

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 754**

21 Número de solicitud: 201730885

51 Int. Cl.:

C07F 5/02 (2006.01)

C09B 57/00 (2006.01)

C09K 11/07 (2006.01)

G03C 1/73 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

04.07.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.01.2019

Fecha de concesión:

09.05.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

17.05.2019

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (60.0%)**

C/ Serrano, 117

28006 Madrid (Madrid) ES y

FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E

**INNOVACIÓN BIOSANITARIA EN EL PRINCIPADO
DE ASTURIAS (FINBA) (40.0%)**

72 Inventor/es:

CHIARA ROMERO, Jose Luís;

GARCÍA-MORENO GONZALO, Inmaculada;

BLÁZQUEZ MORALEJA, Alberto;

CHIARA ROMERO, Maria Dolores y

SÁENZ DE SANTA MARÍA FERNÁNDEZ, Inés

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **Compuestos y sus usos como sondas fluorescentes**

57 Resumen:

Compuestos y sus usos como sondas fluorescentes.
Colorantes orgánicos basados en derivados de F-
BODIPY y carnitina, su procedimiento de obtención y
su aplicación para el etiquetado o marcaje
fluorescente específico de mitocondrias en células
vivas.

ES 2 695 754 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

Compuestos y sus usos como sondas fluorescentes

5 La presente invención se refiere a unos compuestos basados en derivados de F-BODIPY y carnitina como colorantes orgánicos. Además se refiere a su procedimiento de obtención y su aplicación para el etiquetado fluorescente específico de mitocondrias en células vivas. Por tanto, la invención se engloba en el campo de las sondas fluorescentes para marcaje biológico.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las mitocondrias son los orgánulos presentes en casi todas las células eucariotas encargados de la producción de energía en forma de ATP a través de la respiración

15 celular. Además, están involucradas en el metabolismo de grupos hemo, la homeostasis del calcio, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la inflamación, la proliferación celular y la apoptosis, cumpliendo así un papel esencial en la supervivencia de la célula. Estos orgánulos contienen además su propio ADN mitocondrial (mtADN), que es independiente del ADN del núcleo celular. El conjunto de

20 mitocondrias de la célula (condrioma celular) tiene un carácter dinámico que está regulado por complejos mecanismos de comunicación celular, tanto a nivel intra- como extracelular, para responder a las variaciones en las demandas energéticas de la célula mediante procesos de fusión, fisión, autofagia (mitofagia) y biogénesis mitocondrial. El daño o desregulación de estos mecanismos está implicado en

25 numerosos procesos patológicos, bien directamente, como en las enfermedades genéticas mitocondriales, o de forma secundaria en enfermedades neurodegenerativas, inflamatorias, cardiovasculares y en algunos síndromes metabólicos (Suliman, H. B.; Piantadosi, C. A. *Pharmacol. Rev.* **2016**, 68, 20). Se conoce desde hace tiempo que existe además una relación entre los cambios en el

30 condrioma celular y los procesos de envejecimiento, bien como causa o como efecto (Harman, D. *J Gerontol* **1956**, 11, 298; Balaban, R. S.; Nemoto, S.; Finkel, T. *Cell* **2005**, 120, 483). Estudios recientes están empezando a demostrar que el metabolismo mitocondrial puede ser también una diana terapéutica importante para el tratamiento del cáncer (Weinberg, S. E.; Chandel, N. S. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, 11, 9).

35

Aunque se han dedicado grandes esfuerzos al estudio de la biología de las mitocondrias, estamos todavía lejos de conocer en detalle muchas de sus funciones y actividades básicas. El desarrollo de nuevas tecnologías que faciliten este estudio es esencial para poder desentrañar el complejo papel que juegan estos orgánulos en el metabolismo celular y sus efectos sobre el envejecimiento y el desarrollo y posible tratamiento de muchas enfermedades. En comparación con las técnicas analíticas tradicionales, como los ensayos colorimétricos, las sondas fluorescentes (Li, X.; Gao, X.; Shi, W.; Ma, H. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 590) son actualmente las herramientas moleculares más eficientes y versátiles para el estudio de los sistemas biológicos gracias a su gran sensibilidad, selectividad y facilidad de uso, proporcionando una información muy variada en tiempo real y de forma no destructiva. Para su uso en microscopía de células vivas, una sonda fluorescente debe de cumplir idealmente una serie de requisitos básicos: 1) alta luminiscencia (alto rendimiento cuántico) en medio acuoso al ser iluminada en el rango visible-infrarrojo cercano; 2) alta especificidad y afinidad por su estructura celular o biomolécula objetivo; 3) elevada estabilidad química y fotoestabilidad en el medio celular; 4) capacidad para penetrar en la célula; 5) buena solubilidad en agua; y 6) baja o nula toxicidad.

Aunque se conocen actualmente una gran variedad de sondas fluorescentes para la visualización específica de mitocondrias, algunas de ellas disponibles comercialmente como por ejemplo etil éster de tetrametilrodamina (TMRE), yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (CiOC6(3)), MitoTracker® rojo o MitoTracker® verde, ninguna cumple con todos los requerimientos mencionados (Xu, Z.; Xu, L. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1094).

Una característica común de todas estas sondas es la presencia de un grupo catiónico (amonio o fosfonio) que promueve su incorporación a la mitocondria gracias al elevado gradiente de potencial negativo característico de este orgánulo. Además, todos ellos están basados en estructuras de xantenos o cianinas como grupo cromofórico, ambos incorporando aminas en su esqueleto, lo que reduce significativamente su fotoestabilidad, especialmente en condiciones drásticas de bombeo como las implicadas en microscopía de alta resolución (Alvarez, M.; Amat, F., Costela, A., Garcia-Moreno, I., Gomez, C., Liras, M., Sastre, R. *Appl. Phys. B.* **2005**, *80*, 993; Cerdan, I., Enciso, E., Martin, V., Bañuelos, J., Lopez Arbeloa, I.; Costela, A., Garcia-Moreno, I. *Nature Photonics*, **2012**, *6*, 621).

Por tanto, es de gran interés el desarrollo de nuevas sondas fluorescentes como marcadores específicos de mitocondrias en célula viva que puedan superar las limitaciones que presentan los sistemas actualmente comercializados para esta aplicación.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

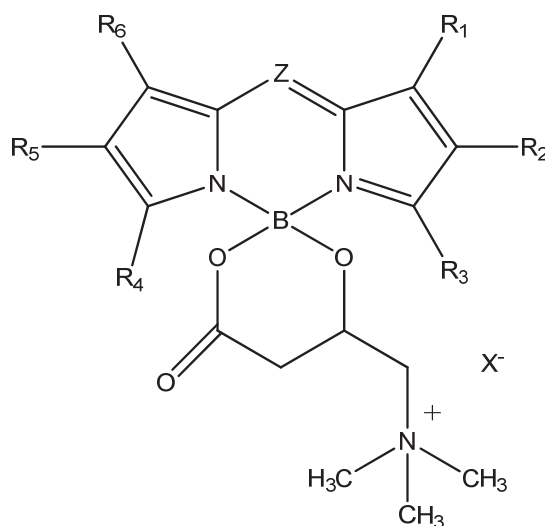
La presente invención describe unas nuevas sondas fluorescentes como marcadores específicos de mitocondrias en célula viva basadas en compuesto que comprende una unidad F-BODIPY como grupo fluoróforo y una unidad L-carnitina como grupo localizador, cuyo sistema supera las limitaciones que presentan los sistemas actualmente comercializados para esta aplicación. Ambas unidades se han unido a través del átomo de boro del fluoróforo, lo que simplifica enormemente la estructura final y el procedimiento de síntesis. Al usar directamente un F-BODIPY como producto de partida, el método tiene carácter general y puede proporcionar otras sondas similares con frecuencias de absorción y emisión sintonizables a lo largo del espectro visible dependiendo solo del F-BODPY empleado.

Los ensayos de tinción de células vivas humanas de origen tumoral con los nuevos marcadores fluorescentes han mostrado la selectividad por mitocondrias demostrada con ensayos de co-tinción con MitoTracker® rojo comercial. La eficiencia y selectividad del marcaje es independiente del patrón de sustitución en el cromóforo así como de la línea celular ensayada. Las nuevas sondas muestran propiedades interesantes con respecto al MitoTracker® rojo comercial. En primer lugar, el MitoTracker® rojo parece concentrarse en los bordes de la mitocondria, mientras que la tinción con las nuevas sondas se localiza preferentemente en su interior (la matriz mitocondrial). Además, la intensidad de la tinción con las nuevas sondas aumenta progresivamente con el tiempo de incubación de las células, mientras que el colorante comercial aparenta teñir estos orgánulos de forma casi instantánea. Estas características están revelando, en el caso de las nuevas sondas y a diferencia del marcador comercial, la intervención de un mecanismo de transporte activo de las mismas hacia el interior de la mitocondria.

La metodología descrita en la presente invención proporciona un nuevo y eficaz protocolo de síntesis para el desarrollo de nuevos colorantes con propiedades

avanzadas para ser aplicados como biomarcadores selectivos, estables, eficaces y baratos.

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) (a partir de ahora compuesto de la invención):

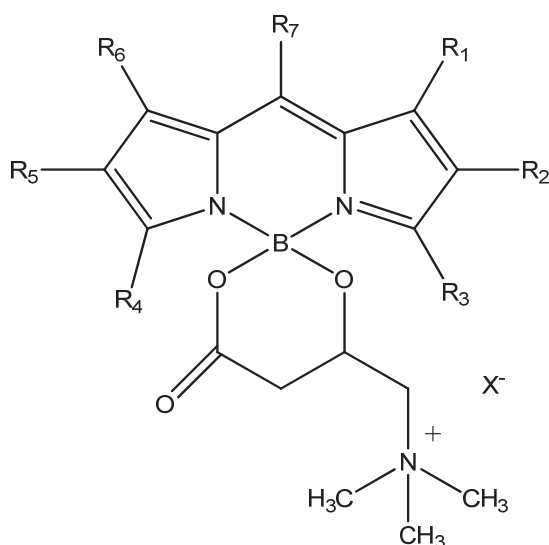


(I)

donde:

- 10 Z se selecciona de entre un átomo de nitrógeno (N) o un grupo C(R₇);
R₁ a R₇ se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈ sustituido o no sustituido, alquenilo C₂-C₁₈ sustituido o no sustituido, alquinilo C₂-C₁₈ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, halógeno, -OR', -COOR', -SR', -SOR', -SOOR' y -NR'R''; o cada dos
15 radicales R₁ a R₇, continuos entre sí como por ejemplo R₁ y R₂, R₂ y R₃, R₄ y R₅ o R₅ y R₆, forman un cicloalquilo, arilo o heteroarilo;
R' y R'' se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, alquenilo C₂-C₁₈, alquinilo C₂-C₁₈, arilo o heteroarilo; y
X⁻ es un contraión,
20 o cualquiera de sus isómeros.

En una realización preferida, Z es C(R₇) y el compuesto sería el siguiente compuesto de fórmula (II):



(II)

donde R₁ a R₇ y X⁻ son los definidos anteriormente.

- 5 El término “alquilo” se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 18 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes
- 10 tales como alquinilo, alquenilo, halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro o mercapto.

El término “alquenilo” se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas insaturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 2 a 18 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 6, y que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles y que opcionalmente puede contener algún enlace triple, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-butenilo, 1,3-butadienilo, etc. Los radicales alquenilos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como alquilo, alquinilo, halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcóxicarbonilo, amino, nitro o mercapto.

20

El término “alquinilo” se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, de 2 a 18 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 6, y que contienen al menos uno o más enlaces carbono-carbono triples y que opcionalmente puede contener algún enlace doble, por ejemplo, etilino, propinilo, butinilo, etc. Los radicales

25

alquinilos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como alquilo, alquenilo, halo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, ciano, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, amino, nitro o mercapto.

- 5 El término “arilo”, se refiere, en la presente invención, a anillos aromáticos, sencillos o múltiples, que tienen entre 5 a 18 átomos de carbono en la parte del anillo, tales como pero sin limitarse a, fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo, fluorenilo o antracilo. Preferiblemente el grupo arilo tiene de 5 a 7 átomos de carbono y más preferiblemente el grupo arilo es un fenilo. Los radicales arilo pueden estar opcionalmente sustituidos
- 10 en cualquiera de sus posiciones por uno o más sustituyentes o dos sustituyentes formando un ciclo condensado al arilo y se seleccionan independientemente entre tales como alquilo, alquenilo, alquinilo, O-alquilo, O, halógeno, hidroxilo, amino o ácido carboxílico. En una realización preferida el arilo es un fenilo opcionalmente sustituido y más preferiblemente un fenilo opcionalmente sustituido por más de un grupo alquilo,
- 15 tal como se ha definido anteriormente.

El término “heteroarilo” se refiere a un arilo, como se ha definido anteriormente, que contiene al menos un átomo distinto de carbono, tales como S, N, ó O, formando parte del anillo aromático.

20

- Por “cicloalquilo” se refiere la presente invención a un radical estable monocíclico o bicíclico de 3 a 10 miembros, que está saturado o parcialmente saturado, y que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, tal como ciclopentilo, ciclohexilo o adamantilo. Los radicales cicloalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos en
- 25 cualquiera de sus posiciones por uno o más sustituyentes o dos sustituyentes formando un ciclo condensado al cicloalquilo y se seleccionan independientemente entre tales como alquilo, alquenilo, alquinilo, O-alquilo, O, halógeno, hidroxilo, amino o ácido carboxílico.

- 30 Por “halógeno” se entiende en la presente invención a un átomo de bromo, cloro, yodo o flúor.

- En otra realización preferida, R_7 es un arilo opcionalmente sustituido, más preferiblemente R_7 es un fenilo opcionalmente sustituido y más preferiblemente fenilo
- 35 sustituido por alquilo C_1-C_6 , aún más preferiblemente es un trimetilfenilo.

En otra realización preferida, R_2 y/o R_5 son hidrógeno o alquilo C_1 - C_6 , más preferiblemente hidrógeno o metilo y aún más preferiblemente son hidrógeno. En una realización aún más preferida R_2 y R_5 son hidrógeno.

5

En otra realización preferida, R_1 , R_3 , R_4 y R_6 son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo C_1 - C_6 , más preferiblemente R_1 , R_3 , R_4 y R_6 son cada uno independientemente hidrógeno o metilo. Más preferiblemente R_1 , R_3 , R_4 y R_6 son hidrógeno o metilo.

10

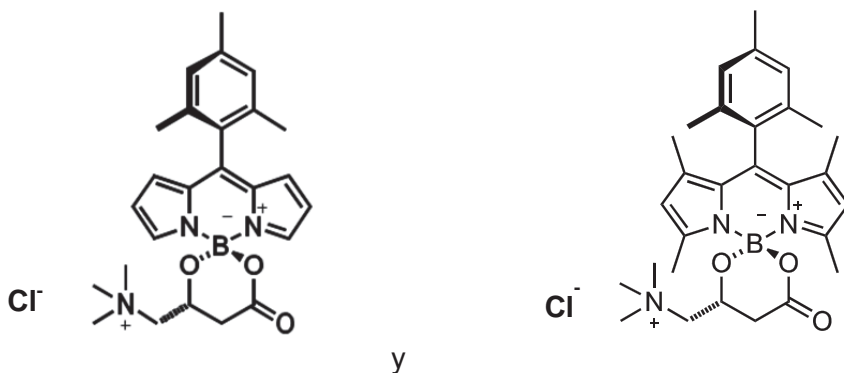
El contraión (X^-) es cualquier anión farmacéuticamente aceptable conocido por un experto en la materia y preferiblemente se puede seleccionar de la lista que comprende Cl^- , Br^- , I^- , F^- , SO_4^{2-} , BF_4^- , PF_4^- , HSO_4^- , $(SO_4^{2-})_{1/2}$, $CF_3SO_3^-$, ClO_4^- , y BF_4^- , más preferiblemente X^- se puede seleccionar de entre un halogenuro que se puede seleccionar de entre Cl^- , Br^- , I^- , F^- ; SO_4^{2-} , BF_4^- , PF_4^- , HSO_4^- y $(SO_4^{2-})_{1/2}$. Más preferiblemente X^- es un halogenuro, aún más preferiblemente Cl^- .

15

Por "isómero" se refiere en la presente invención también a cualquier mezcla racémica.

20

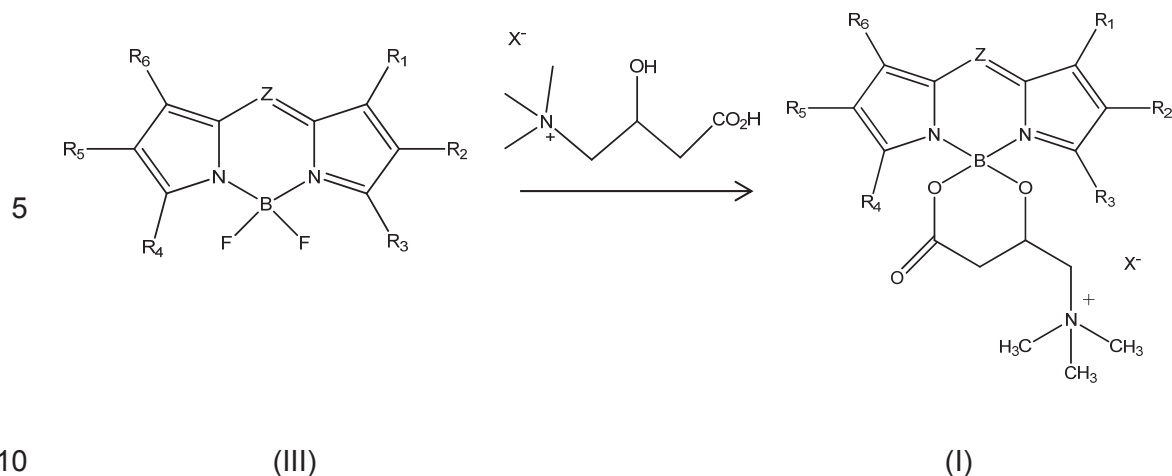
En una realización aún más preferida, el compuesto de la invención se selecciona de entre:



25

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un compuesto de la invención que comprende la reacción entre un compuesto de fórmula (III) y carnitina:

30



donde Z, R₁ a R₆ y X⁻ son los definidos anteriormente.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, carnitina puede seleccionarse entre L-carnitina, D-carnitina y mezcla racémica D/L-carnitina, preferiblemente es L-carnitina.

La reacción descrita se puede llevar a cabo en presencia de un exceso de reactivo, donde este reactivo se puede seleccionar entre cloruro de trimetilsililo (TMSCl), BCl₃, BBr₃, AlCl₃, AlBr₃, SnCl₄, SnBr₄, SiCl₄, SiBr₄, trifluorometilmetanosulfonato de trimetilsililo (Me₃SiOTf), trifluorometilmetanosulfonato de trietilsililo (Et₃SiOTf) y trifluorometilmetanosulfonato de triisopropilsililo (*i*-Pr₃SiOTf). Preferiblemente la reacción se lleva a cabo en presencia de exceso de cloruro de trimetilsililo, aproximadamente entre 20-50 mol-equiv.

En otra realización preferida del procedimiento de la invención la reacción se lleva a cabo en un disolvente polar aprótico capaces de disolver la carnitina. El disolvente se puede seleccionar de entre acetonitrilo, dimetilformamida, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, sulfolano, o mezclas de este disolvente polar aprótico con otros disolventes apróticos menos polares, como por ejemplo, sin limitarse a diclorometano, 1,2-dicloroetano, tetrahidrofurano, 2-methyl tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-diclorobenceno, acetato de etilo o acetona. En una realización preferida el disolvente es acetonitrilo.

Por otro lado, la solubilidad de la carnitina en disolventes orgánicos se puede mejorar cambiando el anión de la sal a los siguientes aniones: BF₄⁻, PF₆⁻, BPh₄⁻, p-

toluensulfonato, mesilato, trifluorometanosulfonato, acetato, benzoato, tricloroacetato o trifluoroacetato.

5 En otra realización de la presente invención el procedimiento se lleva a cabo a una temperatura de entre 50-150 °C, en una realización preferida la reacción se lleva a cabo en condiciones térmicas mediante irradiación por microondas.

10 En una realización preferida, el procedimiento de invención se lleva a cabo en presencia de un exceso de cloruro de trimetilsililo en acetonitrilo y en condiciones térmicas mediante irradiación por microondas.

Posteriormente a la reacción el compuesto obtenido de fórmula (I) se puede recrystalizar o purificar cromatograficamente, después de evaporar la mezcla de reacción a presión reducida.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención como marcador o sonda fluorescente. Más preferiblemente para el marcaje celular y aún más preferiblemente para el marcaje celular específico de mitocondrias, más preferiblemente de células vivas, y aún más preferiblemente en células vivas de mamíferos, preferiblemente humanas. Las células a marcar serán preferiblemente células de origen tumoral.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención, para la fabricación de marcadores para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales. Estas enfermedades se pueden seleccionar de entre deficiencia en translocasa carnitina-acilcarnitina, descompensación metabólica en la infancia, cardiomiopatía en la niñez, fatigabilidad en la edad adulta, trastornos en el metabolismo y transporte de carnitina, además de enfermedades como cáncer, diabetes tipo-2, enfermedades neurológicas, como por ejemplo el Parkinson y enfermedades cardiovasculares, como por ejemplo aterosclerosis.

35 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.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 **Fig. 1.** Marcaje de células SCC38 in vivo con el compuesto **4** a diferentes concentraciones (50, 100 y 500 nM). Barra de escala: 10 μ m

Fig. 2. Estudios de citometría de flujo en células marcadas con el compuesto **4** y MitoTracker® rojo de las líneas SCC38 y HeLa. Histogramas en los que se representa
10 la intensidad del marcaje frente al número de eventos, para cada uno de los tiempos de tinción (5, 15 y 30 min) y el control (Ctrl), para las células SCC38 y HeLa, y para cada uno de los dos marcadores.

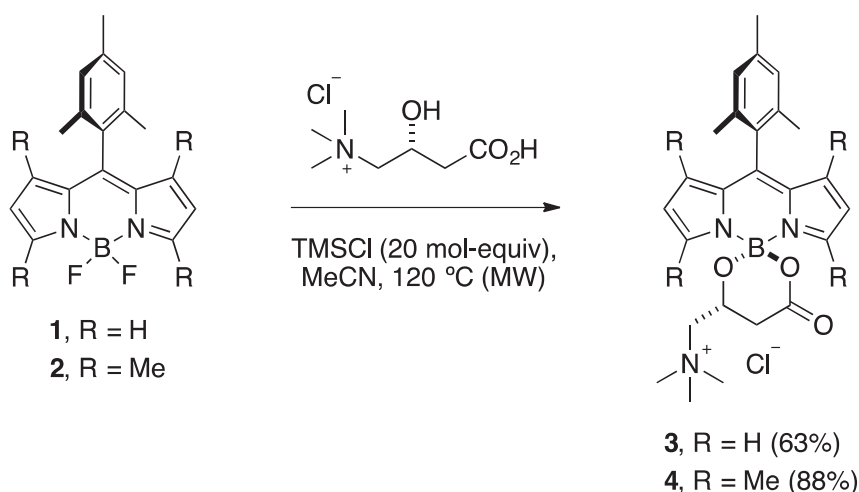
EJEMPLOS

15

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores donde se describe la obtención de unas sondas fluorescentes de la invención, así como su evaluación como marcadores de mitocondrias en células vivas de origen tumoral, que pone de manifiesto la efectividad del compuesto de la invención
20 mediante el seguimiento de su actividad tanto por microscopía confocal de fluorescencia como por citometría de flujo.

A. SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS 3 y 4

25 El método general para la preparación de estas sondas fluorescentes derivadas de L-carnitina se basa en la funcionalización racional de la molécula objetivo que se muestra en forma genérica en el esquema 1:

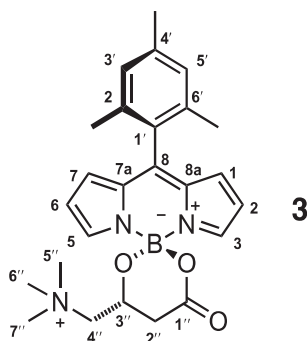


Esquema 1.- Síntesis de dos sondas BODIPY-carnitina (compuestos **3** y **4**).

Mediante esta síntesis la carnitina se une directamente al átomo de boro del F-BODIPY en forma de B-espiro-derivado a través de los grupos hidroxilo y carboxilo para generar el correspondiente derivado O-BODIPY. De esta forma, se simplifica el proceso de síntesis al evitar procesos de funcionalización previa del fluoróforo o la introducción de conectores, reduciendo con ello el tamaño y complejidad de la sonda final al mínimo posible. Aunque se conocen varios métodos de síntesis de O-BODIPYs a partir de los correspondientes F-BODIPYs en la presente invención se ensaya el descrito en Manzano, H. et al., *Adv. Funct. Mater.* 2016, 26, 2756.

Todos los reactivos utilizados en la preparación de los compuestos anteriores son comerciales o se prepararon siguiendo métodos previamente descritos en la literatura. Los disolventes anhidros se trataron mediante las técnicas habituales de secado o con un sistema de purificación de disolventes PureSol modelo 400-3-MD para el secado de los siguientes disolventes (THF, CH_2Cl_2 , MeCN, tolueno, éter dietílico y DMF) y se usaron en la reacción inmediatamente. Las reacciones con irradiación de microondas (MW) se llevaron a cabo en un tubo cerrado en un reactor de microondas focalizadas CEM Discover o Anton Parr Monowave 300, usando tubos estándar de Pyrex de 10 mL de capacidad cerrados con un tapón con septum. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una potencia máxima de 300 W y una presión máxima de 20 bares. El seguimiento de las reacciones se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF) empleando cromatofolios de gel de sílice tipo 60 F254 (230-400 mesh) con soporte de aluminio y un espesor de capa de 0,2 mm (Merck). Las placas de CCF se visualizaron bajo una lámpara de UV 254/365 nm.

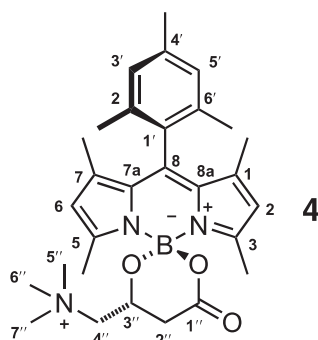
Compuesto 3. A una suspensión de hidrocloreto de L-carnitina (20 mg, 0,100 mmol) en MeCN anhidro (5 mL) en un vial de microondas de 10 mL con barra agitadora se añadió el compuesto **1** (Nepomnyashchii, A. B.; et al., J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 8633) (30 mg, 0,097 mmol) y cloruro de trimetilsililo (TMSCl) (491 µL, 3,87 mmol). La reacción se calentó con el siguiente gradiente de temperatura en un reactor de microondas focalizadas: 25-80 °C en 30 minutos, 80-100 °C en 5 minutos, 100 °C durante 30 minutos, 100-120 °C en 10 minutos, 120 °C durante 30 minutos y 120-150 °C en 1 hora. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se disolvió en la mínima cantidad de CH₂Cl₂ y se re-precipitó añadiendo *tert*-butil metil éter, para dar el compuesto **3** (26,5 mg, 63%) como un sólido rojo con fluorescencia verde en disolución.



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 8.14 (s, 1H, C5H), 7.83 (s, 1H, C3H), 6.95 (s, 2H, C3'H, C5'H), 6.70 (m, *J* = 4.15 Hz, 2H, C1H, C7H), 6.49 (dd, *J* = 8.40, 4.15 Hz, 2H, C2H, C6H), 4.98 (t, *J* = 10.75 Hz, 1H, C3''H), 4.33 (d, *J* = 13.49 Hz, 1H, C4''H), 3.62 – 3.52 (m, 1H, C4''H), 3.41 (s, 9H, C5''H₃, C6''H₃, C7''H₃), 2.98 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H, C2''H), 2.74 – 2.59 (m, 1H, C2''H), 2.36 (s, 3H, CH₃-C4'), 2.05 (s, 6H, CH₃-C2', CH₃-C6'). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃):** δ = 168.80 (C1''), 148.00 (C8), 145.25 (C3), 144.45 (C5), 139.23 (C4'), 136.44 (C2'), 135.91 (C6'), 135.53 (C7a), 135.49 (C8a), 131.10 (C7H), 130.78 (C1), 129.54 (C1'), 128.51 (C3'), 128.34 (C5'), 119.20 (C6), 119.16 (C2), 69.53 (C4''), 63.06 (C3''), 55.01 (C5'', C6'', C7''), 36.95 (C2''), 21.28 (CH₃-C4'), 20.11 (CH₃-C2'), 20.04 (CH₃-C6'). **HRMS (ESI⁺) *m/z*:** calculada para C₂₅H₃₁BN₃O₃⁺ [M⁺]: 432.2453, encontrada 432.2453. **IR (KBr):** ν = 1719.76 (C=O), 1560.24, 1411.23, 1383.73, 1257.88, 1108.77, 1070.62 cm⁻¹.

Compuesto 4. A una suspensión de hidrocloreto de L-carnitina (14,5 mg, 0,072 mmol) en MeCN anhidro (5 mL) en un vial de microondas de 10 mL con barra agitadora, se añadió el compuesto **2** (Kee, H. L.; et al., J. Phys. Chem. B 2005, 109, 20433) (32,3

mg, 0,088 mmol) y TMSCl (466 μ L, 3,67 mmol). La reacción se calentó con el siguiente gradiente de temperatura en un reactor de microondas focalizadas: 25-80 °C en 30 minutos, 80-100 °C en 5 minutos, 100 °C durante 30 minutos, 100-120 °C en 10 minutos y 120 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se evaporó a presión reducida y el crudo de reacción se disolvió en la mínima cantidad de CH_2Cl_2 y se reprecipitó añadiendo *tert*-butil metil éter, para dar el compuesto **4** (31,8 mg, 88%) como un sólido rojo con fluorescencia verde en disolución.



¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 6.97 (s, 1H, C3'H), 6.95 (s, 1H, C5'H), 5.99 (s, 1H, C6'H), 5.97 (s, 1H, C2'H), 4.55 (s, 1H, C3''H), 4.17 (s, 1H, C4''H), 3.32 (s, 9H, C5''H, C6''H, C7''H), 3.26 (s, 1H, C4''H), 2.87 (d, J = 14.45 Hz, 1H, C2''H), 2.54 (s, 3H, CH₃-C5), 2.47 (d, J = 14.45 Hz, 1H, C2''H), 2.39 (s, 3H, CH₃-C3), 2.34 (s, 3H, CH₃-C4'), 2.08 (s, 3H, CH₃-C2'), 1.98 (s, 3H, CH₃-C6'), 1.39 (s, 3H, CH₃-C7), 1.38 (s, 3H, CH₃-C1). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃):** δ = 168.85 (C1'), 155.71 (C3), 154.12 (C5), 143.83 (C8a), 143.52 (C7a), 142.52 (C8), 139.23 (C4'), 135.03 (C6'), 133.90 (C2'), 131.52 (C1), 131.39 (C7), 130.83 (C1'), 129.57 (C5'), 129.25 (C3'), 122.46 (C6), 122.43 (C2), 69.45 (C4''), 62.31 (C3''), 55.07 (C5'', C6'', C7''), 37.06 (C2''), 21.36 (CH₃-C4'), 19.76 (CH₃-C2'), 19.42 (CH₃-C6'), 17.39 (CH₃-C5), 15.67 (CH₃-C3), 13.85 (CH₃-C7), 13.72 (CH₃-C1). **HRMS (ESI⁺) m/z :** calculada para C₂₉H₃₉BN₃O₃⁺ [M^+]: 488.3079, encontrada 488.3090. **IR (KBr):** ν = 1720.45 (C=O), 1546.29, 1505.72, 1470.57, 1295.12, 1187.69, 1155.63, 1083.56, 1043.53, 982.88 cm⁻¹.

B. Caracterización de las nuevas sondas fluorescentes (compuestos **3** y **4**) como marcadores de mitocondrias

Los ensayos celulares se llevaron a cabo sobre dos líneas celulares humanas: SCC38 y HeLa. La línea SCC38 procede de carcinoma epidermoide de laringe de pacientes humanos, mientras que HeLa, la primera línea celular humana establecida en cultivo, deriva de cáncer de cérvix. El medio de cultivo utilizado para ambas líneas celulares fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero

bovino fetal (FBS), 100 U/mL de penicilina, 200 µg/mL de estreptomicina, 100 µmol/L de aminoácidos no esenciales y 2 mmol/L de glutamina. Los cultivos se incubaron a 37 °C y 5% de CO₂.

5 Estas líneas celulares se tiñeron con las sondas fluorescentes sintetizadas siguiendo el protocolo que se describe: Se sembraron 30000-50000 células SCC38 en placas de 24 pocillos con fondo de cristal que se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 70%. Entonces se retiró el medio de cultivo del pocillo y se realizaron al menos 3 lavados con medio DMEM sin aditivos. Tras ello se añadió al pocillo 1 mL de DMEM y
10 el compuesto fluorescente correspondiente. Las células se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, tras lo que se retiró el medio y se realizaron nuevos lavados con DMEM. Por último se añadió medio completo y se observaron las células al microscopio. El análisis al microscopio se realizó usando un equipo Zeiss AxioObserver Z1 con AxioCam MRM y ApoTome 2 (Carl Zeiss, Alemania) con distintos objetivos de aceite de inmersión 40X 63X. Las células se tiñeron también con MitoTracker® Red CMXRos
15 (Thermo Fisher) según las instrucciones del fabricante, con el fin de realizar estudios comparativos con los nuevos marcadores fluorescentes aquí sintetizados. Inicialmente, ambos compuestos **3** y **4** se utilizaron a una concentración de 50 nM, y el tiempo de tinción fue también de 30 minutos.

20 A modo de ejemplo, se describe el comportamiento del compuesto **4** marcando células de SCC38 y analizado por microscopia celular de fluorescencia. En la Fig. 1 se presentan la intensidad de marcaje en función de la concentración de colorante en el medio.

25 Para confirmar la especificidad del marcaje por las mitocondrias, se llevaron a cabo estudios de co-localización mediante co-tinción con el marcador de mitocondrias comercial MitoTracker® rojo en la línea celular. El compuesto **4** se utilizó a una concentración de 50 nM y el MitoTracker® Red a 25 nM. Se añadieron ambos
30 compuestos a la vez y se incubaron durante 30 minutos. Las células marcadas con ambos compuestos se observaron tanto con el microscopio Zeiss AxioObserver Z1 como con un microscopio láser confocal espectral Leica TCS-SP8X (Servicios Científico-Técnicos, Universidad de Oviedo).

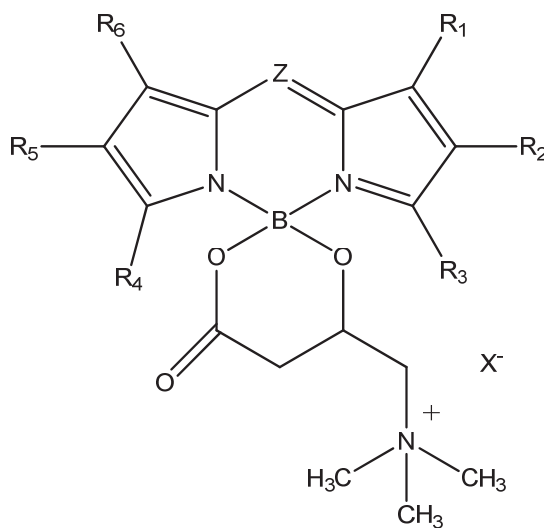
35 Los estudios de microscopía celular mostraron, en el caso de la co-tinción con ambos

compuestos a la vez, una buena co-localización de las dos sondas sin interferencias ni efectos citotóxicos. Cabe destacar que en muchos casos se pudo observar que la tinción del MitoTracker® rojo se concentró en los bordes de la mitocondria, mientras que la tinción verde del compuesto **4** se localizó preferentemente en su interior (la matriz mitocondrial).

La cinética del marcaje celular con **4** se estudió por citometría de flujo con las líneas celulares SCC38 y HeLa, utilizando MitoTracker® rojo como marcador control, ambos a una concentración de 50 nM. Los tiempos de tinción estudiados fueron de 5, 15, 30 y 45 minutos. Tras la tinción, se retiró el medio, se lavó con PBS, se trypsinizó y el pellet se re-suspendió en 500 µL de PBS y se introdujo en el citómetro tras filtración. Se utilizó un citómetro de flujo Analizador Celular Cytomics FC500 de Beckman Coulter (Servicios Científico-Técnicos, Universidad de Oviedo). Parte de las células re-suspendidas fueron sembradas y observadas también al microscopio. Como se puede observar en la Fig. 2, la tinción con MitoTracker® rojo apenas varió al aumentar el tiempo de incubación con el marcador, mientras que el marcaje con el compuesto **4** aumentó claramente de intensidad con el tiempo de incubación. Se realizó un nuevo experimento de citometría en el que se incluyó un tiempo de tinción más largo (45 min), y en el que se pudo ver que el marcaje era aún más intenso que con el tiempo de 30 minutos. Este hecho parece apuntar a la actuación de un mecanismo de transporte activo del compuesto **4** en la mitocondria. Por otro lado, en los experimentos de co-tinción se observó que el MitoTracker® rojo parece concentrarse en los bordes de la mitocondria, mientras que la tinción verde del compuesto **4** se localiza preferentemente en su interior (la matriz mitocondrial). Estos hechos indicarían que la internalización de la sonda **4**, a diferencia del marcador comercial, implica la presencia de un mecanismo de transporte activo del compuesto **4** en la mitocondria.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I)



(I)

donde:

Z se selecciona de entre un N o un grupo C(R₇);

R₁ a R₇ se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈ sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₁₈ sustituido o no sustituido, alquino C₂-C₁₈ sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, halógeno, -OR', -COOR', -SR', -SOR', -SOOR' y -NR'R''; o cada dos radicales R₁ a R₇ forman un cicloalquilo, arilo o heteroarilo;

R' y R'' se seleccionan cada uno independientemente entre hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, alqueno C₂-C₁₈, alquino C₂-C₁₈, arilo o heteroarilo; y

X⁻ es un contraión,

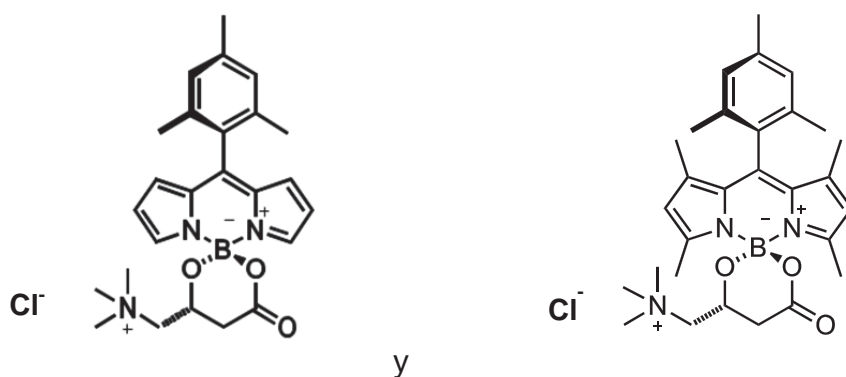
o cualquiera de sus isómeros.

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde Z es C(R₇).

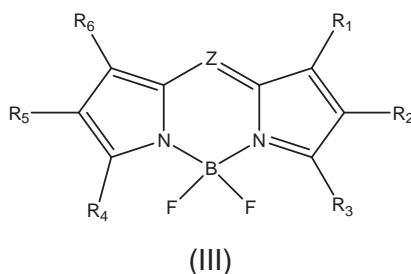
3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde R₇ es un arilo opcionalmente sustituido.

4. Compuesto según la reivindicación 3, donde R₇ es un trimetilfenilo.

5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde R_2 y/o R_5 son hidrógeno.
6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde R_1 , R_3 , R_4 y R_6 son cada uno independientemente hidrógeno o metilo.
7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R_1 , R_3 , R_4 y R_6 son hidrógeno o metilo.
8. Compuesto según cualquier de las reivindicaciones 1 a 7, donde X^- se selecciona de entre un halogenuro, SO_4^- , BF_4^- , PF_4^- , HSO_4^- y $(SO_4^{2-})_{1/2}$.
9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde X^- es Cl^- .
10. Compuesto según la reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona de entre:



11. Procedimiento de obtención del compuesto de fórmula (I) descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende la reacción de un compuesto de fórmula (III) con carnitina:



donde: Z y R_1 a R_6 son los definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

12. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 como marcador o sonda fluorescente.

13. Uso según la reivindicación 12, para el marcaje celular.

14. Uso según la reivindicación 13, para el marcaje celular de mitocondrias.

5

15. Uso según la reivindicación 14, en células vivas.

16. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la fabricación de marcadores para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales.

10

17. Uso según la reivindicación 16, donde las enfermedades mitocondriales se selecciona de entre deficiencia en translocasa carnitina-acilcarnitina, descompensación metabólica en la infancia, cardiomiopatía en la niñez, fatigabilidad en la edad adulta, trastornos en el metabolismo, cáncer, diabetes tipo-
2, enfermedades neurológicas y enfermedades cardiovasculares.

15

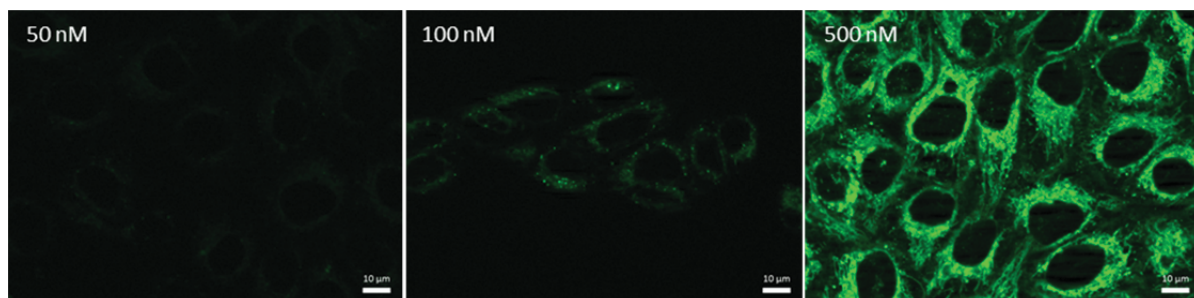


Fig. 1

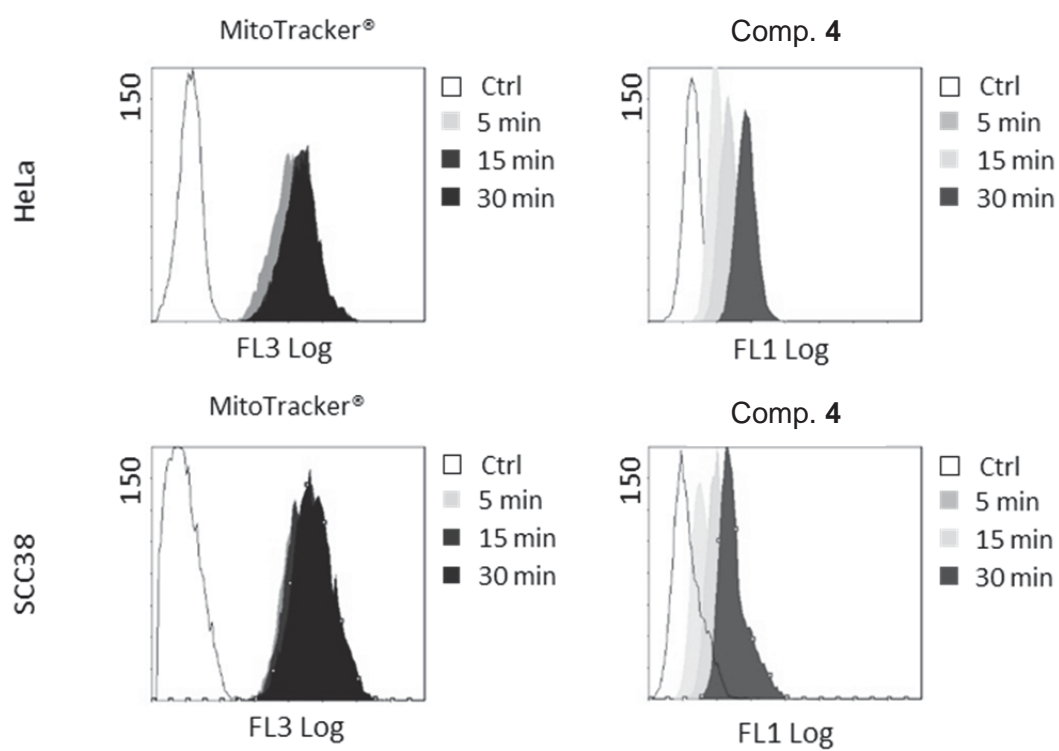


Fig. 2