

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 000**

21 Número de solicitud: 201900017

51 Int. Cl.:

C07F 5/02 (2006.01)

C09B 57/00 (2006.01)

C09K 11/07 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

14.02.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.07.2019

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

04.05.2020

Fecha de concesión:

18.05.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

25.05.2020

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID (80.0%)
Sección de Contratos y Patentes (OTRI), Facultad
de Medicina (Edificio Entrepabellones 7 y 8)
Ciudad Universitaria
28040 Madrid (Madrid) ES y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (20.0%)

72 Inventor/es:

ORTÍZ GARCÍA, Ma. Josefa;
DE LA MOYA CERERO, Santiago;
RODRÍGUEZ AGARRABEITIA, Antonia;
PRIETO CASTAÑEDA, Alejandro;
GARCÍA GARRIDO, Fernando;
VILLANUEVA OROQUIETA, Ángeles y
TABERO TRUCHADO, Andrea

54 Título: **Nuevos compuestos de esqueleto boradiazaindacénico y su uso como agentes teragnósticos basados en acumulación en gotas lipídicas**

57 Resumen:

Nuevos compuestos de esqueleto boradiazaindacénico y su uso como agentes teragnósticos basados en acumulación en gotas lipídicas.

La presente invención se refiere a unos nuevos colorantes con estructura de BODIPY caracterizados por contener al menos un resto (alcoxycarbonil) alquilo en su estructura. capacidad de acumulación específica en gotas lipídicas y actividad teragnóstica, permitiendo su uso dual como marcadores fluorescentes para diagnóstico por bioimagen basada en fluorescencia y como agentes fotocitotóxicos en terapia fotodinámica. Además, se refiere a su procedimiento de obtención y a su aplicación dual en microscopia de fluorescencia y en terapia fotodinámica; así como a una nueva estrategia para conseguir potenciar la actividad teragnóstica deseada, consistente en la acumulación específica del agente teragnóstico en gotas lipídicas.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 719 000 B2

DESCRIPCIÓN

Nuevos compuestos de esqueleto boradiazaindacénico y su uso como agentes teragnósticos basados en acumulación en gotas lipídicas.

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.

Antecedentes de la invención

La teragnosis es una tecnología de vanguardia en el campo emergente de la “medicina personalizada de precisión” y que permite simultáneamente el diagnóstico en el estadio temprano de la enfermedad y su terapia eficiente, así como el seguimiento en tiempo real de la eficacia terapéutica (“*Cancer Theranostics*”, Eds.: X. Chen, S. Wong, Elsevier, Amsterdam (Holanda) 2014; R. Kumar, W. S. Shin, K. Sunwoo, W. Y. Kim, S. Koo, S. Bhuniya, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* 2015, 44, 6670).

El desarrollo de agentes multimodales inteligentes y avanzados con objetivos dirigidos al tratamiento del cáncer mediante diagnóstico precoz por bioimagen y su terapia eficiente y simultánea constituyen la piedra angular de la teragnosis (E.-K. Lim, T. Kim, S. Paik, S. Haam, Y.-M. Huh, K. Lee, *Chem. Rev.* 2015, 115, 327; M. H. Lee, A. Sharma, M. J. Chang, J. Lee, S. Son, J. L. Sessler, C. Kang, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* 2018, 47, 28.). En este sentido, el desarrollo de colorantes que combinen la capacidad de actuar como fotosensibilizadores para la generación de oxígeno singlete, citotóxico y, por tanto, con capacidad para ser usados como agentes en terapia fotodinámica (terapia consistente en producir muerte celular selectiva mediante irradiación luminosa de la lesión tratada con el fotosensibilizador), con capacidad fluorescente para permitir adicionalmente el diagnóstico mediante bioimagen basada en fluorescencia, constituye un claro objetivo en el campo de la teragnosis ya que dichos colorantes podrían configurarse como interesantes biomateriales de uso clínico en medicina de precisión (“*Imaging in Photodynamic Therapy*” in *Series in Cellular and Clinical Imaging*, Eds.: M. R. Hambling, Y. Huang, CRC Press, Boca Ratón (USA) 2017; G. Duran-Sampedro, N. Epelde-Elezcano, V. Martínez-Martínez, I. Esnal, J. Bañuelos, I. García-Moreno, A. R. Agarrabeitia, S. de la Moya, A. Tabero, A. Lazaro, A. Vilanueva, M. J. Ortiz, I. López Arbeloa, *Dyes Pigm.* 2017, 142, 77). Sin embargo, el desarrollo de dichos colorantes (capaces de ser usados en terapia fotodinámica y adquisición de imágenes mediante fluorescencia) aún se encuentra en una etapa temprana ya que su fotoactividad dual exige aunar en una misma estructura química dos procesos fotofísicamente opuestos: fluorescencia vs. fotogeneración de oxígeno singlete (A. Lamkaew, S. H. Lim, H. B. Lee, L. V. Kiew, L. Y. Chung, K. Burgess, *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 77; S. Zhen, S. Wang, S. Li, W. Luo, M. Gao, L. G. Ng, C. C. Goh, A. Qin, Z. Zhao, B. Liu, B. Z. Tang, *Adv. Funt. Mater.* 2018, 28, 1706945). Por tanto, existe la necesidad de desarrollar colorantes que actúen como agentes teragnósticos que presenten un fino balance entre ambas capacidades (fluorescencia y fotogeneración de oxígeno singlete) siendo además, lo suficientemente estables para soportar la intensa radiación que requiere esta fotoactividad dual.

En la presente invención se presentan nuevos colorantes fluorescentes capaces de marcar eficientemente las gotas lipídicas (GL) que permiten avanzar en el estudio de dichos orgánulos mediante estudios basados en microscopía de fluorescencia y modular sus propiedades fotónicas para conseguir nuevos agentes teragnósticos basados en bioimagen y en terapia fotodinámica activada por generación de oxígeno singlete en GL.

El desarrollo de agentes teragnósticos que usan gotas lipídicas (GL) como dianas terapéuticas no se había ensayado con anterioridad, a pesar de la enorme relevancia biológica de estos orgánulos y su reconocida implicación en un vasto número de procesos fisiológicos (M. A. Welte, *Curr. Biol.* 2015, 25, R470; C. C. Scott, S. Vossio. F. Vacca, B. Snijder, J. Larios, O. Schaad, N. Guex, D. Kuznetsov, O. Martin, M. Chambon, G. Turcatti, L. Pelkmans, J. Gruenberg, *EMBO reports* 2015, 76, 741; H. Wang, M. V. Airola, K. Reue, *BBA-Mol. Cell Biol. Lipids* 2017, 1862, 1131; A. R. Thiam, M. Beller, *J. Cell Sci.* 2017, 730, 315; G. Gao, F.-J. Chen, L. Zhou, L. Su, D. Xu, L. Xu, P. Li, *BBA- Mol. Cell Biol. Lipids* 2017, 7862, 1197) como el cáncer donde las GL se encuentran involucradas como una característica generalizada en el proceso neoplásico.

Los marcadores fluorescentes de GL actualmente comercializados, tales como Oil Red O, Nile Red, BODIPY 505/515 o BODIPY 493/503, exhiben importantes limitaciones en el marcaje eficiente de dichos orgánulos relacionadas, fundamentalmente, con baja especificidad, baja fotosensibilidad y protocolos de marcaje complejos o tediosos. Por ello, los protocolos actuales para el marcaje fluorescente de GL implican el empleo de altas concentraciones de colorante (lo que conlleva aumento del coste, citotoxicidad, extinción de fluorescencia por agregación del colorante o pérdida de nitidez en el marcaje, entre otros inconvenientes). Los colorantes descritos en esta invención superan tales limitaciones.

Explicación de la invención

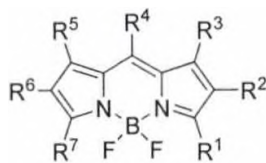
La presente invención describe el diseño estructural, desarrollo sintético y actividad de un nuevo grupo de colorantes pertenecientes a la familia de los BODIPY con capacidad para señalar eficientemente GL mediante fluorescencia, superando las limitaciones existentes hasta el momento en el marcaje fluorescente de estos orgánulos, y con capacidad adicional para producir muerte celular eficiente mediante terapia fotodinámica. Estos nuevos colorantes presentan potencialidad para desarrollo de nuevos agentes teragnósticos de uso clínico.

Estructuralmente, los colorantes objeto de la presente invención se caracterizan por poseer al menos un resto (alcoxilcarbonyl)alquilo unido covalentemente a su esqueleto boradiazaindacénico, característico del conjunto de los colorantes BODIPY. Este resto (alcoxilcarbonyl)alquilo es fundamental para conseguir la acumulación específica del colorante en GL y que dicha acumulación específica potencie, a su vez, su capacidad fototóxica en terapia fotodinámica. Estos colorantes se preparan siguiendo dos metodologías generales para la introducción del resto (alcoxilcarbonyl)alquilo:

- Pre-funcionalización: obtención directa a partir de pirroles y derivados de ácidos carboxílicos basados en (alcoxilcarbonyl)alquilo
- Post-funcionalización en colorantes BODIPY funcionalizados mediante:
 - a) acoplamiento de NEGISHI con reactivos organozíncicos en (alcoxilcarbonyl)alquilo o,
 - b) acilación Friedel-Crafts con un derivado de ácido carboxílico basado en (alcoxilcarbonyl)alquilo, seguido de reducción quimioselectiva del grupo cetónico formado.

Estos protocolos sintéticos tienen carácter general y pueden proporcionar biomateriales moleculares similares con propiedades avanzadas para ser aplicados en el desarrollo de uso clínico.

De forma más concreta, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un conjunto de compuestos de fórmula general (I).



(I)

Donde, al menos, uno de los sustituyentes R^1 a R^7 del esqueleto boradiazaindacénico es un grupo (alcoxicarbonil)alquilo y los sustituyentes R^1 a R^7 diferentes de (alcoxicarbonil)alquilo se seleccionan cada uno, independientemente, de entre hidrógeno, alquilo C_1 - C_{18} sustituido o no sustituido, alqueno C_2 - C_{18} sustituido o no sustituido, alquino C_2 - C_{18} sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, halógeno, hidroxilo (OH), alcóxido (OR), amino (NH_2), amino sustituido (NHR, NRR' , ciano (CN), carboxilo (COOH), acilo (COR), alcoxicarbonilo (COOR), nitro (NO_2), mercapto (SH) o mercapto sustituido (SR). Dos de estos sustituyentes pueden estar conectados entre sí formando un ciclo fusionado al esqueleto boradiazaindacénico.

El término "alquilo" se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 18 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, *sec*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, etc. Preferiblemente, el grupo alquilo tiene entre 1 y 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como arilo, heteroarilo, alqueno, alquino, halógeno, hidroxilo, alcóxido, amino, amino sustituido, ciano, carboxilo, acilo, alcoxicarbonilo, nitro, mercapto o mercapto sustituido. Dos de estos sustituyentes pueden estar conectados entre sí formando un ciclo fusionado al esqueleto boradiazaindacénico.

El término "alqueno" se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas insaturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 2 a 18 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 6, y que contienen uno o más enlaces carbono-carbono dobles, por ejemplo, vinilo, 1-propenilo, alilo, isoprenilo, 2-buten-1-ilo, 1,3-butadien-1-ilo, 2-penten-1-ilo, etc. Estas cadenas pueden incluir uno o más sustituyentes tales como arilo, heteroarilo, alquilo, alqueno, halógeno, hidroxilo, alcóxido, amino, amino sustituido, carboxilo, ciano, arilo, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, nitro, mercapto o mercapto sustituido. Dos de estos sustituyentes pueden estar conectados entre sí formando un ciclo adicional.

El término "alquino" se refiere a radicales de cadenas hidrocarbonadas, lineales o ramificadas, de 2 a 18 átomos de carbono, preferiblemente de 2 a 6, y que contienen uno o más enlaces carbono-carbono triples, y que opcionalmente pueden contener algún enlace carbono-carbono doble, por ejemplo, etinilo, propinilo, 1-butin-1-ilo, etc. Estas cadenas pueden incluir uno o más sustituyentes tales como arilo, heteroarilo, alquilo, alqueno, alquino, halógeno, hidroxilo, alcóxido, carboxilo, ciano, arilo, amino, amino sustituido, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, nitro, mercapto o mercapto sustituido. Dos de estos sustituyentes pueden estar conectados entre sí formando un nuevo ciclo.

El término "arilo" se refiere, en la presente invención, a un resto hidrocarbonado aromático monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que comprende una estructura aromática formada entre 5 y 18 átomos de carbono, por ejemplo, fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo, antracilo o pirenilo. Preferiblemente, el grupo arilo tiene de 5 a 7 átomos de carbono y más preferiblemente el grupo arilo es un fenilo. A su vez, este resto arilo puede incluir uno o más sustituyentes tales como alquilo, alqueno, alquino, halógeno, hidroxilo, alcóxido, carboxilo, ciano, arilo, amino, amino sustituido, carbonilo, acilo, alcoxicarbonilo, nitro, mercapto o mercapto sustituido. Dos de estos sustituyentes pueden estar conectados entre sí formando un nuevo ciclo no aromático fusionado con el resto aromático.

El término "heteroarilo" se refiere a un arilo, tal y como se ha definido anteriormente, que adicionalmente contiene al menos un átomo distinto de carbono, tales como S, N u O, formando parte del anillo aromático.

5

Por "halógeno" se entiende en la presente invención a un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo.

Por "amino sustituido" se entiende a un grupo amino del tipo NHR o NRR', donde R y R' se seleccionan, independientemente de entre arilo, heteroarilo, alquilo, alquenilo o alquinilo. En el caso de NRR', R y R' pueden estar conectados entre sí formando un nuevo ciclo.

10

En un segundo aspecto, la invención describe cuatro opciones estructurales preferidas para el compuesto de la invención.

15

El compuesto de la invención en su opción preferida (a) es un compuesto de fórmula general (I) donde R⁴ es un grupo arilo, R², R³, R⁵ y R⁶ se seleccionan de forma independiente del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y heteroarilo; y, al menos, uno de los sustituyentes R¹ o R⁷ es un grupo (alcoxycarbonil)alquilo y el otro se selecciona de forma independiente entre hidrógenos, halógeno, alquilo, alquenilo, arilo y heteroarilo.

20

El compuesto de la invención en su opción preferida (b) es un compuesto de fórmula general (I) donde R⁴ es un grupo arilo, R¹, R³, R⁵, R⁶ y R⁷ se seleccionan de forma independiente entre el grupo formado hidrógeno, halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y heteroarilo; y R² es un grupo (alcoxycarbonil)alquilo.

25

El compuesto de la invención en su opción preferida (c) comprende un compuesto de fórmula general (I) donde R⁴ es un grupo alquilo, R¹, R², R⁵, R⁶ y R⁷ se seleccionan de forma independiente entre el grupo formado hidrógeno, halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y heteroarilo; y R³ es un grupo (alcoxycarbonil)alquilo.

30

El compuesto de la invención en su opción preferida (d) comprende un compuesto de fórmula general (I) donde R⁴ es un grupo (alcoxycarbonil)alquilo, y R¹, R², R³, R⁵, R⁶ y R⁷ se seleccionan de forma independiente entre el grupo formado hidrógeno, halógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y heterociclo.

35

En un tercer aspecto, la presente invención describe realizaciones preferidas para el compuesto (I) de la invención.

40

En una realización preferida, el compuesto de la invención se refiere a compuesto de fórmula general (I) y estructura (a), donde R⁴ es un grupo arilo opcionalmente sustituido, preferiblemente es un fenilo opcionalmente sustituido y, más preferiblemente, es un fenilo sustituido por alquilo C₁-C₆ y, aún más preferiblemente, es mesitilo (2,4,6- trimetilfenilo).

45

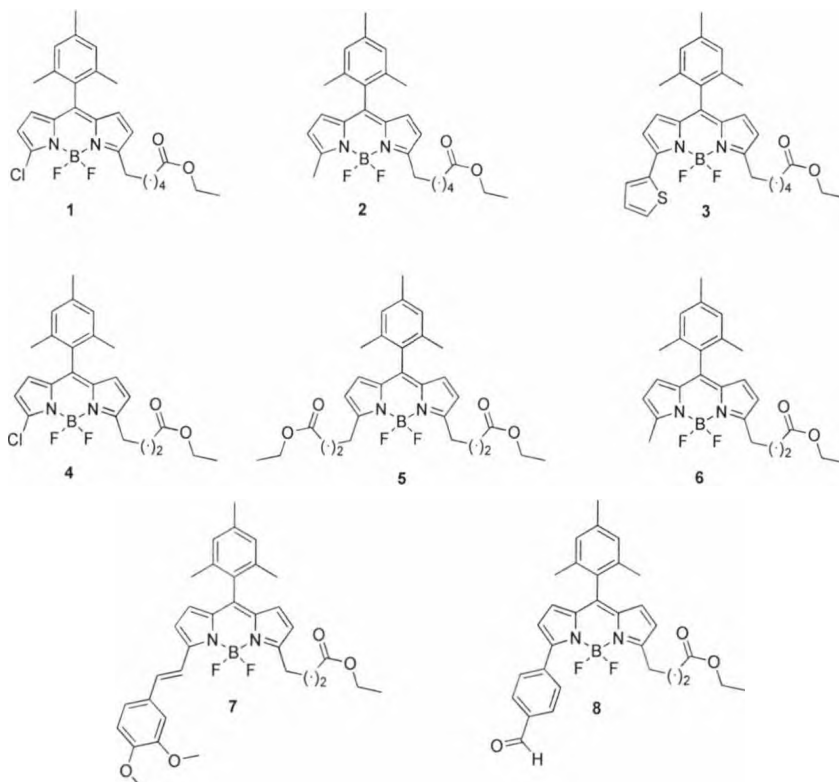
En una realización más preferida, el compuesto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) y estructura (a), donde R⁴ es mesitilo y R², R³, R⁵ y R⁶ se seleccionan de forma independiente del grupo formado por hidrógeno y alquilo C₁-C₆ y, más preferiblemente, de entre el grupo formado por hidrógeno y metilo; y, aún más preferiblemente, R², R³, R⁵ y R⁶ son hidrógeno.

50

En una realización más preferida, el compuesto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) y estructura (a) donde R⁴ es mesitilo, R², R³, R⁵ y R⁶ son hidrógeno y donde, al menos, uno de los sustituyentes R¹ o R⁷ es un grupo (alcoxycarbonil)alquilo con un grupo alquilo C₁-C₆ y un grupo alcoxilo C₁-C₆ y el otro de estos sustituyentes que no es

(alcoxicarbonil)alquilo se selecciona de forma independiente de entre el grupo formado por halógeno, alquilo, alquenilo, arilo y heteroarilo. De forma más especialmente preferida, al menos uno de los sustituyentes R^1 o R^7 es un grupo (alcoxicarbonil)alquilo con un grupo alquilo C_3 o C_5 y un grupo etoxicarbonilo; y el otro sustituyente se selecciona preferentemente de forma independiente de entre el grupo formado por cloro, metilo, 2-ariltenilo, arilo y tienilo.

En una realización especialmente preferida, el compuesto de la invención, tal y como se define en la estructura (a) se selecciona entre el grupo formado por los compuestos 1 a 8.

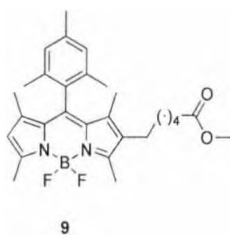


En otra realización preferida, el compuesto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) y estructura (b) donde R^4 es un arilo opcionalmente sustituido, preferiblemente un fenilo opcionalmente sustituido y, más preferiblemente, es fenilo sustituido por alquilo C_1 - C_6 y, aún más preferiblemente R^4 es mesitilo.

En una realización más preferida — el compuesto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) y estructura (b) donde R^4 es mesitilo, R^1 , R^3 , R^5 , R^6 y R^7 se seleccionan de forma independiente entre el grupo formado por hidrógeno y alquilo C_1 - C_6 y, más preferiblemente, R^1 , R^3 , R^5 y R^7 son metilo y R^6 es hidrógeno.

En una realización aún más preferida, el compuesto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) y estructura (b) donde R^4 es mesitilo, R^1 , R^3 , R^5 , R^6 y R^7 son metilo, R^6 es hidrógeno y R^2 es un grupo (alcoxicarbonil)alquilo con un grupo alquilo C_1 - C_6 y un grupo alcoxilo C_1 - C_6 . De forma especialmente preferida, R^2 es un grupo (alcoxicarbonil)alquilo con un grupo alquilo C_5 y un grupo metoxicarbonilo.

En una realización especialmente preferida, el compuesto de la invención de estructura (b) es el compuesto 9.

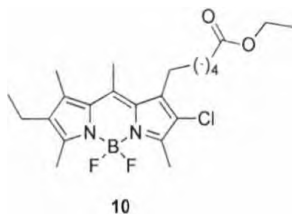


En otra realización preferida, el compuesto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) y estructura (c) donde R^4 es un grupo alquilo C_1-C_6 ; de forma preferente, es un grupo metilo.

5 En otra realización más preferida, el compuesto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) y estructura (c) donde R^4 es metilo y R^1 , R^2 , R^5 , R^6 y R^7 se seleccionan de forma independiente entre el grupo formado por hidrógeno, halógeno o alquilo C_1-C_6 ; de forma preferente R^1 , R^5 , R^6 y R^7 son alquilo C_1-C_2 y R^2 es cloro.

10 En una realización aún más preferida, el compuesto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) estructura (c) donde R^4 es metilo y R^1 , R^2 , R^5 , R^6 y R^7 son alquilo C_1-C_2 , R^2 es cloro y R^3 es un grupo (alcoxycarbonil)alquilo con un grupo alquilo C_5 y un grupo etoxycarbonilo.

15 En una realización especialmente preferida, el compuesto de la invención de estructura (c) es el compuesto 10.



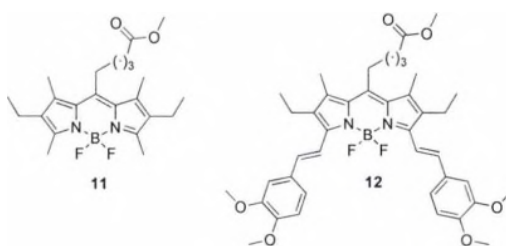
20 En otra realización preferida, el compuesto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) y estructura (d) donde R^4 es un grupo (alcoxycarbonil)alquilo con un grupo alquilo C_1-C_6 y un grupo alcoxilo C_1-C_6 ; de forma preferente R^4 es un grupo (alcoxycarbonil)alquilo con un grupo alquilo C_4 y un grupo metoxycarbonilo.

25 En otra realización más preferida, el compuesto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) y estructura (d) donde R^4 es un grupo (alcoxycarbonil)alquilo con un grupo alquilo C_4 y un grupo metoxycarbonilo y R^2 , R^3 , R^5 y R^6 se seleccionan de forma independiente de entre el grupo que consiste en alquilo C_1-C_6 y, más preferiblemente, entre el grupo que consiste en alquilo C_1-C_2 .

30 En una realización aún más preferida, el compuesto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) y estructura (d) donde R^4 es un grupo (alcoxycarbonil)alquilo con un grupo alquilo C_4 y un grupo metoxycarbonilo y R^2 , R^3 , R^5 y R^6 son alquilo C_1-C_2 y donde R^1 y R^7 se seleccionan de forma independiente entre el grupo que consiste en metilo y 2-(3,4-dimetoxifenil)etenilo.

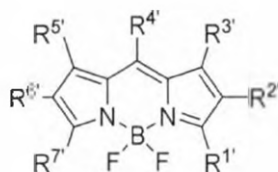
35 En una realización especialmente preferida, el compuesto de la invención de estructura (d) se selecciona entre los compuestos 11 y 12.

40



Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención del compuesto de fórmula (I), a partir de ahora “procedimiento de la invención”, que comprende dos metodologías:

- pre-funcionalización mediante síntesis directa de (I) a partir de pirroles convenientemente funcionalizados, y
- post-funcionalización, bien en otro compuesto de fórmula (I), bien en un 5 compuesto de fórmula (II).



(II)

donde, al menos, uno de los sustituyentes R^1 , R^2 , R^3 o R^7 es hidrógeno, halógeno o pseudohalógeno (trifluorometanosulfonato, acetato, etc.) y el resto de sustituyentes se seleccionan de forma independiente de entre el grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, alquilo, arilo, alquénilo, alquinilo y heteroarilo.

Una realización preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (a) y (c), comprende la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (II) donde al menos uno de los sustituyentes R^1 , R^3 o R^7 es halógeno o pseudohalógeno, preferiblemente halógeno, y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final de fórmula (I) en su opción (a) o (c) que se quiere sintetizar.

Una realización más preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (a) y (c), comprende la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (II), donde al menos uno de los sustituyentes R^1 , R^3 o R^7 es halógeno, y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final de fórmula (I) en su opción (a) o (c), mediante su acoplamiento, activado por un catalizador de paladio, con un compuesto organozincico basado en resto R y elegido preferentemente de entre el grupo formado por R_2Zn y R_2ZnX , donde R es un grupo (alcoxicarbonil)alquilo con grupo alquilo C_1-C_6 y un grupo alcoxilo C_1-C_6 , tal y como se definió para el compuesto (I) de la invención en sus opciones (a) o (c), y X un halógeno. Preferiblemente, el reactivo organozincico es bromuro de 4-etoxi-4-oxobutilzinc o bromuro de 6-etoxi-6-oxohexilzinc.

Una realización aún más preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (a) y (c), comprende la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (II), donde al menos uno de los sustituyentes R^1 , R^3 o R^7 es halógeno y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final del

formula (I) en su opción (a) o (c), mediante su reacción de acoplamiento con bromuro de 4-etoxi-4-oxobutilzinc o bromuro de 6-etoxi- 6-oxohexilzinc, en presencia de un catalizador basado en paladio(0) o paladio(II), soportado o encapsulado en una matriz sólida, y preferentemente seleccionado de entre el grupo formado por paladio(0),
 5 tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0), tris(dibencilindenacetona)dipaladio(0), bis(dibencilindenacetona)paladio(0), acetato de paladio(II), diclorobis(trifenilfosfina)paladio(II), bis(acetilacetato) de paladio(II), diclorobis(triciclohexilfosfina)paladio(II), cloro[(triciclohexilfosfina)-2-(2'-aminobifenil)]paladio(II). Preferiblemente, el catalizador de paladio se selecciona de entre el grupo formado por diclorobis(trifenilfosfina)paladio(II)
 10 ($\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$) y cloro[(triciclohexilfosfina)-2-(2'-aminobifenil)]paladio(II) ($(\text{PCy}_3)\text{PdG2}$).

En una realización aún más preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (a) y (c), comprende la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (II), donde al menos uno de los sustituyentes
 15 R^1 , R^3 o R^7 es halógeno, y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final de formula (I) en su opción (a) o (c), mediante su reacción de acoplamiento con bromuro de 4-etoxi-4-oxobutilzinc o bromuro de 6-etoxi- 6-oxohexilzinc, catalizada por $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ o $(\text{PCy}_3)\text{PdG2}$, y empleando preferentemente un disolvente orgánico elegido compatible de entre el grupo de disolventes orgánicos compatibles con la mencionada reacción de acoplamiento.
 20 Preferiblemente, el disolvente orgánico es tolueno.

En una realización especialmente preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (a) y (c), comprende la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (II), donde al menos uno de los sustituyentes
 25 R^1 , R^3 o R^7 es halógeno, y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final de formula (I) en su opción (a) o (c), mediante su reacción con bromuro de 4-etoxi-4-oxobutilzinc o bromuro de 6-etoxi-6-oxohexilzinc, catalizada por $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ o $(\text{PCy}_3)\text{PdG2}$, empleando tolueno como disolvente orgánico, y llevada a cabo a una temperatura comprendida entre 0 y 140 °C. Preferiblemente, la reacción tiene lugar a una temperatura comprendida entre 10 y 30 °C, y más preferiblemente en atmosfera inerte (por ejemplo de argón).
 30

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (b), comprende en primer lugar la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (II), donde R^2 es hidrógeno, y los restantes
 35 sustituyentes son iguales a los del compuesto final de formula (I) en su opción (b) que se quiere sintetizar.

Una realización más preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (b), comprende en primer lugar la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (II), donde R^2 es hidrógeno, y los restantes
 40 sustituyentes son iguales a los del compuesto final de formula (I) en su opción (b) que se quiere sintetizar, mediante su reacción de condensación con un haluro o anhídrido de ácido carboxílico basado en resto acilo RCO, donde R es un grupo (alcoxicarbonil)alquilo con un grupo alcóxido $\text{C}_1\text{-C}_6$ y un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$, y más preferentemente es cloruro de 6-metoxi-6-oxohexanoilo.
 45

Una realización aún más preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (b), comprende en primer lugar la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (II), donde R^2 es hidrógeno, y los restantes
 50 sustituyentes son iguales a los del compuesto final de formula (I) en su opción (b) que se quiere sintetizar, mediante su reacción de condensación con cloruro de 6-metoxi-6-oxohexanoilo activada por ácido de Lewis, preferentemente seleccionado de entre el grupo formado por tricloruro de aluminio, tribromuro de hierro, trifluoruro de boro, trifluoruro de boro eterato,

tetracloruro de titanio y tetracloruro de estaño. Preferiblemente, el ácido de Lewis es trifluoruro de boro eterato.

5 Una realización aún más preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (b), comprende en primer lugar la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (II), donde R^2 es hidrógeno, y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final de fórmula (I) en su opción (b), que se quiere sintetizar, mediante su reacción con cloruro de 6- metoxi-6-oxohexanoilo activada por trifluoruro de boro eterato y en presencia de un disolvente orgánico compatible con la
10 mencionada reacción de condensación. Preferiblemente, el disolvente orgánico es diclorometano.

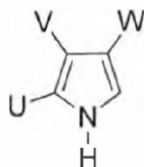
15 Una realización especialmente preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (b), comprende en primer lugar la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (II), donde R^2 es hidrógeno, y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final de fórmula (I) en su opción (b) que se quiere sintetizar, mediante su reacción de condensación con cloruro de 6-metoxi-6-oxohexanoilo activada por trifluoruro de boro eterato, usando diclorometano como disolvente a una temperatura comprendida entre 0 y 140 °C. Preferiblemente, la reacción tiene lugar a una
20 temperatura comprendida entre 0 y 30 °C, y más preferiblemente en atmosfera inerte (por ejemplo de argón).

25 El procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (b), comprende la posterior reducción selectiva de un compuesto de fórmula (II) donde R^2 es un grupo [(alcoxycarbonil)alquil]carbonilo con un grupo alcoxilo C_1-C_6 y un grupo alquilo C_1-C_5 , tal y como se definió para el compuesto (I) de la invención en su opción (b), y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final de fórmula (I) en su opción (b) que se quiere sintetizar, mediante su reacción con un agente reductor quimioselectivo preferentemente seleccionado de entre el grupo formado por borohidruro
30 sódico, zinc(0) amalgamado con mercurio en medio ácido, trietilsilano, cianoborohidruro sódico, acetato de níquel (II) y cobre(0) en medio ácido. Preferiblemente, el agente reductor es cianoborohidruro sódico, y más preferiblemente la reacción de reducción esta activada con un ácido de Lewis compatible con la mencionada reacción de reducción. Preferiblemente, el ácido de Lewis es yoduro de zinc.

35 En una realización preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (b), comprende la posterior reducción selectiva de un compuesto de fórmula (II) donde R^2 es un grupo [(alcoxycarbonil)alquil]carbonilo con un grupo alcoxilo C_1-C_6 y un grupo alquilo C_1-C_5 , y los restantes sustituyentes son iguales a
40 los del compuesto final del fórmula (I) en su opción (b) que se quiere sintetizar, mediante su reacción de reducción quimioselectiva con cianoborohidruro sódico en presencia de yoduro de zinc, preferiblemente llevada a cabo en un disolvente orgánico compatible con dicha reacción de reducción. Preferiblemente, el disolvente orgánico es 1,2-dicloroetano.

45 En una realización más preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (b), comprende la posterior reducción selectiva de un compuesto de fórmula (II) donde R^2 es un grupo [(alcoxycarbonil)alquil]carbonilo con un grupo alcoxilo C_1-C_6 y un grupo alquilo C_1-C_5 , y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final de fórmula (I) en su opción (b) que se quiere sintetizar, mediante su
50 reacción de reducción quimioselectiva con cianoborohidruro sódico en presencia de yoduro de zinc, en 1,2-dicloroetano como disolvente, y preferentemente a una temperatura comprendida entre 0 y 140 °C. Preferiblemente, la reacción tiene lugar a una temperatura de 25 °C, y más preferiblemente en atmósfera inerte (por ejemplo de argón).

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (d), comprende pre- funcionalización, mediante la síntesis de un compuesto de fórmula (I) a partir de pirroles de formula general (III),



(III)

5 Donde U se elige independientemente del grupo formado por R^1 y R^7 , tal y como se definen para el compuesto (I) de la invención en su opción (d), V se elige independientemente del grupo formado por R^2 y R^6 , tal y como se definen para el compuesto (I) de la invención en su opción (d) y, W se elige independientemente del grupo formado por R^3 y R^5 , tal y como se definen para el compuesto (I) de la invención en su opción (d), a través de la previa obtención de un derivado dipirrometénico, convenientemente funcionalizado, mediante la condensación de dos pirroles (III), iguales o distintos, con un derivado de ácido carboxílico basado en resto orgánico R^4 , donde R^4 es un grupo (alcoxicarbonil)alquilo con un grupo alquilo C_1-C_6 y un grupo alcoxilo C_1-C_6 , tal y como se definió para el compuesto (I) de la invención en su opción (d), siendo dicho derivado de ácido carboxílico capaz de promover procesos de acilación en compuestos aromáticos mediante reacción de sustitución electrófila aromática. Preferiblemente, los dos equivalentes de pirrol (III) que intervienen en la condensación son iguales, y aún más preferiblemente el pirrol (III) es 3-etil-2,4-dimetilpirrol. Por otro lado, preferiblemente el derivado de ácido carboxílico es un haluro de ácido carboxílico, R^4COX , donde X es un átomo de halógeno, y más preferiblemente es cloruro de 6- metoxi-6-oxohexanoilo.

25 En una realización más preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (d), comprende la previa condensación de 3-etil-2,4-dimetilpirrol con cloruro de 6-metoxi-6-oxohexanoilo en un disolvente orgánico compatible con la reacción de condensación. Preferiblemente, el disolvente orgánico es diclorometano.

30 En una realización aún más preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (d), comprende la previa condensación de 3-etil-2,4-dimetilpirrol con cloruro de 6-metoxi-6-oxohexanoilo en un disolvente orgánico compatible con la reacción de condensación. Preferiblemente, el disolvente orgánico es diclorometano, y preferentemente a una temperatura comprendida entre 0 y 140°C. 35 Preferiblemente, la reacción tiene lugar a una temperatura de 50 °C, y más preferiblemente en atmósfera inerte (por ejemplo de argón).

40 El procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (d), comprende la posterior complejación del derivado dipirrometénico anteriormente obtenido con trifluoruro de boro eterato, preferiblemente en presencia de una base poco nucleófila. Preferiblemente, esta base es una amina terciaria seleccionada de entre el grupo formado por trimetilamina, trietilamina, disopropilmetilamina y etil(disopropil)amina, y más preferiblemente, la amina es trietilamina.

45 En una realización más preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (d), comprende la posterior complejación del derivado dipirrometénico con trifluoruro de boro eterato en presencia de

triethylamina, y en un disolvente orgánico, compatible con la reacción de complejación, a una temperatura comprendida entre 0 y 30 °C. Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo en diclorometano como disolvente y a temperatura ambiente, y más preferiblemente en atmósfera inerte (por ejemplo de argón).

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (d), donde al menos uno de los restos R^1 y R^7 es un grupo 2-ariletenilo, comprende la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (I), donde al menos uno de los restos R_1 y R_7 es un grupo metilo, mediante su reacción de condensación con un aldehído aromático, preferiblemente elegido de entre el grupo formado por benzaldehído o benzaldehído sustituido, preferiblemente el aldehído es 3,4-dimetoxibenzaldehído. Preferiblemente, esta condensación está catalizada por un ácido, preferiblemente seleccionado de entre el grupo formado por ácido fórmico, ácido acético y ácido propanoico; o por una base, preferiblemente seleccionada de entre el grupo formado por trietilamina, 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 ácido acético.

En otra realización más preferida del procedimiento de la invención, dirigida a la preparación del compuesto (I) de la invención tal y como se define en (d), donde al menos uno de los restos R^1 y R^7 es un grupo 2-ariletenilo, comprende la post-funcionalización de un compuesto de fórmula (I), donde al menos uno de los restos R^1 y R^7 es un grupo metilo, mediante su reacción de condensación con 3,4-dimetoxibenzaldehído catalizada por mezcla piperidina/ácido acético, y llevada a cabo en un disolvente orgánico compatible con dicha reacción de condensación a una temperatura comprendida entre 20 y 140 °C. Preferiblemente, la reacción se lleva a cabo en *N,N*-dimetilformamida como disolvente, más preferiblemente a 120 °C, aún más preferiblemente bajo irradiación de microondas, y de forma especialmente preferida en un atmósfera inerte (por ejemplo de argón).

Finalmente, tras su obtención, el compuesto (I) de la invención puede ser purificado por 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 en esta cromatografía es gel de sílice.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto (I) 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 GL, preferiblemente de células vivas, y aún más preferiblemente en células vivas de mamíferos. De manera especialmente preferente, las células a marcar o a tratar mediante terapia fotodinámica son humanas, preferentemente de naturaleza cancerosa.

Por tanto, un sexto aspecto de la presente invención comprende el uso del compuesto (I) de la invención para el desarrollo y fabricación de marcadores para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con anomalías en GL, tales como proliferación del virus de la hepatitis C, diabetes tipo-2, obesidad o cáncer.

En un uso preferido, los compuestos de fórmula (I) pueden ser empleados de forma directa, o unidos covalentemente, o supramolecularmente, a un sistema químico que mejore su biocompatibilidad y biodistribución; preferiblemente este sistema es una biomolécula, y más preferentemente seleccionada de entre el grupo que consiste en aminoácido, péptido, proteína, lípido, carbohidrato, ácido nucleico y toxina. En 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 preferiblemente la luz es luz láser.

Un último aspecto de la presente invención comprende, por tanto, una nueva estrategia para conseguir potenciar la actividad en agentes teragnósticos basados en terapia fotodinámica y en diagnóstico mediante bioimagen fluorescente, consistente en la acumulación específica del agente teragnóstico en GL.

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.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el marcaje de células HeLa con los compuestos 2, 3 (0.1 μM y 24 h incubación) y 11 (5 μM y 24 h incubación) y con el marcador comercial de gotas lipídicas BODIPY497/503 (40 μM y 10 min de incubación). Se muestra la señal bajo excitación verde y azul. Barra de escala: 10 μm .

La Figura 2 muestra el porcentaje de viabilidad de células HeLa tras los tratamientos con los compuestos 2, 3 y 11 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.

Realización preferente de la invención

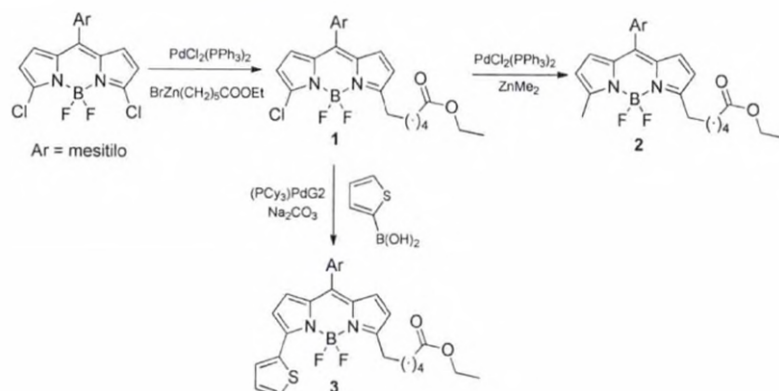
A continuación se ilustra la invención mediante ejemplos de obtención de varios colorantes de la invención, así como su evaluación como marcadores fluorescentes de GL en células vivas de origen tumoral, y como agentes fotocitotóxicos para la destrucción eficiente de las células así marcadas.

SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA (I)

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 productos se han purificado mediante cromatografía en columna flash, utilizando gel de sílice Merck 60 (230-400 mesh), los eluyentes empleados se especifican en cada caso y las proporciones indican la relación volumen:volumen. Todos los productos aislados se han identificado atendiendo a sus datos espectroscópicos y/o analíticos. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se han registrado a 20 °C, y el pico residual de disolvente se ha utilizado como patrón interno. 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 se han obtenido a partir de muestras puras usando la técnica ATR. La espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, High Resolution Mass Spectrometry) se ha realizado utilizando la técnica EI.

Ejemplo 1. Síntesis de los compuestos 1, 2 y 3

La preparación de los compuestos 1,2 y 3 se lleva a cabo a través de las rutas sintéticas mostradas en el esquema 1, ilustrando el procedimiento basado en la metodología de la post-funcionalización descrito en esta invención.



Esquema 1

Así, la introducción del grupo (etoxicarbonil)alquilo en la posición 3 del BODIPY se lleva a cabo mediante post-funcionalización en un cloroBODIPY de partida mediante reacciones de acoplamiento de Negishi catalizadas por paladio. Para ello, se utiliza la metodología descrita por nuestro grupo de investigación para este tipo de acoplamientos en haloBODIPY (E. Palao, G. Duran-Sampedro, S. de la Moya, M. Madrid, C. García- López, A. R. Agarrabeitia, B. Verbelen, W. Dehaen, N. Boens, M. J. Ortiz, *J. Org. Chem.* 2016, 87, 3700). Además, para conseguir desplazamiento espectral hacia la zona roja 25 del espectro visible (colorante 3), se ha utilizado también una reacción de acoplamiento catalizada por paladio, concretamente una reacción de Suzuki.

Procedimiento general para la reacción de Negishi: En un tubo Schlenk, provisto de agitación magnética y sometido a tres ciclos consecutivos de vacío y corriente de argón, se introduce, bajo atmósfera de argón, el haloBODIPY correspondiente (1 mol equiv) en tolueno anhidro y se añade $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (10% mol equiv). La mezcla de reacción se agita durante 5 min a temperatura ambiente y, a continuación, se adiciona el correspondiente organozincico (2-5 mol equiv), y se deja agitando el periodo de tiempo que se especifica en cada caso. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se filtra para eliminar el catalizador, y el producto obtenido se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente mezclas de distinta polaridad que se especifican en cada caso.

3-Cloro-5-(6-etoxi-4-oxohexil)-4,4-difluoro-8-mesitil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno(1):

Siguiendo el procedimiento general de reacción de Negishi, se hacen reaccionar 3,5-dicloro-8-mesitilBODIPY (T. Sakida, S. Yamaguchi, H. Shinokudo, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 2280) (50 mg, 0.132 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (9 mg, 0.013 mmol) y 0.5 M $\text{BrZn}(\text{CH}_2)_5\text{COOEt}$ en THF (1.3 mL, 0.660 mmol) en tolueno anhidro (2 mL) durante 90 min. Cromatografía flash sobre gel de sílice (hexano/AcOEt, 95:5) da lugar al compuesto de partida inalterado (15 mg, 30%), y 1 (40 mg, 62%) como un sólido marrón. ^1H RMN (700 MHz, CDCl_3) δ 6.93 (s, 2H, 2CH), 6.62 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, CH), 6.44 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, CH), 6.36 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, CH), 6.26 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, CH), 4.12 (c, $J = 7.0$ Hz, 2H, CH_2O), 3.07 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH_2), 2.34 (s, 3H, CH_3), 2.32 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH_2), 2.09 (s, 6H, 2 CH_3), 1.79 (q, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH_2), 1.70 (q, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH_2), 1.49 (q, $J = 7.7$ Hz, 2H, CH_2), 1.25 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, CH_3) ppm. ^{13}C RMN (176 MHz, CDCl_3) δ 173.7 (COO), 166.3, 142.9, 140.2, 138.8, 136.6, 135.6, 133.0, 131.5 (CH), 129.1, 128.2 (CH), 127.4 (CH), 120.0 (CH), 116.8 (CH), 60.3 (CH_2O), 34.2 (CH_2), 29.1 (CH_2), 29.0 (CH_2), 28.1 (CH_2), 24.8 (CH_2), 21.1 (CH_3), 20.0 (CH_3), 14.3 (CH_3) ppm. FTIR ν 2928, 2862, 1730, 1562, 1408, 1329, 1267, 1102, 1045, 970 cm^{-1} . HRMS-EI m/z 486.2051 (486.2057 calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{BClF}_2\text{N}_2\text{O}_2$).

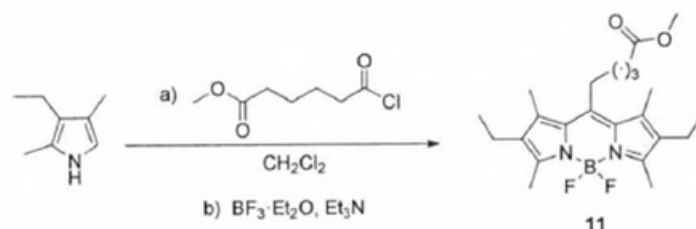
3-(6-Etoxi-4-oxohexil)-4,4-difluoro-8-mesitil-5-metil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno(2): Siguiendo el procedimiento general de reacción de Negishi, se hacen reaccionar 1 (52 mg, 0.106 mmol),

PdCl₂(PPh₃)₂ (8 mg, 0.011 mmol) y 1.2 M ZnMe₂ (0.22 mL, 0.265 mmol) en tolueno anhidro (2 mL) durante 60 min. Cromatografía flash sobre gel de sílice (hexano/AcOEt, 95:5) da lugar a 2 (37 mg, 75%) como un sólido marrón. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 6.92 (s, 2H, 2CH), 6.48 (d, J = 4.2 Hz, 1H, CH), 6.46 (d, J = 4.2 Hz, 1H, CH), 6.24 (d, J = 4.2 Hz, 1H, CH), 6.19 (d, J = 4.2 Hz, 1H, CH), 4.12 (c, J = 7.2 Hz, 2H, CH₂O), 3.03 (t, J = 7.8 Hz, 2H, CH₂), 2.63 (s, 3H, CH₃), 2.34 (s, 3H, CH₃), 2.32 (t, J = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 2.09 (s, 6H, 2CH₃), 1.83-1.66 (m, 4H, 2CH₂), 1.54-1.44 (m, 2H, CH₂), 1.25 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 173.7 (COO), 162.0, 157.5, 142.4, 138.3, 136.6, 134.7, 134.5, 130.1, 129.0 (CH), 128.9 (CH), 128.0 (CH), 119.3 (CH), 117.6 (CH), 60.2 (CH₂O), 34.3 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.7 (CH₂), 28.2 (CH₂), 24.8 (CH₂), 21.1 (CH₃), 20.0 (CH₃), 14.9 (CH₃), 14.3 (CH₃) ppm. FTIR v 2926, 2860, 1733, 1560, 1272, 1142, 1125, 1089, 999 cm⁻¹. HRMS-EI m/z 466.2597 (466.2603 calculado para C₂₇H₃₃BF₂N₂O₂).

3-(6-Etoxi-4-oxohexil)-4,4-difluoro-8-mesitil-5-(tien-2-il)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (3): A una solución del BODIPY 1 (21 mg, 0.044 mmol) en tolueno anhidro (3 mL) se adicionan, bajo atmósfera de argón, ácido 2-tienilborónico (17 mg, 0.132 mmol), Na₂CO₃ disuelto en H₂O (1 mL, 1 M) y (PCy₃)PdG2 (1 mg, 0.002 mmol), y la mezcla de reacción se mantiene a 100 °C durante 4.5 horas. Transcurrido este tiempo, se filtra el crudo de reacción, se extrae con CH₂Cl₂ y se lava con H₂O. La fase orgánica se seca sobre MgSO₄, el desecante se elimina por filtración y el disolvente a presión reducida. Cromatografía flash sobre gel de sílice (hexano/CH₂Cl₂, 8:2) da lugar a 3 (12 mg, 50%) como un sólido morado, y compuesto de partida inalterado 1 (5 mg, 23%). ¹H RMN (700 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (d, J = 3.5 Hz, 1H, CH), 7.45 (d, J = 4.9 Hz, 1H, CH), 7.18 (t, J = 4.2 Hz, 1H, CH), 6.94 (s, 2H, 2CH), 6.67 (d, J = 4.2 Hz, 1H, CH), 6.53 (d, J = 4.2 Hz, 1H, CH), 6.51 (d, J = 4.9 Hz, 1H, CH), 6.31 (d, J = 4.2 Hz, 1H, CH), 4.12 (c, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂O), 3.09 (t, J = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 2.36 (s, 3H, CH₃), 2.35 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 2.12 (s, 6H, 2CH₃), 1.79 (q, J = 7.7 Hz, 2H, 2CH₂), 1.71 (q, J = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.50 (q, J = 7.7 Hz, 2H, CH₂), 1.25 (t, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃) ppm. ¹³C RMN (176 MHz, CDCl₃) δ 173.8 (COO), 163.2, 149.3, 141.8, 138.4, 136.8, 136.3, 134.8, 134.4, 130.5 (CH), 130.2, 129.2 (CH), 128.9 (CH), 128.6 (CH), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 119.6 (CH), 118.7 (CH), 60.2 (CH₂O), 34.2 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.8 (CH₂), 28.1 (CH₂), 24.8 (CH₂), 21.1 (CH₃), 20.0 (CH₃), 14.3 (CH₃) ppm. FTIR v 2925, 2855, 1734, 1570, 1465, 1372, 1269, 1125, 1039 cm⁻¹. HRMS-EI m/z 534.2320 (534.2324 calculado para C₃₀H₃₃BF₂N₂O₂S).

Ejemplo 3. Síntesis del compuesto 11

La preparación del compuesto 11 se lleva a cabo a través de la ruta sintética mostrada en el esquema 2, ilustrando el procedimiento basado en la metodología de la pre-funcionalización descrito en esta invención.



Esquema 2

2,6-Dietil-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametil-8-(5-metoxi-5-oxopentil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (11): A una solución de cloruro de 6-metoxi-6-oxohexanoilo* (175 mg, 0.97 mmol) en CH₂Cl₂ (15 mL) se adiciona, bajo atmósfera de argón, 3-etil-2,4-dimetilpirrol (0.33 mL, 2.44 mmol), y la mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 3 h. Transcurrido este tiempo, se deja que la reacción alcance la temperatura ambiente y se adiciona Et₃N (0.7 mL, 4.88 mmol), pasados 15

min, se añade $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$ (0.6 mL, 4.88 mmol), manteniendo la agitación durante 2 h. Después, se elimina el disolvente a presión reducida, el crudo de reacción se disuelve en AcOEt y se lava con una disolución acuosa de HCl (10%) y H_2O . La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 el desecante se elimina por filtración y el disolvente a presión reducida. Cromatografía flash sobre gel de sílice (hexano/ CHCl_3 , 95:5) da lugar a 11 (120 mg, 30%) como un sólido naranja. ^1H RMN (300 MHz) δ 3.67 (s, 3H, CH_3O), 3.03-2.98 (m, 2H, CH_2), 2.49 (s, 6H, 2 CH_3), 2.40 (t, J = 7.2 Hz, 2H, CH_2), 2.40 (c, J = 7.5 Hz, 4H, 2 CH_2), 2.33 (s, 6H, 2 CH_3), 1.88-1.78 (m, 2H, CH_2), 1.72-1.63 (m, 2H, CH_2), 1.04 (t, J= 7.5 Hz, 6H, 2 CH_3) ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 173.7 (COO), 152.2, 144.0, 135.6, 132.7, 130.9, 51.7 (CH_3O), 33.6 (CH_2), 31.2 (CH_2), 28.2 (CH_2), 25.3 (CH_2), 17.2 (CH_2), 14.9 (CH_3), 13.3 (CH_3), 12.4 (CH_3) ppm. FTIR v 2925, 2855, 1741, 1548, 1472, 1331, 1264, 1198, 1071, 982 cm^{-1} . HRMS-EI m/z 418.3356 (418.3358 calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_2$).

**Síntesis de cloruro de 6-metoxi-6-oxohexanoilo:* A una solución de ácido 6-metoxi-6-oxohexanoico (0.012 mL, 0.11 mmol) en CH_2Cl_2 (2 mL) se adiciona, en atmósfera de argón, cloruro de tionilo (0.035 mL, 0.44 mmol). La mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 20 min y, a continuación, se elimina el exceso de cloruro de tionilo y el disolvente a presión reducida. El compuesto obtenido se utiliza sin posterior purificación.

EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS 1, 2, 3 y 11

Ejemplo 3. Evaluación como marcadores fluorescentes eficientes de GL (compuestos 2, 3 y 11)

Para la evaluación se han utilizado células HeLa (procedentes de un adenocarcinoma de cérvix humano). Las células se han crecido como cultivos en monocapa en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) suplementado con un 10% (v/v) de suero fetal bovino, 50 U/mL de penicilina y 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomycin. Todos los productos se han esterilizado mediante filtros con un tamaño de poro de 0.22 μm . Las células se mantuvieron en un incubador en una atmósfera con un 5% de CO_2 , a una temperatura de 37 $^\circ\text{C}$ y con una humedad del 95%. Para realizar los experimentos, las células se crecieron sobre cubreobjetos de cristal en placas de 24 pocillos. Cuando las células alcanzaron un nivel de confluencia de aproximadamente el 50%, el medio de cultivo se sustituyó por diluciones de los compuestos 2, 3 y 11 (0.1 μM para los compuesto 2 y 3, y 5 μM para el compuesto 11) en medio de cultivo, y se incubaron durante 24 h en el incubador. Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados con medio de cultivo y se colocaron los cubreobjetos, aún húmedos, sobre portaobjetos para su observación. Para la observación de las células se empleó un microscopio de epifluorescencia Olympus BX61 equipado con una cámara digital Olympus DP50.

Resultados: Todos los compuestos probados fueron eficientemente internalizados por las células Hela presentando excelentes propiedades como marcadores fluorescentes. En todos los casos, la intensidad y definición del marcaje fue muy elevada, así como el tiempo de mantenimiento de la señal bajo la excitación intensa del microscopio. En el caso de los compuesto 2 y 11, se pudo detectar señal fluorescente con los filtros de excitación verde y azul, mientras que el marcaje con el compuesto 3 solo era visible bajo excitación verde. El patrón de localización subcelular de los compuestos 2, 3 y 11 fue muy similar, en forma de gránulos de tamaño y forma muy regulares, distribuidos por todo el citoplasma y ausentes en el núcleo celular. Este patrón morfológico corresponde con el descrito para GL, lo que se corroboró mediante tinción de células HeLa con el marcador de GL BODIPY497/503 (40 μM y 10 min incubación), obteniendo un patrón de distribución totalmente similar al obtenido con los compuestos 2, 3 y 11. No se pudieron realizar experimentos de co-localización debido a la superposición de los espectros de absorción/emisión del marcador comercial con los de los compuestos 2, 3 y 11.

En la figura 1 se muestran las imágenes de localización mediante el uso de los compuestos 2, 3 y 11, así como las obtenidas mediante el uso del marcador comercial BODIPY497/503.

Ejemplo 4. Evaluación como agentes fotocitotóxicos eficientes por acumulación selectiva en GL (compuestos 2, 3 y 11).

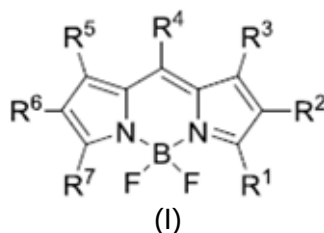
Para la evaluación se utilizaron células HeLa. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se incubaron con distintas concentraciones de los compuestos seleccionados a distintas concentraciones (1, 2.5, 5, 7.5 y 10 μM), diluidos en medio de cultivo. Tras 24 h de incubación, las células se lavaron tres veces con medio de cultivo y se irradiaron 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 mantuvieron en el incubador durante 24 h, y se evaluó la supervivencia celular mediante el ensayo de citotoxicidad del MTT. Para ello, las células se incubaron durante 3 h con una solución 50 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto MTT. Trascurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se añadió dimetilsulfóxido para solubilizar el formazán formado por la reducción del MTT. Se midió la absorbancia de cada pocillo a 542 nm y se obtuvo el porcentaje de supervivencia celular en 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 realizaron los mismos experimentos en ausencia de irradiación para evaluar la toxicidad de los compuestos en oscuridad.

Resultados: Todos los compuestos probados mostraron excelentes propiedades fototóxicas, llegando a inducir, en todos los casos, un descenso de la viabilidad superior al 90% en alguna de las condiciones experimentales seleccionadas. Además, se comprobó que la toxicidad de todos los compuestos en ausencia de irradiación (lo que se conoce en terapia fotodinámica como dark toxicity) era prácticamente nula. Esta es una condición indispensable para cualquier agente para terapia fotodinámica, ya que evita efectos secundarios al limitar la toxicidad del compuesto a la zona de irradiación.

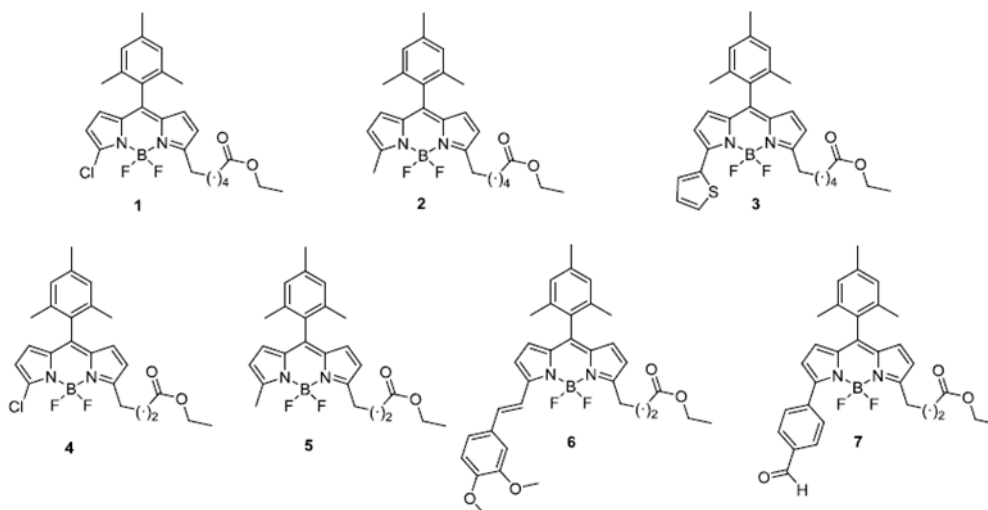
En la figura 2 se muestran los resultados de viabilidad de las células HeLa tras la incubación con cada uno de los compuestos seleccionados, tanto en oscuridad (barras grises) como en presencia de 10.3 J/cm² de irradiación verde (barras rayadas). Estos resultados demuestran que los compuestos desarrollados, en presencia de una dosis de luz adecuada, generan un alto porcentaje de muerte en células tumorales de origen humano, a la vez que mantienen una toxicidad mínima o nula en condiciones de oscuridad.

REIVINDICACIONES

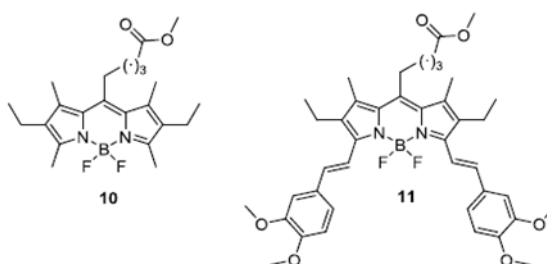
1. Compuesto de fórmula general (I) donde los sustituyentes R^1 o R^7 del esqueleto boradiazaindacénico de (I) es un grupo (alcoxicarbonil)alquilo que comprende un grupo alquilo C_3 o C_5 y un grupo etoxycarbonilo y el otro R^1 o R^7 que no es (alcoxicarboxinil)alquilo se selecciona de entre el grupo formado por cloro, metilo, 2-arilenetilo, arilo y tienilo, R^2 , R^3 , R^5 y R^6 son hidrógeno y R^4 es un grupo arilo opcionalmente sustituido.



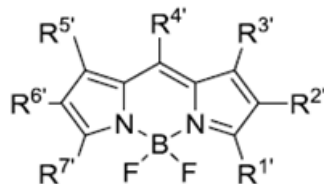
2. Compuesto, según reivindicación 1, donde R^4 es 2,4,6-trimetilfenilo (mesitilo).
3. Compuesto de fórmula general (I), según reivindicación 2, donde el compuesto se selecciona de entre los compuestos de fórmula 1 a 7.



4. Compuesto de fórmula general (I) donde el sustituyente R^4 del esqueleto boradiazaindacénico de (I) es un grupo (alcoxicarbonil)alquilo con un grupo alquilo C_4 y un grupo metoxycarbonilo, los sustituyentes R^1 y R^7 son 2-(3,4-dimetoxifenil)etenilo.
5. Compuestos, según reivindicación 4, de fórmula 10 y 11.



6. Procedimiento de obtención de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una reacción de acoplamiento de Negishi entre un compuesto de fórmula (II) y un reactivo organozíncico, en presencia de un catalizador de paladio,



(II)

- 5 donde al menos uno de los sustituyentes $R^{1'}$, $R^{3'}$ y/o $R^{7'}$ es halógeno o pseudohalógeno y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final.
- 10 7. Procedimiento de obtención de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una reacción de Suzuki entre un compuesto de fórmula (II) y un ácido borónico o derivado de ácido borónico, en presencia de una base y un catalizador de paladio, donde $R^{7'}$ es un halógeno o pseudohalógeno y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final de fórmula (I).
- 15 8. Procedimiento de obtención de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, que comprende una reacción de condensación entre un cloruro de ácido que presenta un grupo (alcoxicarbonil)alquilo y un derivado de pirrol, seguido de complejación con trifluoruro de boro eterato.
- 20 9. Procedimiento de obtención de compuestos, según cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, que comprende post-funcionalización de un compuesto de fórmula (I) donde, al menos, uno de los grupos R^1 y R^7 es metilo, mediante su reacción con un aldehído aromático, y los restantes sustituyentes son iguales a los del compuesto final el cual es un compuesto de fórmula (I) donde, al menos, uno de los grupos R^1 y R^7 es un grupo 2-arileténilo.
- 25 10. Marcador (sonda) fluorescente que comprende un compuesto según reivindicaciones 1 a 5.
11. Marcador (sonda) fluorescente, según reivindicación 10, donde el marcaje es celular.
- 30 12. Marcador (sonda) fluorescente, según la reivindicación 11, donde el marcaje celular se realiza sobre gotas lipídicas.
13. Marcador (sonda) fluorescente, según reivindicación 12, donde el marcaje se realiza en células vivas.
- 35 14. Marcador, según reivindicación 10, unido covalentemente, o supramolecularmente, a un sistema químico seleccionado de entre el grupo que consiste en aminoácido, péptido, proteína, lípido, carbohidrato, ácido nucleico y toxina.
- 40 15. Marcador, según reivindicaciones 10 y 14, para su uso en la obtención de imágenes en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con anomalías en gotas lipídicas, tales como proliferación del virus de la hepatitis C, diabetes tipo-2, 25 obesidad o cáncer.
- 45 16. Marcador, según reivindicación 10, para su uso como agente fotocitotóxico.
17. Marcador, según reivindicación 10, para su uso en el tratamiento mediante terapia fotodinámica de células humanas.

18. Uso, según reivindicación 17, donde las células humanas son células de naturaleza cancerosa.
- 5 19. Agente teragnóstico que usa gotas lipídicas (GL) como dianas terapéuticas caracterizado porque comprende, al menos, un compuesto según reivindicaciones P201900017
- 10 20. Método para potenciar la actividad fotocitotóxica de un agente fotocitotóxico minimizando la pérdida de capacidad fluorescente que consiste en acumular específicamente el agente teragnóstico, según reivindicación 19, en gotas lipídicas.

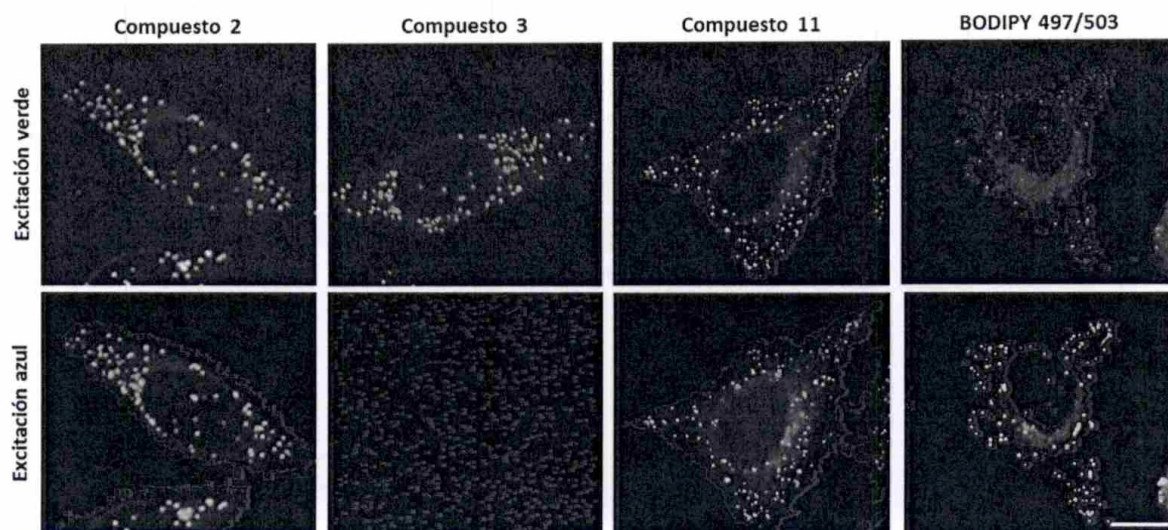


Figura 1

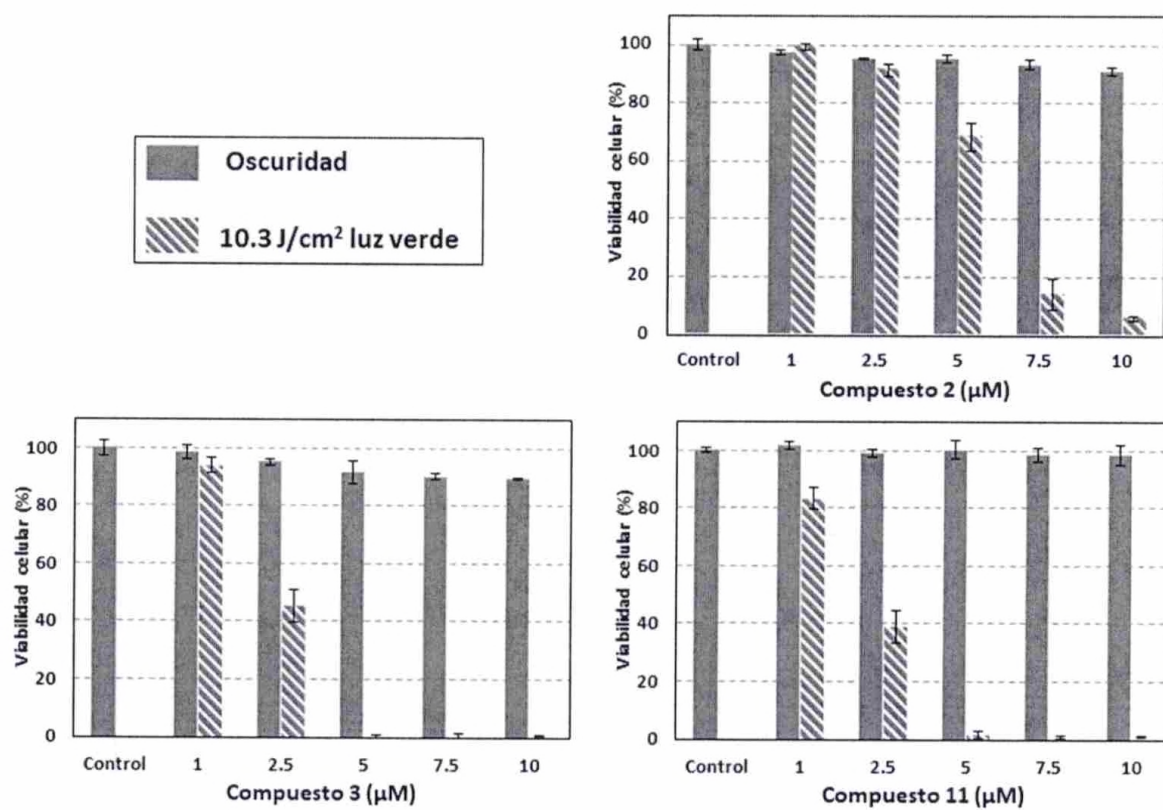


Figura 2