

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
23 de diciembre de 2021 (23.12.2021) **WIPO | PCT**

(10) Número de publicación internacional
WO 2021/255319 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

C07F 5/02 (2006.01) C09K 11/07 (2006.01)
C09B 57/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2021/070455

(22) Fecha de presentación internacional:

18 de junio de 2021 (18.06.2021)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P202030600 19 de junio de 2020 (19.06.2020) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID** [ES/ES]; Avenida de Séneca 2, 28040 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID** [ES/ES]; Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049 Madrid (ES). **ROYAL FREE LONDON NHS FOUNDATION TRUST** [GB/GB]; Pond Street, Royal Free Hospital, Upper Third Floor, Institute for Liver & Digestive Health, University College London, Division, Pond Street, Royal Free Hospital, Upper Third Floor, Institute for Liver & Digestive Health, University College London, Division of Medicine, London London NW3 2QG (GB).

(72) Inventores: **ORTIZ GARCIA, M^a Josefa**; Ciudad Universitaria, s/n, Ciudad Universitaria, s/n, 28040 Madrid (ES). **RODRIGUEZ AGARRABEITIA, Antonia**; Arcos de Jalón, 118, Arcos de Jalón, 118, 28037 Madrid (ES). **DE LA MOYA CERERO, Santiago**; Ciudad Universitaria, s/n, Ciudad Universitaria, s/n, 28040 Madrid (ES). **MAZUELO SANTOS, Tania**; Ciudad Universitaria, s/n, Ciudad Universitaria, s/n, 28040 Madrid (ES). **PRIETO CASTAÑEDA, Alejandro**; Ciudad Universitaria s/n, Ciudad Universi-

taria s/n, 28040 Madrid (ES). **VILLANUEVA OROQUE-TA, Angeles**; Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049 Madrid (ES). **TABERO TRUCHADO, Andrea**; Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Ciudad Universitaria de Cantoblanco, 28049 Madrid (ES). **ACEDO NUÑEZ, M^a del Pilar**; Pond Street, Royal Free Hospital, University Colledge London, Division of Medicine, Pond Street, Royal Free Hospital, University Colledge London, Division of Medicine, London Greater London NW3 2QG (GB). **GARCIA SAMPEDRO, Andres**; Pond Street, Royal Free Hospital, Upper Third Floor, Institute for Liver & Digestive Health, University College London, Division, Pond Street, Royal Free Hospital, Upper Third Floor, Institute for Liver & Digestive Health, University College London, Division of Medicine, London Greater London NW3 2QG (GB).

(74) Mandatario: **MARTINEZ, Miguel Angel**; Paseo de la Castellana, 140 3a. Planta, Edificio LIMA, 28046 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL,

(54) Title: NEW BODIPY DYES FOR PHOTODYNAMIC TERAGNOSIS BASED ON ACCUMULATION IN MITOCHONDRIA

(54) Título: NUEVOS COLORANTES BODIPY PARA TERAGNOSIS FOTODINÁMICA BASADOS EN ACUMULACIÓN EN MITOCONDRIAS

(57) Abstract: Structurally simple organic compounds with antitumour activity by acting on mitochondria through various action mechanisms hold substantial promise for development as cancer treatment agents. The present invention relates to new compounds with F-BODIPY structure capable of specific accumulation in mitochondria, of exhibiting photocytotoxicity without the need to involve heavy atoms or other functional residues capable of interacting in biological processes, and with the potential for developing new teragnostic agents for clinical use. Furthermore, it relates to their obtainment process and their application as fluorescent markers of mitochondria, and as photocytotoxic agents for photodynamic therapy (PDT) and phototheragnostics based on mitochondrial accumulation.

(57) Resumen: 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 fotocitotoxicidad 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.

ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

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.

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.

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).

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, 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
- 10 papel central en las vías apoptóticas (Noh, I. et al. *Adv. Sci.* **2018**, 5, 1700481; Thomas, P. et al. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 8351).

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

15 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.

Actualmente existen marcadores de mitocondrias comercializados que están basados

20 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.

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

30 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.

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.

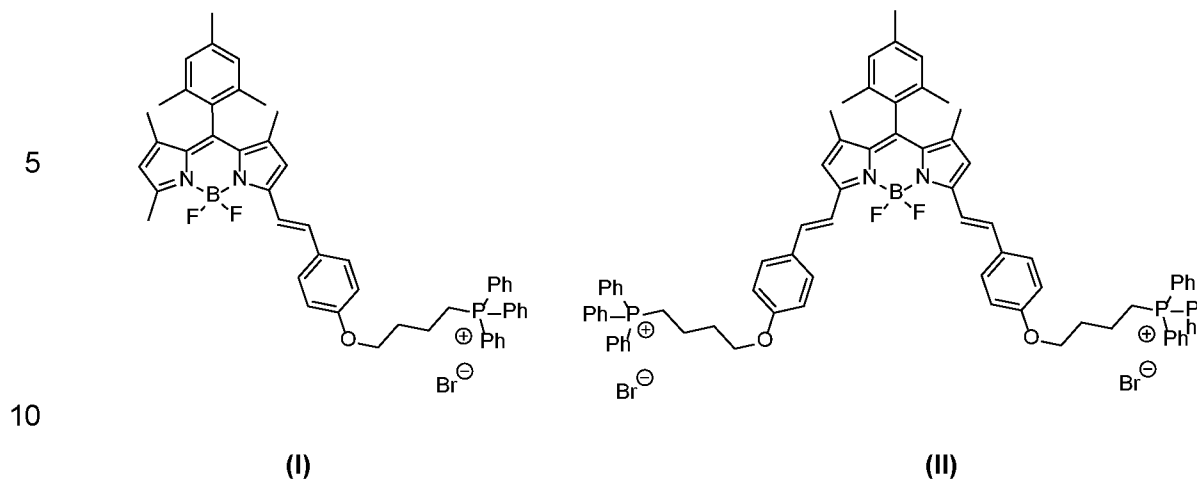
Estructuralmente, los colorantes objetos de la presente invención se caracterizan por poseer una unidad de *F*-BODIPY (4,4-difluoroBODIPY) π -extendida por la acción de uno o varios grupos 2-arilitenilo que, a su vez, portan un resto polar basado en alquil(trifenil)fosfonio.

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.

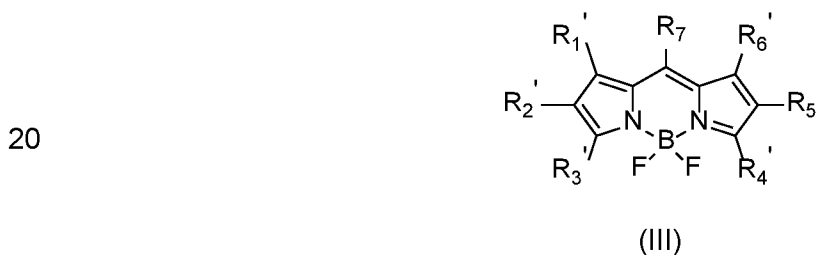
De forma más concreta, en un **primer aspecto**, la presente invención se refiere a los compuestos Mito-1 y Mito-2 de fórmula (I) y (II), respectivamente, a los que, en adelante,

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.

15



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

25

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 fosfonio, 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

30

35

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 especialmente preferida en atmósfera inerte (por ejemplo de argón).

10 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 en columna y, más preferiblemente, el adsorbente de esta cromatografía de elución es gel de sílice.

15 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, 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.

20 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, 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 no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15

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/cm² 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/cm² 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

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

35

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.

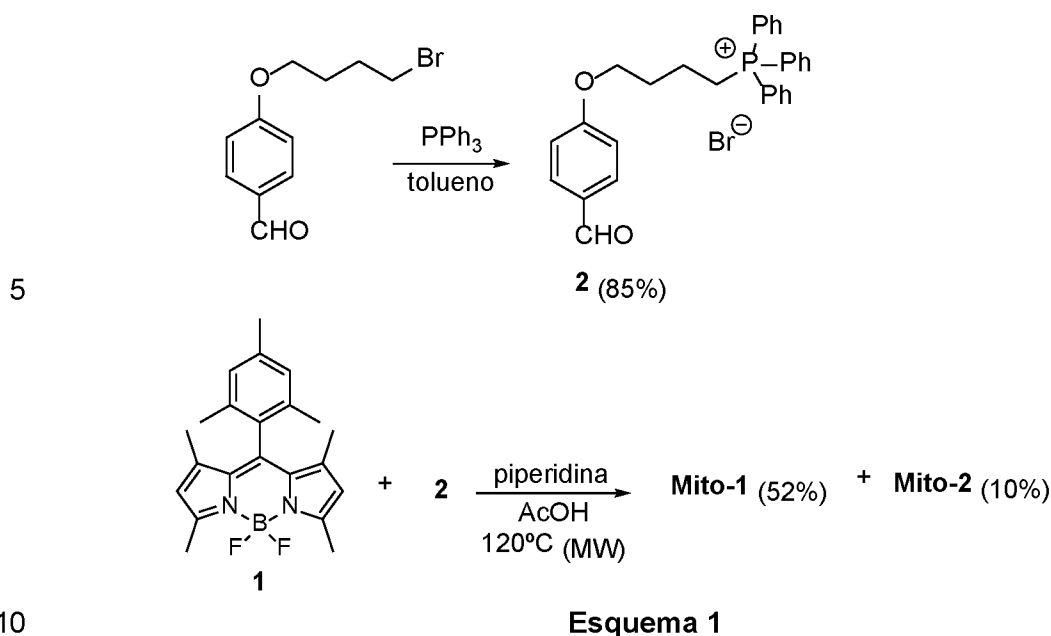
5 SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS

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 intermediarios 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 = cuádruplete, 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.



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, $^4J_{CP}$ = 4.5 Hz, CH), 134.9 (C), 133.4 (d, $^3J_{CP}$ = 9.9 Hz, CH), 131.7 (C), 131.1 (C), 130.2 (d, $^2J_{CP}$ = 12.4 Hz, CH), 129.6 (C), 128.8 (CH), 128.5 (CH), 120.5 (CH), 118.4 (d, $^1J_{CP}$ = 85.9 Hz, C), 117.0 (CH), 116.6 (CH), 114.7 (CH), 66.2 (CH₂O), 29.3 (CH₂), 20.9 (d, $^1J_{CP}$ = 51.7 Hz, CH₂P), 19.9 (CH₃), 18.9 (d, $^2J_{CP}$ = 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, $^4J_{CP}$ = 2.8 Hz, CH), 133.4 (d, $^3J_{CP}$ = 10.0 Hz, CH), 132.1 (C), 131.2 (C), 130.2 (d, $^2J_{CP}$ = 13.0 Hz, CH), 129.7 (C), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 118.4 (d, $^1J_{CP}$ = 86.6 Hz, C), 117.1 (CH), 116.6 (CH), 114.7 (CH), 66.1 (CH₂O), 29.3 (CH₂), 20.8 (d, $^1J_{CP}$ = 51.7 Hz, CH₂), 19.9 (CH₃), 18.9 (d, $^2J_{CP}$ = 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 C₈₀H₇₇BF₂N₂O₂P₂₂⁺).

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

- 5 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 µg/mL de estreptomicina. Todos los productos se esterilizan por medio de filtros de 0.22 µm. Las células se
- 10 mantienen en un incubador en una atmósfera con un 5% de CO₂, 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
- 15 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
- 20 condiciones experimentales se incuban adicionalmente con el marcador *MitoTrackerTM 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
- 25 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.

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

Ejemplo 2.

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

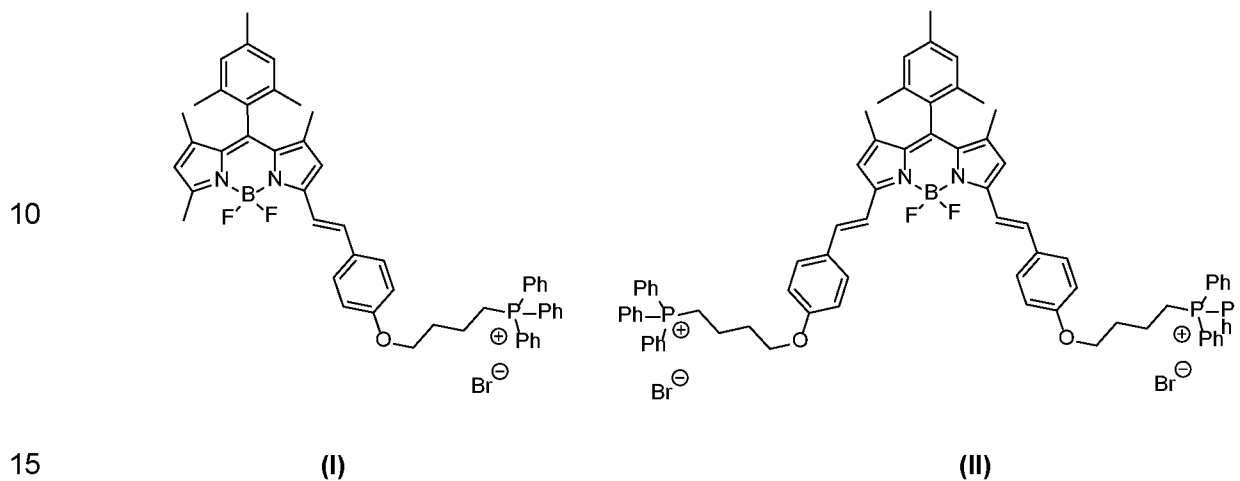
Para la evaluación se utilizan células HeLa. Las células se siembran en placas de 24 pocillos y se incuban con distintas concentraciones de los compuestos seleccionados (1, 2.5, 5, 7.5 y 10 μM), diluidos en medio de cultivo. Tras 3 h de incubación las células se lavan tres veces con medio de cultivo y se irradian con una lámpara LED *Par 64 Short* (Showtec, Burgebrach, Holanda) con una dosis de luz de 10.3 J/cm² y una longitud de onda de 518 $\pm$ 10 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.

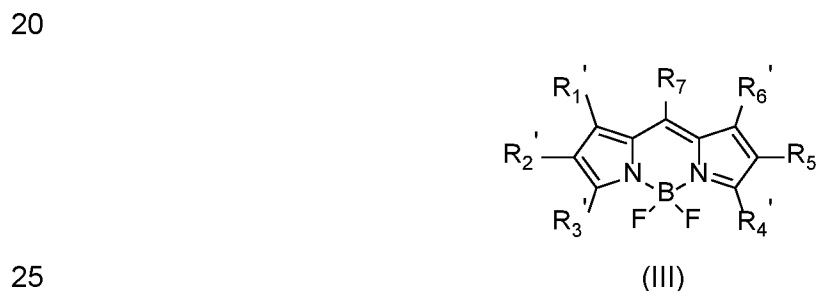
En la Figura 3 se muestra la morfología de las células tras 3 y 24 h desde la irradiación con Mito-1 (5 μM). Como puede observarse, tras la irradiación las células comienzan a retraerse y se observa la característica morfología “globular” de la membrana celular, típica de la muerte celular en apoptosis.

REIVINDICACIONES

1. Compuestos que contienen en su estructura una unidad de *F*-BODIPY π -extendida por la acción de uno o varios grupos 2-ariltenilo 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 R₄' (y/o R₃') es metilo y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final.

- 30 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.
- 35 4. Procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (I) y (II), según
reivindicación 3, donde la reacción está catalizada por un ácido, preferiblemente

- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 7. Marcador (sonda) fluorescente que comprende, al menos, un compuesto según reivindicación 1.
8. Marcador (sonda) fluorescente, según reivindicación 7, donde el marcaje es celular.
- 25 9. Marcador (sonda) fluorescente, según reivindicación 8, donde el marcaje celular se realiza en mitocondrias.
- 30 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.
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.

15

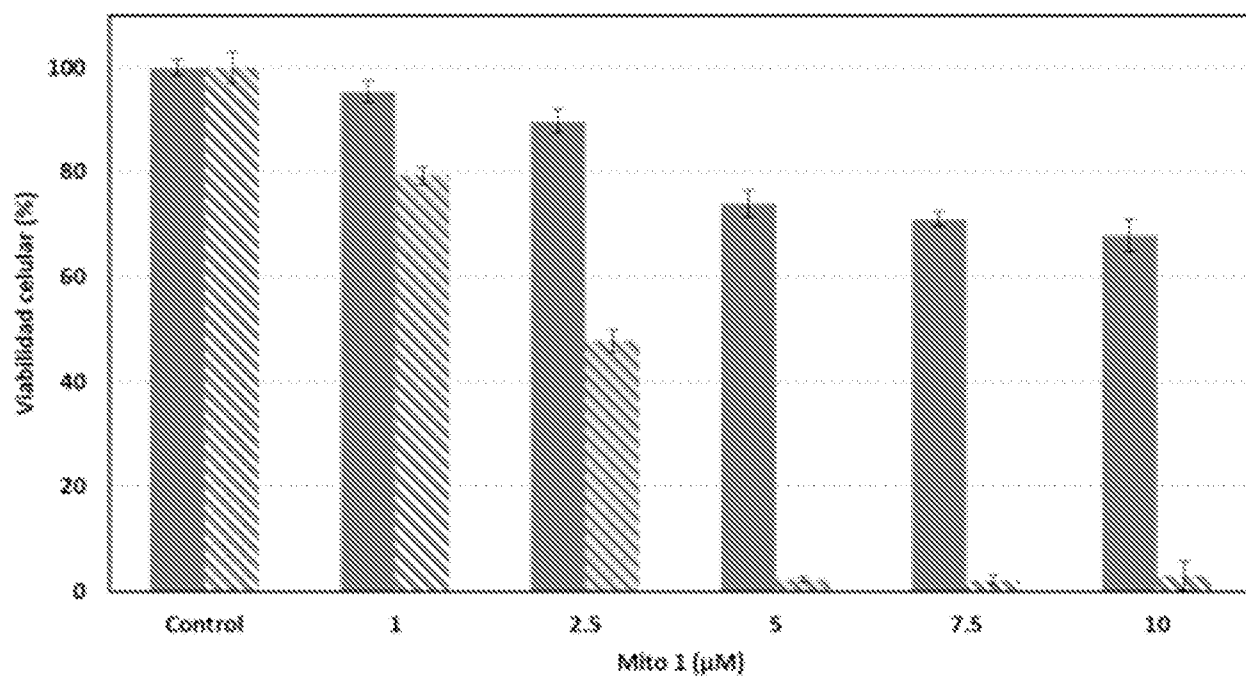
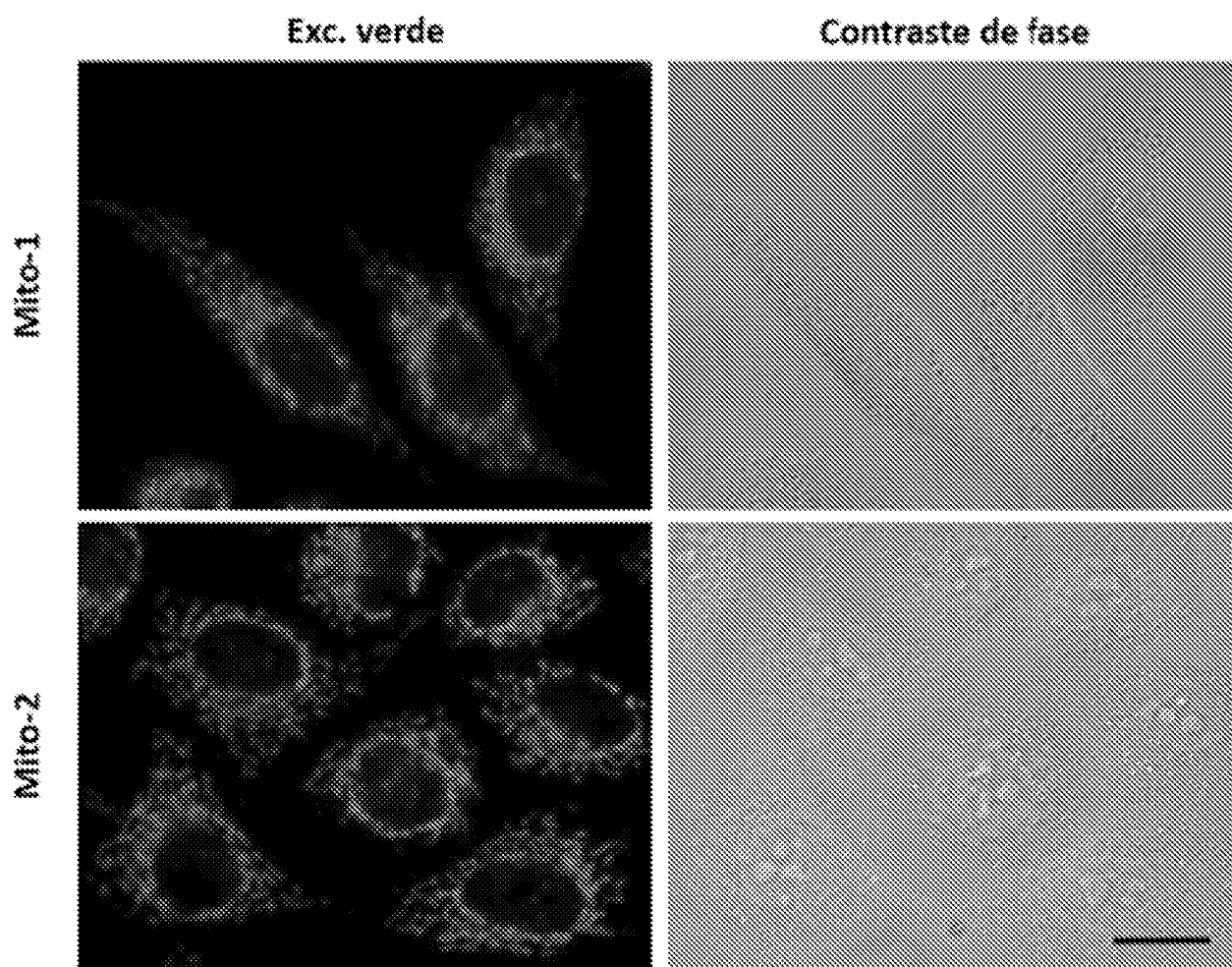
20

25

30

35

FIGURES



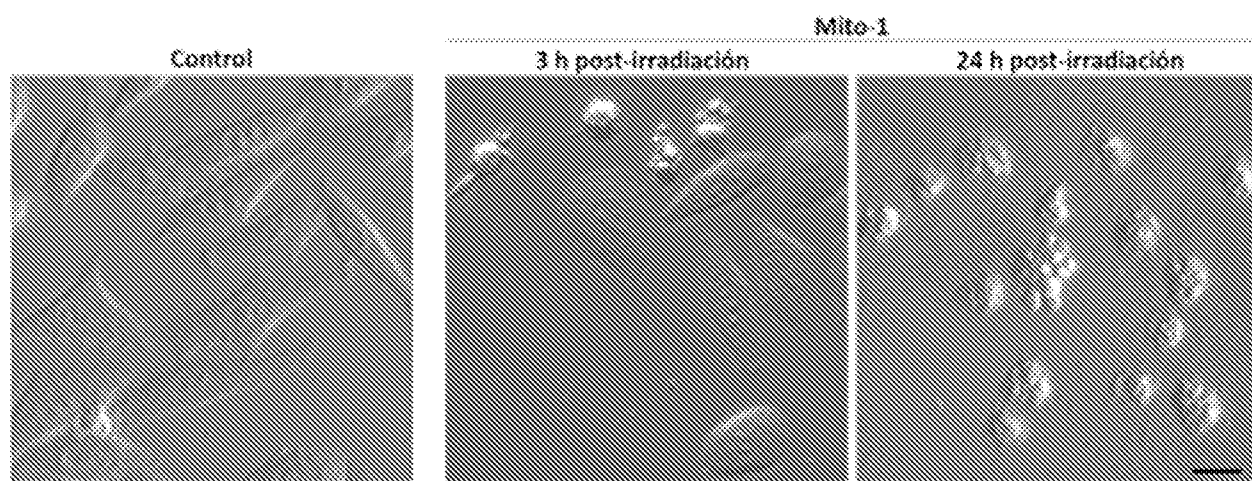


FIG. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070455

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07F, C09B, C09K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, PATENW, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANG, J. et al.. Synthesis, spectroscopic characterization, one and two-photon absorption properties and electrochemistry of π -expanded BODIPYs dyes. Dyes And Pigments, Vol. 175, Pages 2-8, 27/12/2019 scheme 1, compounds 2 a-d and 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, Vol. 176, Pages 1-7. 07/01/2020 scheme 1, compounds 7 a-d and 8 a-d.	1-16
A	ES 2719000 A1 (UNIV MADRID COMPLUTENSE ET AL.) 05/07/2019, page 8, compounds 1-8, claims	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20/08/2021

Date of mailing of the international search report
(25/08/2021)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
H. Aylagas Cancio

Telephone No. 91 3498563

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070455

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG SISI et al.. A BODIPY-based 'turn-on ' fluorescent probe for hypoxic cell imaging... Chemical Communications (Cambridge, England) .07/09/2015, Vol. 51, N° 69, pages 13389 - 13392, ISSN 1364-548X (Electronic), <DOI: 10.1039/c5cc05139h pubmed:26207944> scheme 2.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070455

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2719000 A1	05.07.2019	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2021/070455

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07F5/02 (2006.01)

C09B57/00 (2006.01)

C09K11/07 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2021/070455

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C07F, C09B, C09K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, PATENW, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, REGISTRY, HCAPLUS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	YANG, J. et al.. Synthesis, spectroscopic characterization, one and two-photon absorption properties and electrochemistry of π -expanded BODIPYs dyes. Dyes And Pigments, Vol. 175, Páginas 2-8, 27/12/2019 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, Vol. 176, Páginas 1-7. 07/01/2020 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

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
20/08/2021

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
25 de agosto de 2021 (25/08/2021)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
H. Aylagas Cancio
Nº de teléfono 91 3498563

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2021/070455

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WANG SISI et al.. A BODIPY-based 'turn-on ' ; fluorescent probe for hypoxic cell imaging... Chemical Communications (Cambridge, England)., 07/09/2015, Vol. 51, Nº 69, páginas 13389 - 13392, ISSN 1364-548X (Electronic), <DOI: 10.1039/c5cc05139h pubmed:26207944> esquema 2	1-16

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES2021/070455

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2719000 A1	05.07.2019	NINGUNO	

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C07F5/02 (2006.01)

C09B57/00 (2006.01)

C09K11/07 (2006.01)