

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 548**

21 Número de solicitud: 202030600

51 Int. Cl.:

C07F 5/02 (2006.01)

C09B 57/00 (2006.01)

C09K 11/07 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.06.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.12.2020

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(60.0%)**

Avenida de Séneca 2

28040 MADRID ES y

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (40.0%)

72 Inventor/es:

ORTIZ GARCÍA, M^a Josefa;

RODRÍGUEZ AGARRABEITIA, Antonia;

DE LA MOYA CERERO, Santiago;

MAZUELO SANTOS, Tania;

PRIETO CASTAÑEDA, Alejandro;

VILLANUEVA OROQUIETA, Ángeles y

TABERO TRUCHADO, Andrea

54 Título: **Nuevos colorantes BODIPY para teragnosis fotodinámica basados en acumulación en mitocondrias**

57 Resumen:

Nuevos colorantes BODIPY para teragnosis fotodinámica (fototeragnosis) basados en acumulación en mitocondrias.

Los compuestos orgánicos estructuralmente simples y con actividad antitumoral por actuación en mitocondrias a través de varios mecanismos de acción, constituyen una promesa sustancial para ser desarrollados como agentes para el tratamiento del cáncer. La presente invención se refiere a nuevos compuestos con estructura de F-BODIPY con capacidad de acumulación específica en mitocondrias, de exhibir fotocitotóxicidad sin necesidad de involucrar átomos pesados u otros restos funcionales capaces de interaccionar en los procesos biológicos, y con potencialidad para el desarrollo de nuevos agentes teragnósticos de uso clínico. Además, se refiere a su procedimiento de obtención y a su aplicación como marcadores fluorescentes de mitocondrias, y como agentes fotocitotóxicos para terapia fotodinámica (TFD) y fototeragnosis basados en acumulación en mitocondrias.

ES 2 800 548 A1

DESCRIPCIÓN

Nuevos colorantes BODIPY para teragnosis fotodinámica basados en acumulación en mitocondrias

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se enmarca en el campo de la Química Orgánica Precisa, concretamente en el campo de los agentes químicos para bioimagen y terapia fotodinámica de aplicación en (bio)medicina.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las mitocondrias son orgánulos de morfología alargada y doble membrana, característicos de las células eucariotas. Las mitocondrias están recibiendo una atención especial en el campo de la investigación como resultado de su implicación tanto en el funcionamiento normal del organismo como en su participación en distintas enfermedades. Todo ello se ha reflejado en un elevado número de publicaciones científicas relacionadas con estos orgánulos.

20 En los últimos años, las mitocondrias son objeto de estudio como orgánulos diana en nuevas terapias anti-tumorales, aprovechando las propiedades específicas que poseen estos orgánulos cuando se localizan en células neoplásicas.

25 Los agentes con actividad antitumoral que actúan sobre las mitocondrias a través de varios mecanismos de acción se han denominado *mitocanos* (acrónimo procedente de “mitocondrias” y “cáncer”) y constituyen una promesa sustancial para ser desarrollados como fármacos anticancerígenos clínicamente relevantes (Neuzil, J. et al., *Mitochondrion* **2013**, 13, 19).

30 En la última década, la terapia fotodinámica (TFD) ha surgido como una herramienta terapéutica para el tratamiento de varios tipos de tumores y ha conseguido despertar un elevado interés debido a que se trata de una técnica mínimamente invasiva. Su efecto terapéutico surge de la combinación de tres componentes: un fotosensibilizador (FS), luz y oxígeno. Cada uno de estos componentes no es tóxico por sí mismo pero, 35 cuando se combinan, producen una cadena de reacciones que conducen a la

formación de ROS (*Reactive Oxygen Species*), especies citotóxicas entre las que se encuentra el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), causando la muerte celular. La generación de oxígeno singlete tras la irradiación del FS es el paso clave en la TFD (van Straten, D. *Cancers* **2017**, 9, 19).

5

La eficiencia de la TFD depende de la localización subcelular del FS, debido a que el oxígeno singlete es altamente reactivo y que su vida media es del orden de 40 ns y su radio de difusión de ~ 20 nm (Oliveira, C.S. et al. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, 512, 824). En relación con este hecho, los FSs que se localizan en las mitocondrias poseen un elevado potencial para ser utilizados en TFD, ya que estos orgánulos desempeñan un papel central en las vías apoptóticas (Noh, I. et al. *Adv. Sci.* **2018**, 5, 1700481; Thomas, P. et al. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 8351).

10

Durante la última década se han desarrollado FS basados en BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) con capacidad para generar ROS y que han sido destacados como prometedores para el desarrollo de agentes para TFD. La mayoría de estos FS presentan en su estructura átomos pesados (metales o halógenos), potencialmente tóxicos.

15

Actualmente existen marcadores de mitocondrias comercializados que están basados fundamentalmente en estructuras de rodaminas, cianinas o sales de piridinio. También se han descrito diversos BODIPYs fluorescentes que permiten la visualización de mitocondrias (por ejemplo, Huang, Y. *J. Mater. Chem. B* **2019**, 7, 305; ES2695754). Sin embargo, no existen sondas comerciales basadas en BODIPY para el marcaje fluorescente de mitocondrias.

20

25

Recientemente se ha intentado desarrollar BODIPYs terganósticos con capacidad para actuar como FS para TFD y como sondas fluorescentes para marcaje específico de mitocondrias (Kesavan, P.E. et al. *Bioorg. Chem.* **2019**, 91, 103139; Du, X. et al. *Inter. J. Pharm.* **2019**, 555, 346; He, H. et al. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 13543). Sin embargo, estos BODIPYs involucran azufre (potencialmente tóxico) en su estructura o indol (de potencial interacción en múltiples procesos de biológicos), lo que podría suponer una limitación en su uso clínico. Además, presentan absorción y emisión en la zona verde del espectro, fuera de la denominada ventana biológica (600 – 800 nm), lo que supone otra limitación a su posible uso clínico.

30

35

Por tanto, sería deseable disponer de BODIPYs teragnósticos con capacidad para actuar de forma dual, como FS para TFD y como sondas fluorescentes para marcaje específico de mitocondria, y apropiada para uso clínico.

5

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe el diseño estructural, desarrollo sintético y actividad de un nuevo grupo de colorantes pertenecientes a la familia de los BODIPY, que tienen capacidad para señalar mitocondrias eficientemente mediante fluorescencia en el entorno de la llamada ventana biológica, y capacidad adicional para producir muerte celular eficiente mediante TFD sin necesidad de involucrar en su molécula átomos pesados o restos funcionales de desconocida actividad biológica capaces de interaccionar en procesos biológicos.

15

Estructuralmente, los colorantes objetos de la presente invención se caracterizan por poseer una unidad de *F*-BODIPY (4,4-difluoroBODIPY) π -extendida por la acción de uno o varios grupos 2-arilitenilo que, a su vez, portan un resto polar basado en alquil(trifenil)fosfonio.

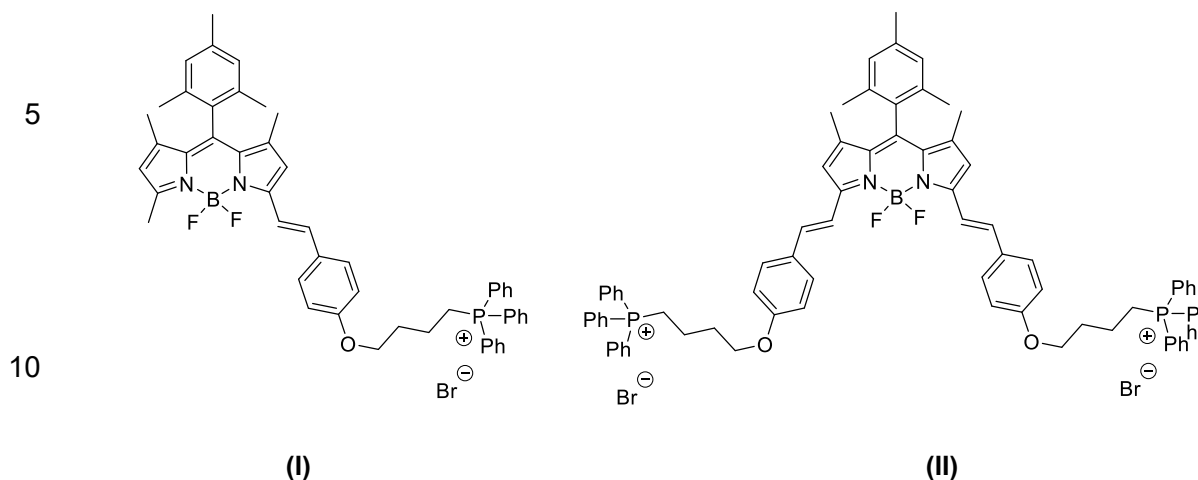
20

Los compuestos de la presente invención se preparan mediante post-funcionalización de colorantes BODIPY previamente α -funcionalizados con uno o dos metilos, por reacción con un aldehído aromático convenientemente funcionalizado. Este protocolo sintético tiene carácter general y puede proporcionar biomateriales con propiedades avanzadas similares para ser aplicados en el desarrollo de agentes teragnósticos de uso clínico.

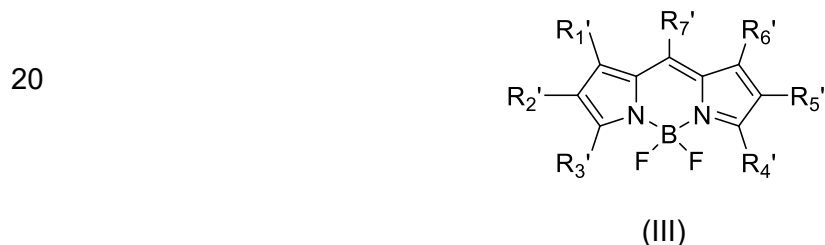
Se trata de colorantes con potencialidad para el desarrollo de nuevos agentes teragnósticos de uso clínico. Los ensayos de tinción de células humanas de origen tumoral con los nuevos colorantes demuestran que estos sistemas se acumulan específicamente en mitocondrias y que dicha acumulación específica potencia, a su vez, su capacidad fototóxica en TFD.

De forma más concreta, en un **primer aspecto**, la presente invención se refiere a los compuestos Mito-1 y Mito-2 de fórmula (I) y (II), respectivamente, a los que, en

adelante, se hará referencia en este documento como los “compuestos de la invención”



Un **segundo aspecto** de la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de los compuestos Mito-1 y Mito-2, en adelante denominado “procedimiento de la invención”, que comprende la reacción entre un compuesto de fórmula (III) y un aldehído aromático.



Donde R₄' (y/o R₃') es metilo y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final.

Una realización más preferida del procedimiento de la invención, comprende la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (III), mediante su reacción de condensación con un aldehído aromático funcionalizado con un grupo fosonio, preferiblemente elegido entre el grupo formado por los benzaldehídos, y más preferiblemente donde el benzaldehído es bromuro de (4-(4-formilfenoxi)butil)(trifenil)fosfonio. Preferiblemente, esta reacción está catalizada por un ácido, preferiblemente seleccionado entre el grupo formado por ácido fórmico, ácido acético (AcOH) y ácido propanoico; o por una base, preferiblemente seleccionada

entre el grupo formado por trimetilamina, etil(diisopropil)amina, piperidina, pirrolidina y morfolina; o por una mezcla de ácido y base. Preferiblemente, el catalizador es una mezcla formada por piperidina y AcOH.

- 5 En otra realización más preferida del procedimiento de la invención, la reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico compatible con la reacción de condensación a una temperatura comprendida entre 20 y 140°C. Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo en *N,N*-dimetilformamida (DMF) como disolvente, más preferiblemente a 120°C, aún más preferiblemente bajo irradiación de microondas, y de forma
10 especialmente preferida en atmósfera inerte (por ejemplo de argón).

Finalmente, tras su obtención, el compuesto de la invención puede ser purificado mediante las técnicas habituales de purificación de compuestos moleculares orgánicos. Preferentemente, la técnica de purificación es la cromatografía de elución
15 en columna y, más preferiblemente, el adsorbente de esta cromatografía de elución es gel de sílice.

Un **tercer aspecto** de la presente invención se refiere al uso de cada compuesto de la invención, como biomarcador fluorescente y/o como agente fotocitotóxico,
20 preferiblemente para marcaje celular y, aún más preferiblemente, para el marcaje celular específico de mitocondrias, preferiblemente de células vivas y, aún más preferiblemente, en células vivas de mamíferos. De manera especialmente preferente, las células a marcar y/o tratar mediante TFD son humanas, preferentemente de naturaleza cancerosa.

25

Por tanto, un **cuarto aspecto** de la presente invención comprende el uso de los compuestos de fórmula (I) y (II) para el desarrollo y fabricación de marcadores para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con anomalías en mitocondrias.

- 30 En un uso preferido, los compuestos de la invención pueden ser empleados de forma directa o unidos, covalentemente o supramolecularmente, a un sistema químico que mejore sus propiedades ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad); preferiblemente este sistema es una biomolécula, preferiblemente seleccionada entre el grupo que consiste en un aminoácido, péptido, proteína, lípido,
35 carbohidrato, ácido nucleico y toxina. En un uso preferido del compuesto (I) de la

invención, éste se utiliza de forma directa y es preferiblemente fotoactivado mediante irradiación con luz visible, preferentemente de la región verde-roja del espectro electromagnético y, más preferentemente, la luz es láser.

- 5 Un **último aspecto** de la presente invención comprende, por tanto, una nueva estrategia para conseguir potenciar la actividad de agentes teragnósticos basados en TFD y en diagnóstico mediante bioimagen fluorescente, consistente en la acumulación específica de agente teragnóstico en mitocondrias.
- 10 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 objetivos, 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
- 15 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Visualización de los compuestos Mito-1 y Mito-2 en células HeLa (2,5 μM , 3 h de incubación) bajo excitación verde en microscopía óptica de contraste de fase. Barra de escala: 10 μm .

20

Figura 2. Porcentaje de viabilidad de células HeLa tras los tratamientos con los compuestos Mito-1 y Mito-2 a distintas concentraciones en condiciones de oscuridad y tras 10,3 J/cm^2 de irradiación verde. Se representa el valor medio de la viabilidad de seis experimentos $\pm$ desviación típica.

25

Figura 3. Imagen de las alteraciones morfológicas de las células HeLa incubadas con el compuesto Mito-1 (5 μM) e irradiadas con 10,3 J/cm^2 de luz verde. Tras la irradiación, las células HeLa comienzan a morir exhibiendo la morfología típica de la muerte celular por apoptosis. Barra de escala es 10 μm .

30

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

35 A continuación se ilustra la invención mediante ensayos realizados por los inventores,

donde se describe la obtención de varios colorantes de la invención, así como su evaluación como marcadores fluorescentes de mitocondrias en células vivas de origen tumoral, y como agentes fotocitotóxicos para la destrucción eficiente de las células así marcadas.

5

SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS

Todos los reactivos y compuestos de partida se han obtenido comercialmente, a menos que se indique lo contrario, y se han usado sin purificaciones adicionales. Los disolventes comunes se han secado y destilado por procedimientos estándar. Los intermedios sintéticos y productos finales se han purificado mediante cromatografía en columna flash, utilizando gel de sílice Merck 60 (230-400 mesh). Los eluyentes empleados en cromatografía se especifican en cada caso y sus proporciones se indican en relación volumen:volumen. Las reacciones con irradiación de microondas (MW) se han llevado a cabo en un reactor de microondas (*Biotage® Initiator Classic*) usando tubos cerrados estándar de Pyrex de 2 mL de capacidad, a una potencia máxima de 400 W y una presión máxima de 22 bares. Todos los productos aislados se han identificado atendiendo a sus datos espectroscópicos y/o analíticos. Los espectros de RMN (Resonancia Magnética Nuclear) de ^1H y ^{13}C se han registrado a 20 °C. La señal residual de disolvente se ha utilizado como referencia de escala en los espectros de RMN. Las multiplicidades de los desplazamientos químicos se indican como s = singlete, d = doblete, t = triplete, c = cuadruplete, q = quintuplete y m = multiplete. Los espectros FTIR (*Fourier Transform Infrared*) se han obtenido a partir de muestras puras usando la técnica ATR (*Attenuated Total Reflectance*). La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, *High Resolution Mass Spectrometry*) se ha realizado utilizando la técnica MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*).

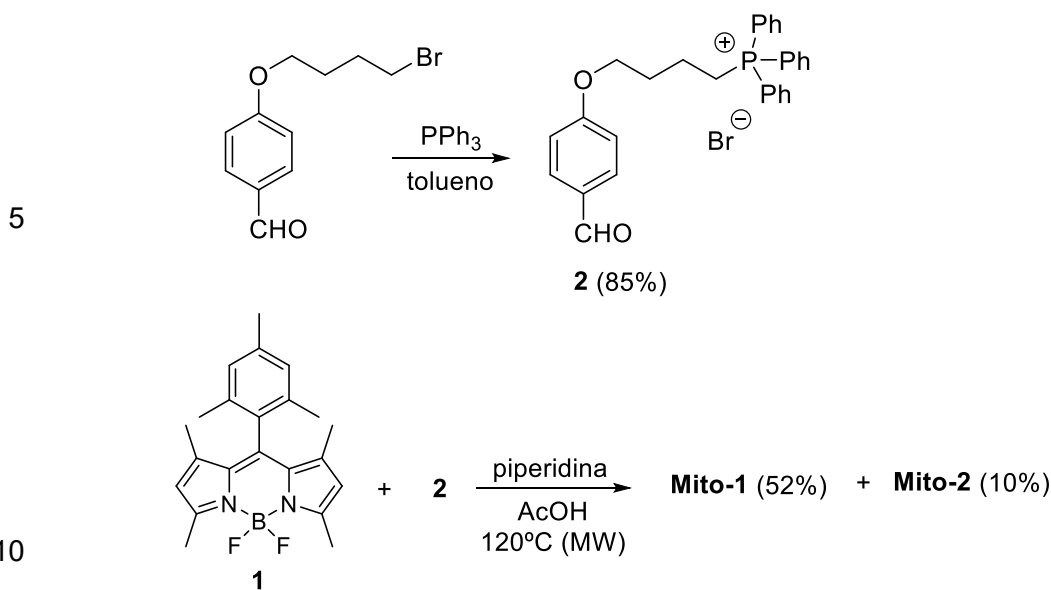
25

Ejemplo 1.

Síntesis de los compuestos Mito-1 y Mito-2

La preparación de los compuestos Mito-1 y Mito-2 se ha llevado a cabo a través de la ruta de síntesis que se recoge en el esquema 1, mediante post-funcionalización del BODIPY 1. Para ello, se ha utilizado una reacción de tipo Knoevenagel promovida por MW entre 1 y el aldehído aromático 2. Este aldehído se sintetizó previamente a partir del correspondiente aldehído bromado por reacción con trifenilfosina, según se indica en el esquema 1.

30



Esquema 1

Para ello, a una disolución (60 mg, 0.23 mmol) de 4-(4-bromobutoxi)benzaldehído (Gao. T et al. *Org. Dyes Pigments* **2017**, 141, 530) en tolueno (3 mL), se añade, en atmósfera de argón, trifenilfosfina (612 mg, 2.33 mmol) y la mezcla de reacción se agita a 100°C durante 48 h. Finalizado este tiempo, la reacción se lleva a temperatura ambiente y se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando CH₂Cl₂/MeOH (9:1 a 7:3) como eluyente. Se obtiene el aldehído aromático **2** (99 mg, 83%) como un sólido blanco.

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 9.83 (s, 1H, CHO), 7.91-7.71 (m, 17H, 17CH), 7.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2CH), 4.17 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH₂), 3.57-3.48 (m, 2H, CH₂), 2.12-2.03 (m, 2H, CH₂), 1.96-1.86 (m, 2H, CH₂) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD) δ 191.4 (CHO), 164.0 (C), 134.9 (d, ⁴*J*_{CP} = 3.0 Hz, CH), 133.4 (d, ³*J*_{CP} = 9.9 Hz, CH), 131.7 (CH), 130.2 (d, ²*J*_{CP} = 12.5 Hz, CH), 130.1 (C), 119.0 (d, ¹*J*_{CP} = 85.8 Hz, C), 114.6 (CH), 66.6 (CH₂O), 29.2 (CH₂), 20.9 (d, ¹*J*_{CP} = 51.8 Hz, CH₂), 18.8 (d, ²*J*_{CP} = 3.8 Hz CH₂) ppm; FTIR ν 2960, 2833, 1744, 1615, 1465, 1370, 1210, 1003, 771 cm⁻¹; HRMS-EI *m/z* 439.1813 (439.1821 calculado para C₂₉H₂₈O₂P⁺).

Para sintetizar los compuestos Mito-1 y Mito-2, sobre un vial de MW se añade una disolución (50 mg, 0.15 mmol) del compuesto **1** (Fu, L. et al. *Chem. Commun.* **2011**,

47, 5503) en DMF (1 mL), aldehído 2 (82.4 mg, 0.15 mmol), piperidina (0.04 mL, 0.45 mmol) y AcOH (0.03 mL, 0.45 mmol); la mezcla se calienta en un reactor de microondas a 120°C durante 2 h. A continuación, la mezcla se lleva a temperatura ambiente y se adiciona CH₂Cl₂. Se extrae la fase orgánica, se lava con agua y después se seca sobre Na₂SO₄; el desecante se elimina por filtración y el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice utilizando, en primer lugar, hexano/ CH₂Cl₂ (8:2) como eluyente para dar lugar al compuesto Mito-1 (61.6 mg, 52%) como un sólido morado y, en segundo lugar, utilizando CH₂Cl₂/MeOH (95:5) para obtener Mito-2 (18.7 mg, 10%) como un sólido azul.

Mito-1: ¹H RMN (300 MHz, CD₃OD) δ 7.90-7.72 (m, 15H, 15CH), 7.51 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2CH), 7.50 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, CH), 7.34 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H, CH), 7.04 (s, 2H, 2CH), 6.89 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, 2CH), 6.75 (s, 1H, CH), 6.08 (s, 1H, CH), 4.09 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H, CH₂), 3.53-3.44 (m, 2H, CH₂), 2.53 (s, 3H, CH₃), 2.35 (s, 3H, CH₃), 2.09 (s, 6H, 2CH₃), 2.05-1.99 (m, 2H, CH₂), 1.91-1.86 (m, 2H, CH₂), 1.45 (s, 3H, CH₃), 1.41 (s, 3H, CH₃) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD) 159.7 (C), 154.3 (C), 153.2 (C), 142.1 (C), 141.7 (C), 139.9 (C), 139.0 (C), 135.9 (CH), 135.0 (d, ⁴*J*_{CP} = 4.5 Hz, CH), 134.9 (C), 133.4 (d, ³*J*_{CP} = 9.9 Hz, CH), 131.7 (C), 131.1 (C), 130.2 (d, ²*J*_{CP} = 12.4 Hz, CH), 129.6 (C), 128.8 (CH), 128.5 (CH), 120.5 (CH), 118.4 (d, ¹*J*_{CP} = 85.9 Hz, C), 117.0 (CH), 116.6 (CH), 114.7 (CH), 66.2 (CH₂O), 29.3 (CH₂), 20.9 (d, ¹*J*_{CP} = 51.7 Hz, CH₂P), 19.9 (CH₃), 18.9 (d, ²*J*_{CP} = 4.0 Hz, CH₂), 18.2 (CH₃), 13.3 (CH₃), 12.4 (CH₃), 12.2 (CH₃) ppm; FTIR ν 2922, 2855, 1598, 1540, 1438, 1369, 1305, 1252, 1198, 1165, 1114, 1038, 732 cm⁻¹; HRMS-MALDI-TOF *m/z* 787.7612 (787.7620 calculado para C₅₁H₅₁BF₂N₂OP⁺).

Mito-2. ¹H RMN (700 MHz, CD₃OD) δ 7.89-7.87 (m, 6H, 6CH), 7.81-7.78 (m, 12H, 12CH), 7.74-7.73 (m, 12H, 12CH), 7.57-7.56 (m, 6H, 6CH), 7.37 (d, *J* = 16.2 Hz, 2H, 2CH), 7.07 (s, 2H, 2CH), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H, 4CH), 6.80 (s, 2H, 2CH), 4.11 (t, *J* = 5.3 Hz, 4H, 2CH₂), 3.52-3.48 (m, 4H, 2CH₂), 2.37 (s, 3H, CH₃), 2.12 (s, 6H, 2CH₃), 2.06-2.03 (m, 4H, 2CH₂), 1.90-1.87 (m, 4H, 2CH₂), 1.48 (s, 6H, 2CH₃) ppm; ¹³C RMN (176 MHz, CD₃OD) δ 159.7 (C), 152.6 (C), 141.3 (C), 139.1 (C), 137.9 (C), 135.6 (CH), 135.2 (C), 134.9 (d, ⁴*J*_{CP} = 2.8 Hz, CH), 133.4 (d, ³*J*_{CP} = 10.0 Hz, CH), 132.1 (C), 131.2 (C), 130.2 (d, ²*J*_{CP} = 13.0 Hz, CH), 129.7 (C), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 118.4 (d, ¹*J*_{CP} = 86.6 Hz, C), 117.1 (CH), 116.6 (CH), 114.7 (CH), 66.1 (CH₂O), 29.3 (CH₂), 20.8 (d, ¹*J*_{CP} = 51.7 Hz, CH₂), 19.9 (CH₃), 18.9 (d, ²*J*_{CP} = 3.7 Hz, CH₂), 18.3 (CH₃), 12.4 (CH₃) ppm; FTIR ν 2923, 2854, 1597, 1536, 1487, 1438, 1368, 1303, 1250, 1200,

1164, 1111, 990, 730 cm^{-1} ; HRMS-MALDI-TOF m/z 1209.2604 (1209.2612 calculado para $\text{C}_{80}\text{H}_{77}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{P}_{22}^+$).

Ejemplo 2.

5 Evaluación de los compuestos Mito-1 y Mito-2 como marcadores fluorescentes de mitocondrias.

Los ensayos celulares se llevan a cabo en células de HeLa (ATCC, CCL-2) que proceden de cáncer de cuello uterino. Las células se cultivan en monocapa en medio de Eagle modificado por DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) complementado con suero bovino fetal al 10% (v/v), 50 U/mL de penicilina y 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin. Todos los productos se esterilizan por medio de filtros de 0.22 μm . Las células se mantienen en un incubador en una atmósfera con un 5% de CO_2 , a una temperatura de 37°C y con una humedad del 95%, Para la realización de los experimentos, las células se crecen sobre cubreobjetos de cristal en placas de 24 pocillos. Cuando las células alcanzan un nivel de confluencia de, aproximadamente, el 50%, el medio de cultivo se sustituye por disoluciones de los compuestos Mito-1 y Mito-2, (2.5 μM) en medio de cultivo y se incuban 3 h en el incubador. A continuación, se lavan las células con PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) estéril y se coloca el cubreobjetos (aún húmedo) sobre un portaobjetos. Esta preparación se observa inmediatamente en el microscopio de fluorescencia automatizado (*Olympus BX63* equipado con una fuente de luz pE-300 y una cámara digital *Olympus DP74*). Células del mismo tipo y bajo las mismas condiciones experimentales se incuban adicionalmente con el marcador *MitoTracker™ Green FM*, según las instrucciones del fabricante, para realizar estudios comparativos con los nuevos marcadores fluorescentes aquí descritos.

La Figura 1 muestra el comportamiento de Mito-1 y Mito-2 como marcadores fluorescentes de mitocondrias en células HeLa. Se presentan los resultados obtenidos para estas nuevas sondas usadas en concentración de 2.5 μM durante un tiempo de incubación de 3 h. Con ambos compuestos se observa un marcaje mitocondrial muy específico y de elevada intensidad de fluorescencia.

Debido a que Mito-1 y Mito-2 emiten tanto en rojo como en verde, no se pueden hacer estudios de co-localización con *MitoTracker™ Green FM*, pero se puede comprobar que el patrón los patrones de distribución son en ambos casos muy similares.

5 **Ejemplo 2.**

Evaluación de los compuestos Mito-1 y Mito-2 como agentes fotocitotóxicos eficientes por acumulación en mitocondrias.

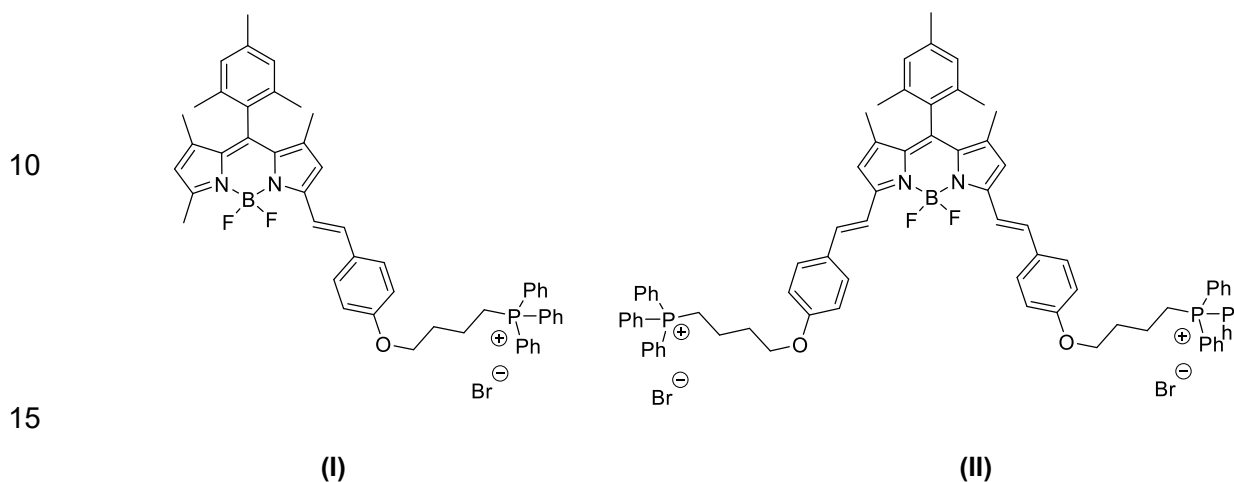
Para la evaluación se utilizan células HeLa. Las células se siembran en placas de 24 pocillos y se incuban con distintas concentraciones de los compuestos seleccionados (1, 2.5, 5, 7.5 y 10 μM), diluidos en medio de cultivo. Tras 3 h de incubación las células se lavan tres veces con medio de cultivo y se irradian con una lámpara LED *Par 64 Short* (Showtec, Burgebrach, Holanda) con una dosis de luz de 10.3 J/cm^2 y una longitud de onda de $518 \pm 10 \text{ nm}$. Tras la irradiación, las células se mantienen en el incubador durante 24 h, y se evalúa la supervivencia celular mediante el ensayo de citotoxicidad del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) Para ello, las células se incuban durante 3 h con una solución 50 $\mu\text{g/mL}$ de MTT. Transcurrido este tiempo, se retira el medio de cultivo y se añade dimetilsulfóxido para solubilizar el formazán formado por la reducción del MTT. Se mide la absorbancia de cada pocillo a 542 nm y se obtiene el porcentaje de supervivencia celular de cada pocillo respecto a la viabilidad de las células control (considerada el 100%). Los resultados se expresan como la media de la viabilidad celular de los pocillos de cada condición $\pm$ su desviación típica. En paralelo, se realizan los mismos experimentos en ausencia de irradiación para evaluar la toxicidad de los compuestos en oscuridad.

En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos para Mito-1. Se observa, en los resultados del ensayo MTT, que esta sonda mitocondrial presenta una elevada fototoxicidad, induciendo un progresivo aumento de la muerte celular en función de su concentración en el medio, alcanzando prácticamente un 100% de muerte celular a una concentración de 5 μM a las 24 h del tratamiento. Sin embargo, en ausencia de irradiación la toxicidad de la sonda en ningún caso supera el 40% de muerte celular.

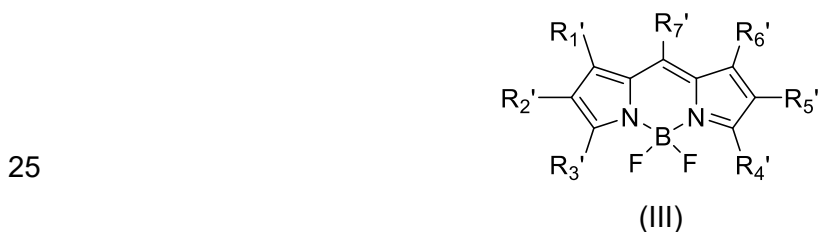
En la Figura 3 se muestra la morfología de las células tras 3 y 24 h desde la irradiación con Mito-1 (5 μM). Como puede observarse, tras la irradiación las células comienzan a retraerse y se observa la característica morfología “globular” de la membrana celular, típica de la muerte celular en apoptosis.

REIVINDICACIONES

1. Compuestos que contienen en su estructura una unidad de *F*-BODIPY π -extendida por la acción de uno o varios grupos 2-arilietenilo que, a su vez, portan un resto polar basado en alquil(trifenil)fosfonio, de fórmula (I) y (II)



2. Procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (I) y (II) que comprende una reacción de tipo Knoevenagel entre un compuesto de fórmula (III) y un aldehído aromático,



donde R_4' (y/o R_3') es metilo y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final.

3. Procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (I) y (II), según reivindicación 2, donde el aldehído aromático es bromuro de(4-(4-formilfenoxi)butil)(trifenil)fosfonio.

4. Procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (I) y (II), según

- reivindicación 3, donde la reacción está catalizada por un ácido, preferiblemente seleccionado entre el grupo formado por ácido fórmico, AcOH y ácido propanoico; o por una base, preferiblemente seleccionada entre el grupo formado por trimetilamina, etil(diisopropil)amina, piperidina, pirrolidina y morfolina; o por una mezcla de ácido y base. Preferiblemente, el catalizador es una mezcla formada por piperidina y AcOH.
- 5
5. Procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (I) y (II), según reivindicación 4, donde la reacción se lleva a cabo en un disolvente orgánico compatible con dicha reacción de condensación a una temperatura comprendida entre 20 y 140°C.
- 10
6. Procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (I) y (II), según reivindicación 4, donde la reacción se lleva a cabo en DMF como disolvente a 120°C, bajo irradiación de microondas y en atmósfera inerte.
- 15
7. Marcador (sonda) fluorescente que comprende, al menos, un compuesto según reivindicación 1.
- 20
8. Marcador (sonda) fluorescente, según reivindicación 7, donde el marcaje es celular.
9. Marcador (sonda) fluorescente, según reivindicación 8, donde el marcaje celular se realiza en mitocondrias.
- 25
10. Marcador (sonda) fluorescente, según reivindicación 9, donde el marcaje se realiza en células vivas.
11. Marcador (sonda) fluorescente, según reivindicación 7, para su uso en la obtención de imágenes en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con anomalías en mitocondrias.
- 30
12. Agente fotocitotóxico que comprende, al menos, un compuesto según reivindicación 1.
- 35
13. Agente fotocitotóxico, según reivindicación 12, para su uso en tratamientos basados en terapia fotodinámica de células humanas.

14. Uso, según reivindicación 13, donde las células humanas son células de naturaleza cancerosa.
- 5 15. Agente fototeragnóstico basado en marcaje fluorescente mitocondrial y terapia fotodinámica, caracterizado porque comprende, al menos, un compuesto según reivindicación 1.
- 10 16. Método estratégico para potenciar la eficiencia fluorescente y fotocitotóxica en agentes fototeragnósticos, consistente en su acumulación, según reivindicación 15, en mitocondrias.

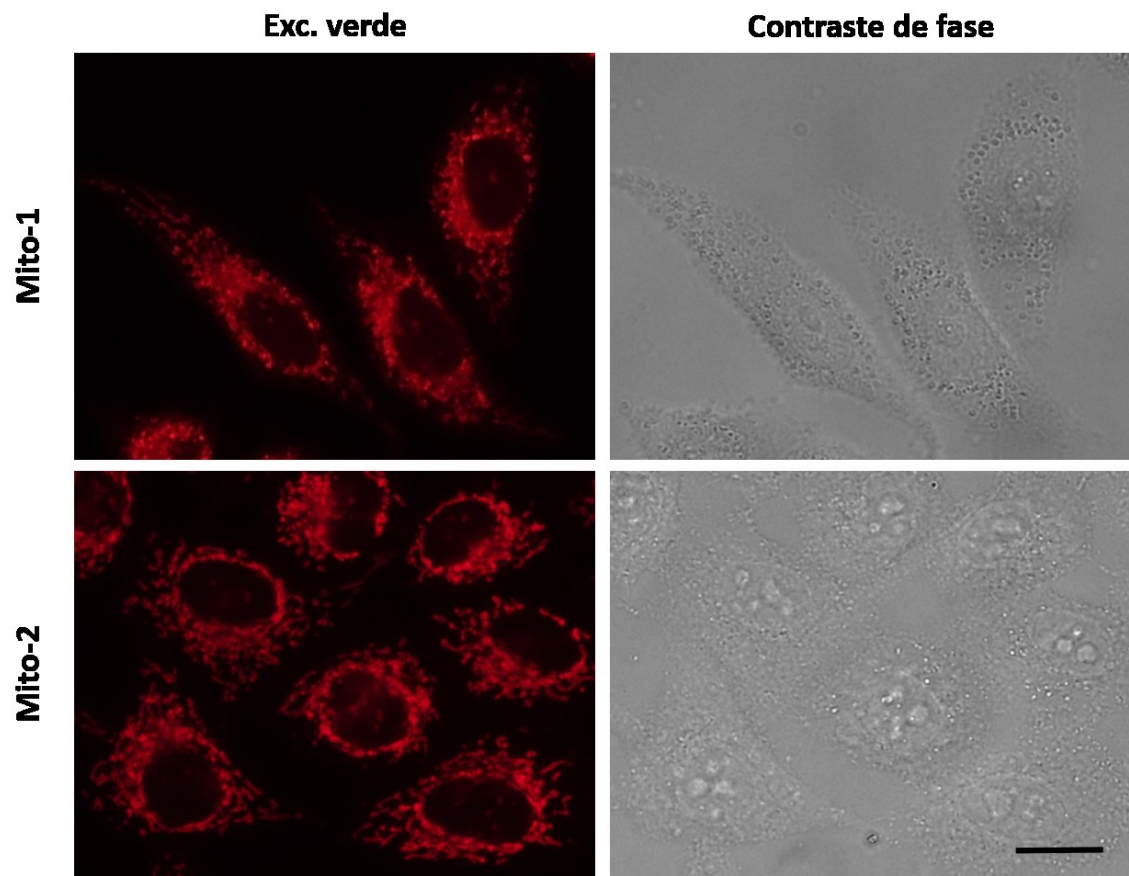


Fig. 1

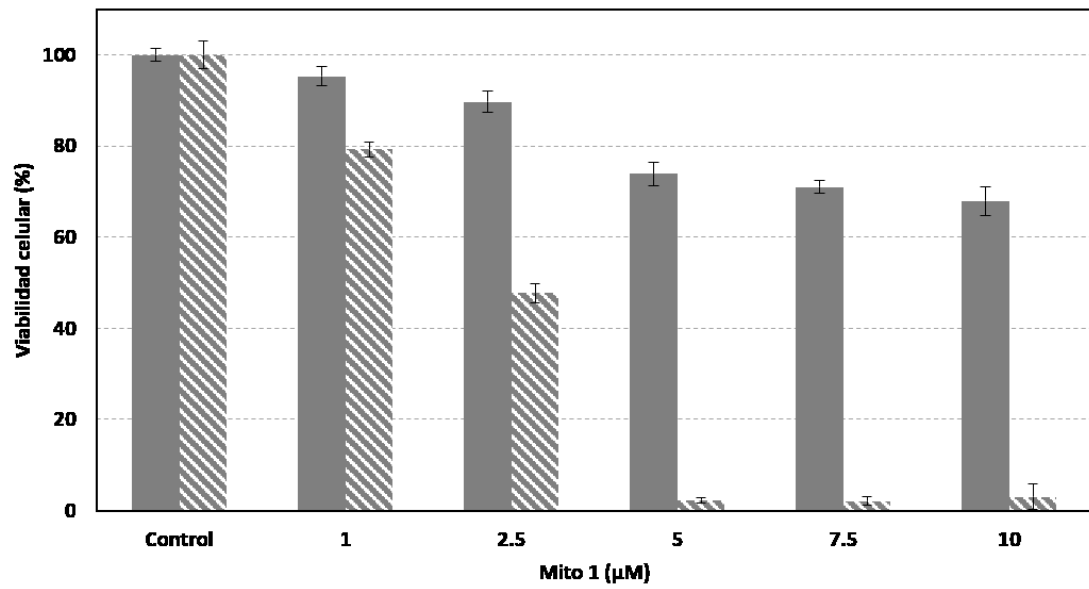


Fig. 2

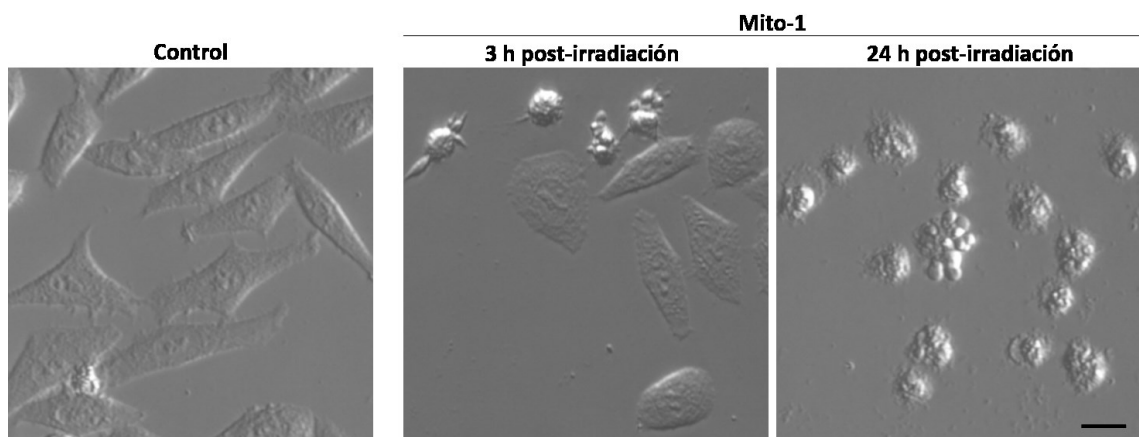


Fig.3



- ②① N.º solicitud: 202030600
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.06.2020
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YANG, J. et al. Synthesis, spectroscopic characterization, one and two-photon absorption properties and electrochemistry of π -expanded BODIPYs dyes. Dyes and Pigments, 27/12/2019, Vol. 175, Páginas 2-8. esquema 1, compuestos 2 a-d y 3 a-d	1-16
A	YANG, J. et al. Synthesis, spectroscopic characterization, one and two-photon absorption properties, and electrochemistry of truxene π -expanded BODIPYs dyes,. Dyes and Pigments, 07/01/2020, Vol. 176, Páginas 1-7. esquema 1, compuestos 7 a-d y 8 a-d	1-16
A	ES 2719000 A1 (UNIV MADRID COMPLUTENSE et al.) 05/07/2019, página 8, compuestos 1-8 reivindicaciones	1-16
A	WANG SISI et al. A BODIPY-based 'turn-on'; fluorescent probe for hypoxic cell imaging.. Chemical communications (Cambridge, England) England 07 Sep 2015. 07/09/2015, Vol. 51, Páginas 13389 - 13392, ISSN 1364-548X (Electronic), <DOI: doi:10.1039/c5cc05139h pubmed:26207944>. esquema 2	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
13.12.2020

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07F5/02 (2006.01)**C09B57/00** (2006.01)**C09K11/07** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07F, C09B, C09K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, PATENW, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS