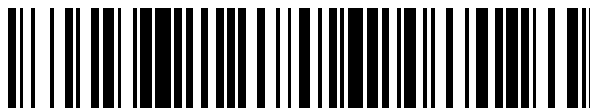


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 011 263**

21 Número de solicitud: 202330836

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C07D 209/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.10.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

07.04.2025

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA (100.00%)

Avenida Cervantes, 2

29071 Málaga (Málaga) ES

72 Inventor/es:

BENÍTEZ MARTÍN, Carlos;

MARÍN BELOQUI, José Manuel;

CASADO CORDÓN, Juan;

NÁJERA ALBENDÍN, Francisco y

PÉREZ-INESTROSA VILLATORO, Ezequiel

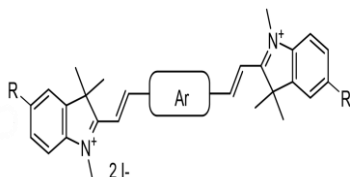
74 Agente/Representante:

PADIMA TEAM, S.L.P.

54 Título: **Compuestos fluorescentes basados en bisestirilindolios simétricos con propiedades de absorción de dos fotones, procedimiento de preparación de dichos compuestos y procedimiento y uso como identificadores de mitocondrias**

57 Resumen:

La presente invención preconiza unos compuestos fluorescentes basados en bisestirilindolios simétricos con propiedades de absorción de dos fotones de fórmula general (3):



(3)

En la que R = H, Me, MeO, CN, CO₂H, Cl, Br, I, NO₂; y el grupo arilo (Ar) es un difenilo, trifenilo, naftaleno, antraceno, tiofeno, ditiofeno, furano, pirrol. También es objeto de la presente invención las formulaciones de los productos de fórmula general (3) aceptables para ser usados como identificadores de mitocondrias en células vivas, preferentemente, aplicando una excitación bifotónica con una longitud de onda entre 700 y 850 nm; así como el procedimiento de preparación de dicho compuesto.

ES 3 011 263 A1

DESCRIPCIÓN

Compuestos fluorescentes basados en bisestirilindolios simétricos con propiedades de absorción de dos fotones, procedimiento de preparación de dichos compuestos y procedimiento y uso como identificadores de mitocondrias

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención refiere la síntesis de compuestos fluorescentes simétricos basados en cromóforos del tipo bisestirilindolio. Estos compuestos tienen la capacidad de absorber dos fotones, con la particularidad de que las moléculas sintetizadas puedan aplicarse en el área de la bioimagen ya que reconocen específicamente a las mitocondrias en células vivas.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Las mitocondrias son los orgánulos subcelulares encargados de gestionar el suministro de energía a la célula. Dentro de las mitocondrias se genera trifosfato de adenosina (ATP), mediante la acción de diversas bombas de protones para eliminar el exceso de protones que se produce en este proceso. Por ello, la doble membrana que rodea a estos orgánulos está polarizada, presentando un potencial de membrana mitocondrial alrededor de 180 mV. Este potencial de membrana facilita el paso de moléculas cargadas permitiendo la acumulación selectiva de especies con carga positiva dentro de las mitocondrias. Además, las mitocondrias son una de las fuentes más importantes de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel celular. Esta función implica que las mitocondrias puedan sufrir un daño oxidativo gradual que, a menudo, se asocia con el envejecimiento, el cáncer y enfermedades neurodegenerativas. El poder acceder a métodos fáciles y rápidos que permitan marcar y visualizar selectivamente a las mitocondrias con compuestos fluorescentes permite el estudio de su morfología y monitorizar su evolución en células, tejidos y órganos.

La introducción de la microscopía de fluorescencia de dos fotones (2PM) en los años 90 supone un punto de inflexión en el campo de la bioimagen. Una de las principales ventajas de los procesos de absorción de dos fotones es la oportunidad de excitar a longitudes de onda dentro de las ventanas biológicas. La relativa transparencia de los tejidos a estas longitudes de onda asegura poder obtener imágenes de tejidos entre 500 y 1000 μm , que es una profundidad considerablemente mayor que la alcanzada en microscopía confocal

(aproximadamente menos de 100 μm). Tanto si el propósito es obtener información sobre estructuras y/o procesos biológicos como si se pretende estudiar procesos fotoinducidos en un entorno determinado, la 2PM se establece definitivamente como una herramienta extremadamente útil. El uso de longitudes de onda de excitación en el infrarrojo cercano (NIR) no sólo permite la obtención de imágenes a mayor profundidad, sino que a su vez facilita el seguimiento in vivo de procesos biológicos debido a la baja fototoxicidad de la luz empleada, siendo por tanto estas razones las que justifican la creciente importancia de la 2PM en las tareas de bioimagen.

En la mayoría de los casos, los encargados de este cometido son fluoróforos de naturaleza orgánica y con estructuras generalmente pequeñas. Aunque en un principio los compuestos usados fueron los que tradicionalmente habían sido empleados en microscopía convencional de excitación de un fotón, dadas las características de la 2PM y su potencial, surgieron estudios sobre el desarrollo de nuevos fluoróforos específicos para su aplicación en 2PM, y con ello a su vez, guías de diseño para nuevos compuestos con estas particularidades. El diseño de estos compuestos, en esencia, se basa en la teoría del proceso de absorción de dos fotones y en concreto, en la aproximación dipolar a la misma. De este modo, los compuestos que tradicionalmente se han erigido como más efectivos para la absorción de dos fotones son aquellos que presentan estructuras simétricas que combinan distintos grupos dadores y aceptores de electrones a través de diversos sistemas conjugados, existiendo por tanto múltiples posibles combinaciones (por ejemplo, D- π -D, A- π -A, D-A-D, A-D-A, D- π -A- π -D, A- π -D- π -A, etc.). En términos generales, estos nuevos fluoróforos especialmente concebidos para la bioimagen 2P pueden clasificarse en dos categorías: 1) fluoróforos 2P pensados para marcar compartimentos subcelulares y 2) fluoróforos 2P pensados para monitorizar procesos subcelulares o especies químicas dentro de las células.

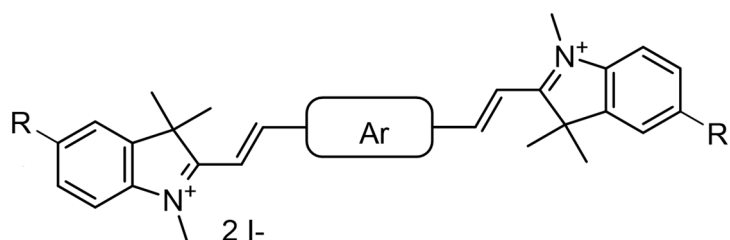
Por estas razones, el desarrollo de nuevos compuestos fluorescentes con capacidad de absorber dos fotones que permitan el marcaje de forma específica, sensible y rápida de mitocondrias supone un importante avance en el campo de la bioimagen.

Por todo lo anterior, el solicitante de la presente patente detecta la necesidad de desarrollar nuevos compuestos fluorescentes con capacidad de absorber dos fotones que permitan el marcaje de forma específica, sensible y rápida de mitocondrias, lo cual sería un importante avance en el campo de la bioimagen.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención propone compuestos fluorescentes que resuelven la problemática anteriormente detallada y que tienen la propiedad de absorber dos fotones y son capaces de marcar selectivamente las mitocondrias en células vivas, actuando por tanto como identificadores y permitiendo la monitorización de las mitocondrias identificadas por los compuestos de la fórmula general de la invención.

Así, las moléculas fluorescentes simétricas sintetizadas en esta invención y con propiedades de absorción de dos fotones son los compuestos de fórmula general **(3)**

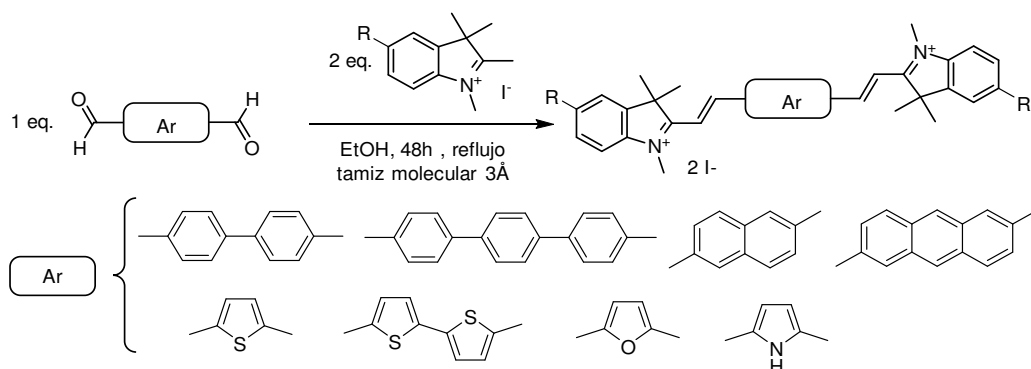
**(3)**

Donde:

R = H, Me, MeO, CN, CO₂H, Cl, Br, I, NO₂;

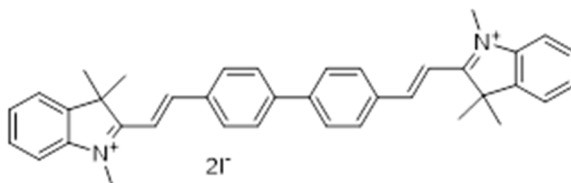
y el grupo arilo (denominado "Ar") puede ser difenilo, trifenilo, naftaleno, antraceno, tiofeno, ditionfeno, furano, pirrol;

Estos compuestos se preparan mediante las reacciones que se recogen en el siguiente esquema (en el ejemplo 1 detallado en el apartado de "exposición detallada de realizaciones preferentes de la invención" se recogen las condiciones para la síntesis de cada uno de los compuestos):



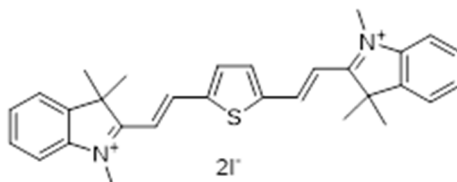
De forma general, el centro de estas moléculas, que actuará como dador de electrones, denominado Ar, debe ser un di-aldehído aromático, donde Ar = difenilo, trifenilo, naftaleno, antraceno, tiofeno, ditiófeno, furano, pirrol, y en cada uno de los extremos deben tener una unidad aceptora de electrones que será un indolio que podrá estar sustituido con R = H, Me, MeO, CN, CO₂H, Cl, Br, I, NO₂.

A título de ejemplo, cuando el grupo arilo es un difenilo, la formula estructural del compuesto (3) corresponde al compuesto A representado a continuación:



Compuesto A

Por otro lado, cuando el grupo arilo es un tiofeno, la formula estructural del compuesto (3) corresponde al compuesto B representado seguidamente:



Compuesto B

Esta invención presenta las ventajas siguientes:

- Permiten obtener imágenes de dos fotones de las mitocondrias presentes en células vivas

5 Cuando se emplea la longitud de onda de 720 nm empleando una excitación bifotónica, los compuestos de la presente invención muestran una fuerte señal de fluorescencia a nivel intracelular. Esto permite obtener imágenes de dos fotones.

- Síntesis sencilla y buena aplicabilidad

10 Los compuestos fluorescentes sintetizados en la presente invención permiten visualizar las mitocondrias y tienen la propiedad de obtener imágenes de dos fotones, altamente selectiva.

- Presentan aplicaciones en la obtención de imágenes biológicas:

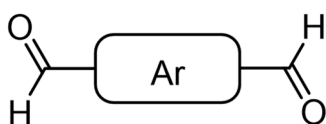
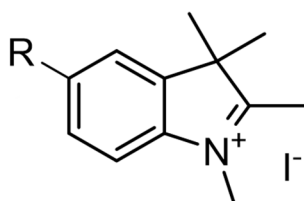
15 Los compuestos sintetizados reconocen y marcan fluorescentemente a las mitocondrias en células vivas y tienen la propiedad de absorber dos fotones permitiendo obtener imágenes intracelulares de estos orgánulos subcelulares. Esto permite aplicarlos en la obtención de imágenes biológicas y que se puedan añadir al campo de los biomarcadores fluorescentes. Estos compuestos tienen un valor de aplicación potencial para añadirse a los marcadores comerciales de mitocondrias con la posibilidad de poder obtener imágenes utilizando la microscopía de dos fotones, lo que permitirá abrir una nueva dirección en el desarrollo de
20 nuevos marcadores fluorescentes con aplicaciones biológicas.

Cabe señalar que también es objeto de la presente invención el procedimiento de marcado e identificación de mitocondrias de células vivas empleando los compuestos de fórmula (3), de forma que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas de:

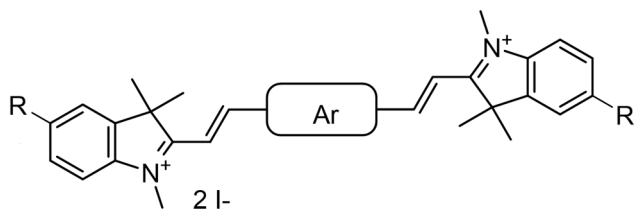
- 25
- Cultivo o tratamiento de las células vivas durante al menos 4 horas con una disolución que contiene los compuestos de fórmula (3).
 - Excitación bifotónica con una longitud de onda entre 700 y 850 nm.
 - Registro de imágenes de fluorescencia empleando un microscopio de fluorescencia
30 acoplado a un láser multifotónico donde se observan las mitocondrias marcadas.

Finalmente, se detalla seguidamente el procedimiento de preparación de compuestos de fórmula (3) el cual está formado por las siguientes etapas:

- 5
- condensación de tipo Knoevenagel entre dicarboxaldehídos aromáticos **(1)** y yoduro de 1,2,3,3-tetrametil-3H-indolinio **(2)** empleando etanol como disolvente y añadiendo tamiz molecular de 3Å a la reacción. De forma preferente, dicha condensación se realiza en presencia de un reflujo de etanol durante un tiempo de entre 24 h y 36 h.

**(1)****(2)**

- 10
- Adición de metanol para disolver el sólido resultante en la etapa anterior, obteniendo una disolución homogénea junto con el tamiz molecular,
 - 15 - Filtración sobre una capa de celita para separar el tamiz molecular, obteniendo la disolución homogénea,
 - Concentración a vacío de la disolución homogénea,
 - Lavado con éter dietílico y acetato de etilo, obteniéndose un compuesto fluorescente basado en bisestirilindolios simétricos con propiedades de absorción de dos fotones de fórmula general **(3)**.
- 20

**(3)**

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la explicación de la invención y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la misma, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un conjunto de imágenes donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La Figura 1 muestra un gráfico con el resultado de los espectros normalizados de absorción y fluorescencia del compuesto A y el compuesto B - ejemplos de realización preferente de la invención - a concentración 10 μM en acetonitrilo, donde en el eje de abscisas se ha representado la longitud de onda en nm y en el eje de ordenadas la absorbancia o I_f

La Figura 2 muestra un gráfico donde se observa la dependencia de la *cross-section* del compuesto A y del compuesto B con la longitud de onda, donde en el eje de abscisas se ha representado la longitud de onda en nm y en el eje de ordenadas $\sigma_{2\text{PA}}$ (GM).

La Figura 3 muestra un gráfico donde se observa la dependencia del logaritmo de la Intensidad de fluorescencia I_f , eje ordenadas, con el logaritmo de la potencia del láser, eje abscisas, para los compuestos A y B.

La Figura 4 muestra una imagen de la fluorescencia que se observa después de 4 horas de incubación del compuesto A con células HeLa.

La Figura 5 muestra una imagen de la fluorescencia que se observa después de 4 horas de incubación del compuesto B con células HeLa.

La Figura 6A representa la imagen de fluorescencia del compuesto A incubado con células HeLa, mientras que la figura 6A' representa la imagen de fluorescencia del marcador comercial MitoTracker™ Red.

La Figura 7B representa la imagen de fluorescencia del compuesto B incubado con células HeLa, mientras que la figura 7B' representa la imagen de fluorescencia del marcador comercial MitoTracker™ Green.

EXPOSICION DETALLADA DE REALIZACIONES PREFERENTES DE LA INVENCION

Los siguientes ejemplos servirán para detallar el proceso de síntesis de dos realizaciones preferentes de la invención (compuestos A y B) [ejemplo 1], la verificación de su comportamiento en condiciones de excitación de un fotón [ejemplo 2], y la verificación de su comportamiento en condiciones de excitación de dos fotones [ejemplo 3].

También en el presente apartado se muestran los resultados del ensayo por el que se introducen los compuestos A y B dentro de células vivas [ejemplo 4], y finalmente el ensayo para verificar que los compuestos A y B marcan mitocondrias [ejemplo 5].

Las moléculas sintetizadas en el ejemplo 1 se han caracterizado por Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbono además de por espectrometría de masas de alta resolución. Todas ellas han mostrado poseer buenas propiedades fotofísicas cuando se excitan en condiciones de trabajo de un fotón (ver figura 1 que corresponde al resultado obtenido en el ejemplo 2). También han mostrado tener valores de *cross-section* elevados cuando se las irradia con dos fotones, es decir que ofrece buenas propiedades de absorción de dos fotones, tal como se ilustra en las figuras 2 y 3 que corresponden a resultado del ejemplo 3.

Estos compuestos se han aplicado para detectar mitocondrias en células vivas, permitiendo obtener imágenes de fluorescencia de estos orgánulos celulares empleando la microscopía de fluorescencia bifotónica obteniendo los resultados del ejemplo 4 representados en las figuras 4 y 5 para los compuestos A y B, respectivamente, los cuales son similares o superiores a los marcadores comerciales MitoTracker™ Red, en adelante MTR, y MitoTracker™ Green, en adelante MTG, que necesitan ser irradiados en régimen de un fotón.

Al mismo tiempo se han llevado a cabo experimentos de colocalización con respecto de los marcadores MTR y MTG demostrándose así la habilidad de reconocimiento de mitocondrias por parte de los compuestos A y B, tal como queda ilustrado en los resultados obtenidos del ejemplo 5 y que están representados en las figuras 6 y 7 para el compuesto A y B, respectivamente.

Los experimentos de colocalización han confirmado que se pueden obtener imágenes de las mitocondrias en células vivas empleando los compuestos A y B excitando a una longitud de onda de 720 nm. La señal de fluorescencia obtenida con estos compuestos cuando han sido

irradiados con dos fotones ha sido fuerte y estable. Esto indica que estos compuestos A y B tienen la propiedad de poder realizar imágenes de dos fotones lo que conlleva reducir en gran medida el daño que puedan sufrir las células estudiadas, eliminar interferencias y las señales correspondientes a la autofluorescencia celular, además de aumentar la resolución de las imágenes obtenidas.

Esta invención presenta las ventajas siguientes:

- Permiten obtener imágenes de dos fotones de las mitocondrias presentes en células vivas

Cuando se emplea la longitud de onda de 720 nm empleando una excitación bifotónica, los compuestos muestran una fuerte señal de fluorescencia a nivel intracelular. Esto permite obtener imágenes de dos fotones.

- Síntesis sencilla y buena aplicabilidad

Los compuestos A y B son un nuevo tipo de moléculas simétricas fluorescentes con capacidad de absorber dos fotones de forma altamente selectiva. Estos compuestos tienen una ruta de síntesis sencilla y son de fácil aplicación a las células, no necesitando de co-disolventes orgánicos para ser solubilizados en agua. Es decir, se pueden incubar directamente con las células. Los compuestos A y B se localizan en las mitocondrias frente a los marcadores comerciales MTR y MTG con un coeficiente de colocalización de Pearson entre 0.8 y 0.9, lo que permite la detección eficaz de las mitocondrias.

- Los compuestos A y B tienen aplicaciones en la obtención de imágenes biológicas

Los compuestos fluorescentes A y B basados en compuestos derivados de moléculas simétricas derivadas de bisestirilindolios, permiten reconocer mitocondrias en células vivas y tienen la propiedad de absorber dos fotones permitiendo obtener imágenes intracelulares de estos orgánulos subcelulares.

Ejemplo 1: Procedimiento general para la síntesis de los compuestos A y B

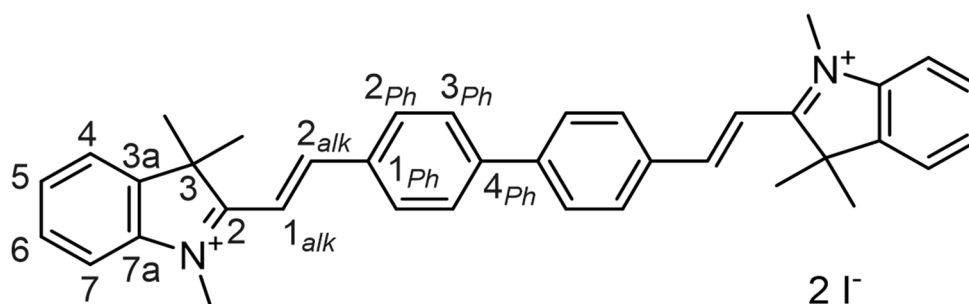
Los derivados de bis(indolinio) (1-2) se prepararon mediante una condensación de tipo Knoevenagel entre dicarboxaldehídos aromáticos comerciales (1 eq.) y yoduro de 1,2,3,3-

tetrametil-3H-indolinio (2 eq.) empleando etanol como disolvente y añadiendo tamiz molecular de 3Å a la reacción. Una vez completada la reacción, se añadió metanol para disolver completamente el sólido resultante, obteniendo una disolución homogénea.

- 5 A continuación, se filtró el tamiz molecular junto con la disolución homogénea sobre una capa o filtro de Celita. De forma que sobre la capa de celita queda retenido el tamiz molecular y la disolución homogénea ha pasado a través de la citada capa de celita.

Finalmente, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo obtenido se lavó con éter dietílico y acetato de etilo para obtener el producto deseado.

Síntesis del compuesto A: En un tubo de 20 mL, se disolvieron 4,4'-bifenildicarboxaldehído (100 mg, 0,48 mmol) y yoduro de 1,2,3,3-tetrametil-3H-indolinio (289 mg, 0,96 mmol) en etanol (10 mL). A continuación, se añadió tamiz molecular de 3Å. El tubo se selló y la mezcla se calentó a reflujo durante 48 h. Una vez completada la reacción, el crudo se trató como se indica en el procedimiento general. El compuesto A se obtuvo como un sólido rojo (30 mg, 8% de rendimiento).



Compuesto A

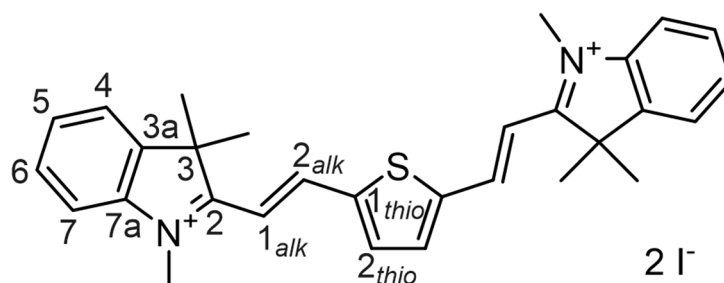
A continuación se muestra la descripción del compuesto A en base a las distintas técnicas espectroscópicas y espectrometría de masa de alta resolución:

RMN-¹H (400 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 8.50 (d, *J* = 16.4 Hz, 2H, *H*_{2alk}), 8.38 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, *H*_{2Ph}), 8.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, *H*_{3Ph}), 7.98-7.93 (m, 2H, *H*₇), 7.93-7.90 (m, 2H, *H*₄), 7.81 (d, *J* = 16.4 Hz, 2H, *H*_{1alk}), 7.70-7.64 (m, 4H, *H*₅ & *H*₆), 4.21 (s, 6H, *NCH*₃), 1.84 (s, 12H, *C(CH*₃)₂).

RMN-¹³C (101 MHz, (CD₃)₂SO, δ ppm): 182.2 (*C*₂), 152.4 (*C*_{2alk}), 144.2 (*C*_{3a}), 143.1 (*C*_{4Ph}), 142.3 (*C*_{7a}), 135.1 (*C*_{1Ph}), 131.7 (*C*_{2Ph}), 130.1 (*C*₅), 129.5 (*C*₆), 128.1 (*C*_{3Ph}), 123.4 (*C*₄), 115.8 (*C*₇), 114.1 (*C*_{1alk}), 52.8 (*C(CH*₃)₂), 35.1 (*NCH*₃), 25.7 (*C(CH*₃)₂).

HRMS (ESI): masa calculada para $C_{38}H_{38}N_2$ (M^{2+}): 261.1512, encontrada: 261.1516.

Síntesis del compuesto B: En un tubo de 20 mL se disolvieron 2,5-tiofenicarboxaldehído (100 mg, 0,71 mmol) y yoduro de 1,2,3,3-tetrametil-3H-indolinio (428 mg, 1,42 mmol) en etanol (10 mL). A continuación, se añadió tamiz molecular de 3 Å. El tubo se selló y la mezcla se calentó a reflujo durante 48 h. Una vez completada la reacción, el crudo se trató como se indica en el procedimiento general. El compuesto B se obtuvo como un sólido rojo (181 mg, 36% de rendimiento).



Compuesto B

A continuación se muestra la descripción del compuesto B en base a las distintas técnicas espectroscópicas y espectrometría de masa de alta resolución:

RMN- 1H (400 MHz, $(CD_3)_2SO$, δ ppm): 8.69 (d, $J = 16.1$ Hz, 2H, H_{2alk}), 8.34 (s, 2H, H_{2thio}), 7.99-7.93 (m, 2H, H_7), 7.93-7.88 (m, 2H, H_4), 7.71-7.64 (m, 4H, H_5 & H_6), 7.52 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H_{1alk}), 4.16 (s, 6H, NCH_3), 1.81 (s, 12H, $C(CH_3)_2$).

RMN- ^{13}C (101 MHz, $(CD_3)_2SO$, δ ppm): 181.2 (C_2), 147.3 (C_{1thio}), 144.3 (C_{3a}), 143.8 (C_{2alk}), 142.3 (C_{7a}), 137.1 (C_{2thio}), 130.3 (C_5), 129.6 (C_6), 123.4 (C_4), 115.9 (C_7), 114.8 (C_{1alk}), 52.7 ($C(CH_3)_2$), 35.1 (NCH_3), 25.6 ($C(CH_3)_2$).

HRMS (ESI): masa calculada para $C_{30}H_{32}N_2S_1$ (M^{2+}): 226.1138, encontrada: 226.1141.

Ejemplo 2: verificación del comportamiento de los compuestos A y B en condiciones de excitación de un fotón.

Los compuestos A y B han presentado los espectros de absorción y fluorescencia que se muestran en la Figura 1 y cuyos datos fotofísicos se encuentran en la Tabla 1.

Estos espectros se han realizado empleando acetonitrilo como disolvente y a una concentración 10 μM en disoluciones con presencia de oxígeno. Se emplearon cubetas de cuarzo de 1 cm longitud de paso. Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (ϕ) se determinaron por comparación con el violeta de cresilo ($\phi_f = 0.56$, en etanol).

5

Tabla 1. Datos fotofísicos de los compuestos **A** y **B** (10 μM en acetonitrilo).

Compuesto	$\lambda_{\text{abs}} \text{ (nm)}^{[a]}$	$\lambda_{\text{em}} \text{ (nm)}^{[b]}$	$\phi^{[c]}$
	$[\epsilon \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1})]$		
A	434 [59900]	539	0.004
B	509 [45000]	561	0.003

^[a]Longitud de onda máxima de absorción. ^[b]Longitud de onda máxima de fluorescencia.

^[c]Rendimiento cuántico de fluorescencia.

10 La figura 1 corresponde a los espectros normalizados de absorción y fluorescencia del compuesto A y el compuesto B a concentración 10 μM en acetonitrilo.

Concretamente, en la figura 1 se representa en el eje de abscisas la longitud de onda (expresada en nm), mientras que en el eje de ordenadas se representan los datos obtenidos del espectro de absorción y fluorescencia (I_f). Es decir, en la figura 1 se recogen los datos representados para el compuesto A, y los datos que corresponden al compuesto B.

15

Este ejemplo nos permite predecir que los compuestos A y B podrán absorber 2 fotones de longitudes de onda por encima de 700 nm y también aseguran que se podrá seguir o monitorizar su distribución celular midiendo la fluorescencia que emiten entre 530-570 nm.

20

Ejemplo 3: verificación del comportamiento de los compuestos A y B en condiciones de excitación de dos fotones.

25 El comportamiento de los compuestos A y B bajo condiciones de excitación de dos fotones se representa en las Figuras 2 y 3 y la Tabla 2.

Tabla 2. Comportamiento fotofísico de los compuestos A y B bajo excitación de dos fotones (a concentración de 10 μM en acetonitrilo).

Compuesto	λ_{em} (nm) ^[a]	$\sigma_{2\text{PA}}$ (GM) ^[b]
		$[\lambda_{\text{abs},2\text{P}}$ (nm)]
A	539	248 [700], 30 [890]
B	561	510 [700], 48 [890]

^[a] Longitud de onda máxima de fluorescencia.

5 ^[b] *Cross-section* obtenidas en condiciones de excitación de dos fotones

La figura 2 representa la dependencia de la *cross-section* del compuesto A y del compuesto B con la longitud de onda.

10 Concretamente, en la figura 2 se representa en el eje de abscisas la longitud de onda (expresada en nm), mientras que en el eje de ordenadas se representan los datos obtenidos del *Cross-section* ($\sigma_{2\text{PA}}$) para cada compuesto A y B, y expresados en GM.

15 Los compuestos A y B presentan *cross-sections* con valores superiores a 100 GM entre 710 y 730 nm (Figura 2), y también presentan valores de *cross-section* suficientemente altos hasta 850 nm. Esto asegura que se puedan emplear para el marcado de orgánulos celulares empleando longitudes de onda de excitación de baja energía.

20 En un proceso bifotónico la dependencia la intensidad de fluorescencia con la potencia del láser es cuadrática.

La confirmación de que el compuesto A y que el compuesto B absorben dos fotones se obtiene de la representación de los logaritmos de la intensidad de fluorescencia con la potencia del láser, tal como se puede observar en la figura 3, la cual representa la dependencia del
25 logaritmo de la Intensidad de fluorescencia con el logaritmo de la potencia del láser.

Así, en la figura 3 se representa en el eje de abscisas el logaritmo de la potencia del láser, mientras que en el eje de ordenadas se representa el logaritmo de la intensidad de fluorescencia (I_F).

Las pendientes de las rectas obtenidas, y representadas en la figura 3, tienen valores de 1.8 y 1.9 respectivamente.

5 **Ejemplo 4: ensayo por el que se introducen los compuestos A y B dentro de células vivas**

Obtención de las imágenes de fluorescencia

10 Las células que se han empleado son HeLa (células cancerígenas estándares muy utilizadas en investigación científica debido a que pueden cultivarse constantemente en el laboratorio).

Las células se cultivaron en medio completo (DMEM + 10% FBS + 1% Penicilina-Estreptomicina + 2 mM L-Glutamina) a 37°C en un ambiente humificado con 5% de CO₂. Siendo DMEM un Medio de Eagle Modificado de Dulbecco que corresponde a un tipo de
15 medio modificado que se prepara comercialmente como un polvo blanco cremoso, mientras que las siglas FBS corresponden a la expresión en inglés *Fetal Bovine Serum* (Suero Fetal Bovino).

Para los experimentos de microscopia de fluorescencia, las células se cultivaron hasta
20 aproximadamente un 50% de confluencia en placa multipocillos de 8 pocillos adecuados para la microscopia óptica. Las células HeLa se trataron durante 4 horas con una disolución de medio completo que contenía los compuestos A o B de la presente invención a una concentración entre 5 y 10 µM. Posteriormente se registraron imágenes de fluorescencia empleando un microscopio multifotónico Leica SP5 de configuración invertida. Las imágenes
25 de las células se realizaron utilizando un objetivo de inmersión en aceite PLAN APO NA 1.4 63x. La emisión se registró entre $\lambda_{em} = 500 - 600$ nm utilizando como fuente de excitación: $\lambda_{exc, 2P} = 720$ nm, para el compuesto A.

La emisión se registró entre $\lambda_{em} = 570 - 650$ nm utilizando como fuente de excitación: $\lambda_{exc, 2P}$
30 $= 720$ nm, para el compuesto B.

En la figura 4 se muestra la fluorescencia que se observa después de 4 horas de incubación del compuesto A con células HeLa (10 µM, $\lambda_{exc, 2P} = 720$ nm, $\lambda_{em} = 500-600$ nm).

Para que la figura de fluorescencia obtenida sea ilustrativa, la figura 4 es el resultado de invertir el color negro del fondo por blanco y pasarla a escala de grises, de forma que la fluorescencia que originalmente se observaba en color verde aparece representada en color gris.

5

Así, se concluye que la fluorescencia está localizada en orgánulos celulares que, por su morfología, se pueden identificar como mitocondrias. Igualmente, al hacer la superposición de la figura 4 con el campo claro, se confirmó que toda la fluorescencia se encuentra localizada en el interior de las células, es decir, no se observó fluorescencia ni en el núcleo ni en citoplasma de las células (esta figura no se incluye en la presente memoria porque en escala de grises no presenta claridad suficiente).

10

En la Figura 5 se muestra la fluorescencia observada después de 4 horas de incubación del compuesto B con células HeLa (5 μ M, $\lambda_{exc,2P}$ = 720 nm, λ_{em} = 570-650 nm). La fluorescencia se localiza en orgánulos celulares que, por su morfología, se identifican como mitocondrias.

15

Para que la figura de fluorescencia obtenida sea ilustrativa, la figura 5 es el resultado de invertir el color negro del fondo por blanco y pasarla a escala de grises, de forma que la fluorescencia que originalmente se observaba en color morado aparece representada en color gris.

20

Con la superposición de la figura 5 con el campo claro, se confirmó que toda la fluorescencia se encuentra localizada en el interior de las células, es decir, no se observó fluorescencia ni en el núcleo ni en citoplasma de las células (esta figura no se incluye en la presente memoria porque en escala de grises no presenta claridad suficiente).

25

Ejemplo 5: ensayo para verificar que compuestos A y B marcan mitocondrias

En este ejemplo se verifica que los compuestos A y B, introducidos dentro de mitocondrias conforme a lo detallado en el ensayo del ejemplo 4, marcan las mitocondrias.

30

Para ello, se determina la colocación de los compuestos A y B con respecto al marcador comercial: MitoTracker™ Red (MTR) (Thermofisher Scientific Cat. No. M22426) y MitoTracker™ Green (Thermofisher Scientific Cat. No. M7514).

35

Los compuestos A y B se incubaron en células HeLa siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 4. A las células incubadas con el compuesto A se les añadió el marcador comercial de mitocondrias MTR y se obtuvieron las imágenes de fluorescencia del marcador MTR con un microscopio confocal ($\lambda_{\text{exc},1\text{P}} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 640\text{-}680 \text{ nm}$); las del compuesto A se obtuvieron en el régimen de excitación de dos fotones tal como se ha descrito en el ejemplo 4.

Para el compuesto B se empleó el marcador MTG ($\lambda_{\text{exc},1\text{P}} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 490\text{-}520 \text{ nm}$). Los índices de Pearson (es un tipo de índice de colocación) de los compuestos A y B tienen valores entre 0.8-0.9 medido en base a MTR y MTG, lo que indica que los compuestos se han colocalizado (=marcado/teñido) con éxito en las mitocondrias.

En la figura 6A se representa la imagen de fluorescencia del compuesto A incubado con células HeLa (10 μM , $\lambda_{\text{exc},2\text{P}} = 720 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}600 \text{ nm}$). Mientras que en la figura 6A' se representa la imagen de fluorescencia del marcador comercial MitoTrackerTM Red ($\lambda_{\text{exc},1\text{P}} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 640\text{-}680 \text{ nm}$).

Al hacer la superposición de las imágenes representadas en la figura 6A y la figura 6A' es posible realizar el cálculo del índice de colocación (índice PCC) que corresponde en este caso a 0.8.

El índice de colocación de Pearson es una medida de correlación lineal entre dos conjuntos de datos [en el artículo de Cytometry A, 2010, 77(8),733-42. doi: 10.1002/cyto.a.20896 se explica cómo se obtiene el índice de colocación para comparar medias de fluorescencia en las células]. Cuanto más cercano al valor de 1, mejor es la colocación que hay entre las dos medidas de fluorescencia que se comparan. En este caso, permite concluir que la colocación entre la fluorescencia obtenida a partir del marcador comercial de mitocondrias y el compuesto A es buena.

La figura 6A muestra, originalmente en color verde, la fluorescencia obtenida cuando se incuban las células HeLa con el compuesto A y se emplea una excitación bifotónica. La figura 6A' muestra, originalmente en color rojo, la fluorescencia obtenida cuando se incuban las células HeLa con MTR y se emplea una excitación de un fotón.

En la figura 7B se representa la imagen de fluorescencia del compuesto B incubado con células HeLa ($5\text{ }\mu\text{M}$, $\lambda_{\text{exc},2\text{P}} = 720\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570\text{-}650\text{ nm}$). Mientras que en la figura 7B' se representa la imagen de fluorescencia del maracador comercial MitoTrackerTM Green ($\lambda_{\text{exc},1\text{P}} = 561\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 490\text{-}520\text{ nm}$).

5

Al hacer la superposición de las imágenes representadas en la figura 7B y 7B' es posible realizar el cálculo del índice de colocación (índice PCC) que corresponde en este caso a 0.9.

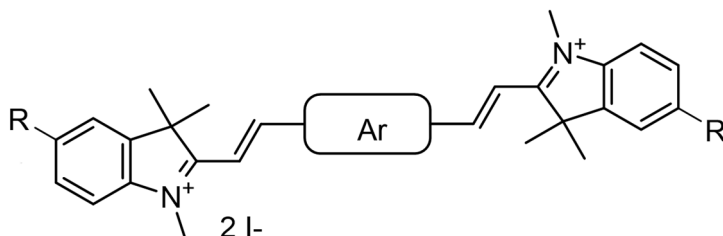
10 En la Figura 7A se muestra, originalmente en color magenta, la fluorescencia obtenida cuando se incuban las células HeLa con el compuesto B y se emplea una excitación bifotónica. En la Figura 7B' se muestra, originalmente en color azul, la fluorescencia obtenida cuando se incuban las células HeLa con MTG y se emplea una excitación de un fotón.

15 Los buenos índices de Pearson obtenidos para la superposición de las imágenes de fluorescencia, en condiciones de excitación de dos fotones, para los compuestos A y B, con respecto a los marcadores comerciales MTR y MTG permiten concluir que ambos compuestos A y B propuestos como realizaciones preferentes de la presente invención están marcando selectivamente mitocondrias y que pueden utilizarse en condiciones de excitación de dos
20 fotones.

REIVINDICACIONES

1. Compuestos fluorescentes basados en bisestirilindolios simétricos con propiedades de absorción de dos fotones de fórmula general **(3)**

5

**(3)**

en la que:

R = H, Me, MeO, CN, CO₂H, Cl, Br, I, NO₂;

10 Ar = difenilo, trifenilo, naftaleno, antraceno, tiofeno, ditionfeno, furano, pirrol;

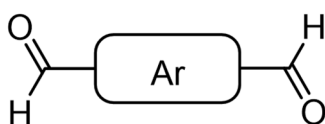
2. Compuestos de fórmula **(3)** definidos en la reivindicación 1 para uso como identificadores de mitocondrias en células vivas.

15 3. Compuestos de fórmula **(3)** definidos en la reivindicación 1 para uso en la monitorización de mitocondrias identificadas por los compuestos de fórmula **(3)**.

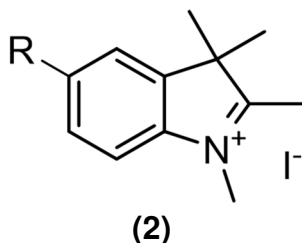
4. Procedimiento de preparación de compuestos de fórmula **(3)**, conforme los compuestos descritos en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:

20

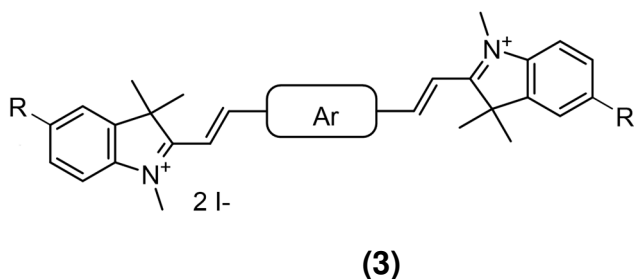
- condensación de tipo Knoevenagel entre dicarboxaldehídos aromáticos **(1)** y yoduro de 1,2,3,3-tetrametil-3H-indolinio **(2)** empleando etanol como disolvente y añadiendo tamiz molecular de 3Å a la reacción,

**(1)**

25



- Adición de metanol para disolver el sólido resultante en la etapa anterior, obteniendo una disolución homogénea junto con el tamiz molecular,
- Filtración sobre una capa de celita para separar el tamiz molecular, obteniendo la disolución homogénea,
- Concentración a vacío de la disolución homogénea,
- Lavado con éter dietílico y acetato de etilo, obteniéndose un compuesto fluorescente basado en bisestirilindolios simétricos con propiedades de absorción de dos fotones de fórmula general **(3)**.



5. Procedimiento, según reivindicación 4ª, caracterizado por que la condensación de tipo Knoevenagel se realiza en presencia de un reflujo de etanol durante un tiempo de entre 24 h y 36 h.

6. Procedimiento de marcado e identificación de mitocondrias de células vivas empleando los compuestos de fórmula (3) definidos en la reivindicación 1 que comprende las etapas de:

- Cultivo o tratamiento de las células vivas durante al menos 4 horas con una disolución que contiene los compuestos de fórmula (3).
- Excitación bifotónica con una longitud de onda entre 700 y 850 nm.
- Registro de imágenes de fluorescencia empleando un microscopio de fluorescencia acoplado a un láser multifotónico donde se observan las mitocondrias marcadas.

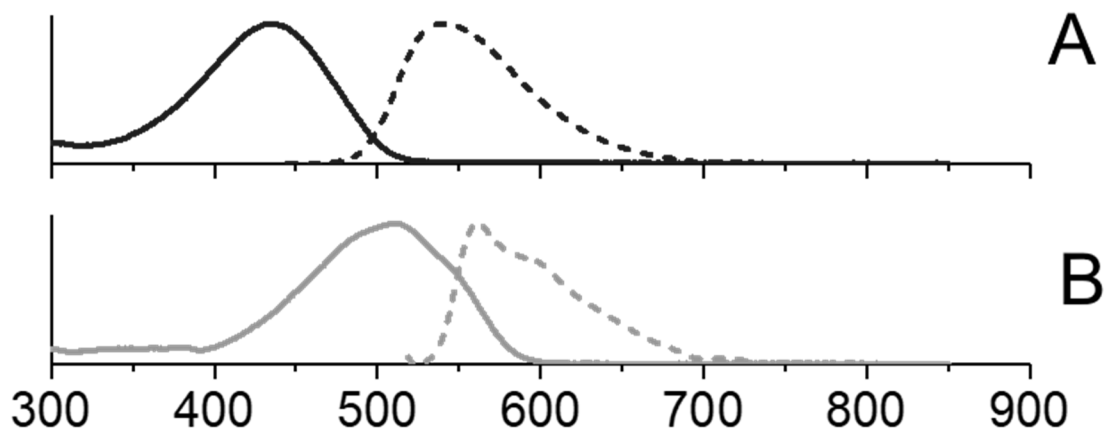


FIG. 1

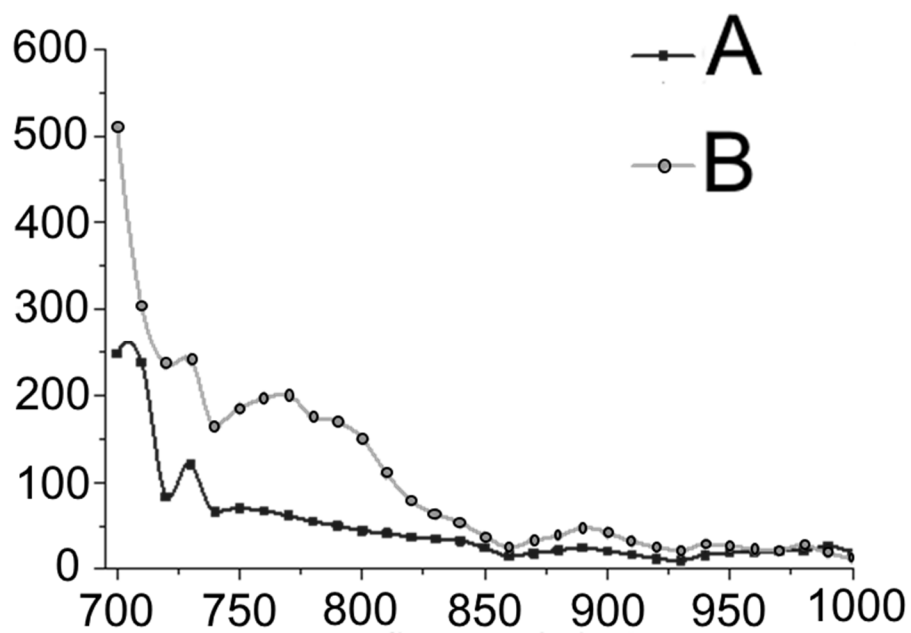


FIG. 2

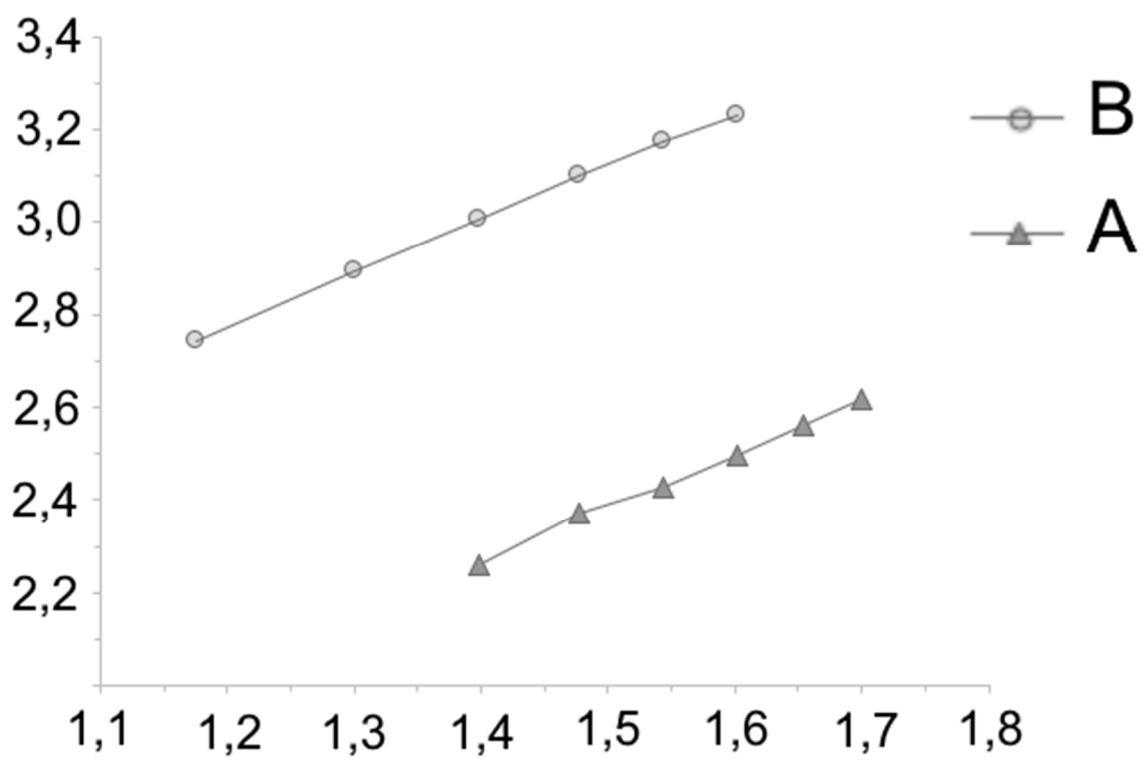


FIG. 3

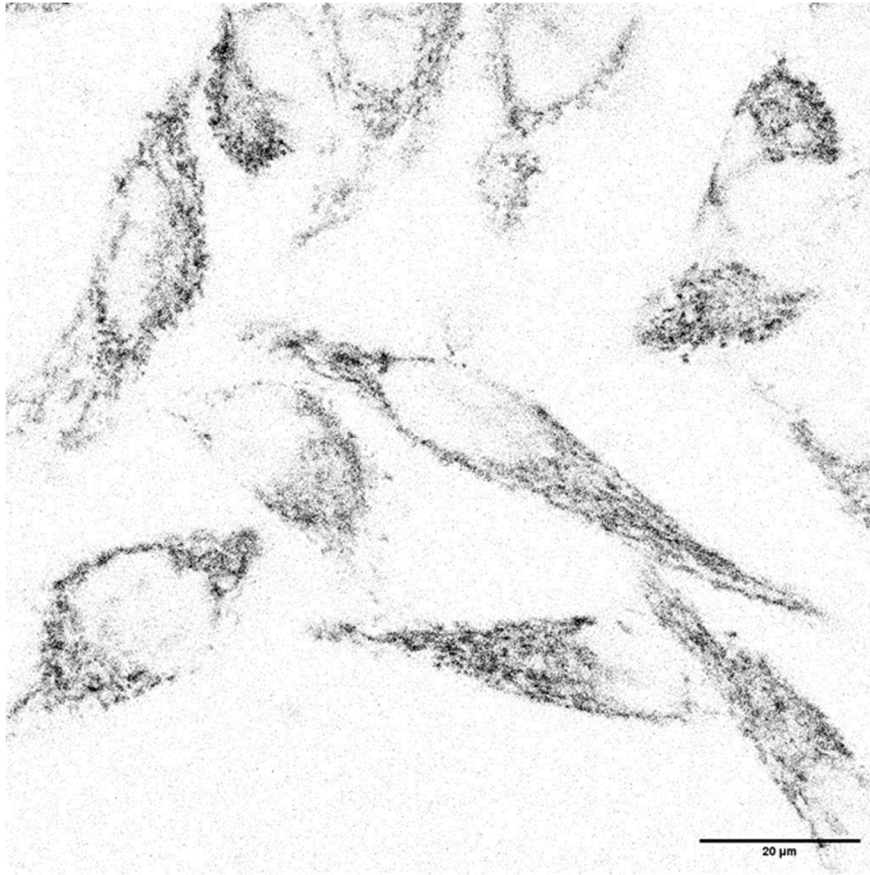


FIG. 4

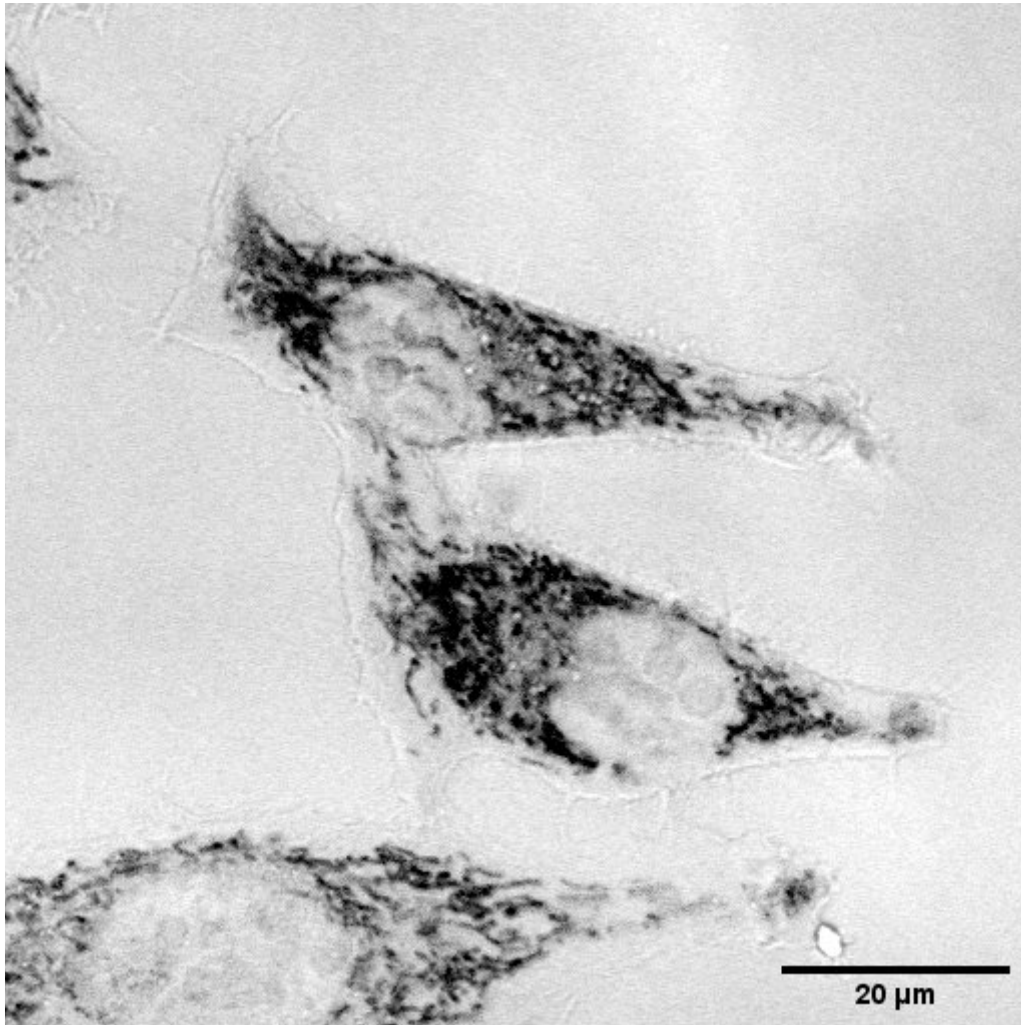
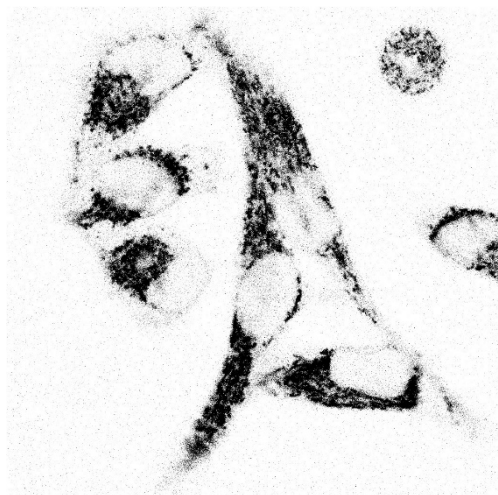
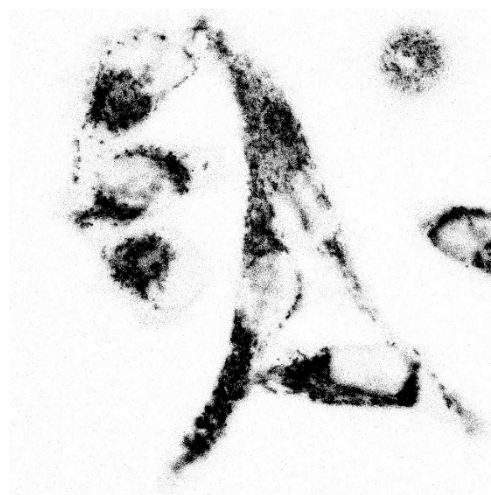


FIG. 5

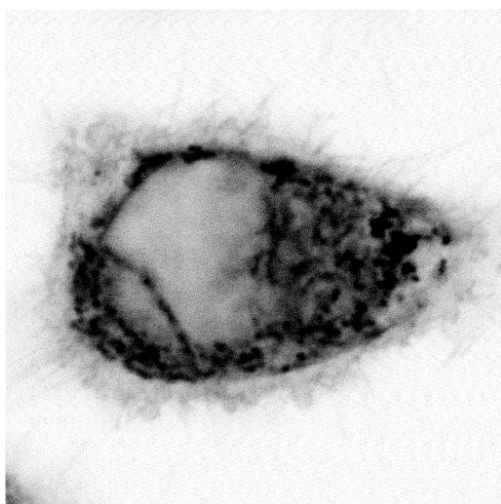


A

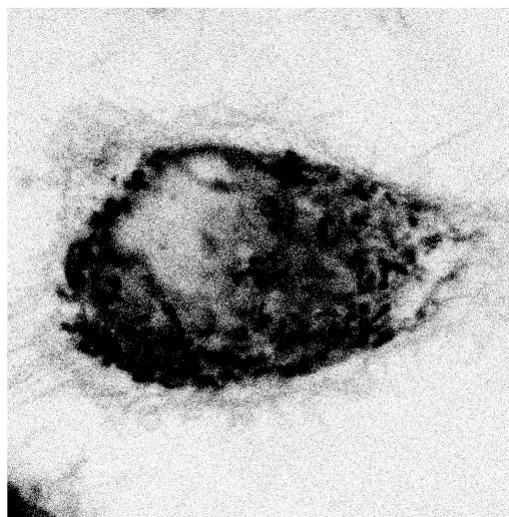


A'

FIG. 6



B



B'

FIG. 7



- ②① N.º solicitud: 202330836
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.10.2023
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	CN 109053549 A (UNIV JINAN) 21/12/2018, párrafo 0004, ejemplos 1, 3 y 4.	1-6
A	CN 106366074 A (UNIV JINAN) 01/02/2017, párrafos 0005-0007 y ejemplos 1 y 5.	1-6
A	KRCOVA, L. et al. Highly selective mitochondrial probes based on fluorinated pentamethinium salts: On two-photon properties and microscopic applications. Dyes and Pigments, 17/08/2019, Vol. 172, Nº 17/08/2019, vol. 172, nº 107802, <DOI: 10.1016/j.dyepig.2019.107802>. Ver resumen, esquema 1, secciones 2.2, 2.2.3, 2.7, 3.2 y 3.3	1-6
A	HE, L. et al. A unique type of pyrrole-based cyanine fluorophores with turn-on and ratiometric fluorescence signals at different pH regions for sensing pH in enzymes and living cells, ACS Applied Materials & Interfaces, 10/12/2014, Vol. 6, Páginas 22326-22333, <DOI: 10.1021/am506322h>. Ver resumen, esquema 2, sección 2.8 y 3.3 y figura 2.	1-6
A	GUERRIN, C. et al. When Light and Acid Play Tic-Tac-Toe with a Nine-State Molecular Switch. Journal of the American Chemical Society, 14/11/2019, Vol. 141, Páginas 19151-19160, <DOI: 10.1021/jacs.9b11048>. Ver resumen, figura 7 y conclusiones.	1-6
A	WO 2017218537 A1 (UNIV ARIZONA STATE) 21/12/2017, párrafos 0005, 0044 y figura 5b.	1-6

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
06.08.2024

Examinador
B. de Luis Fernández

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K49/00 (2006.01)**G01N21/64** (2006.01)**C07D209/08** (2006.01)

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

A61K, G01N, C07D

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, CAPLUS, XPESP, REGISTRY