

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 357**

21 Número de solicitud: 201930893

51 Int. Cl.:

**C07D 209/12** (2006.01)

**C07H 15/26** (2006.01)

**G01N 33/52** (2006.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**10.10.2019**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**28.11.2019**

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA  
(90.0%)**

**Servicio de Promoción y Apoyo a Investigación,  
Innovación y Transferencia (I2T) Edificio Nexus  
(6G) Camí de Vera, s/n**

**46022 Valencia ES y**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRINCIPE FELIPE  
(10.0%)**

72 Inventor/es:

**LOZANO TORRES, Beatriz;**

**BLANDEZ BARRADAS, Juan Francisco;**

**MARTÍNEZ MAÑEZ, Ramón;**

**GALIANA GUILLEM, Irene;**

**GARCÍA FERNÁNDEZ, Alba;**

**SANCENÓN GALARZA, Félix y**

**ORZÁEZ CALATAYUD, Mar**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **COMPUESTO PARA LA DETECCIÓN DE CÉLULAS SENESCENTES Y USO DEL MISMO**

57 Resumen:

Compuesto para la detección de células senescentes y uso del mismo.

La invención se refiere a un compuesto o sonda de detección que presenta una alta actividad diurética y se encuentra constituida por una unidad de señalización (fluoróforo) provista de grupos funcionales con carga negativa (grupos aniónicos). Unida a la unidad de señalización mediante enlace covalente directo se encuentra la unidad de reconocimiento que consiste en un sacárido. La invención se extiende también al uso del compuesto como sonda de detección de células senescentes en la orina.

ES 2 733 357 A1

## DESCRIPCIÓN

### Compuesto para la detección de células senescentes y uso del mismo

En la presente invención se describe un compuesto, también denominado sonda o herramienta de diagnóstico, para la detección de células senescentes a través de la orina logrando una cuantificación de la senescencia celular. La presente invención se encuadra, por tanto, en el campo de la medicina y, más particularmente, en las herramientas de diagnóstico.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El principal papel de la senescencia celular es la prevención de la proliferación de células dañadas o estresadas y su posterior eliminación. Por otro lado, la senescencia celular actúa como detonante para la activación de procesos de reparación y regeneración de tejidos dañados o durante el proceso embrionario, lo cual indica que la presencia de células senescentes puede también suponer un beneficio para el sistema biológico. Sin embargo, estos procesos de reparación de tejidos se pueden volver ineficientes cuando existe una persistencia del daño celular o durante el envejecimiento. Esta insuficiencia permite que las células senescentes se acumulen sobre tejidos u órganos dañados, lo cual promueve inflamaciones locales, el envejecimiento y destrucción de tejidos, la formación de tumores e incluso la generación de metástasis. Se ha demostrado que la eliminación selectiva de células senescentes mediante apoptosis celular (senolisis) promueve la mejora de una gran variedad de enfermedades asociadas a la presencia de células senescentes, revirtiendo los síntomas de las mismas y mejorando la calidad y esperanza de vida de los individuos. De hecho, se han llevado a cabo estudios en modelos murinos donde se ha corroborado la eficacia de los procesos de senolisis para la eliminación y mejora de los síntomas de enfermedades como disfunción renal, fibrosis pulmonar, hipertrofia o sarcopenia. En la bibliografía se encuentra descrito que ciertas moléculas de pequeño tamaño presentan efectos terapéuticos para múltiples enfermedades, esta actividad farmacológica se basa en la capacidad de promover la senolisis. Basados en estos mismos principios, existen estudios donde se demuestra que la senolisis puede presentar igual eficacia para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el envejecimiento celular.

Dentro del campo de la senescencia celular, es de extrema importancia el desarrollo de nuevos métodos para lograr la detección de células senescentes tan pronto como

aparecen en el organismo, así como en el momento que empiezan a acumularse. Sin embargo, la gran mayoría de los métodos descritos a día de hoy no pueden ser aplicados para la detección directa de células senescentes y prácticamente ninguno de ellos puede ser empleado en modelos *in vivo*. Con lo expuesto anteriormente, queda de claro manifiesto la necesidad del desarrollo de nuevos sistemas o métodos para la detección de células senescentes que puedan ser empleados como herramientas de diagnóstico, y aún de mayor importancia, es el poder lograr un método que permita cuantificar el grado de senescencia celular y posibilite el seguimiento de los tratamientos con senoterapéuticos en las diferentes enfermedades asociadas a la acumulación de células senescentes.

El documento US2016229840 describe compuestos fluorogénicos diseñados de tal manera que, ante un evento químico, se generan compuestos capaces de emitir fluorescencia. También se describen los usos de los compuestos fluorogénicos para monitorizar la presencia y/o nivel de varios analitos. Frente al documento US2016229840, donde se exponen sondas con propiedades fotoquímicas similares a las descritas en la presente invención, las sondas propuestas en la presente invención presentan características diuréticas que permiten la medición de los analitos, en este caso la detección de células senescentes, de una forma no invasiva a través de la orina. Dicha propiedad diurética implica que las sondas sean expulsadas rápidamente del cuerpo evitando la bioacumulación de las mismas y permitiendo el almacenaje de las muestras para su posterior medición si esta no se pudiera realizar *in situ*.

El documento ES2710322 (T3) se basa en compuestos útiles para visualizar la senescencia celular, su preparación y uso. En particular, esta invención se refiere a nuevos derivados de fucosa y amino-quinolina útiles como trazadores de senescencia y su preparación. El documento ES2710322 (T3) emplea sondas para la detección de senescencia constituidas por dos tipos de marcadores, uno fluorogénico y un segundo marcador de radioisótopo. La detección de senescencia *in vitro* se realiza por fluorescencia mediante técnicas basadas en citometría de flujo, este tipo de técnicas impiden su uso para sistemas *in vivo*. Por otro lado, la detección de senescencia *in vivo* se realiza con radioisotopos de halógenos. En la presente invención proponemos un método de detección de senescencia *in vivo* basado en fluorescencia, método más simple donde se emplean equipos de medición mucho más comunes y asequibles, técnicas que pueden ser empleadas por personal no cualificado. Por otro lado, aunque

en ambos casos se tratan de dos técnicas no invasivas, en la presente invención proponemos la medición de senescencia a través de la orina debido a las características intrínsecas de las sondas, esto permite el almacenaje de las muestras para una posterior medición en caso de que no se puedan realizar mediciones directas de las muestras.

5 Por último, frente a las sondas descritas en el documento ES2710322 (T3) que presentan rutas sintéticas complejas, en la presente invención la ruta sintética descrita consiste en dos etapas, partiendo directamente de compuestos comerciales y de bajo coste.

10 Por ello, la presente invención propone una nueva herramienta (sonda) para la detección no invasiva de senescencia celular en sujetos a través de la orina.

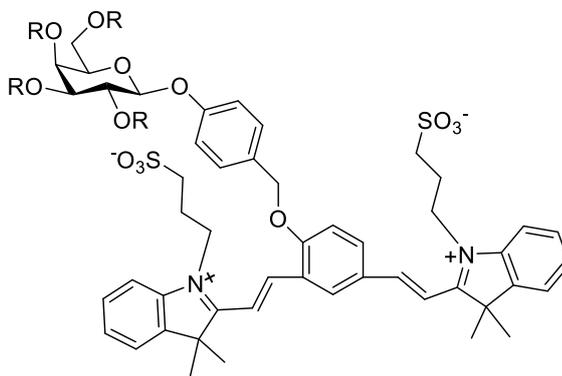
### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto caracterizado por comprender:

15 - una unidad de señalización que consiste en un fluoróforo que comprende al menos un grupo aniónico y

- una unidad de reconocimiento que consiste en un sacárido, donde la unidad de señalización está unida directa y covalentemente a la unidad de reconocimiento.

20 La unión directa y covalente implica la no existencia de grupos de unión o "linkers" entre la unidad de señalización y la de reconocimiento. Por tanto, el compuesto de fórmula:



25 donde R es H o un grupo acetilo (CH<sub>3</sub>-CO-) estaría excluido del alcance de la presente invención, ya que existe un grupo de unión entre el monosacárido y el fluoróforo.

El término “sacárido” se refiere a un carbohidrato constituido por, o que consiste en, al menos un monosacárido (unidad básica de azúcar), donde los monosacáridos que conforman el sacárido están unidos entre sí por enlaces glucosídicos. En la presente invención, el término monosacárido incluye la unidad básica de azúcar que comprende

5 grupos -OH (por ejemplo, glucosa, galactosa, fructosa, etc), así como derivados de los mismos. Estos derivados se obtienen por sustitución de alguno de los grupos hidroxilo por algún otro grupo funcional, o bien por oxidación o reducción de alguno de los átomos de carbono del monosacárido original. Los derivados pueden ser, por ejemplo, aminoazúcares, en los que al menos un grupo hidroxilo del monosacárido de origen

10 está sustituido por un grupo amino; azúcares-ácidos, que resultan de la oxidación de algún átomo de carbono del monosacárido de origen a grupo carboxilo; desoxiazúcares, en los que alguno de los grupos hidroxilo del monosacárido de origen está sustituido por un átomo de hidrógeno; azúcares-fosfato, que son azúcares fosforilados (unidos a un grupo fosfato mediante enlace éster) en alguno de sus grupos hidroxilo, monosacáridos

15 obtenidos por sustitución de al menos un grupo -OH por un -OR', donde R' se selecciona entre: acetilo (Ac: CH<sub>3</sub>-CO-), alquilo C1-C8, arilalquilo, arilo y heteroarilo. En este último caso, el monosacárido puede tener varios o todos los grupos -OH sustituidos. Preferiblemente, los derivados de monosacáridos son los que tienen todos sus -OH sustituidos por -OAc. Dentro de los monosacáridos se incluyen las distintas formas

20 anoméricas de los mismos:  $\alpha$  (alfa) y  $\beta$  (beta), así como sus configuraciones Dextro (D) y Levo (L).

El término “alquilo C1-C8” se refiere, en la presente invención, a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 8 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo,

25 n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 4 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como halógeno, hidroxilo, azida, ácido carboxílico o un grupo sustituido o no sustituido seleccionado de entre amino, amido, éster carboxílico, éter, tiol, acilamino o

30 carboxamido.

Por “arilalquilo” se entiende en la presente invención a un grupo arilo unido al resto de la molécula por un grupo alquilo. Un ejemplo, no limitante, de arilalquilo es un grupo bencilo.

35

El término "arilo" se refiere en la presente invención a una cadena carbocíclica aromática, que tiene de 6 a 12 átomos de carbono, pudiendo ser de anillo único o múltiple, en este último caso con anillos separados y/o condensados. Un ejemplo, no limitante, de arilo es un grupo fenilo. Los grupos arilo son, por ejemplo, pero sin limitarse a fenilo, naftilo, difenilo, indenilo, fenantrilo o antracilo. Los radicales arilos pueden estar  
5 opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes.

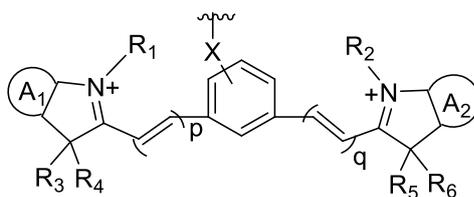
El término "heteroarilo" se refiere, en la presente invención, a anillos cíclicos aromáticos (mono- o bicíclicos) que tienen entre 5 y 10 eslabones en los que se ha sustituido un  
10 carbono por un elemento electronegativo como puede ser el azufre, nitrógeno, u oxígeno. Preferentemente el grupo heteroarilo tiene entre 5 y 6 eslabones. Los radicales arilos pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como grupos alquilo, halógeno, hidroxilo, alcóxido, tiol, nitro, amino, acilamino, ciano, carboxilato, carboxamida, carboxiéster, o combinaciones de estos grupos.

15 El término "fluoróforo" se refiere a una molécula capaz de emitir una radiación electromagnética en respuesta a la absorción de una radiación de excitación, siendo la longitud de onda de la radiación emitida distinta a la longitud de onda de la radiación de excitación y donde la emisión de radiación persiste únicamente mientras se mantiene la  
20 radiación de excitación. Esta emisión de radiación del fluoróforo de la invención se originan a longitudes de ondas que no solapan con la auto emisión procedente de células senescente existentes en las muestras biológicas.

El enlace químico entre la unidad de señalización y la de reconocimiento es un enlace  
25 covalente, preferiblemente a través de un átomo de N, S, P u O de la unidad de señalización y el átomo de C anomérico del sacárido, donde el grupo OH del carbono anomérico está sustituido por el fluoróforo. La unidad de señalización que consiste en un fluoróforo presenta al menos un grupo aniónico (también denominado unidad diurética), que es el encargado de llevar a cabo la función diurética y de incrementar la  
30 solubilidad del compuesto para que pueda excretarse por la orina. El grupo aniónico se puede seleccionar entre, por ejemplo y sin limitar a, grupo carboxilato ( $-\text{CO}_2^-$ ), sulfonato ( $-\text{SO}_3^-$ ), sulfato ( $-\text{SO}_4^-$ ), haluro ( $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  y  $\text{I}^-$ ) o cualquier anión con capacidad para interaccionar con las proteínas co-transportadoras  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  que se localizan en las células de las extremidades ascendentes de las asas de Henle. En una realización  
35 preferida, los grupos aniónicos unidos al fluoróforo son grupos sulfonatos y/o

carboxilatos. En una realización más preferida, la unidad de señalización comprende dos grupos aniónicos. Más preferiblemente dos grupos sulfonatos.

Preferiblemente, el fluoróforo que conforma la unidad de señalización está basado en una estructura de cianina que presentan grupos aniónicos unidos covalentemente para conferirle propiedades diuréticas. Más preferiblemente, el fluoróforo presenta una estructura (fórmula (I)) como se define a continuación:



(I)

10

donde  $A_1$  y  $A_2$  son independientemente grupos arilo o heteroarilo (fusionados al anillo de pirrolinio, tal y como muestra la estructura),

$p$  y  $q$  son independientemente un número entero que varía entre 1 y 4,

$R_1$  y  $R_2$  son independientemente un grupo  $-(CH_2)_n-R_a$ , donde:

15  $R_a$  es un anión que se selecciona de la lista que consiste en:  $-SO_3^-$ ,  $-CO_2^-$ ,  $-SO_4^-$ , haluro,

$n$  es un número entero que varía entre 0 y 8,

$X$  es O, N, P ó S y

20  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  son seleccionados independientemente entre: alquilo C1-C8, arilo y heteroarilo,

$\sim$  representa el punto de unión covalente con un carbono de un monosacárido de la unidad de reconocimiento.

Los términos alquilo C1-C8, arilo y heteroarilo son como se ha definido previamente.

25

En una realización preferida del fluoróforo,  $A_1$  y  $A_2$  son independientemente fenilo.

En otra realización preferida del fluoróforo,  $p$  y  $q$  son independientemente 1.

30 En otra realización preferida del fluoróforo,  $R_1$  y  $R_2$  son independientemente un grupo  $-(CH_2)_n-SO_3^-$  ó  $-(CH_2)_n-CO_2^-$ ,  $n$  entre 1 y 8, más preferiblemente  $n$  es 4.

En otra realización preferida del fluoróforo, X es O.

En una realización preferida del fluoróforo, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> son independientemente metilo.

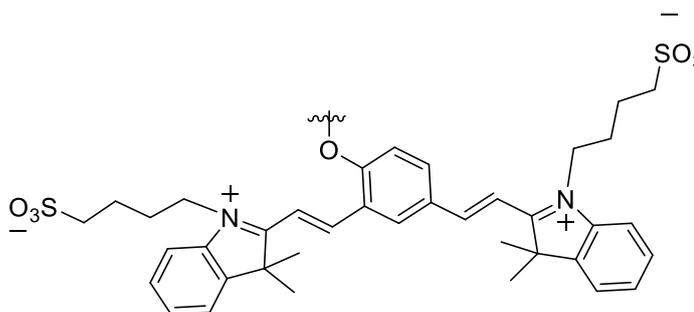
5

En otra realización preferida, A1 y A2 son independientemente fenilo; p y q son independientemente 1 y X es O.

En otra realización preferida, A1 y A2 son independientemente fenilo; p y q son independientemente 1; X es O y R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son independientemente -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> ó -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO<sub>2</sub>.

10

En una realización preferida, el fluoróforo tiene la siguiente fórmula:



15

Preferiblemente, la unidad de reconocimiento es un sacárido que comprende, o consiste en, entre 1 a 100 monosacáridos.

En una realización más preferida, el sacárido comprende, o consiste en, entre 1 y 50 monosacáridos o, aún más preferiblemente, entre 1 y 20 monosacáridos.

20

En otra realización preferida, del 60 al 95% de los monosacáridos que comprende el sacárido son galactosa, fucosa y/o derivados de los mismos obtenidos por sustitución de al menos un grupo -OH, tal y como se ha explicado anteriormente en la definición de monosacárido. Más preferiblemente, del 60 al 95% de los monosacáridos que comprende el sacárido son galactosa, fucosa y/o derivados de los mismos donde todos sus OH se han sustituido por -OAc.

25

En otra realización preferida, los monosacáridos que comprende el sacárido son galactosa, fucosa y/o derivados de los mismos obtenidos por sustitución de al menos un

30

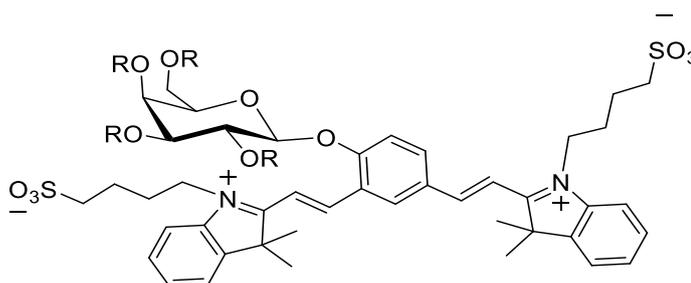
grupo -OH, tal y como se ha explicado anteriormente en la definición de monosacárido. Más preferiblemente, los monosacáridos que comprende el sacárido son galactosa, fucosa y/o derivados de los mismos donde todos sus OH se han sustituido por -OAc.

- 5 En otra realización preferida, el sacárido consiste en un monosacárido, preferiblemente éste es galactosa, fucosa o un derivado de cualquiera de ellos donde todos sus OH se han sustituido por -OAc.

Preferiblemente, cuando se hace referencia en la presente invención a la galactosa, ésta es la  $\beta$ -D-galactosa y cuando se hace referencia a la fucosa, ésta es preferiblemente la  $\alpha$ -D fucosa.

En una realización más preferida, el compuesto tiene la siguiente fórmula:

15



donde R es H o un grupo acetilo ( $\text{CH}_3\text{-CO-}$ ).

20

Las células senescentes se caracterizan por un incremento en el número y tamaño de lisosomas que provoca la sobreexpresión de las enzimas hidrolasas lisosomales, las más características de las cuales son la sobreexpresión de actividad de la enzima lisosomal  $\beta$ -galactosidasa conocido como (SA- $\beta$  gal) y la sobreexpresión de actividad de la enzima lisosomal  $\alpha$ -fucosidasa conocido como (SA- $\alpha$ -fuc).

25

En particular, en la presente invención, se produce la activación del compuesto debido a la sobreactividad de la enzima lisosomal, en el modelo anterior se produciría por la sobreactividad de  $\beta$ -galactosidasa (SA- $\beta$ -gal) asociada a la presencia de senescencia celular. Esta actividad lleva a cabo la hidrólisis entre la unidad de señalización y la de

30

- reconocimiento del compuesto de la presente invención. La desconexión de la unidad de reconocimiento produce la activación de la unidad de señalización. Esta activación queda reflejada por la aparición de una marcada emisión de fluorescencia. Por último, los grupos aniónicos que se encuentran unidos a la unidad de señalización presentan una elevada actividad diurética que permite la expulsión del compuesto por la orina. Al encontrarse directamente unida la unidad diurética a la de señalización permite la expulsión tanto del compuesto activado como desactivado, sin embargo, únicamente el compuesto activado presenta señal de fluorescencia.
- 5
- 10 Los grupos aniónicos (sulfonatos o carboxilatos preferiblemente) se emplean como detonantes de la actividad diurética al interactuar sobre las proteínas co-transportadoras  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  que se localizan en las células de las extremidades ascendentes de las asas de Henle.
- 15 Estos grupos aniónicos se unen en los sitios activos existentes para los  $\text{Cl}^-$  bloqueando el sistema de co-transporte de la proteína. Para que los grupos funcionales puedan interactuar en los centros activos de las proteínas, estos grupos funcionales han de presentar una geometría y un potencial electrostático parecido al del analito. Por ello, la presencia de los grupos aniónicos juega un papel principal en el proceso diurético.
- 20 Los grupos aniónicos presentes en la unidad diurética del compuesto se unen a las posiciones de reconocimiento de  $\text{Cl}^-$  de las proteínas de co-transporte y provocan la alta actividad diurética que presenta el compuesto.
- 25 El compuesto de la presente invención se trata, por tanto, de una molécula de fácil síntesis que inicialmente se encuentra en una forma "apagada". Este compuesto se debe administrar de forma simple sufriendo una transformación ante la presencia de células senescentes que permite su detección por fluorescencia tanto en el sistema urinario como tras la micción de la orina. La intensidad de fluorescencia que se observa en las muestras de orina es proporcional a la cantidad de células senescentes, lo que permite la cuantificación y el seguimiento en el número de células senescentes. Además de ello, una pequeña cantidad del compuesto activado se acumula en aquellas zonas donde se produce la activación (donde se localizan las células senescentes), por lo que, debido a la gran emisión de fluorescencia que presenta la unidad de señalización, esta pequeña cantidad es suficiente para localizar la zona que presenta células inmersas en
- 35

procesos de senescencia.

Con estas características, las sondas propuestas permiten la detección de células senescentes *in vivo* a través de medidas de fluorescencia de la orina tanto antes como después de la micción, dando lugar a un método, no invasivo y cuantitativo para la determinación de senescencia celular, todo ello permite su uso para diferentes aplicaciones de gran interés como son:

- 5 - Su uso en el seguimiento de tratamientos de quimioterapia. Algunos tratamientos de quimioterapia se basan en el empleo de inductores de senescencia o el uso de otros protocolos médicos con el fin de llevar a cabo la transformación de las células tumorales en células senescentes y lograr la detección de la proliferación celular. Por lo tanto, el compuesto de la invención puede ser empleado en el seguimiento de la formación de células senescentes *in vivo* tras el uso de quimioterapia, permitiendo la cuantificación de senescencia celular de una forma no invasiva a través de medidas de fluorescencia de la orina.
- 10 - Pueden ser empleados para obtener información en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con el envejecimiento donde los tratamientos convencionales se basan en el uso de senolíticos. Con esta nueva herramienta se puede llevar un seguimiento de la eliminación de estas células senescentes con la bajada de emisión de fluorescencia obtenida en las medidas de orina.
- 15 - Por último, la variación de la unidad de reconocimiento permitiría el uso del mismo protocolo para la detección y seguimiento de otras enfermedades o patologías.
- 20

El término detección "*in vivo*" en la presente invención se refiere a una detección a través de muestras de orina ya sea en el sistema urinario o tras la micción, llevadas a cabo tras la administración del compuesto de la invención. En la presente invención el término "*in vivo*" se emplea para indicar que no es necesario la realización de biopsias o extracción de zonas dañadas, a diferencia de lo que requieren la gran mayoría de métodos descritos que precisan de extracciones de tejidos o células para determinar la presencia de senescencia celular *in vitro*.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende el compuesto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización preferida, la composición es una composición farmacéutica.

El "vehículo", es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos y permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición. Por tanto, el vehículo es una sustancia que es capaz de permitir una mejor dosificación y administración o da consistencia y forma a la composición. El "vehículo farmacéuticamente aceptable" debe permitir la actividad del compuesto, ser compatible con él y no causar daño a los organismos a los que se administra.

La composición de la invención puede administrarse de cualquiera de las maneras conocidas de administración. En una realización preferida, la composición está configurada para poder administrarse de forma intravenosa, intraperitoneal u oral. En este último caso el compuesto puede recubrirse con un polímero que libere su contenido pasado el estómago. De manera aún más preferida, la composición está configurada para ser inyectada por vía intravenosa o intraperitoneal.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto de la invención, o de la composición que le comprende, como sonda para la detección de células senescentes en una muestra de orina donde previamente se ha administrado dicho compuesto.

Los términos "sonda" o "herramienta de diagnóstico" se utilizan como sinónimos en la presente invención y se refieren a un compuesto químico capaz de detectar de forma selectiva senescencia celular. La sonda de la invención presenta además las siguientes características:

- una toxicidad mínima o cero;
- Presenta una bajada en la señal de fluorescencia, o no presenta fluorescencia, en comparación con la unidad de señalización no modificada (fluoróforo) hasta el momento en que se produzca la ruptura del enlace en presencia de células senescente debido a una elevada actividad de  $\beta$ -galactosidasa,  $\alpha$ -fucosida u otra hidrolasa lisosomal;
- La sonda se mantiene estable en su forma inactivada (unidad de señalización y unidad de reconocimiento unidas) hasta que se encuentre en presencia de células senescentes;

- La sonda conserva la mayoría de las características físicas y químicas que permiten su uso de una manera similar a la de la unidad de señalización (fluoróforo).

5 Las células senescentes son células que presentan el ciclo celular arrestado, lo que impide una actividad celular normal y la división celular. Estas células presentan una morfología aplanada en cuyo citoplasma se ha incrementado el número y tamaño de vacuolas. Las células senescentes presentan un fenotipo distintivo y una modificación de su expresión genética que permite su identificación. Entre los ensayos comúnmente  
10 empleados para su identificación, el más importante es la determinación de la sobreactividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) asociada a senescencia.

Para uso como sonda, el compuesto se puede administrar a un sujeto de cualquiera de las maneras conocidas de administración; preferiblemente, de forma intravenosa,  
15 intraperitoneal u oral.

La sonda presenta propiedades diuréticas (sonda diurética) por lo que, una vez administrada, esta sonda se escinde en presencia de células senescentes de manera que la unidad de señalización se excreta por la orina y puede ser detectada por  
20 fluorescencia, revelando la existencia de células senescentes. Luego, con esta finalidad, el compuesto de la invención puede utilizarse como sonda diurética (sonda con propiedades diuréticas), cuya forma activa (una vez que se escinde en las dos unidades que la conforman) puede ser visualizada por fluorescencia en la orina excretada, revelando la existencia de senescencia celular. De igual forma, cuando la sonda no es  
25 activada, la unidad diurética lleva a cabo su eliminación, en este caso no se observa fluorescencia en la orina. Ello implica que la sonda no se acumula en el cuerpo y es expulsada rápidamente vía urinaria.

El uso de la sonda para la detección de células senescentes a través de la orina permite  
30 llevar a cabo un estudio cuantitativo del grado de senescencia celular presente en el sujeto, además de, obtener información sobre la posible presencia de enfermedades del sujeto derivadas de la acumulación de dichas células.

Otro aspecto de la invención se refiere al compuesto de la invención para su uso en un  
35 método de detección de células senescentes a través de la orina. Más concretamente,

para o en, un método de detección de células senescentes en una muestra de orina de un sujeto al que previamente se ha administrado dicho compuesto.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de detección de células senescentes, que comprende las siguientes etapas:

- administración de una cantidad efectiva del compuesto de la invención a un sujeto,
- obtención de una muestra de orina tras la administración del compuesto,
- obtención de datos de fluorescencia de la muestra de orina obtenida.

En la presente invención, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a aquella cantidad del compuesto que cuando se administra, es suficiente para ser detectado por la orina una vez que ha sido hidrolizada en el organismo.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1.** Estructura general de una sonda donde se aprecian las diferentes unidades que la conforman: unidad de señalización que incluye las unidades o grupos diuréticos y unidad de reconocimiento.

**FIG. 2.** Estructura de Cy7-Gal, una de las posibles sondas (compuestos de la presente invención), donde se muestran los diferentes grupos cada uno de ellos con una función individual.

**FIG. 3.** (a-d) Imágenes de microscopía confocal para células 4T1. (a,b) imágenes obtenidas para células 4T1 normales. (c,d) Imágenes de células 4T1 tratadas con Palbociclib para inducir senescencia celular. (a,c) Imágenes de células control y senescentes en ausencia de la sonda Cy7-Gal. (b,d) Células control y senescentes tras ser incubadas 30 min en la presencia de Cy7-Gal. e) Cuantificación de la intensidad en

la emisión de fluorescencia para células 4T1 control y tratadas con Palbociclib (senescentes) incubadas en la ausencia o en presencia de la sonda Cy7-Gal, f) Viabilidad de las células 4T1 control y senescentes tras la incubación con Cy7-Gal a diferentes concentraciones tras 24 h.

5

**FIG. 4.** a) Imágenes *in vivo* obtenidas por la técnica de formación de imágenes *in vivo* (IVIS, del inglés “*in vivo* imaging system”) donde las ratonas fueron inyectadas con células tumorales 4T1 (carcinoma de mama en ratón). A la izquierda se llevó a cabo un tratamiento con Palbociclib para obtener la transformación de las células tumorales en células senescentes y detener el crecimiento del tumor, mientras que en la derecha (vehículo) no se realizó dicho tratamiento con Palbociclib manteniéndose las células 4T1 cancerígenas. b) Cuantificación del fluoróforo Cy7 en la vejiga en función del tiempo. c) Cuantificación de fluorescencia en la orina con la técnica IVIS después de la metabolización de la sonda Cy7-Gal en el cuerpo. Las ratonas orinaron tras salir de la anestesia debido a las propiedades diuréticas de la sonda Cy7-Gal.

15

**FIG. 5.** a) Imágenes *ex vivo* de los tumores de células 4T1 extraídos tras sacrificar las ratonas de los diferentes grupos. b) Cuantificación de la fluorescencia de Cy7 en los tumores extraídos.

20

**FIG. 6.** a) Imágenes obtenidas por la técnica IVIS donde se inyectó con células 4T1 (carcinoma de mama de ratón). b) Cuantificación de la señal de fluorescencia en la vejiga a diferentes tiempos y concentraciones de Palbociclib. c) Ampliación de la señal de fluorescencia a los 15 min para los diferentes grupos de tratamientos.

25

**FIG. 7.** a) Imágenes de IVIS de las orinas obtenidas para los diferentes grupos, de izquierda a derecha las columnas corresponden con los grupos: no tratados con Palbociclib, 10 mg/Kg de Palbociclib, 50 mg/Kg Palbociclib, 100 mg/Kg, todos ellos tratados con la sonda, y finalmente, 100mg/kg Palbociclib no tratados con la sonda Cy7-Gal. b) Cuantificación de fluorescencia para las muestras de orina de los diferentes grupos con la técnica de IVIS. c) Medidas de fluorescencia obtenidos para las orinas recogidas de los diferentes grupos. d) Cuantificación fluorimétrica de las orinas para los diferentes grupos.

30

**FIG. 8.** a) Imágenes *ex vivo* de los tumores de células 4T1 extraídos tras sacrificar a los

35

diferentes grupos llevándose posteriormente a cabo la tinción con X-gal, marcador comercial empleado para corroborar la existencia de senescencia celular, siendo posible llevar a cabo una determinación semi-cuantitativa en función de la coloración azul-verdosa que adquiere el tumor. De izquierda a derecha se observan los tumores del grupo sin tratar con Palbociclib y los tumores obtenidos de los grupos tratados con concentraciones de 10 mg/Kg, 50 mg/kg y 100 mg/Kg de Palbociclib. b) Cuantificación por IVIS de la señal de fluorescencia para los diferentes tumores mostrados anteriormente. c) Cuantificación media de fluorescencia correspondiente a la sonda hidrolizada de los tumores extraídos en cada grupo. d) Cuantificación por IVIS de los tumores y los órganos más representativos para los diferentes grupos, mostrando que únicamente se observa señal en los tumores senescentes sin observarse señal en los diferentes órganos.

**FIG. 9.** a) Cuantificación inmunohistoquímica del grado de senescencia mediante la tinción del biomarcador de proliferación Ki67. b) Cuantificación del biomarcador Ki67 que muestra una caída de la proliferación celular con el aumento de la concentración de Palbociclib empleada.

## EJEMPLOS

20

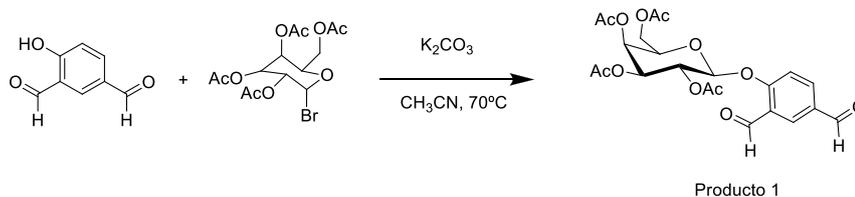
A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

### **Ejemplo 1: Síntesis de la sonda Cy7-Gal:**

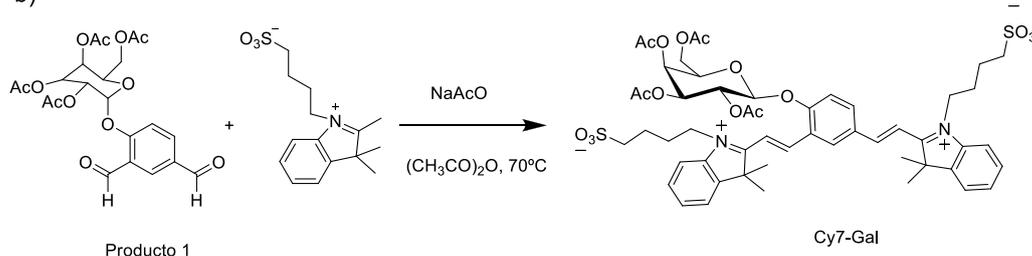
25

La sonda Cy7-Gal se preparó de acuerdo con siguiente esquema de reacción:

a)



b)



### Materiales y métodos:

El compuesto 5-Formilsalicilaldehído fue adquirido en la casa Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (TCI) mientras que la  $\alpha$ -acetobromogalactosa, el carbonato potásico, la sal inerte de 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimetilindolium), el acetato sódico y el anhídrido acético se adquirieron en Sigma-Aldrich. El acetonitrilo anhidro fue comprado a la casa Acros Organics B.V.B.A. El buffer de fosfato salino (PBS) se adquirió a Sharlab S.L., El Medio Eagle Modificado por Dulbecco's (DMEM) y el suero bovino fetal (FBS) se compraron a Gibco. Palbociclib fue adquirido a Selleckchem. Las placas de fondo transparente de 96 platos y cellTiter-Glo(R) Luminescent Cell para viabilidad celular se obtuvieron en Promega. Senescence beta-Galactosidase KIT para tinción de X-gal se adquirió en Werfrem. Anti-Ki67 anticuerpo (ab833) se obtuvo de Abcam. Recombinada  $\beta$ -Galactosidase-1/GLB1 Proteína humana (Human  $\beta$ -Gal) se obtuvo de R&D system a biotechne brand. Las células 4T1 de (carcinoma de mama de ratón) fueron adquiridas a American Type Culture Collection (AATC). Las hembras de ratón BALB/cByJ se adquirieron a Charles River laboratories, Francia.

Para la espectrometría de masas se empleó un espectrómetro de masas Tripletof T5600 (ABSciex, USA). En el caso de la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para la caracterización de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se empleó un equipo Bruker FT-NMR Avance 400 (Ettlingen, Germany) spectrometre 300K empleándose tetrametilsilano (TMS) como patrón interno. Las medidas de espectroscopia de fluorescencia se realizaron con un equipo JASCO spectrofluorometer FP-8500. Mientras que las imágenes de

fluorescencia confocal de los cultivos de células 4T1 fueron adquiridas en un microscopio Leica TCS SP8 AOBS y analizadas usando el software Image. Por su parte las imágenes de IVIS se adquirieron en un equipo IVIS® spectrum CT imaging y analizadas empleando el software de imagen viva de Caliper Life Sciences tanto para  
 5 las muestras *in vivo* como en el caso de órganos y tumores *ex vivo*. Las medidas de luminiscencia para los ensayos de viabilidad se realizaron en un equipo VICTOR Multilabel Plate Reader (Pelkin Elmer)

### Síntesis y caracterización:

10 Los reactivos 5-Formilsalicilaldehído (75 mg, 0.5 mmol),  $\alpha$ -acetobromogalactosa (607 mg, 1.5 mmol) y carbonato potásico (400 mg, 4 mmol) fueron introducidos en un matraz de fondo redondo bajo atmosfera de argón y disueltos en 30 mL de acetonitrilo anhidro. La mezcla de reacción se calentó a 70 °C en agitación durante 4 h. manteniendo la atmosfera inerte. Tras completar la reacción, el disolvente fue evaporado mediante  
 15 presión reducida. El crudo de reacción fue purificado empleando una columna de sílice gel y una mezcla hexano-acetato de etilo (2:1 v/v) como eluyente. El producto **1** se obtuvo como un aceite verdoso claro (230 mg, 0.46 mmol, 92.6% rendimiento).

En una segunda etapa, el producto **1** obtenido en el paso previo (90 mg, 0.17 mmol) fue introducido junto con sal 1-(4-sulfobutil)-2,3,3-trimethylindolium (100 mg, 0.35 mmol) en  
 20 un tubo Schlenk bajo condiciones inertes. Los sólidos fueron disueltos en 2 mL de anhídrido acético. La reacción se agita a 70 °C durante 4 h. bajo atmosfera inerte. Tras ello, el disolvente es evaporado bajo presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante columna de cromatografía en fase reversa empleando como eluyente una mezcla diclorometano: metanol (10:1 v/v) para obtener Cy7-Gal como un sólido marrón  
 25 rojizo (120 mg, 0.116 mmol, 68.1% rendimiento).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7,72 – 7,62 (m, 1H), 7,53 (dd, J = 7,5; 1,6 Hz, 1H), 7,49 – 7,43 (m, 2H), 7,42 – 7,32 (m, 2H), 7,00 (d, J = 7,3 Hz, 2H), 6,79 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 6,69 (t, J = 7,3 Hz, 1H), 6,37 (d, J = 1,7 Hz, 1H), 5,69 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 5,49 (d, J = 1,3 Hz, 1H), 5,42 (dd, J = 3,4; 0,9 Hz, 1H), 5,34 – 5,32 (m, 2H), 5,24 (s, 1H), 5,07 (dd, J = 10,4; 3,4 Hz, 1H), 4,17 – 4,04 (m, 4H),  
 30 3,48 (s, 4H), 2,91 (s, 4H), 2,03 (s, 12H), 1,93 (s, 4H), 1,82 (s, 4H), 1,58 (s, 12H).  
 $^{13}\text{C}$ - NMR (101 MHz, DMSO)  $\delta$  = 169,98 (1C), 169,88 (1C), 169,83 (1C), 169,55 (1C), 169,53 (1C), 169,51 (1C), 160,25 (1C), 160,01 (1C), 158,49 (1C), 142,26 (4C), 135,71 (1C), 131,03 (1C), 130,85 (1C), 129,31 (2C), 129,10 (1C), 127,74 (2C), 126,92 (2C), 122,89 (1C), 121,01 (2C), 115,67 (2C), 97,17 (1C), 73,73 (1C), 71,08 (1C), 68,35 (1C),  
 35 65,90 (1C), 63,53 (2C), 63,38 (2C), 61,51 (1C), 49,02 (2C), 36,20 (2C), 28,24 (2C), 24,39

(1C), 24,26 (1C), 24,09 (1C), 23,68 (1C), 20,53 (1C), 20,48 (1C), 20,34 (1C), 20,25 (1C). HRMS (espectrometría de masas de alta resolución): Calculada para  $C_{52}H_{63}N_2O_{16}S_2$  ( $M+H^+$ ) 1035.3619 m/z; encontrada 1035.3606 m/z ( $M+H^+$ ), 1051.3546 ( $M+H_2O-2H^+$ ).

## 5 **Microscopía confocal:**

Las células de carcinoma de mama de ratón 4T1 fueron cultivadas en DMEM suplementado con un 10% de FBS y se incubaron en un 20% de  $O_2$  y 5%  $CO_2$  a 37°C. Las células fueron incubadas con 5  $\mu M$  de Palbociclib en DMEM durante una semana para inducir el proceso de senescencia. Posteriormente, las células fueron sembradas en una placa de 96 pocillos de fondo plano transparente con una densidad de 6000 células para las senescentes y 4000 en control (sin tratamiento previo con Palbociclib). Tras 24 horas las células fueron incubadas con diferentes concentraciones de la sonda Cy7-Gal y de su fluoróforo (Cy7) adquiriéndose las imágenes de microscopía confocal tras 30 min de incubación. Se observa un incremento en la emisión de fluorescencia superior a 10 veces entre las células senescentes tratadas con la sonda Cy7-Gal y las células senescentes no tratadas (señal de autofluorescencia). Este incremento en la emisión de fluorescencia es ligeramente superior entre las células senescentes y las células control cuando ambas han sido incubadas en presencia de la sonda Cy7-Gal, demostrando con ello la alta selectividad de la sonda en la detección de células senescentes.

## **Espectroscopia de fluorescencia:**

Las mediciones de fluorescencia de orina se llevaron a cabo tomando 5  $\mu L$  de orina y diluyéndolo en agua destilada hasta los 100  $\mu L$ . Las muestras se obtuvieron excitando a 535nm y recogiendo el máximo de absorción a 566nm. Se puede observar una clara correlación entre el grado de senescencia y la intensidad de fluorescencia emitida por la orina correspondiente a la presencia del fluoróforo Cy7 libre.

## **Ensayos de viabilidad:**

Las células de carcinoma de mama de ratón 4T1 se cultivaron en DMEM suplementado con un 10% de FBS y se incubaron en un 20% de  $O_2$  y 5%  $CO_2$  a 37°C. Para obtener senescencia celular, las células fueron incubadas con 5  $\mu M$  de Palbociclib en DMEM durante una semana. Posteriormente, las células fueron sembradas en una placa de 96 pocillos de fondo plano transparente con una densidad de 6000 células para las

senescentes y 4000 en control. Tras 24 h las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de la sonda Cy7-Gal y de su fluoróforo (Cy7). Las medidas de viabilidad se obtuvieron tras 24 h de incubación empleando CellTiter-GLO Luminescent Cell Viability Assay como revelador. Los ensayos de viabilidad mostraron que tanto la sonda  
 5 Cy7-Gal como su fluoróforo Cy7 presentan una toxicidad mínima incluso a tiempos de exposición mucho mayores a los empleados en los ensayos *in vivo*.

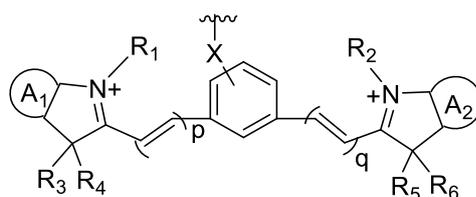
### **Ensayos *In vivo*:**

Los ratones fueron mantenidos en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF)  
 10 siguiendo las recomendaciones de la Federaion of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA). Todos los procesos aplicados sobre los animales fueron aprobados por el Comité Técnico de Investigación para el bienestar de los animales (CElyBA). Los tumores de mama 4T1 se generaron empleando células 4T1: Las células se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10% y penicilina estreptomycin. Para  
 15 generar la formación de tumores de mama, las células se tripsinizaron y se contabilizaron con un contador de células automatizado LUNA™ y se inyectaron por vía subcutánea en la mama izquierda de ratones hembra BALB/CBY de 28 a 34 semanas de edad a una concentración de  $0.5 \cdot 10^6$  células en un volumen de 100  $\mu$ l. El volumen del tumor se midió cada dos días con un calibrador y se calculó como  $V = (a \times b^2) / 2$  donde a es  
 20 el más largo y b es el más corto de dos diámetros perpendiculares. El Palbociclib se administró por sonda oral diariamente durante 7 días a diferentes concentraciones de 10 mg / kg, 50 mg / kg y 100 mg / kg disueltos en lactato sódico 50 mM a pH 5 con el fin de inducir senescencia. Posteriormente, la sonda Cy7-Gal fue administrada a una concentración de 23,3 mg/ml en un volumen de 100  $\mu$ l. Los ratones fueron monitorizados  
 25 durante 15 minutos post-inyección de la sonda en el equipo IVIS® siguiendo la acumulación del fluoróforo Cy7 en la vejiga después de la hidrólisis de la sonda Cy7-Gal en la presencia de células senescentes. Las ratonas orinaron tras salir de la anestesia, momento en el que tanto la sonda Cy7-Gal como el fluoróforo Cy7 fueron expulsados del organismo favorecido por la presencia de la unidad diurética. La  
 30 fluorescencia de las muestras de orina para los diferentes grupos de ratones fue obtenida directamente empleando la técnica IVIS y posteriormente mediante espectroscopia de fluorescencia, corroborando la correspondencia entre la emisión de fluorescencia de las muestras de orina y el grado de senescencia celular inducido a los diferentes sujetos, así como la posible detección de la sonda en el tracto urinario  
 35 permitiendo la medición *in vivo* de senescencia celular.

Posteriormente, los ratones fueron sacrificados y sus órganos extraídos rápidamente. Para corroborar la presencia de senescencia celular, los tumores fueron teñidos con el kit comercial X-gal siguiendo el protocolo descrito con tal fin, dicha tinción permite una semi-cuantificación de senescencia en función de la coloración, de igual forma se llevó a cabo la tinción inmunohistoquímica de Ki67, biomarcador de proliferación. La medición de fluorescencia en órganos y tumores para los diferentes grupos de ratones se realizó con la técnica de IVIS.

**REIVINDICACIONES**

1. Compuesto caracterizado por comprender:
- 5       - una unidad de señalización que consiste en un fluoróforo que comprende al menos un grupo aniónico y
- una unidad de reconocimiento que consiste en un sacárido, donde la unidad de señalización está unida directa y covalentemente a la unidad de reconocimiento.
- 10
2. Compuesto, según reivindicación 1, donde el sacárido comprende entre 1 y 50 monosacáridos.
3. Compuesto, según reivindicación 2, donde el sacárido comprende entre 1 y 20
- 15       monosacáridos.
4. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde entre 60 y 95% de las unidades de monosacárido son galactosa, fucosa y/o derivados de los mismos.
- 20
5. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 3, los monosacáridos son galactosa, fucosa y/o derivados de los mismos.
6. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la unidad de
- 25       señalización comprende dos grupos aniónicos.
7. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde los grupos aniónicos son grupos sulfonatos, carboxilatos, sulfatos y/o haluros.
- 30
8. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el fluoróforo presenta una estructura como se define a continuación:



(I)

donde  $A_1$  y  $A_2$  son independientemente grupos arilo o heteroarilo,

$p$  y  $q$  son independientemente un número entero que varía entre 1 y 4,

5  $R_1$  y  $R_2$  son independientemente un grupo  $-(CH_2)_n-R_a$ , donde:

$R_a$  es un anión que se selecciona de la lista que consiste en:  $-SO_3^-$ ,  $-CO_2^-$ ,  $-SO_4^-$ , haluro,

$n$  es un número entero que varía entre 0 y 8,

$X$  es O, N, P ó S y

10  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  son seleccionados independientemente entre: alquilo C1-C8, arilo y heteroarilo,

~~~~~ representa el punto de unión covalente con un carbono de un monosacárido de la unidad de reconocimiento.

15 9. Compuesto, según reivindicación 8, donde  $A_1$  y  $A_2$  son independientemente fenilo.

10. Compuesto, según reivindicación 8 o 9, donde  $p$  y  $q$  son independientemente 1.

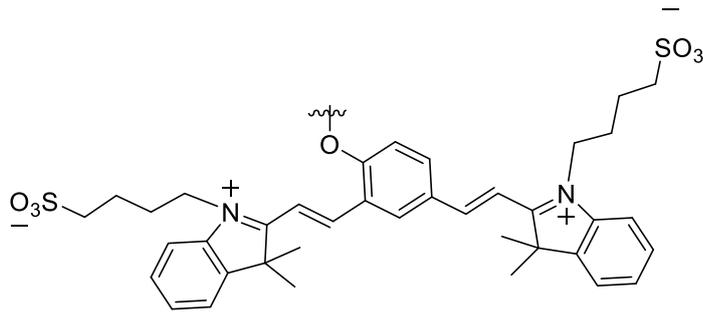
20 11. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde  $R_1$  y  $R_2$  son independientemente un grupo  $-(CH_2)_n-SO_3^-$  ó  $-(CH_2)_n-CO_2^-$ , siendo  $n$  un número entero que varía entre 0 y 8.

12. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde  $X$  es O.

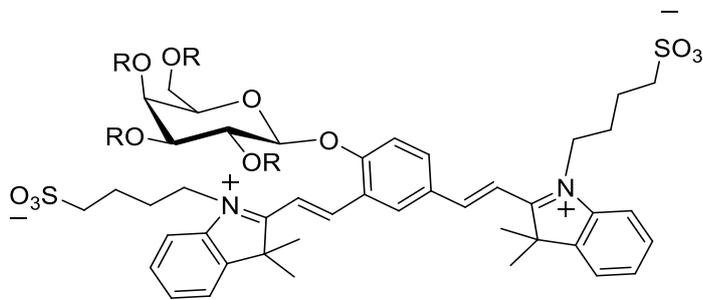
25

13. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, donde  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  son independientemente metilo.

30 14. Compuesto, según reivindicación 8, donde el fluoróforo tiene la siguiente fórmula:



- 5 15. Compuesto, según reivindicación 8, que presenta la fórmula siguiente:



donde R es H o acetilo.

- 10 16. Composición que comprende el compuesto descrito en cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 a 15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable
- 15 17. Uso del compuesto descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o de la composición descrita en la reivindicación 16, como sonda para la detección de células senescentes en una muestra de orina de un sujeto al que previamente se le ha administrado dicho compuesto.

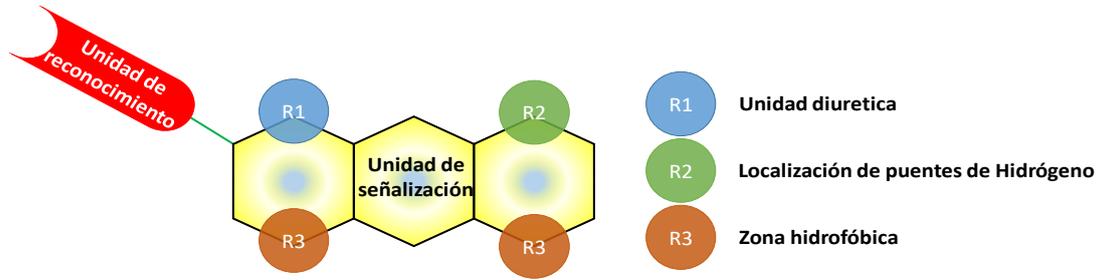


FIG. 1

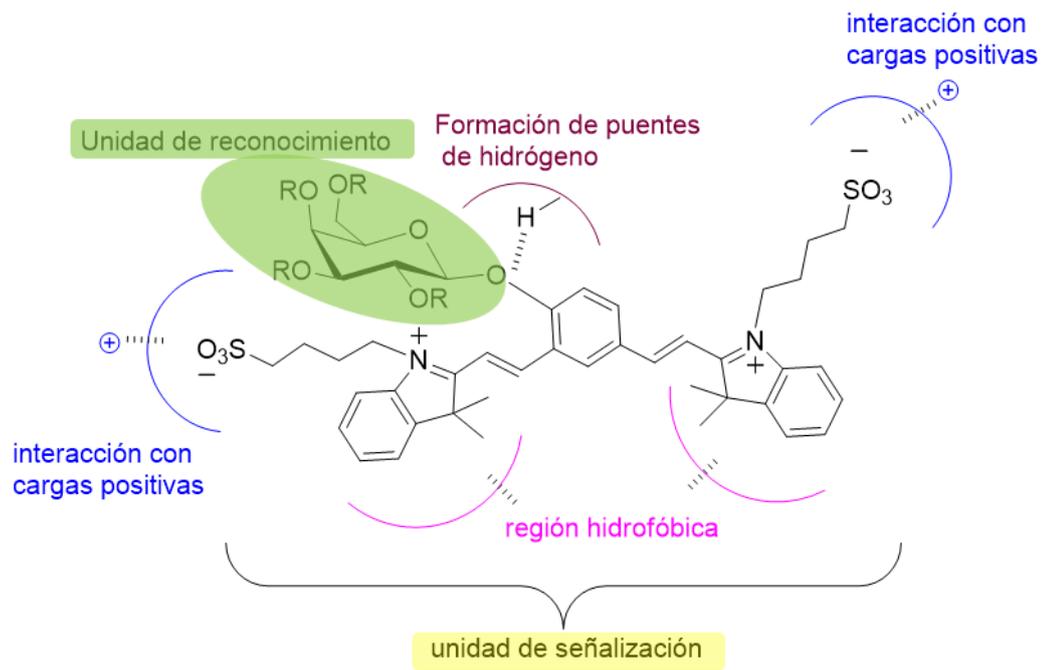


FIG. 2

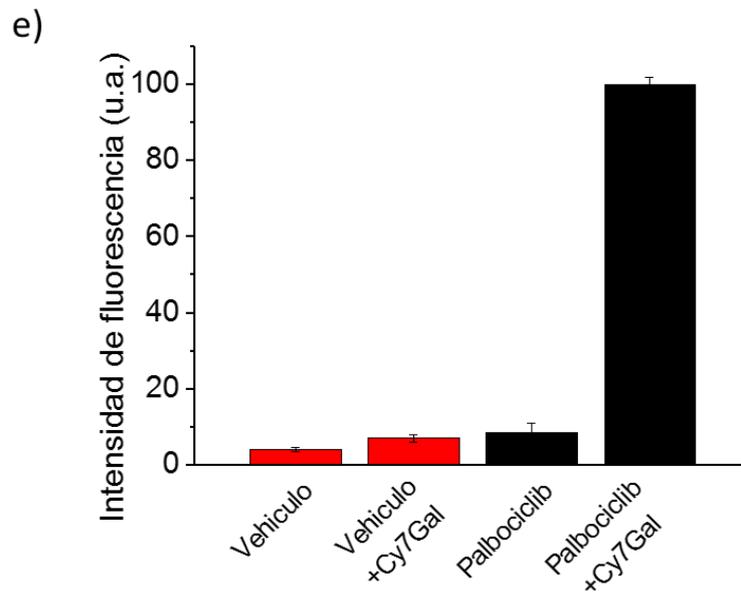
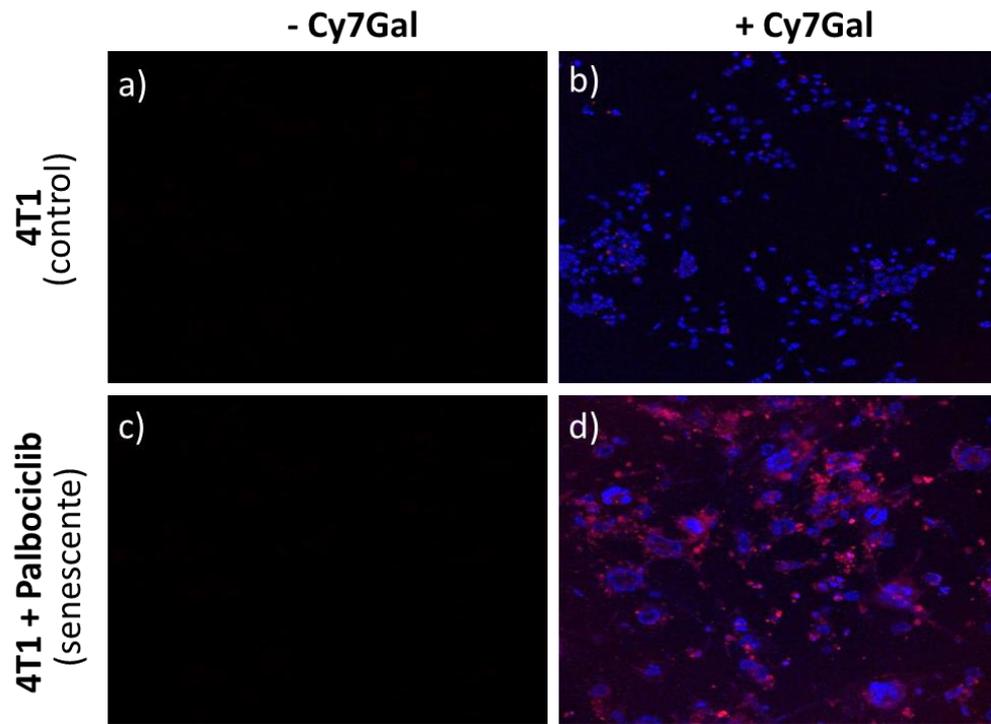


FIG. 3

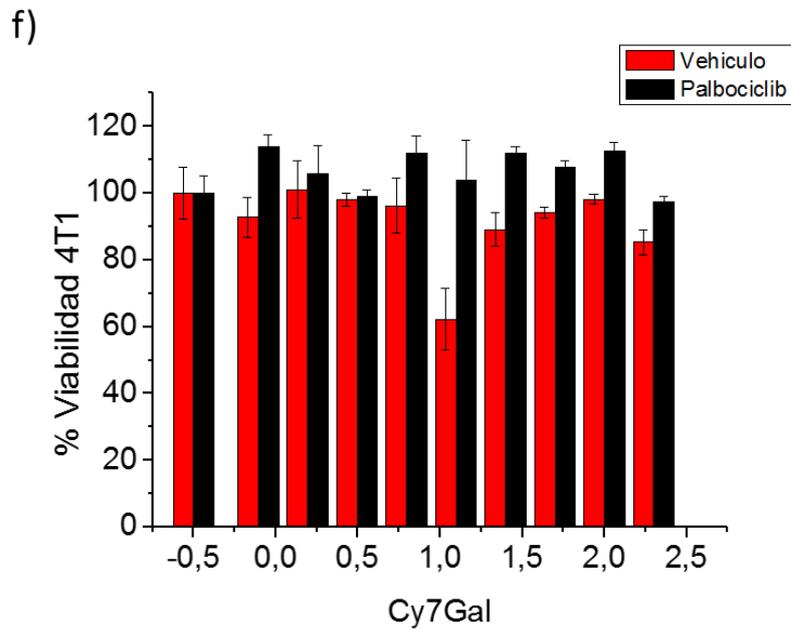


FIG. 3 cont.

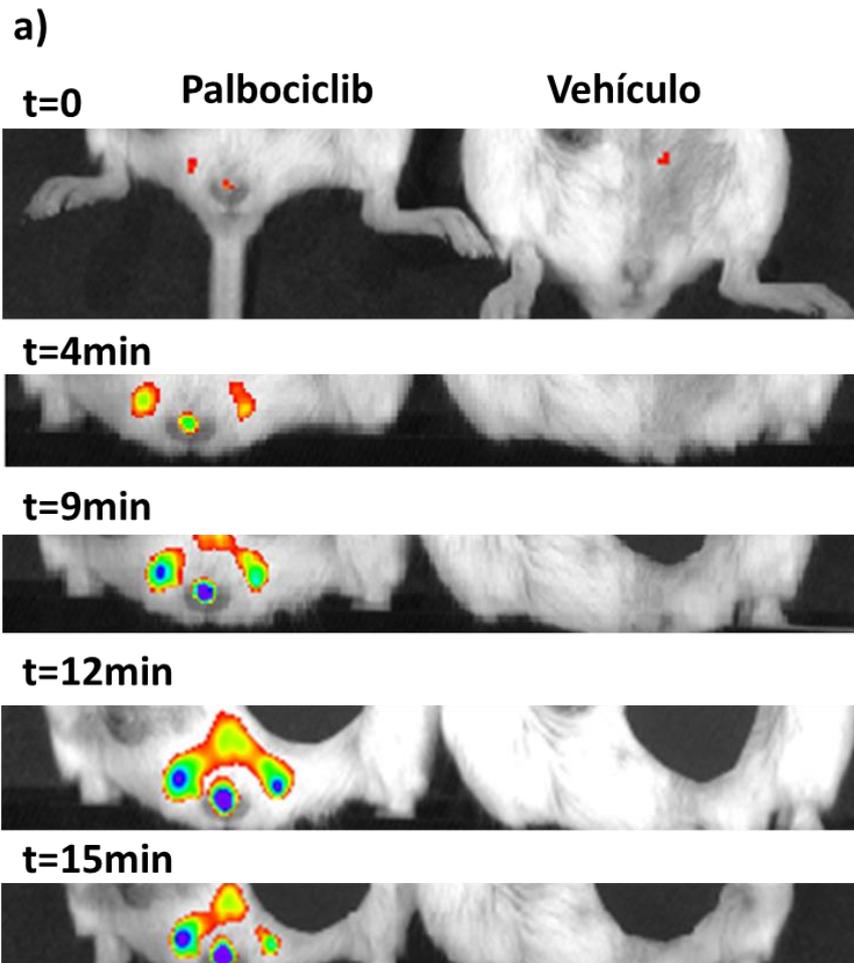


FIG. 4

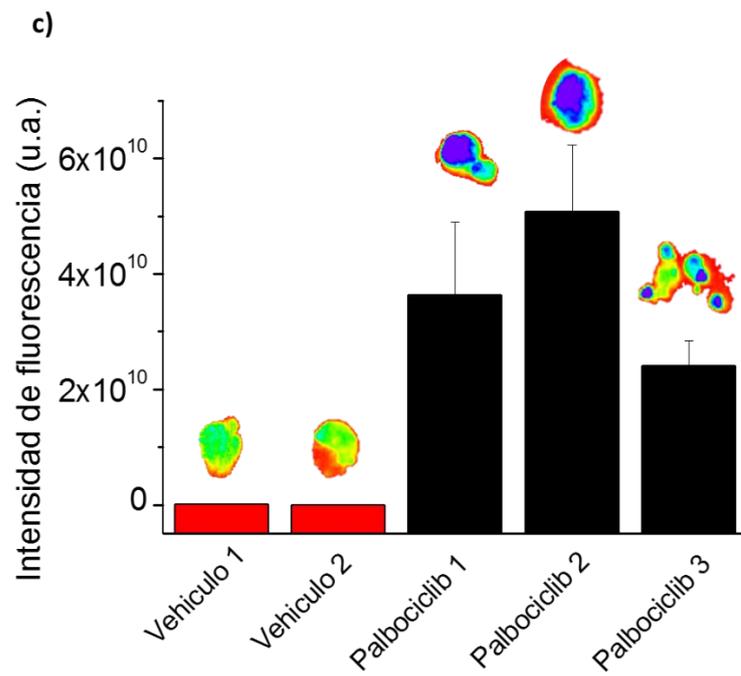
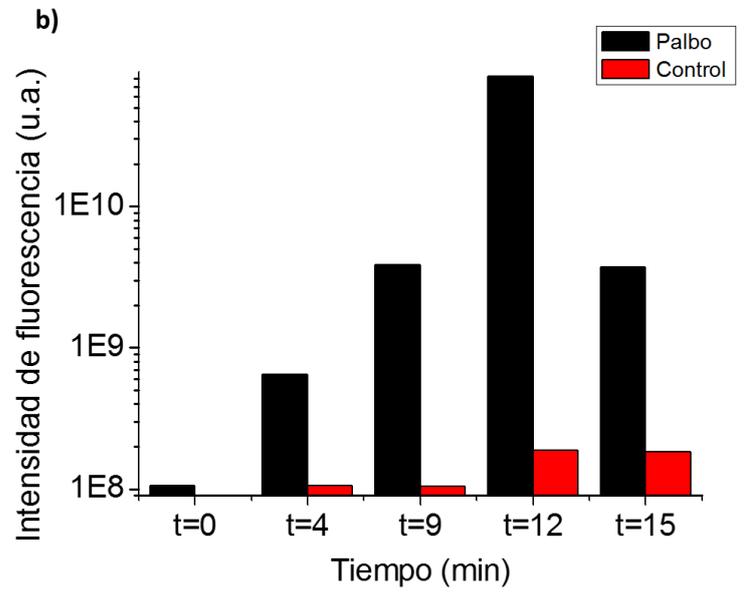


FIG. 4 cont.

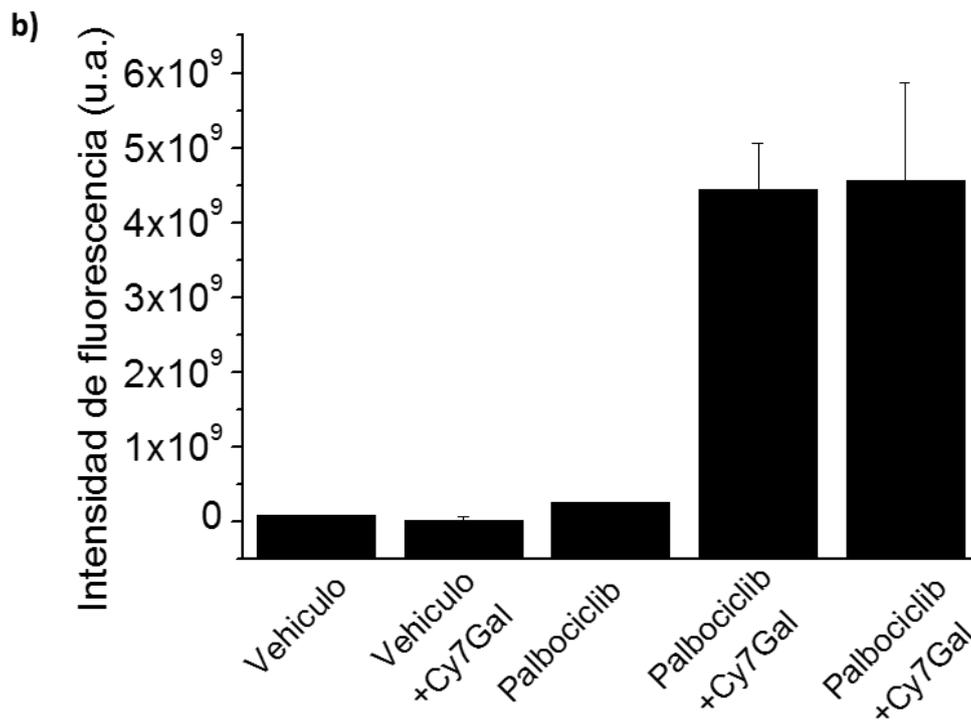
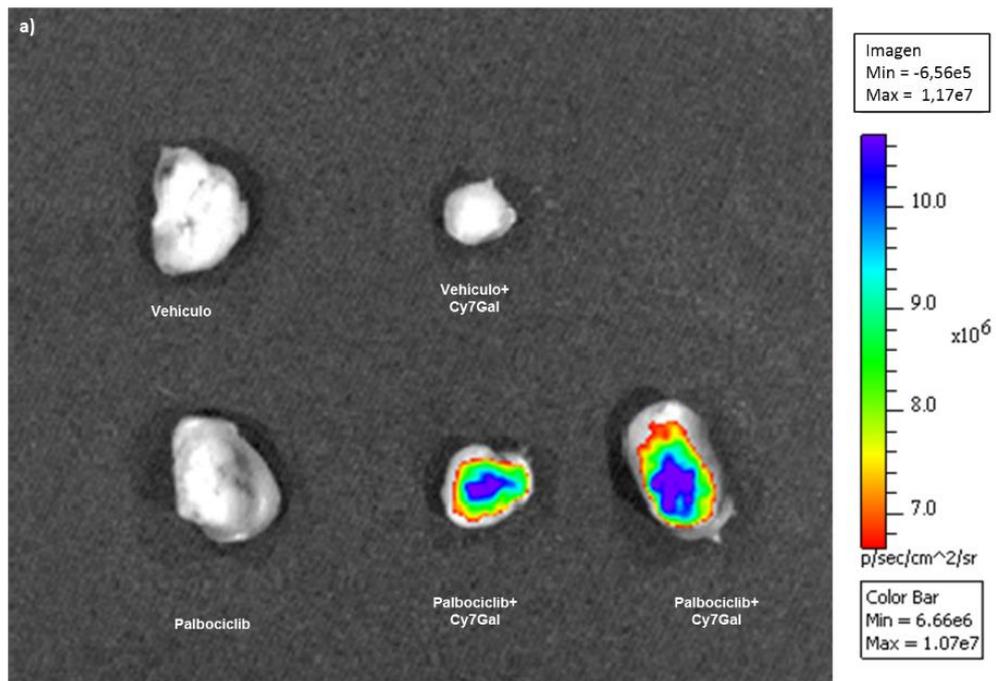


FIG. 5

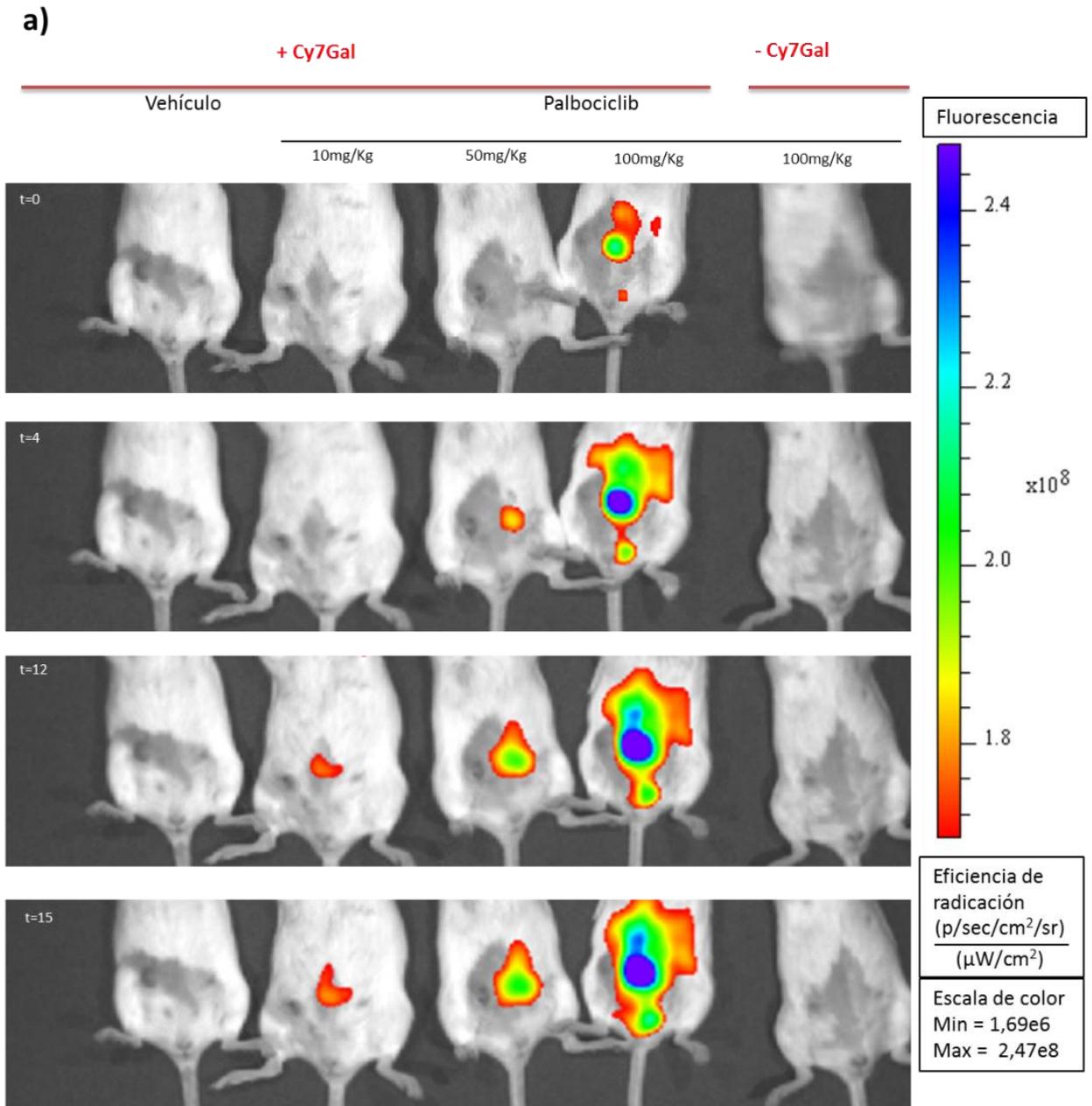


FIG. 6

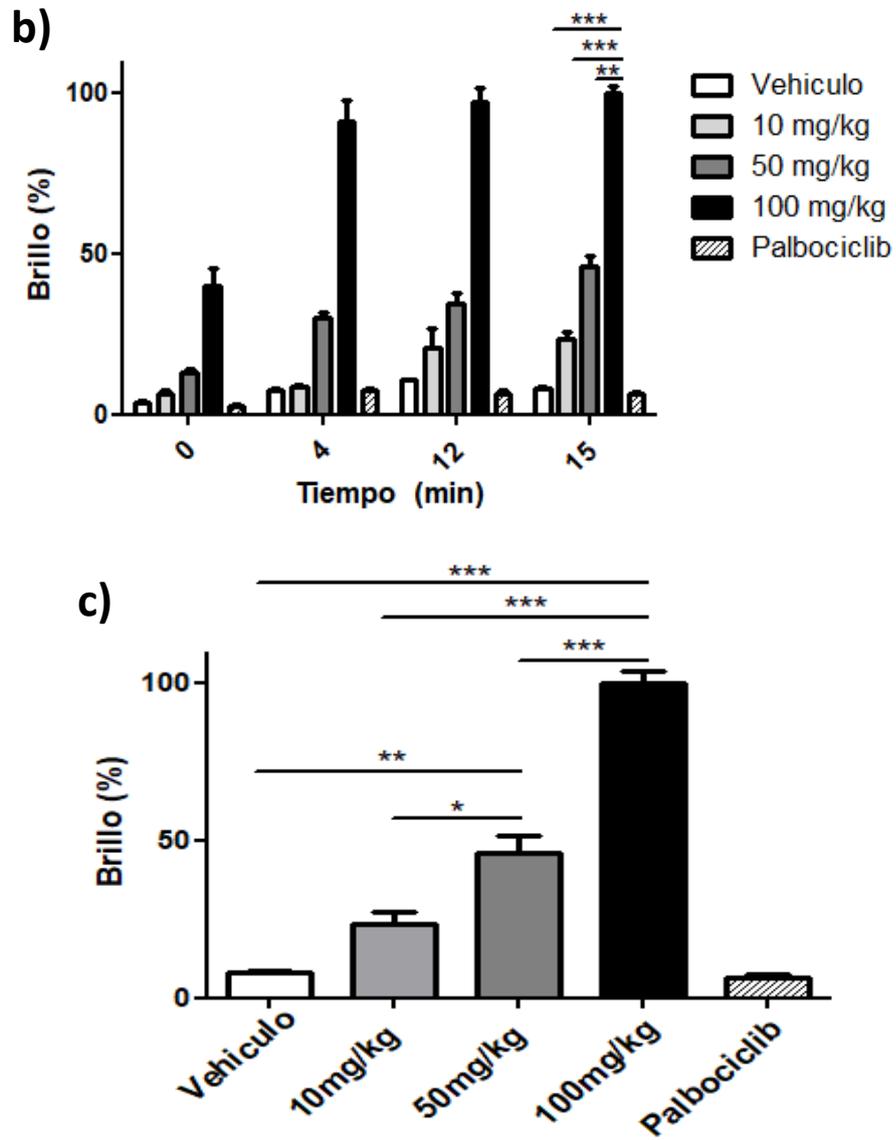


FIG. 6 cont.

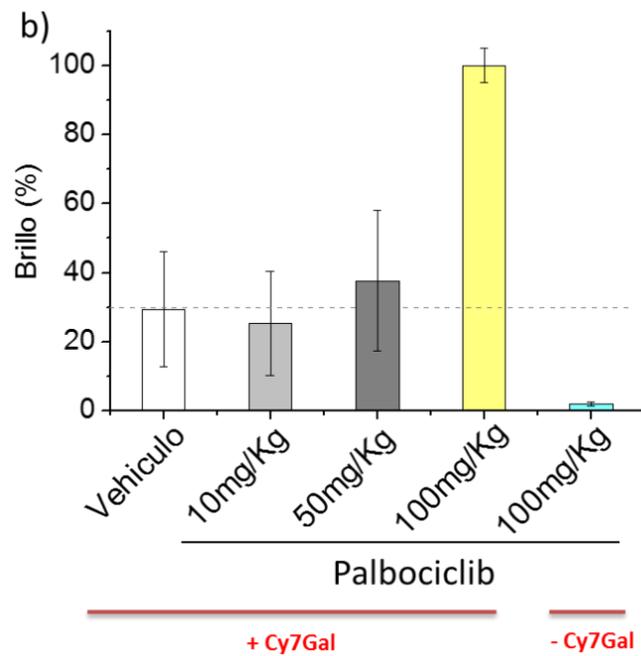
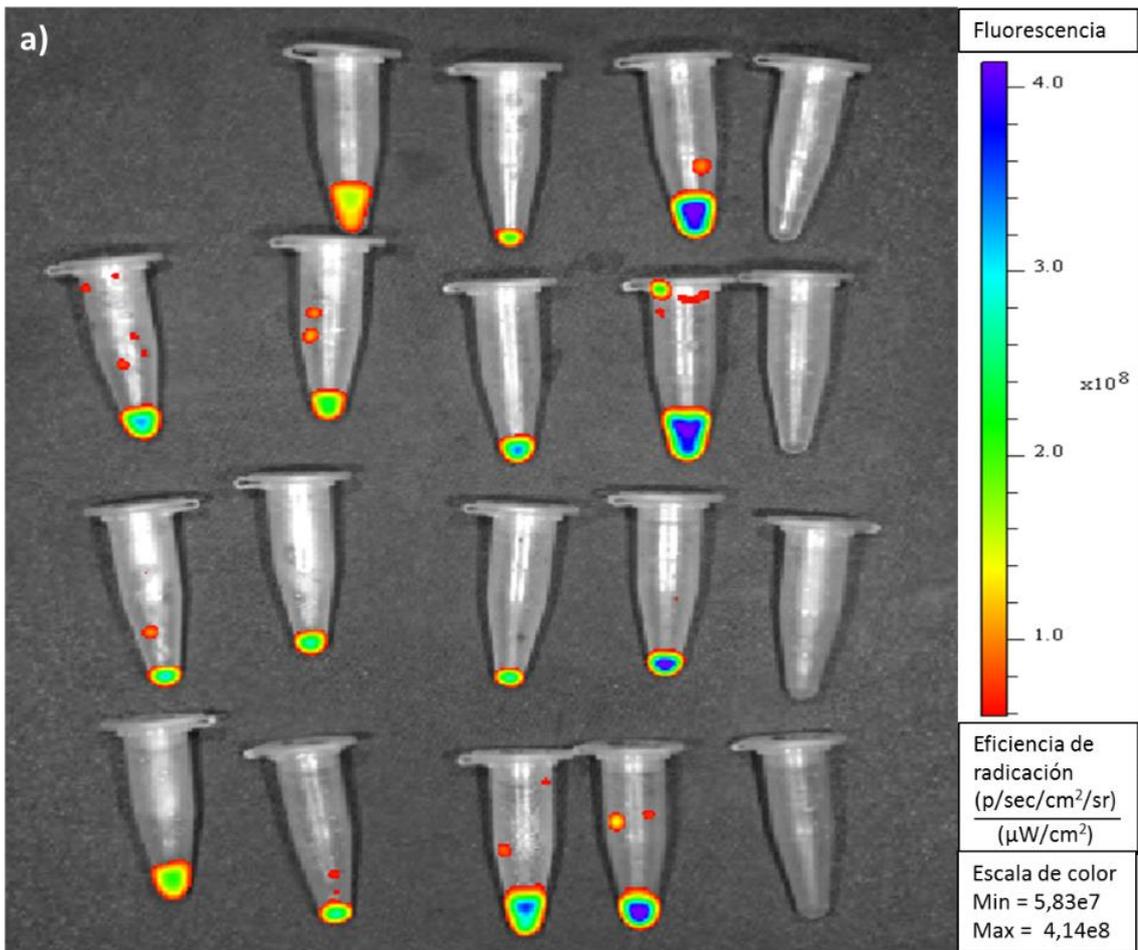


FIG. 7

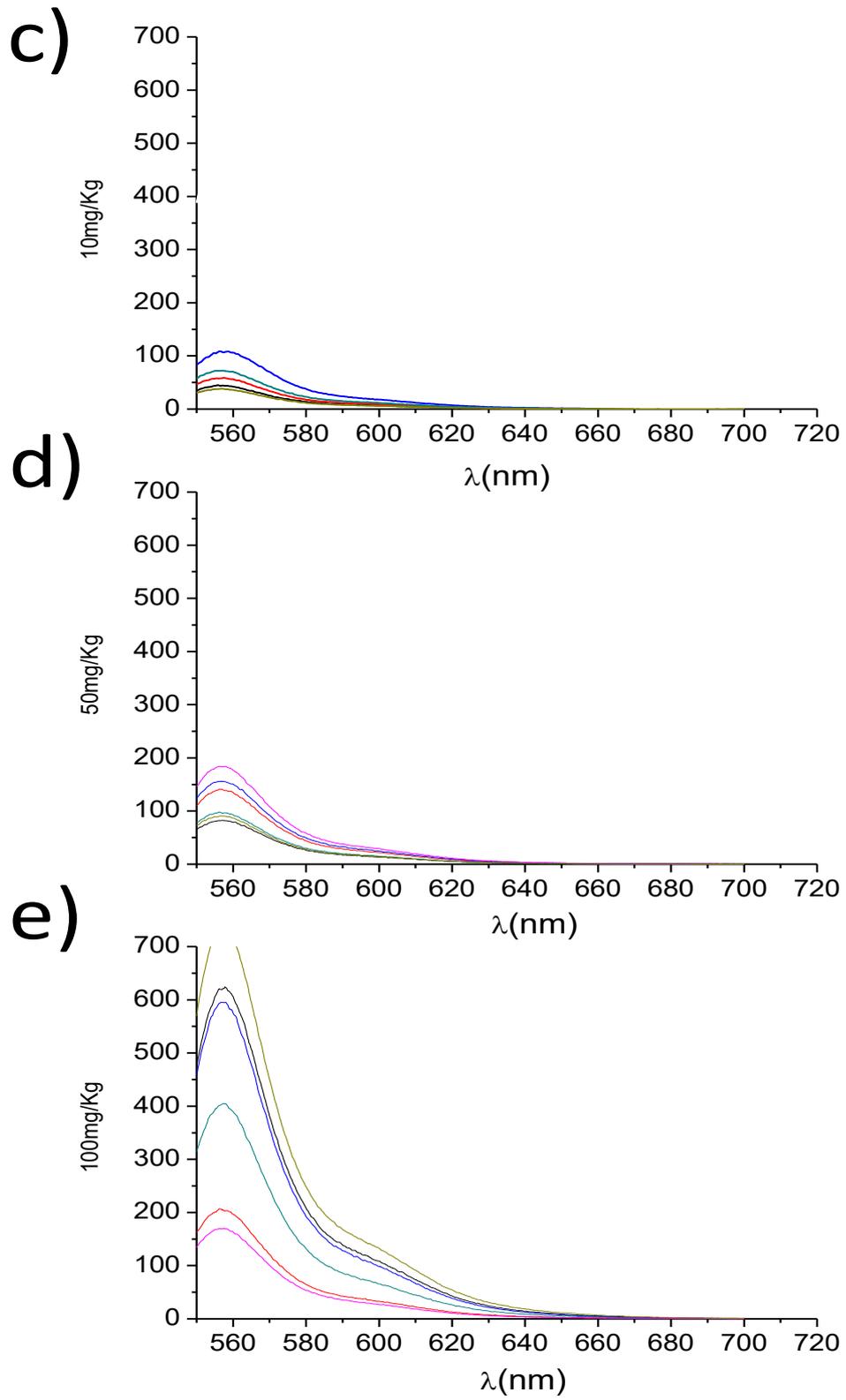


FIG. 7 cont.

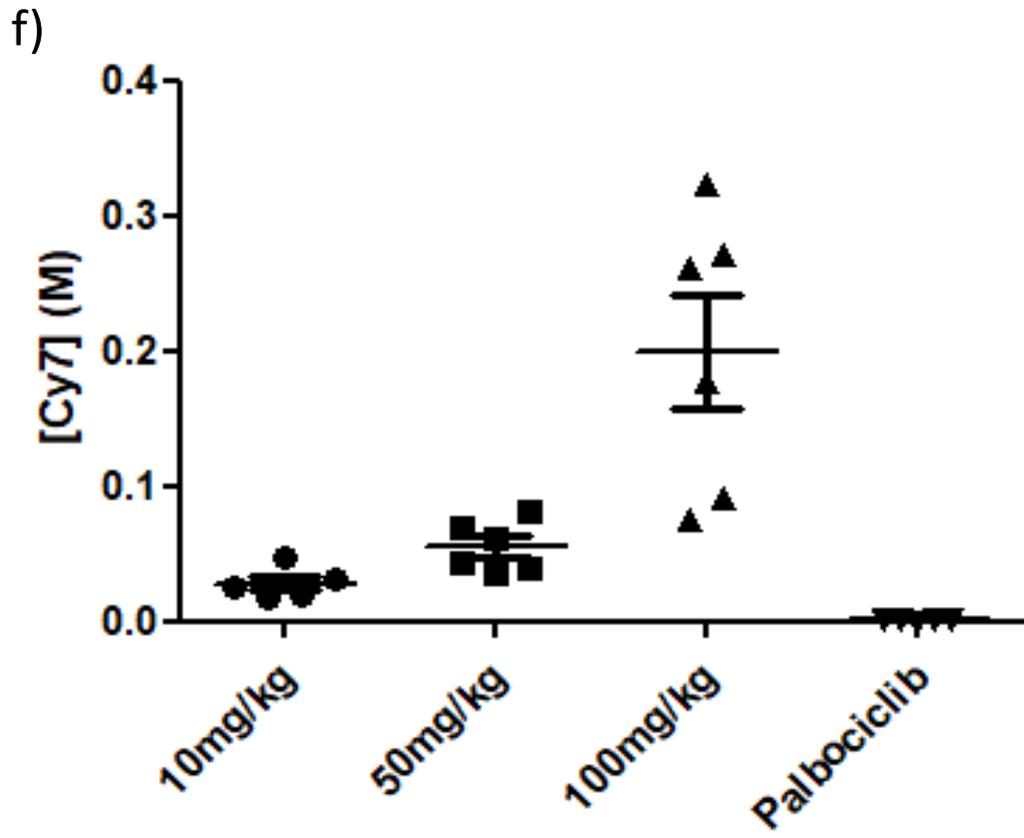


FIG. 7 cont.

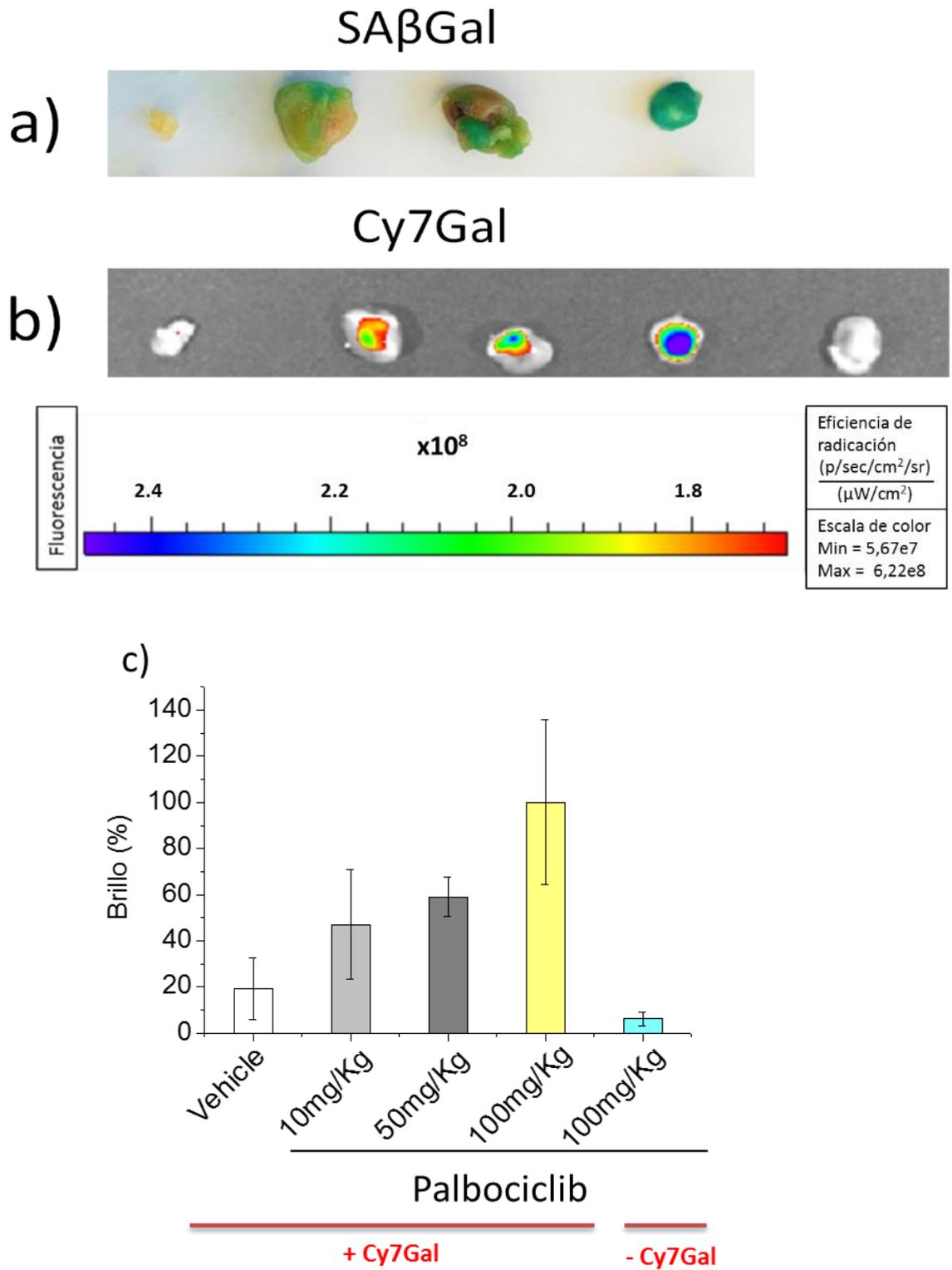


FIG. 8

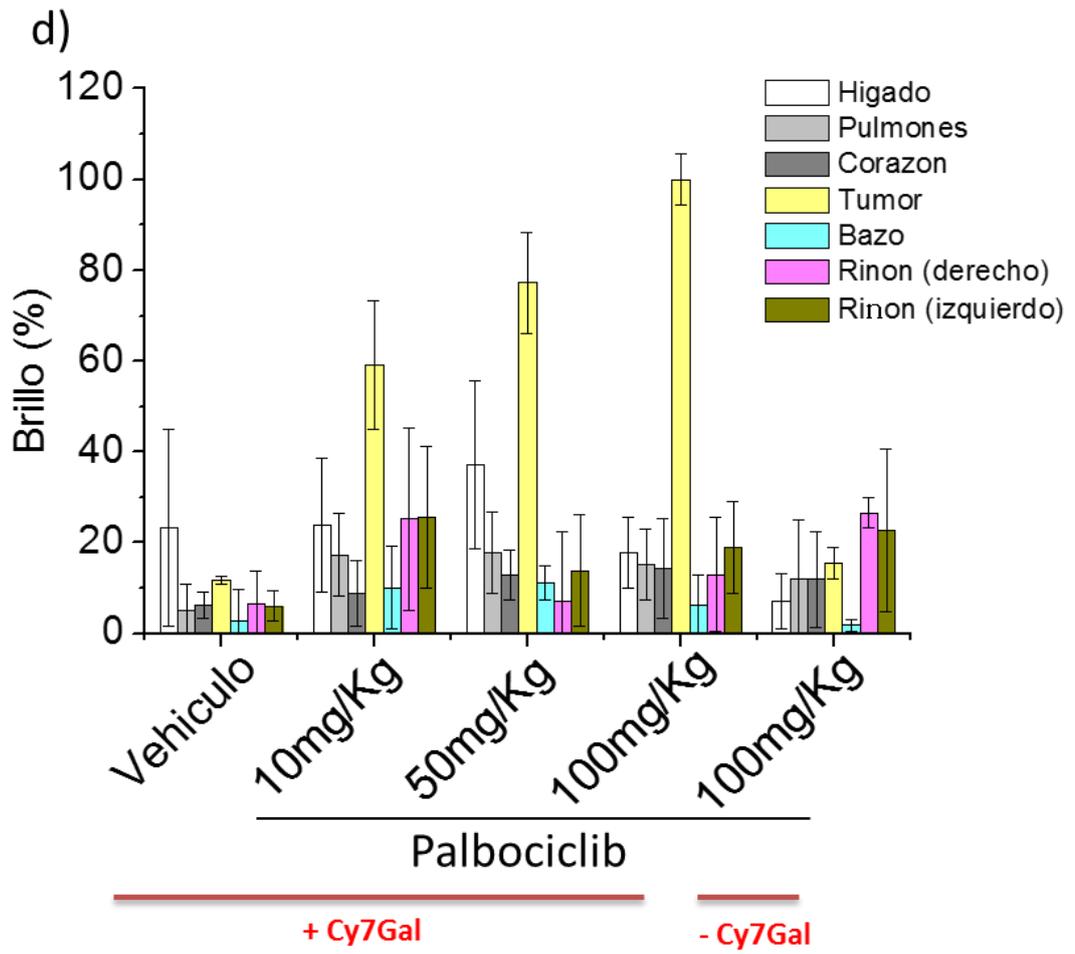


FIG. 8 cont.

a)

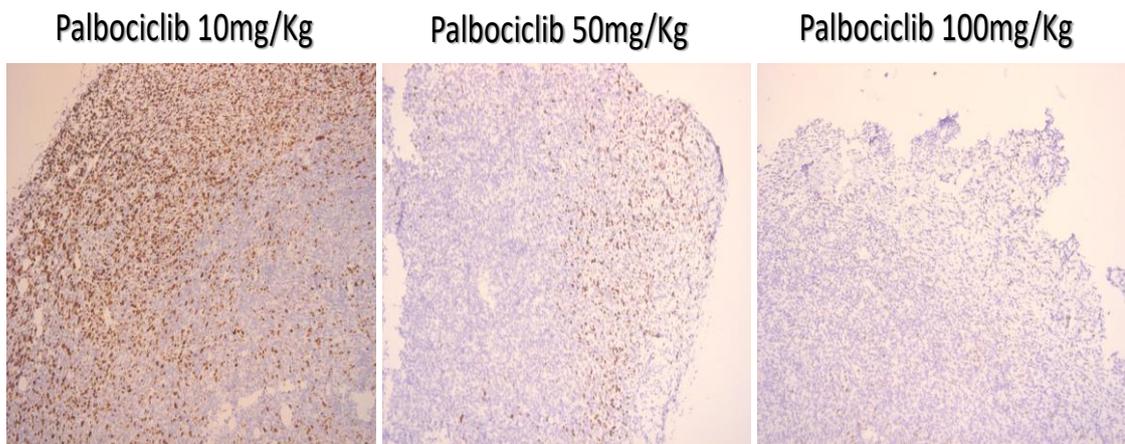


FIG. 9

b)

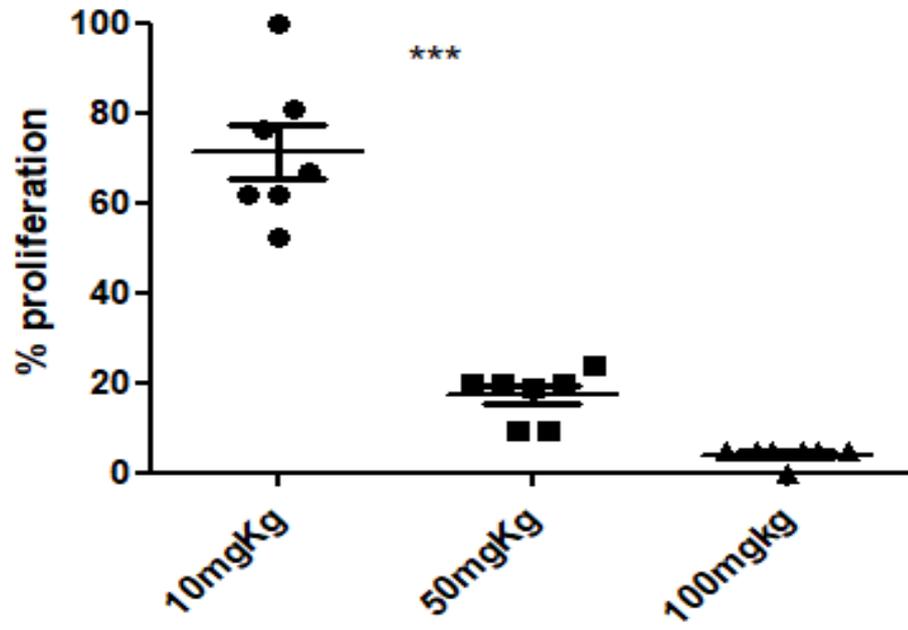


FIG. 9 cont.



- ②① N.º solicitud: 201930893  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.10.2019  
③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados                                                                                                                                                                                                                            | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| A         | WO 2012/123916 A2 (RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY) 20/09/2012, todo el documento en especial reivindicación 38 y figs 2 A-H                                                                                                                        | 1-17                       |
| A         | WO 2014/032737 A1 (EBERHARD KARLS UNIVERSITAET TUEBINGEN MEDIZINISCHE FAKULTAET) 06/03/2014, reivindicaciones                                                                                                                                    | 1-17                       |
| A         | MAURO SAFIR et al. Development of highly sensitive fluorescent probes for the detection of beta-galactosidase activity, application to the real-time monitoring of senescence in live cells. ANALYST, 2018, Vol. 143, Páginas 2680-2688. resumen | 1-17                       |
| A         | RONALD GARY et al. Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 2005, Vol. 343, Páginas 329-334. resumen                                                         | 1-17                       |
| A         | QIN ZENG et al. Photoacoustic nanoprobe for beta-galactosidase activity detection and imaging in vivo. Journal Innovative Optical Health Sciences, 05/2019, Vol. 12, Páginas 1941001. resumen, figura 1                                          | 1-17                       |

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
14.11.2019

Examinador  
M. Fernández Fernández

Página  
1/2

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07D209/12** (2006.01)

**C07H15/26** (2006.01)

**G01N33/52** (2006.01)

**A61K49/00** (2006.01)

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

C07D, C07H, G01N, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, ESPACENET, BIOSIS, CAS, PUBMED, NPL