemente Cl<sup>-</sup>.

10

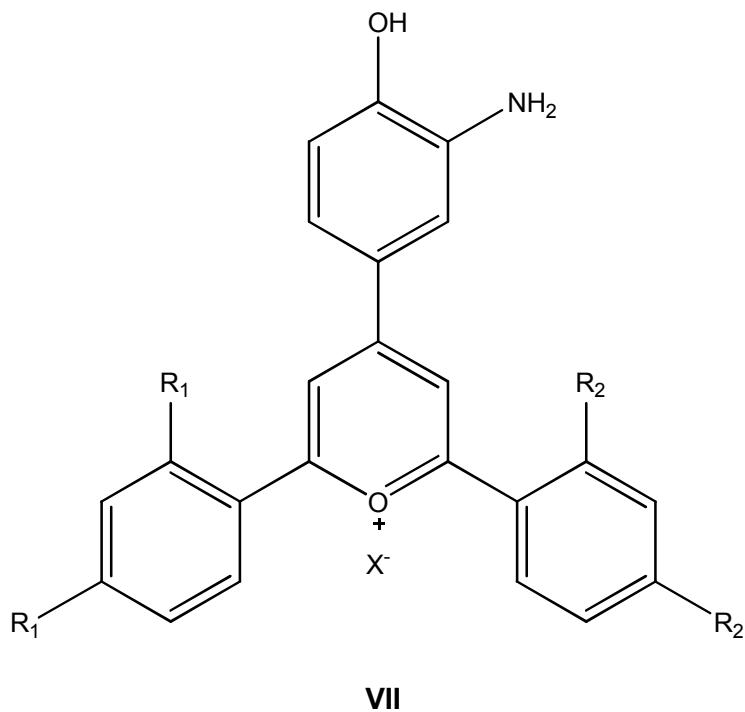
En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula VI:



- En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se
- 5 ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula VI donde:  
 cada R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 o fenilo, preferiblemente –OCH<sub>3</sub>; y  
 X<sup>–</sup> representa F<sup>–</sup>, Cl<sup>–</sup>, Br<sup>–</sup>, I<sup>–</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>–</sup>, BF<sub>4</sub><sup>–</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>–</sup>, preferiblemente Cl<sup>–</sup> o BF<sub>4</sub><sup>–</sup>, y más  
 preferiblemente Cl<sup>–</sup>.

10

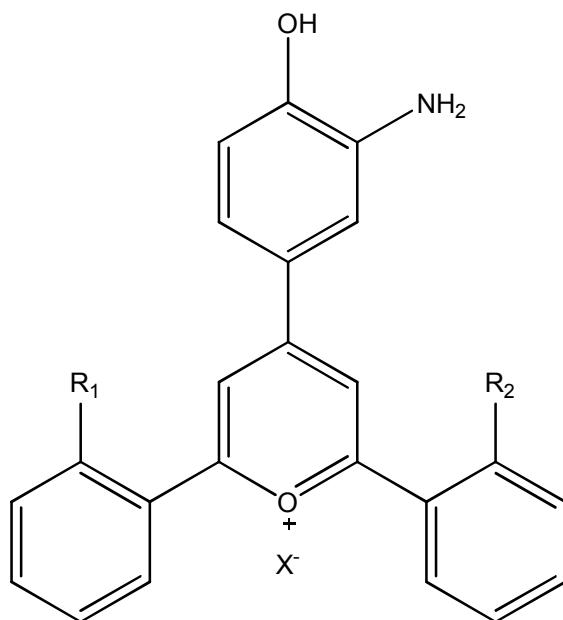
En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se  
 ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula VII:



En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se  
 5 ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula VII donde:  
 cada R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 o fenilo, preferiblemente –OCH<sub>3</sub>; y  
 X<sup>-</sup> representa F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, preferiblemente Cl<sup>-</sup> o BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, y más  
 preferiblemente Cl<sup>-</sup>.

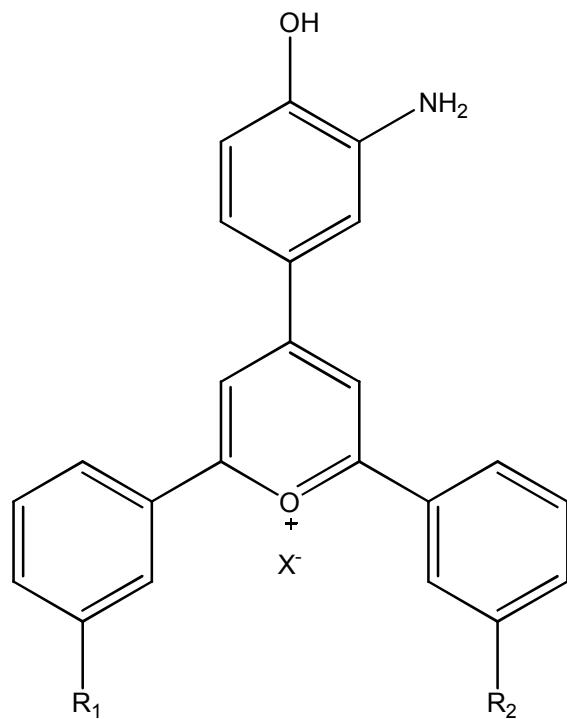
10

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se  
 ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula VIII:



En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula **VIII** donde:

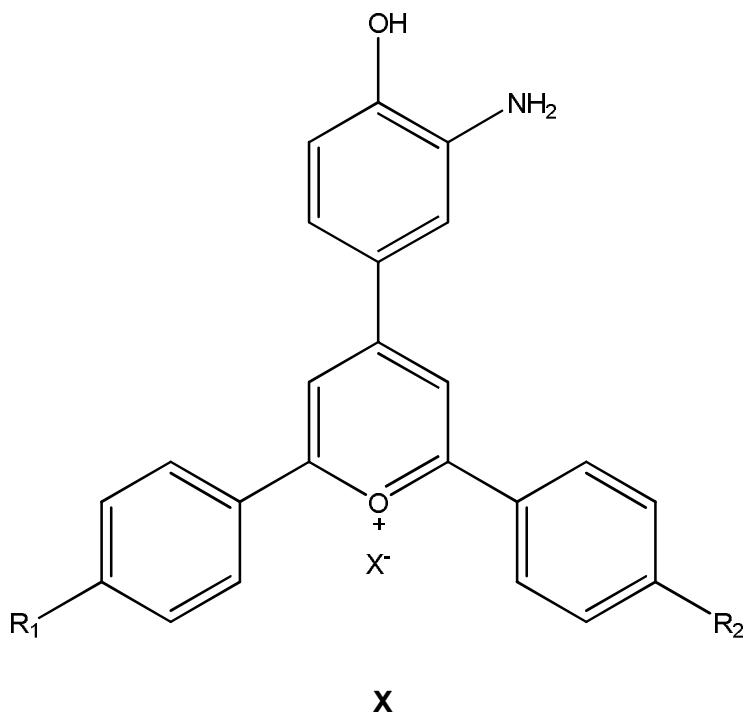
- 5 cada  $R_1$  y  $R_2$  independientemente representan H,  $CH_3-$ ,  $CH_3CH_2-$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$  o fenilo, preferiblemente  $-OCH_3$ ; y  
 $X^-$  representa  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $ClO_4^-$ ,  $BF_4^-$  o  $HSO_4^-$ , preferiblemente  $Cl^-$  o  $BF_4^-$ , y más preferiblemente  $Cl^-$ .
- 10 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula **IX**:



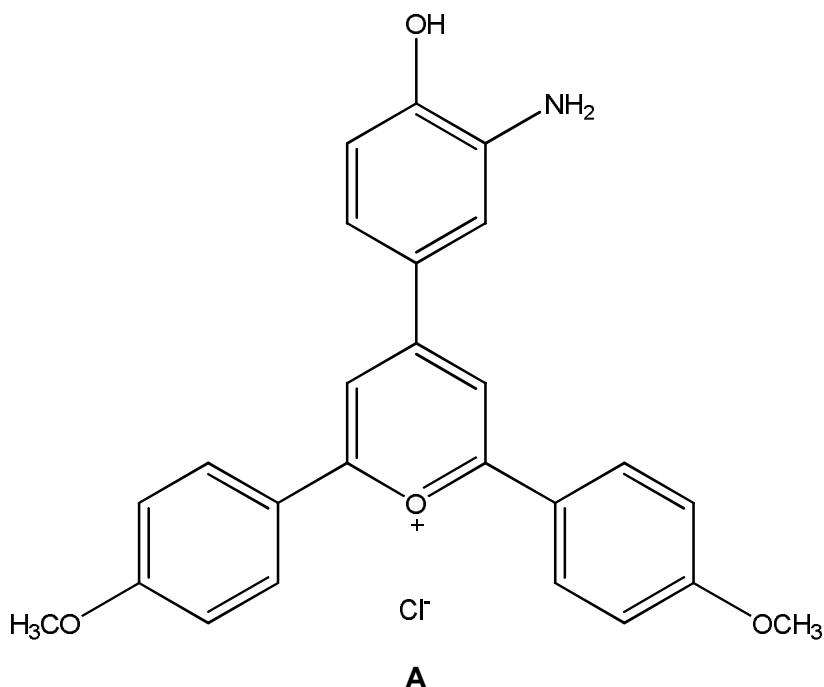
- En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se  
 5 ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula IX donde:  
 cada R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
 o fenilo, preferiblemente –OCH<sub>3</sub>; y  
 X<sup>–</sup> representa F<sup>–</sup>, Cl<sup>–</sup>, Br<sup>–</sup>, I<sup>–</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>–</sup>, BF<sub>4</sub><sup>–</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>–</sup>, preferiblemente Cl<sup>–</sup> o BF<sub>4</sub><sup>–</sup>, y más  
 preferiblemente Cl<sup>–</sup>.

10

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula I tal y como se  
 ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula X:



- En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula **I** tal y como se  
 5 ha definido anteriormente, seleccionado de un compuesto de fórmula **X** donde:  
 cada  $R_1$  y  $R_2$  independientemente representan H,  $CH_3-$ ,  $CH_3CH_2-$ ,  $-OCH_3$ ,  $-OCH_2CH_3$   
 o fenilo; y  
 $X^-$  representa  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $ClO_4^-$ ,  $BF_4^-$  o  $HSO_4^-$ , preferiblemente  $Cl^-$  o  $BF_4^-$ .
- 10 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto de fórmula **I** tal y como se  
 ha definido anteriormente, seleccionado de **A**:



- Algunos compuestos de la presente invención contienen o pueden contener uno o más grupos básicos y podrían por tanto formar sales con ácidos, tanto orgánicos como inorgánicos. Ejemplos de dichas sales incluyen: sales con ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; y sales con ácidos orgánicos, como ácido metanosulfónico, ácido trifluorometanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido fumárico, ácido oxálico, ácido acético, ácido maleico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido malónico, ácido glicólico, ácido succínico y ácido propiónico, entre otros.
- Algunos compuestos de la presente invención contienen o pueden contener uno o más protones ácidos y por tanto podrían formar también sales con bases. Ejemplos de dichas sales incluyen: sales con cationes inorgánicos como sodio, potasio, calcio, magnesio, litio, aluminio, zinc, etc.; y sales formadas con aminas farmacéuticamente aceptables como amoníaco, alquilaminas, hidroxialquilaminas, lisina, arginina, *N*-metilglucamina, procaína y similares.
- Las sales de un compuesto de fórmula I pueden obtenerse durante el aislamiento final y purificación de los compuestos de la invención o bien pueden prepararse por tratamiento de un compuesto de fórmula I con una cantidad suficiente del ácido o la base deseados para dar la sal de una forma convencional. Las sales de los

compuestos de fórmula I se pueden transformar a su vez en otras sales de compuestos de fórmula I por intercambio de iones mediante una resina de intercambio iónico.

- 5 Los compuestos de fórmula I y sus sales pueden diferir en ciertas propiedades físicas, pero son equivalentes a efectos de la invención. Todas las sales de los compuestos de fórmula I quedan incluidas dentro del ámbito de la invención.

Los compuestos de la presente invención pueden formar complejos con disolventes en  
10 los que se hacen reaccionar o desde los que se hacen precipitar o cristalizar. Estos complejos se conocen como solvatos. Tal como se utiliza aquí, el término solvato se refiere a un complejo de estequiometría variable formado por un soluto (un compuesto de fórmula I o una sal del mismo) y un disolvente. Ejemplos de disolventes incluyen los disolventes farmacéuticamente aceptables como agua, etanol y similares. Un complejo  
15 con agua se conoce como hidrato. Los solvatos de los compuestos de la invención (o sus sales), incluyendo hidratos, quedan incluidos dentro del ámbito de la invención.

Los compuestos de fórmula I pueden existir en diferentes formas físicas, es decir en forma amorfa y formas cristalinas. Asimismo, los compuestos de la presente invención  
20 pueden tener la capacidad de cristalizar de más de una forma, una característica que se conoce como polimorfismo. Los polimorfos se pueden diferenciar por varias propiedades físicas bien conocidas por los entendidos en la materia como por ejemplo sus difractogramas de rayos X, puntos de fusión o solubilidad. Todas las formas físicas de los compuestos de fórmula I, incluyendo todas sus formas polimórficas  
25 ("polimorfos"), quedan incluidas dentro del ámbito de la presente invención.

Algunos compuestos de la presente invención podrían existir en forma de varios diastereoisómeros y/o varios isómeros ópticos. Los diastereoisómeros pueden separarse mediante técnicas convencionales como la cromatografía o la cristalización  
30 fraccionada. Los isómeros ópticos pueden ser resueltos mediante el uso de técnicas convencionales de resolución óptica, para dar los isómeros ópticamente puros. Esta resolución puede realizarse sobre los intermedios de síntesis que sean quirales o bien sobre los productos de fórmula I. Los isómeros ópticamente puros también pueden ser obtenidos individualmente empleando síntesis enantioespecíficas. La presente

invención cubre tanto los isómeros individuales como sus mezclas (por ejemplo mezclas racémicas o mezclas de diastereoisómeros), tanto si se obtienen por síntesis como mezclándolos físicamente.

5 Como se ha mencionado anteriormente, la invención en la presente invención se describe una familia de moléculas, basadas en el catión pirilio, que:

- son sensibles a NO en medio oxigenado, sin presentar interferencias apreciables con otras especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, y muy especialmente sin presentar

10 interferencia con ácido dehidroascórbico; y

- se obtienen mediante un procedimiento sencillo que permite sintetizar gran cantidad de producto y en pocos pasos sintéticos.

15 Las moléculas sensibles a NO en medio oxigenado que se han citado anteriormente están basadas en el catión pirilio, más concretamente en el catión 2,4,6-triarilpirilio de fórmula I.

Estructuralmente, los compuestos de fórmula I tienen como elemento característico la

20 presencia de un grupo hidroxilo más un grupo amino contiguos (ortho-hidroxiamino), en el anillo aromático superior. La presencia de estos grupos funcionales en esta disposición específica, y en combinación con el anillo de pirilio antes mencionado, es lo que proporciona a las moléculas su reactividad frente a óxido nítrico en medio oxigenado y su elevada selectividad frente a otras especies potencialmente 25 interferentes.

Como se ha mencionado anteriormente, las moléculas descritas en el estado de la técnica, útiles para el análisis químico de óxido nítrico se basan principalmente en complejos organometálicos y en agrupaciones orto-diamino. La reactividad de éstas

30 últimas procede mediante la formación de una sal de diazonio con uno de los grupos amino y posterior conversión en un 1,2,3-benzotriazol, más fluorescente que el compuesto de partida. En el caso de las sondas de la invención, el mecanismo de reacción es diferente dado que tras la primera reacción de diazotación del grupo amina no existe ciclación, sino pérdida de nitrógeno, lo que da lugar al compuesto

desaminado, es decir, sin amina; el cual resulta ser fluorescente, al contrario que el producto de partida. La presencia de un grupo hidroxilo contiguo al grupo amino es necesaria para que tal reacción de perdida de nitrógeno tenga lugar. Ensayos realizados con sales de pirilio con una estructura similar a los de los compuestos de

5 fórmula I, pero sin el grupo OH, no dieron lugar a aumentos de emisión como los registrados cuando los dos grupos están presentes en posición relativa orto.

Así, en el caso de compuestos con un grupo hidroxiamino, como el compuesto de

fórmula A, el aumento de emisión al adicionar NO es del 8200 % mientras que el

10 compuesto equivalente sin el grupo hidroxilo no experimenta aumento de emisión en las mismas condiciones.

Por otro lado, respecto a la selectividad, varias de las sondas conocidas en el estado

de la técnica reaccionan con el ácido dehidroascórbico para dar un intermedio de tipo

15 quinoxalínico, para lo cual es imprescindible la presencia de dos nitrógenos en

posición relativa orto. Este problema no se presenta en el caso de las sondas descritas

en la presente invención, dado que la agrupación orto-hidroxiamino no puede dar lugar

a dicho intermedio. Por tanto, las sondas basadas en sales de pirilio con grupos orto-

hidroxiamino presentan aumento de emisión por NO en medio oxigenado sin que esta

20 se vea afectada por la presencia de DHA.

Los compuestos de fórmula I pueden obtenerse siguiendo los procedimientos descritos

a continuación. Como será evidente para un experto en la materia, el método preciso

utilizado para la preparación de un compuesto dado puede variar en función de su

25 estructura química. Asimismo, en alguno de los procedimientos que se detallan a

continuación puede ser necesario o conveniente proteger los grupos reactivos o lábiles

mediante grupos protectores convencionales. Tanto la naturaleza de dichos grupos

protectores como los procedimientos para su introducción y eliminación son bien

conocidos y forman parte del estado de la técnica (véase por ejemplo Greene T.W. y

30 Wuts P.G.M, "Protective Groups in Organic Synthesis", John Wiley & Sons, 4<sup>a</sup> edición,

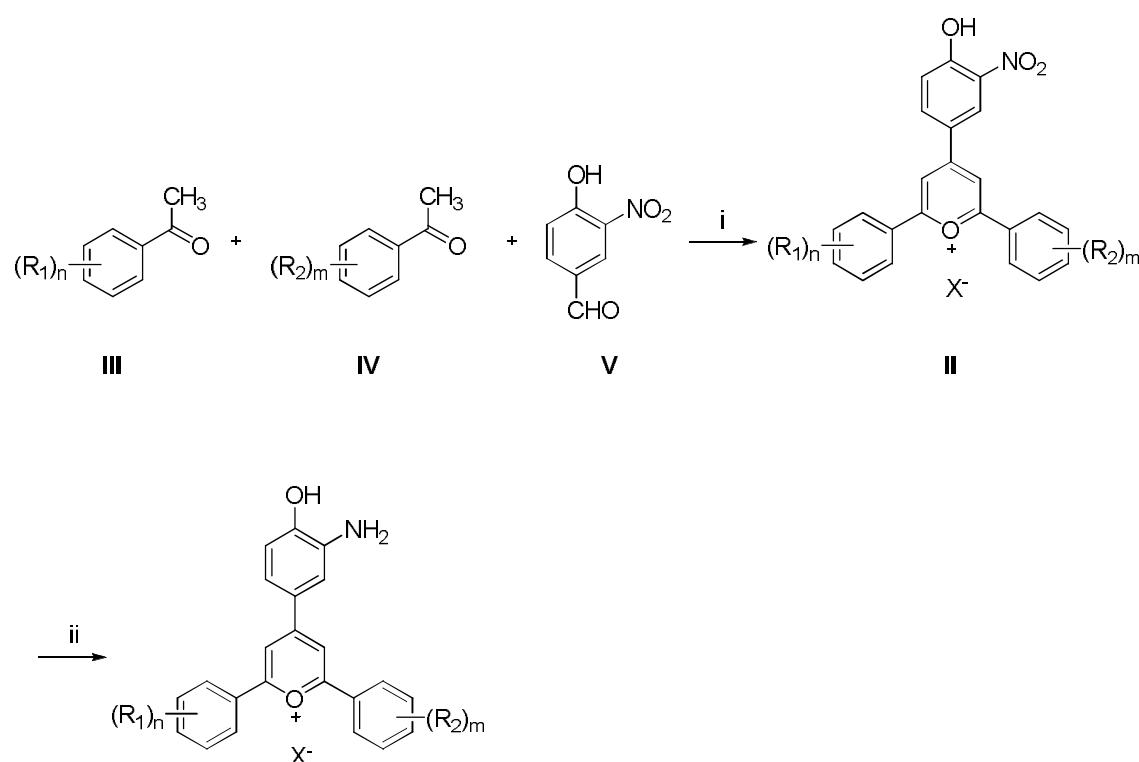
2006). Siempre que esté presente algún grupo protector, será necesaria una posterior

etapa de desprotección, que se realiza en las condiciones habituales en síntesis

orgánica, como las descritas en la referencia mencionada más arriba.

Excepto que se indique lo contrario, en los métodos que se describen a continuación los significados de los distintos sustituyentes son los significados descritos anteriormente en relación con un compuesto de fórmula I.

- 5 Los compuestos de fórmula I se pueden sintetizar de manera sencilla modificando los procedimientos descritos en la bibliografía para la síntesis de sales de pirilio (A. T. Balaban, G. W. Fischer, A. Dinculescu, A. V. Koblik, G. N. Dorofeenko, V. V. Mezheritskii, W. Schroth, Pyrylium salts: synthesis, reactions and physical properties. A. R. Katrisky (ed.), Academic Press, New York, USA, 1982). A diferencia de la  
 10 mayoría de los sensores fluorescentes de NO conocidos en el estado de la técnica, los compuestos de fórmula I se pueden obtener en dos etapas, como se indica en el esquema 1.



15

Esquema 1

En una primera etapa (i), se lleva a cabo una condensación (generalmente catalizada por ácido como puede ser  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}$ ) de una molécula de benzaldehído sustituido con grupos hidroxilo y nitro en posición relativa orto de fórmula V, con dos

- 20 moléculas de acetofenona sustituida apropiadamente de fórmula III y IV. Donde  $R_1$ ,  $R_2$

y R<sub>3</sub> tienen el significado descrito anteriormente para un compuesto de fórmula I Esta reacción da lugar a un derivado de pilirio con sustitución orto-hidroxinitro de fórmula II.

En una segunda etapa (ii), un compuesto de fórmula II se trata con un agente reductor,

tal como SnCl<sub>2</sub> o tal como un metal, preferiblemente hierro, cinc o estaño, en medio

5 ácido, preferiblemente ácido clorhídrico) para dar lugar a un compuesto de fórmula I con la sustitución orto-hidroxiamino buscada

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o

10 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.

## 15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. representa los espectros de emisión del compuesto A con concentración 10 µM en agua y a pH 7.2 en presencia de cantidades crecientes de NO (de abajo a arriba la concentración de NO varia de 0,1 µM a 1000 µM). Excitación a 450 nm.

20

Fig. 2. representa una curva para calcular Límite de Detección del compuesto A (concentración 10 µM en agua a pH 7,2). Se representa la intensidad de fluorescencia a 550 nm excitando a 450 nm en función de concentraciones crecientes de NO (medio aireado), expresadas en micromolar.

25

Fig. 3. representa la intensidad de fluorescencia a del compuesto A (concentración 10 µM en agua a pH7,2) en presencia de 50 equivalentes de cada una de las especies indicadas. La primera columna por la izquierda corresponde a la emisión del compuesto A sin nada adicionado. Excitación: 450 nm. Emisión: 550 nm.

30

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

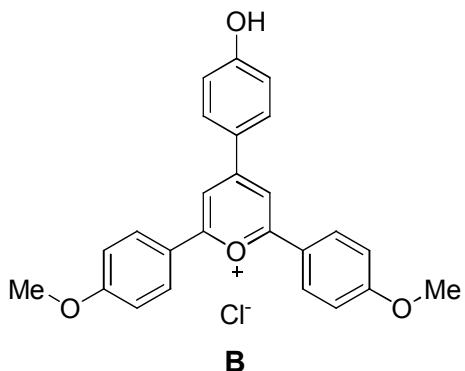
**Ejemplo 1****Síntesis del compuesto A.**

- En un balón de fondo redondo se disuelven 1,78 g de 4-metoxiacetofenona más 1 g de
- 5 4-hidroxi-3-nitro benzaldehído en 30 mL de tolueno anhidro. Se añaden 1,4 mL de  $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}$  bajo atmósfera de nitrógeno. Se calienta la mezcla a reflujo, con agitación continua, durante 2h. Pasado ese tiempo la mezcla de reacción se enfriá a temperatura ambiente y se vierte sobre unos 200 mL de éter etílico. El sólido que queda en el balón de reacción se disuelve en 3 mL de acetona y también se vierte
- 10 sobre el éter. Se observa la formación de un precipitado que recoge por filtración y se lava posteriormente con más éter etílico. Peso de producto obtenido: 0,440 g (rendimiento: 14 %) El compuesto obtenido es el correspondiente pirilio con sustitución orto-hidroxinitro de fórmula II.
- 15 Posteriormente, el compuesto de pirilio con sustitución orto-hidroxinitro (300 mg) se disuelve en diclorometano (20 mL). A continuación se añaden 6 equivalentes de  $\text{SnCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  y 30 equivalentes de HCl (aq) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3h. Pasado ese tiempo la mezcla se enfriá y se neutraliza lavando con NaOH (aq). Se extrae con diclorometano y se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$
- 20 anhidro. Se concentra en rotavapor y se obtienen 0,258 g de un compuesto morado (rendimiento: 91 %). La caracterización mediante resonancia magnética nuclear de protón y de carbono (RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) así como espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), confirman la obtención del compuesto A.

25 **Ejemplo 2**

**Reactividad y sensibilidad.** El compuesto A reacciona con óxido nítrico en medio acuoso oxigenado para dar un producto B que presenta una elevada emisión de fluorescencia, tal y como se describe a continuación. Una disolución de A (10 micromolar en agua, pH 7,2) es débilmente fluorescente. Tras burbujejar dicha

30 disolución con NO gaseoso se observa cambio de coloración (de morado a amarillo) y aparición de una banda intensa de fluorescencia centrada en 540 nm aproximadamente, cuando se excita con luz de longitud de onda de 470 nm. Un análisis químico del producto de reacción B mediante RMN y HRMS confirmó la desaminación del producto (pérdida de nitrógeno).



- 5 Para una correcta evaluación de las propiedades analíticas del compuesto **A** se prepararon diferentes disoluciones de **A** (en las condiciones anteriormente descritas) las cuales se pusieron en contacto cantidades crecientes del compuesto 1,1-dietil-2-hidroxi-2-nitroso-hidrazina de sodio (NONOato de sodio) el cual es un conocido dador de NO (libera controladamente NO en medio acuoso) (J. M. Wang, J. A. Hrabie, J. J.
- 10 Oppenheim, L. K. Keefer, C. M. Maragos et al., Cancer Res. 1993, 53, 564). En la figura 1 se muestra la fluorescencia de las muestras, al cabo de 5 min de reacción, en función de la concentración de NO presente en el medio (medio aireado). Un análisis de las correspondientes curvas de Intensidad de fluorescencia frente a concentración de NO proporcionó un límite de detección de 1 micromolar de NO para el compuesto **A**
- 15 en las citadas condiciones (Figura 2).

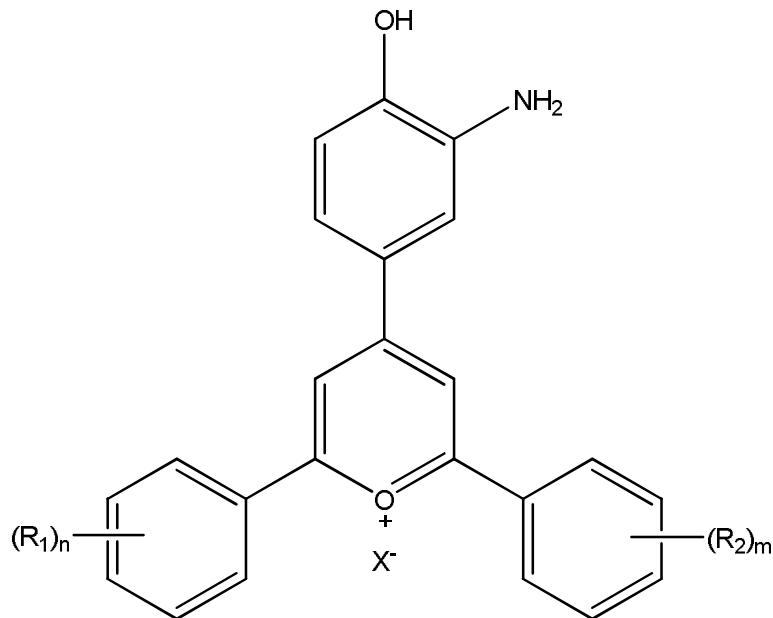
**Selectividad.** El compuesto **A** es selectivo para la detección mediante fluorescencia de óxido nítrico en medio oxigenado, como se ha descrito anteriormente. Además resulta altamente selectivo para NO frente a otras especies reactivas de oxígeno y

20 nitrógeno. Se prepararon disoluciones de **A** (10 micromolar en agua, pH 7,2) y se pusieron en contacto con 50 equivalentes de las siguientes especies químicas: NO,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  ${}^1\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{ONOO}^-$ , HNO, DHA y ácido ascórbico (HAA). Tras un tiempo de reacción de 5 min se midió la emisión de las disoluciones resultantes. Como se muestra en la figura 3, la emisión aumentó de manera muy

25 apreciable únicamente en el caso de NO como especie reactiva. De manera notable, atendiendo a lo anteriormente expuesto, el aumento de emisión con DHA es mínimo, y por tanto no resulta una interferencia para la medida de NO por fluorescencia.

## REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula I:



5

o cualquiera de sus sales, donde:

cada  $R_1$  y  $R_2$  independientemente representan H,  $C_{1-4}$ alquilo, - $OC_{1-4}$ alquilo o fenilo, donde  $C_{1-4}$ alquilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más  $R_4$  y donde fenilo puede estar opcionalmente sustituido por uno o más  $R_5$ ;

10 cada n y m independientemente representan de 0 a 3;

$X^-$  representa un contra ión; y

cada  $R_4$  y  $R_5$  independientemente representan H o - $OC_{1-4}$ alquilo.

2.- El compuesto según la reivindicación 1, donde  $X^-$  representa  $F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $ClO_4^-$ ,

15  $BF_4^-$  o  $HSO_4^-$ .

3.- El compuesto según la reivindicación 2, donde  $X^-$  representa  $Cl^-$ .

4.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde cada n y m

20 independientemente representan 1 ó 2.

5.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde n y m representan 1.

6.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde cada R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo.

5 7.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.

8.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde:  
cada R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
10 o fenilo;  
cada n y m independientemente representan 1 ó 2;  
X<sup>–</sup> representa F<sup>–</sup>, Cl<sup>–</sup>, Br<sup>–</sup>, I<sup>–</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>–</sup>, BF<sub>4</sub><sup>–</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>–</sup>; y  
R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.

15 9.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde:  
cada R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> independientemente representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  
o fenilo;  
cada n y m independientemente representan 1 ó 2;  
X<sup>–</sup> representa Cl<sup>–</sup>; y  
20 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.

10.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde:  
R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo;  
n y m representan 1 ó 2;  
25 X<sup>–</sup> representa F<sup>–</sup>, Cl<sup>–</sup>, Br<sup>–</sup>, I<sup>–</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>–</sup>, BF<sub>4</sub><sup>–</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>–</sup>; y  
R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.

11.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde:  
R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo;  
30 n y m representan 1 ó 2;  
X<sup>–</sup> representa Cl<sup>–</sup>; y  
R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.

12.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde:

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo;

n y m representan 1;

X<sup>–</sup> representa F<sup>–</sup>, Cl<sup>–</sup>, Br<sup>–</sup>, I<sup>–</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>–</sup>, BF<sub>4</sub><sup>–</sup> o HSO<sub>4</sub><sup>–</sup>; y

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.

5

13.- El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde:

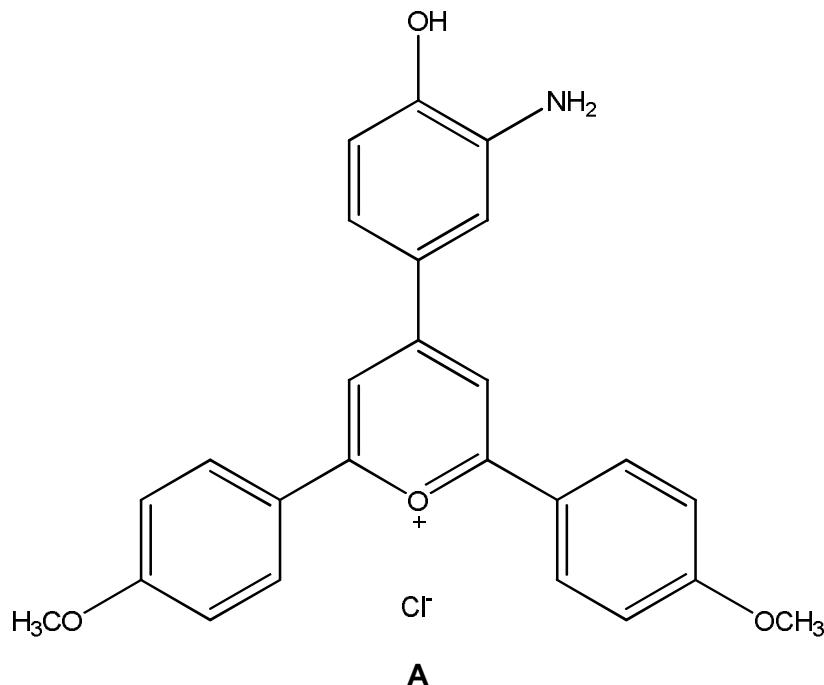
R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan H, CH<sub>3</sub>–, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>3</sub>, –OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o fenilo;

n y m representan 1;

X<sup>–</sup> representa Cl<sup>–</sup>; y

10 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H.

14.- El compuesto según la reivindicación 1, seleccionado de A:

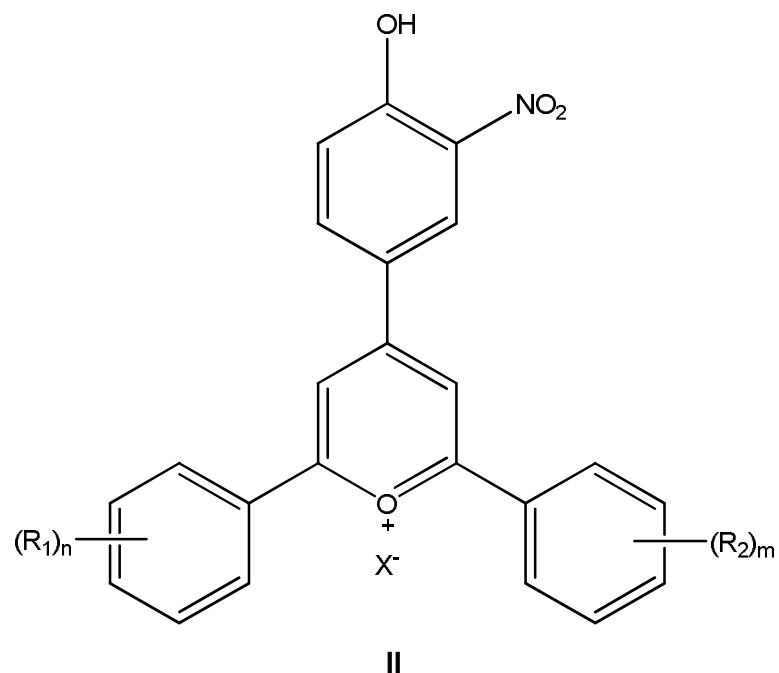


15

15.- Uso de un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido en las reivindicaciones 1 a 14, para la detección de óxido nítrico.

16.- Procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula I tal y como se ha

20 definido en las reivindicaciones 1 a 14, que comprende la etapa de reducción de un compuesto de fórmula II:



donde R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, X<sup>-</sup>, n y m tienen el significado descrito para un compuesto de fórmula I, caracterizada por llevarla a cabo en presencia de un agente reductor.

5

17.- El procedimiento según la reivindicación 16, donde el agente reductor es SnCl<sub>2</sub>.

ES 2 523 504 A1

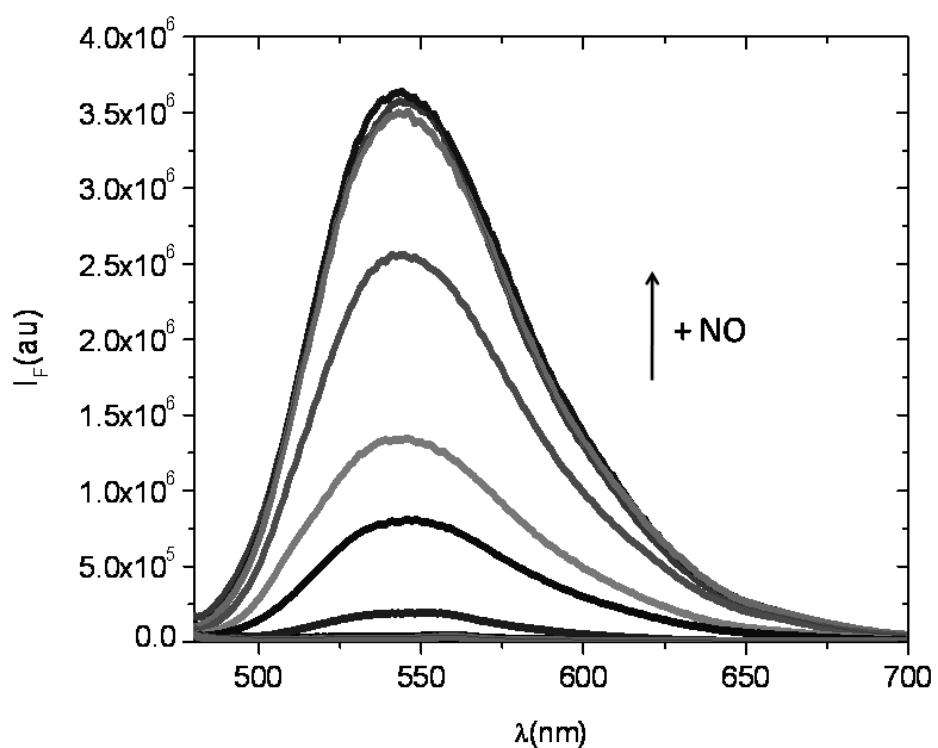
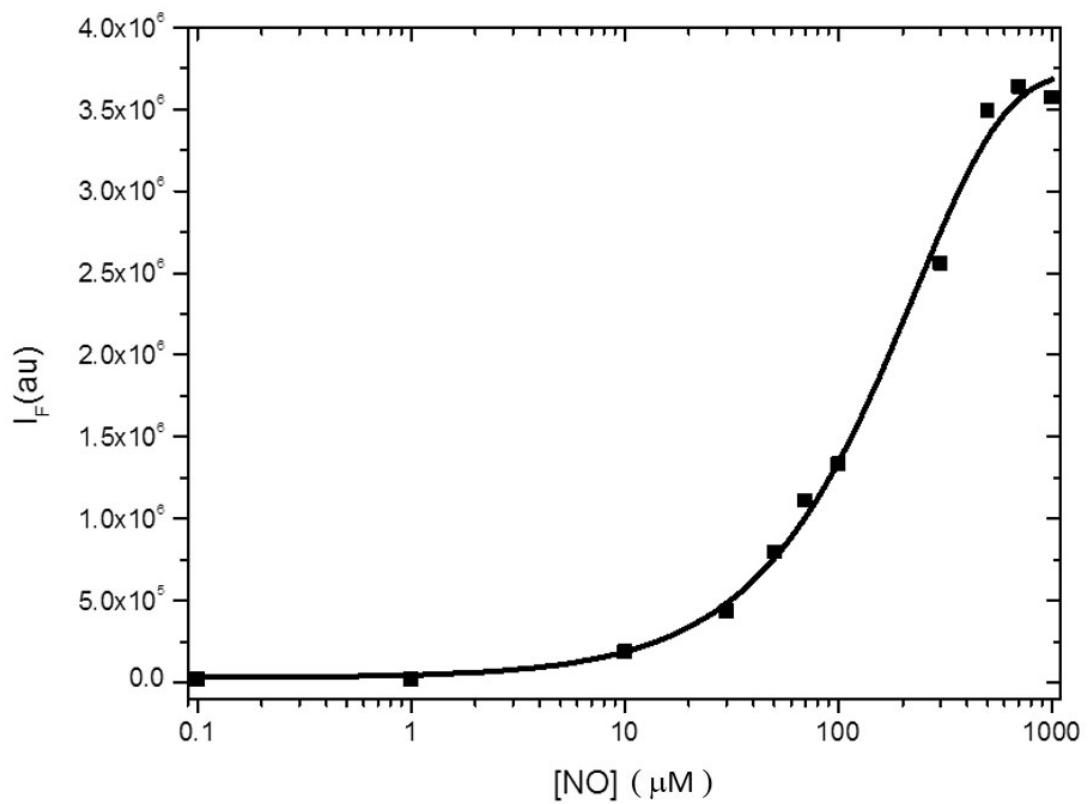
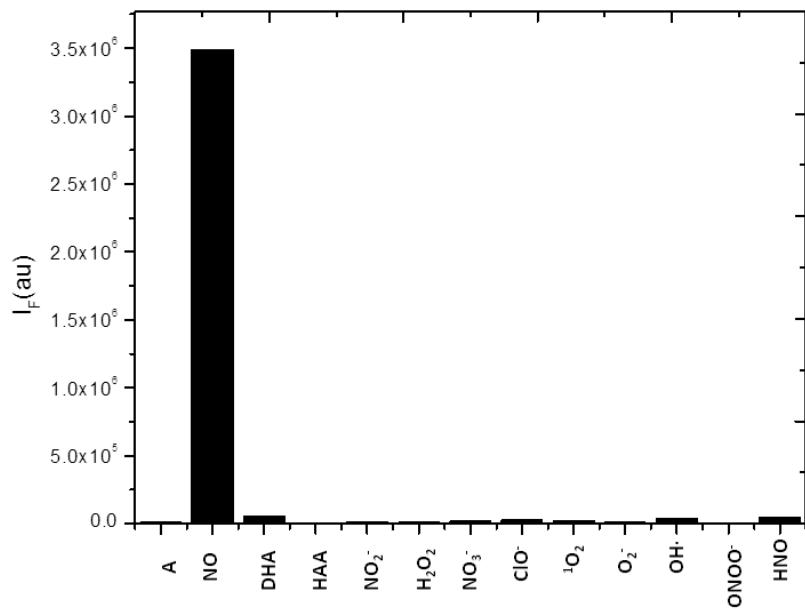


FIG.1

**FIG.2**

# ES 2 523 504 A1



**FIG.3**