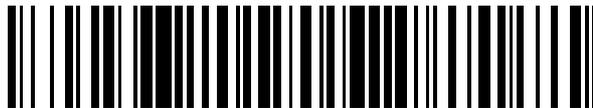


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 255**

21 Número de solicitud: 201300610

51 Int. Cl.:

**C07C 211/30** (2006.01)

**G01N 23/223** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**20.06.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.01.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070503**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA (100.0%)  
Centro de Innovación e Transferencia de  
Tecnoloxía, Edif. Emprendia Campus Sur  
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**MASCAREÑAS CID , José Luis ;  
VAZQUEZ SENTIS , Eugenio ;  
MARTINEZ COSTAS , José y  
SANCHEZ LOPEZ , Mateo Isidro**

54 Título: **Compuestos fluorescentes**

57 Resumen:

Compuestos fluorescentes. La presente invención se dirige a los compuestos de fórmula I, a un kit que comprende dichos compuestos y a su aplicación como agentes de tinción. Dichos compuestos están diseñados para que sean capaces de internalizarse en la célula viva, acumularse selectivamente en las mitocondrias y teñirlas de forma preferente a otros orgánulos celulares. Además tienen una elevada fotoestabilidad. Adicionalmente, los compuestos de la invención permiten ser aplicados en cultivos celulares, tanto cultivos primarios como líneas celulares, bien en células vivas o bien fijadas con paraformaldehído, manteniendo la eficacia de la tinción y su selectividad, permitiendo su use en experimentos de visualización en tiempo real.

ES 2 527 255 A1

## **DESCRIPCIÓN**

### Compuestos fluorescentes

#### **Sector de la técnica**

La presente invención se dirige a los compuestos de fórmula I, a un kit que comprende dichos compuestos y a su aplicación como agentes de tinción.

#### **Antecedentes de la invención**

Las mitocondrias son responsables de la producción de más del 90% de la energía celular de los mamíferos y juegan un papel fundamental en la función celular y de ciertos tejidos. Debido a su implicación crítica en las células es importante la detección de las mismas y la identificación de su comportamiento, que depende del estado metabólico de la célula . En este sentido se han diseñado agentes de tinción fluorescentes selectivos para mitocondrias y varios son comerciales, por ejemplo el Mitotracker ® o el Rodamina123.

La publicación Cancer Research, 2002, 62, 7219-7229, describe difenilfurano diamidinas y cómo puede influir la incorporación de anillos aromáticos como grupos terminales de las cadenas laterales de la furamidina en la acumulación de dichos compuestos entre el núcleo y el citoplasma. En concreto, se describe que los derivados de furamidina que poseen un anillo aromático o heteroaromático en la posición terminal de una cadena lateral se acumulan más fácilmente en el citoplasma, mayoritariamente en las mitocondrias, a diferencia de los correspondientes derivados alquílicos que se acumulan selectivamente en el núcleo.

La reciente publicación Journal of the American Chemical Society, 2012, 135, 62-65, describe un compuesto que combina un grupo luminógeno de emisión inducida por agregación y dos grupos trifenilfosfonio, que es conocido por dirigir la entrada de sondas a las mitocondrias. El compuesto resultante mostró especificidad por las mitocondrias y una fotoestabilidad más elevada que otros reactivos.

Sin embargo, los agentes de tinción comerciales presentan problemas y la industria busca constantemente agentes fluorescentes con propiedades mejoradas. Por ejemplo, en muchos casos estos agentes presentan una baja fotoestabilidad, pobre selectividad y/o insuficiente internalización en las mitocondrias.

**Descripción breve de la invención**

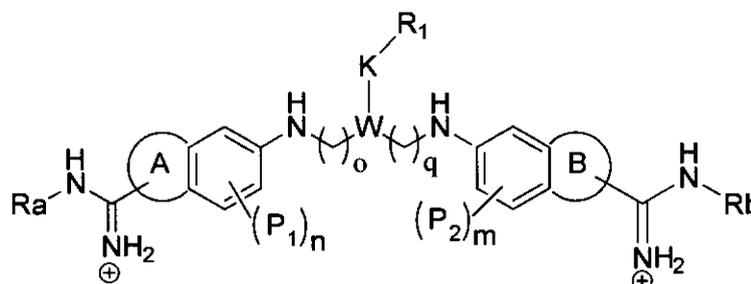
Los autores de la presente invención han desarrollado nuevos compuestos con propiedades fluorescentes que los hacen adecuados para ser utilizados en investigación aplicada a células. Dichos compuestos están diseñados para que sean capaces de internalizarse en la célula viva, acumularse selectivamente en las mitocondrias y teñirlas de forma preferente a otros orgánulos celulares. Más concretamente, los autores encontraron que compuestos derivados de bis-amidinios con sistemas aromáticos extendidos son capaces de internalizarse en la célula con sorprendente efectividad y acumularse de forma selectiva en las mitocondrias. Además no tiñen otros orgánulos celulares, de manera que son adecuados para teñir selectivamente las mitocondrias. Además, los compuestos de la presente invención presentan sorprendentemente una elevada fotoestabilidad, de modo que pueden ser irradiados durante un tiempo prolongado sin que tenga lugar su fotodegradación, lo que permite un mayor tiempo de observación durante el experimento. La fotoestabilidad de estos compuestos permite diseñar una gran variedad de experimentos, por ejemplo irradiar la muestra en diferentes momentos durante el experimento o el estudio celular, irradiar la muestra durante tiempo prolongado, o combinar estos compuestos con otros reactivos durante el experimento.

Adicionalmente, los compuestos de la invención permiten ser aplicados en cultivos celulares, tanto cultivos primarios como líneas celulares, bien en células vivas o bien fijadas con paraformaldehído, manteniendo la eficacia de la tinción y su selectividad, permitiendo su uso en experimentos de visualización en tiempo real (*time-resolved fluorescence*).

Por otra parte, se ha comprobado con alguno de los compuestos de la invención, que no son citotóxicos, y que permiten monitorizar el proceso de reciclaje mitocondrial, lo que le confiere un valor añadido.

Así, en un aspecto la invención se dirige a compuestos de fórmula I

30



I

donde A y B se seleccionan cada uno independientemente de arilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos,

5 cada uno de n, m, o, q se selecciona independientemente de 1, 2, ó 3,

W se selecciona de entre enlace sencillo, alquilo, arilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos,

R<sub>1</sub> se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, -OR', -N(R')(R''), alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquino, arilo, heteroarilo, azido, tetrazino y un grupo fluoróforo aceptor,

10 K se selecciona de entre enlace sencillo, alquilo, -O-alquil-, -O-alquil-N(R')-, heterociclo y heteroarilo,

cada uno de R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> se selecciona independientemente de entre hidrógeno y un grupo protector fotolábil,

15 cada uno de P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>, heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub> y heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub> opcionalmente sustituidos, NO<sub>2</sub>, CN, halógeno, -OR', -SR', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -OS(O)<sub>2</sub>R', -N(R')(R''), -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)N(R')(R''), -OC(O)R' y -N(R')C(O)R'',

20 cada R' y R'' se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>, heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub> y heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub> opcionalmente sustituidos,

y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

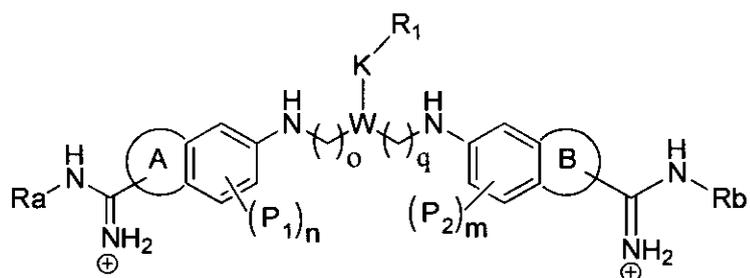
En otro aspecto la invención se dirige a un kit para el estudio celular que comprende un compuesto de fórmula I como se ha descrito anteriormente.

25 En otro aspecto la invención se dirige al uso de un compuesto de fórmula I como se ha descrito anteriormente, como reactivo de fluorescencia o agente de tinción.

En otro aspecto la invención se dirige a un método para teñir mitocondrias o un componente mitocondrial, que comprende incubar una muestra, donde dicha muestra

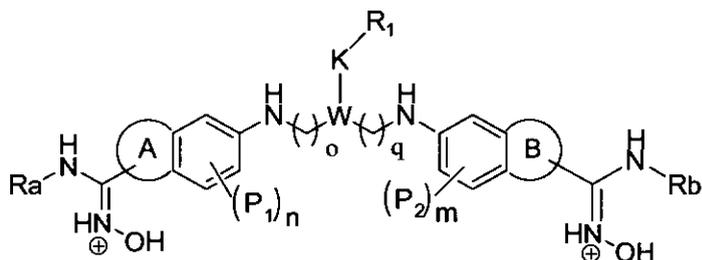
comprende mitocondrias o un componente mitocondrial, con una solución acuosa de un compuesto de fórmula I tal y como se define arriba, donde dicho compuesto está en una cantidad suficiente para teñir mitocondrias o un componente mitocondrial y la incubación tiene lugar durante un tiempo suficiente para detectar fluorescencia.

- 5 Un aspecto adicional de la invención es un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula I,



I

- 10 que comprende la reducción de un compuesto de fórmula IX



IX

- 15 y opcionalmente el acoplamiento con un grupo protector fotolábil, donde A, B, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o, q, W, K, R<sub>1</sub>, Ra, Rb son como se han definido anteriormente, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

Un aspecto adicional de la invención son los compuestos de fórmula IX y X utilizados como intermedios en la síntesis de los compuestos de fórmula I.

## 20 Descripción de las figuras

**Figura 1.** Arriba: Estructura del Compuesto (3). Abajo: Espectro de emisión de fluorescencia en agua del Compuesto (3). Longitud de onda de excitación 329 nm, el espectro es recogido de 385 a 600 nm.

**Figura 2.** Fila superior: Izquierda: Células CEF incubadas con Compuesto (3) 5 $\mu$ M y observadas en el canal del azul a 1000X. Centro: Células CEF incubadas con MitoTracker 500 nM y observadas en el canal del rojo a 1000X. Derecha: Superposición de ambas imágenes que demuestra la localización mitocondrial del Compuesto (3) en un cultivo primario. Fila inferior: Mismo protocolo realizado sobre células VERO fijadas con para-formaldehído.

**Figura 3.** Columna Izquierda: Diferentes líneas celulares incubadas con Compuesto (3) 5 $\mu$ M, observadas en el canal del azul a 1000X. Columna Central: Mismas líneas celulares incubadas con MitoTracker 500 nM, observadas en el canal del rojo a 1000X. Columna Derecha: Superposición de ambas imágenes que demuestra la localización mitocondrial del Compuesto (3) en diferentes líneas inmortales.

**Figura 4.** Arriba: Células Vero incubadas con Rodamina123 2 $\mu$ M durante 30 min y observadas en el canal del verde a 1000X a tiempo 0, 30 y 60 segundos. Medio: Células Vero incubadas con MitoTracker 500 nM durante 30 min y observadas en el canal del rojo a 1000X a tiempo 0, 30 y 60 segundos. Abajo: Células Vero incubadas con Compuesto (3) 5  $\mu$ M durante 30 min y observadas en el canal del rojo a 1000X a tiempo 0, 2 y 8 minutos.

**Figura 5.** Izquierda: Celulas Vero incubadas con Compuesto (3) 5 $\mu$ M observadas en el canal del azul a 1000X tras 24 horas. Centro: Celulas Vero incubadas con Rodamina123 2 $\mu$ M antes de ser observadas en el canal del verde a 1000X. Derecha: Superposición de ambas imágenes que demuestra la no localización mitocondrial del Compuesto (3) al cabo de 24 horas.

**Figura 6.** Columna Izquierda: Células Vero incubadas con LysoTracker 30 minutos antes de ser visualizadas, a diferentes tiempos de incubación con Compuesto (3), en el canal del rojo a 1000X. Columna Central: Células Vero incubadas con Compuesto (3) 5 $\mu$ M durante 30 minutos y, tras lavar, se deja evolucionar el cultivo a tiempo 0, 3 y 5 horas visualizado en el canal de azul a 1000X. Columna Derecha: Superposición de ambas imágenes que demuestra el reciclaje mitocondrial del Compuesto (3) y como este se encuentra en Lisosomas.

**Figura7:** Fotografías de microscopia electrónica de células Vero sin tratar (7A y 7B), o incubadas con Compuesto (3) 5 $\mu$ M en las condiciones previamente descritas (7C y 7D).

**Figura 8:** Fotografías del cultivo celular teñido con azul de tripano a las 48 y 72 horas tras ser incubado con Compuesto (3) 5 M durante 30 minutos en las condiciones

previamente descritas. Las células muertas resultan teñidas de azul y son indicadas en una foto con una flecha.

**Figura 9.** Arriba: Estructura de la 6-{3-[(6-carbamimidoylnaftalen-2-il)oxi]propoxi}naftalen-2-carboximidamide. Centro: Células Vero incubadas a 5  $\mu$ M en las condiciones descritas. Abajo: Espectro de emisión de fluorescencia en agua de este compuesto. Longitud de onda de excitación 329 nm, el espectro es recogido de 355 a 550 nm

**Figura 10.** Arriba: Estructura de la 6-((3-hidroxipropil)amino)-2-naftimidamide. Centro: Células Vero incubadas a 5  $\mu$ M en las condiciones descritas. Abajo: Espectro de emisión de fluorescencia en agua de este compuesto. Longitud de onda de excitación 329 nm, el espectro es recogido de 385 a 600 nm.

**Figura 11.** Arriba: Estructura de la 6-({3-[(naftalen-2-il)amino]propil}amino)-naftalen-2-carboximidamide midamida (Compuesto (18)). Abajo izquierda (11A): Células Vero incubadas con Compuesto (3) 1 $\mu$ M en las condiciones descritas observadas en el canal del azul a 1000X. Abajo centro (11B) Células Vero incubadas con LysoTracker® en las condiciones descritas observadas en el canal del rojo a 1000X. Abajo derecha (11C): Superposición de ambas imágenes que demuestra la no localización mitocondrial del Compuesto (18).

## 20 Descripción detallada de la invención

### Definiciones

“Alquilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, acíclica, formada por átomos de carbono e hidrógeno, sin insaturaciones, de, salvo que se indique otra cosa, 1 a 12, preferiblemente de 1 a 8, más preferiblemente de 1 a 6, y aún más preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono, y que se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo. Los radicales alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo alcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo tioalcoxi, un grupo amino, un grupo heteroalquilo o CF<sub>3</sub>, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, n-pentilo, etc.

“Alquenilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, acíclica, formada por átomos de carbono e hidrógeno, que posee de, salvo que se indique otra

cosa, entre 1 y 3 grupos alqueno, de 1 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono. Los radicales alquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo tioalcoxi, un grupo amino, un grupo heteroalquilo o CF<sub>3</sub>, por ejemplo, etenilo, n-propenilo, n-butenilo, n-pentenilo, etc.

“Alquinilo” se refiere a una cadena hidrocarbonada lineal o ramificada, acíclica, formada por átomos de carbono e hidrógeno, que posee de, salvo que se indique otra cosa, entre 1 y 2 grupos alquino, de 1 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono. Los radicales alquinilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo tioalcoxi, un grupo amino, un grupo heteroalquilo o CF<sub>3</sub>, por ejemplo, propinilo, n-butinilo, n-pentinilo, etc.

“Cicloalquilo”, “cicloalquenilo” y “cicloalquinilo” se refieren a un anillo monocíclico o policíclico, no aromático que comprende átomos de carbono e hidrógeno, preferiblemente de, salvo que se indique otra cosa, entre 3 y 10 átomos de carbono y respectivamente está saturado (cicloalquilo), posee al menos un grupo alqueno (cicloalquenilo), posee al menos un grupo alquino (cicloalquinilo). Son ejemplos de estos grupos, aunque no se limita a esta lista, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclooctenilo, ciclohexinilo.

“Halógeno” es flúor, cloro, bromo o yodo.

“Ariilo” se refiere a un hidrocarburo aromático de, salvo que se indique otra cosa, 6 a 15, preferiblemente de 6 a 10 átomos de carbono, tal como fenilo o naftilo. Los radicales ariilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro, un grupo tioalcoxi, un grupo alquilo o CF<sub>3</sub>.

“Heterociclo” se refiere a un anillo estable de, salvo que se indique otra cosa, 3 a 15 miembros formado por átomos de carbono e hidrógeno y de entre 1 a 5 heteroátomos, donde los heteroátomos se seleccionan de entre nitrógeno, oxígeno y azufre, preferiblemente un anillo de 3 a 6 miembros formado, y más preferiblemente un anillo

de 5 a 6 miembros y de entre 1 a 3 heteroátomos. Para los propósitos de esta invención, los grupos heterocíclico pueden ser sistemas monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos, que pueden incluir anillos fusionados; y el átomo de nitrógeno o de azufre en el anillo heterocíclico puede estar opcionalmente oxidado; el átomo de nitrógeno puede estar  
 5 opcionalmente cuartenarizado; y el radical heterocíclico puede estar parcial o totalmente saturado. Los radicales heterocíclicos pueden ser aromáticos (por ejemplo, pueden tener uno o más anillos aromáticos) en cuyo caso se consideran como "heteroarilos" para los propósitos de la presente invención. El anillo heterocíclico puede estar sustituido por uno o más sustituyentes seleccionados entre el grupo consistente en un átomo de  
 10 halógeno, un grupo hidroxilo, un grupo carboxi, un grupo alcoxi, un grupo alquilo, un grupo tioalcoxi, un grupo ciano, un grupo nitro o CF<sub>3</sub>. Ejemplos de tales heterociclos incluyen, por ejemplo, furano, tiofeno, pirrol, imidazol, triazol, alquiltriazol, tetrazol, isotiazol, benzotiofeno, benzofurano, indol, benzoimidazol, tetrahidrofurano, ciclooctan[d]piridazino, piridina, biperidina y terpiridina.

15 "Buen grupo saliente", es un átomo o fragmento molecular que se desprende de una molécula de forma eficiente en una rotura heterolítica de enlace llevando consigo el par electrónico del enlace. Normalmente los grupos salientes se desprenden en forma de aniones y se considera que un buen grupo saliente es una base débil. Ejemplos de buen grupo saliente son generalmente conocidos por el experto medio y la elección del más  
 20 apropiado en cada situación forma parte de su trabajo diario. Ejemplos no limitativos son OTs (tosilo), OMs (mesilo) o halógeno.

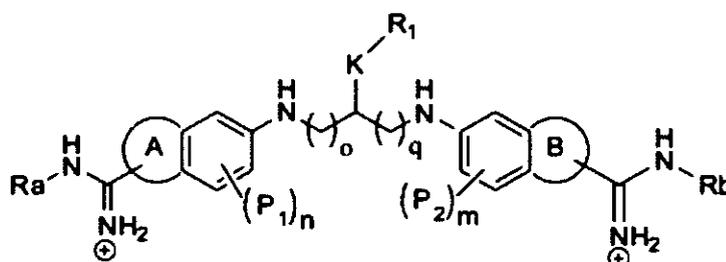
Los compuestos de la presente invención están cargados positivamente por lo que siempre están acompañados por un anión orgánico o inorgánico, lo que constituye una sal del compuesto de fórmula I. Dicho anión puede ser, aunque la siguiente lista no es  
 25 limitativa, formiato, acetato, trifluoroacetato, oxalacetato, succinato, fosfato, cloruro, bromuro, yoduro, sulfato, hidrogenosulfato, etc.

### Compuestos

Los compuestos de fórmula I son capaces de internalizarse en las células y una vez en  
 30 su interior se acumulan en las mitocondrias con excelente selectividad. Al irradiar las células tratadas con los compuestos de la invención se observa una emisión de fluorescencia que señala las mitocondrias y/o componentes mitocondriales. En una

realización particular, los compuestos de la invención emiten fluorescencia a una longitud de onda de entre 380 nm y 750 nm. En una realización más particular, los compuestos de la invención emiten fluorescencia a una longitud de onda de entre 420 nm y 570 nm.

5 En otra realización particular, la invención se refiere a compuestos de fórmula Ia

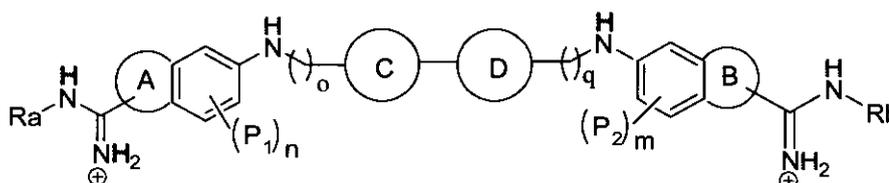


Ia

donde A, B, Ra, Rb, K, R<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o, q son como se han definido anteriormente, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

10 En una realización particular de los compuestos de fórmula I el grupo K-R<sub>1</sub> es -OR' o -N(R')(R''), en donde R' y R'' son tal y como se han definido anteriormente.

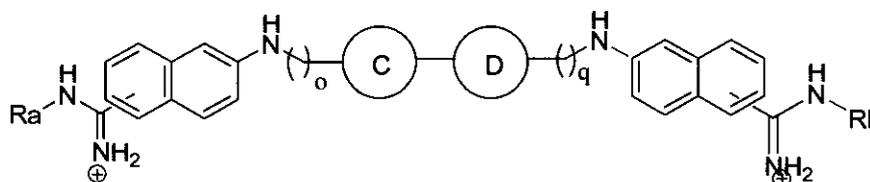
En otra realización particular, la invención se refiere a compuestos de fórmula Ib



Ib

15

o a un compuesto de fórmula Ic



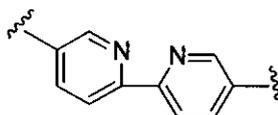
Ic

20 en donde A, B, Ra, Rb, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o, q son como se han definido anteriormente, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad, y en donde los anillos C y D son heterociclos.

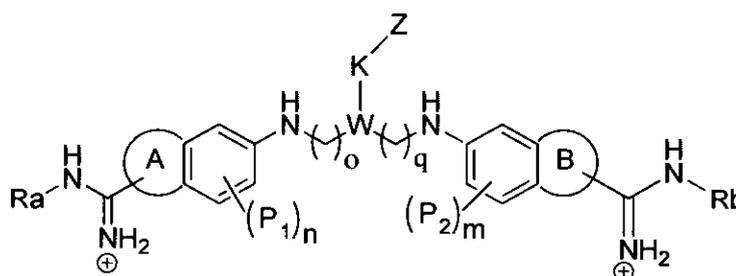
Estos derivados son especialmente apropiados para obtener compuestos de coordinación con metales de transición que permitan modular las propiedades de los compuestos de

la invención. En una realización particular, los compuestos de la invención de fórmula Ib o Ic se coordinan con metales de transición, por ejemplo los que se seleccionan del grupo formado por Ru, Ir, Os, Rh y Re.

En una realización particular los anillos C y D de los compuestos de fórmula Ib o Ic son una piridina, formando el siguiente grupo bis-piridinio:



En otra realización particular, la invención se refiere a compuestos de fórmula Id

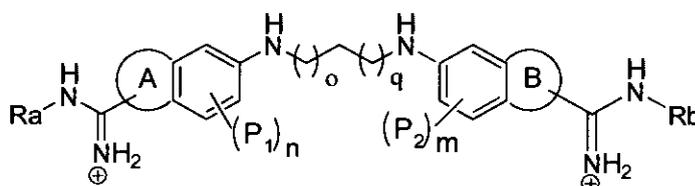


10 Id

donde Z es un grupo fluoróforo aceptor y A, B, Ra, Rb, W, K, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o, q son como se han definido anteriormente, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

Otra realización particular de la presente invención se refiere a compuestos de fórmula

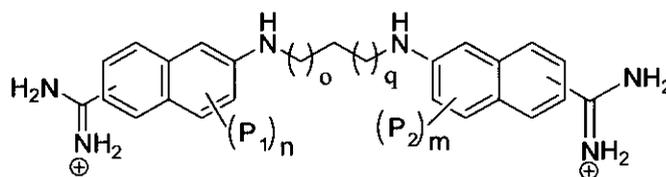
15 Ie



Ie

donde A, B, Ra, Rb P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o, q son como se han definido anteriormente, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

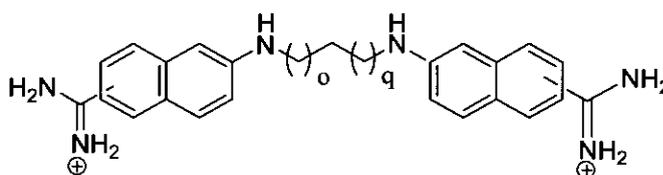
20 Otra realización particular de la presente invención se refiere a compuestos de fórmula If



If

donde o y q son como se han definido anteriormente, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

- 5 Otra realización particular de la presente invención se refiere a compuestos de fórmula Ig

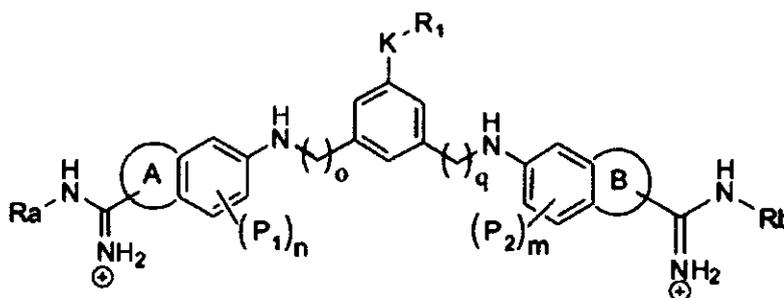


Ig

donde P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o, q son como se han definido anteriormente, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

10

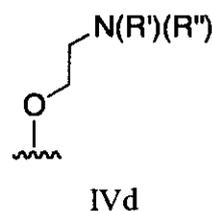
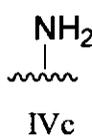
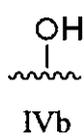
Otra realización particular de la presente invención se refiere a compuestos de fórmula Ih

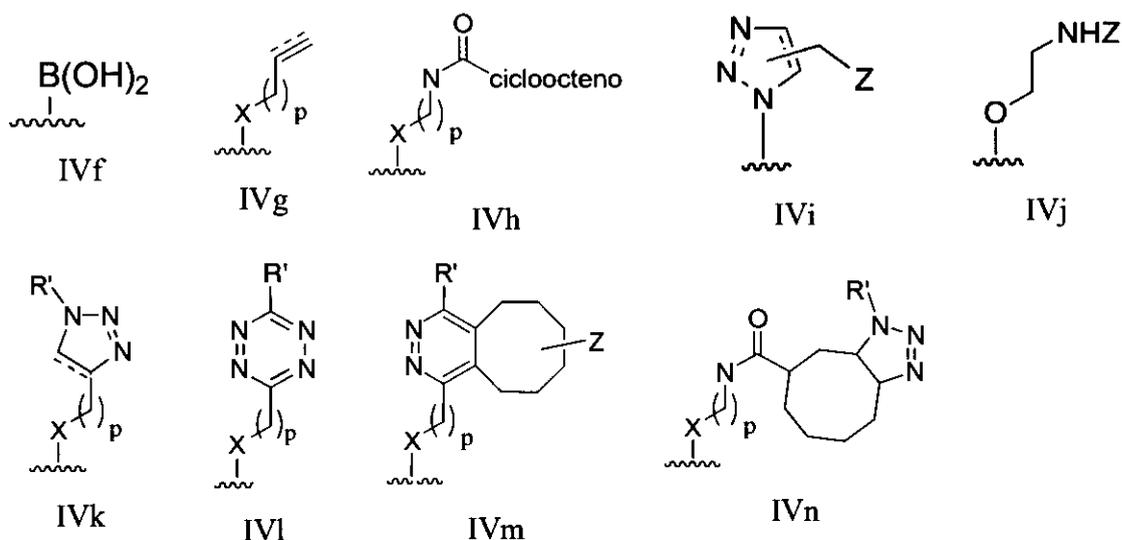


Ih

- 15 donde Ra, Rb, A, B, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o, q, K y R<sub>1</sub> son como se han definido anteriormente, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

En una realización particular, en un compuesto de fórmula I, Ia, Id o Ih, conjuntamente K-R<sub>1</sub> y K-Z se selecciona entre los siguientes grupos





donde Z es un grupo fluoróforo aceptor, p se selecciona de entre 1, 2 y 3, y X es oxígeno o nitrógeno, y R' es tal y como se ha definido anteriormente.

En una realización particular R' en los fragmentos de fórmula IVa-n es un grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono.

En una realización particular, K es un enlace sencillo y R<sub>1</sub> es hidrógeno.

En una realización particular o y q son iguales y se seleccionan de entre 1 y 2.

En una realización particular A y B son iguales y se seleccionan entre fenilo y piridina opcionalmente sustituidos.

10 En una realización particular P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> son hidrógeno.

En una realización particular, W es -CH<sub>2</sub>-.

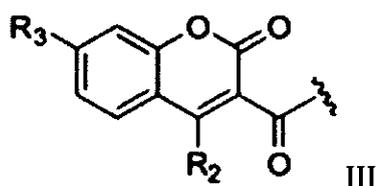
En una realización particular la suma de o y q es 2, 3 ó 4.

En la presente invención, el término “fluoróforo aceptor” se refiere a una especie que participa en un proceso de transmisión de energía de resonancia (FRET) aceptando la energía transferida por otra especie que se encuentra en estado excitado (esta transferencia puede tener lugar a través de cualquier proceso fotofísico, incluyendo mecanismos de tipo Förster o Dexter). Un parámetro clave para la transferencia de energía entre dos fluoróforos es la combinación de especies con niveles de energía próximos. Esta proximidad se relaciona con la teoría de transferencia de manera que cuanto mayor sea el valor de la integral de solapamiento entre el dador y aceptor (JDA), entre el espectro de emisión del dador y el espectro de absorción del aceptor, mejor será el FRET. En la presente invención, se incorpora la teoría de transferencia de energía, así

como el cálculo de dicha integral, la interpretación de sus valores y la detección de energía de transferencia por medio del siguiente artículo: "Resonante Energy Transfer: Methods and Applications", Analytical Biochemistry, 1994, 218, 1-13. Además, estos requerimientos energéticos pueden ser visualizados fácilmente por el solapamiento del espectro de emisión del fluoróforo dador y el espectro de excitación del fluoróforo  
5 aceptor.

Cuando un grupo fluoróforo aceptor está presente en un compuesto de la invención, éstos presentan la ventaja adicional de que emiten luz a una longitud de onda todavía más alta que en los compuestos en los que no están presentes estos grupos, debido al  
10 proceso de transferencia de energía intramolecular. Gracias a este proceso de transferencia se extiende de forma efectiva el rango de longitudes de onda de emisión a las cuales se pueden monitorizar las mitocondrias o los componentes mitocondriales. Además, modificando el grupo fluoróforo aceptor es posible diseñar derivados que emitan luz a diferentes longitudes de onda que sean de interés para su aplicación como  
15 biosensores luminiscentes. Otra ventaja adicional es que la intensidad de la banda de emisión incrementa cuando un grupo fluoróforo aceptor esté presente en un compuesto de fórmula I, lo que conduce a una mayor sensibilidad en la detección.

En una realización particular, el grupo fluoróforo aceptor, se selecciona entre un ión lantánido complejado con un agente quelante o una cumarina de fórmula general III



20 donde R<sub>2</sub> se selecciona entre hidrógeno, halógeno y alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, opcionalmente sustituido, y R<sub>3</sub> se selecciona entre -NR<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, -OH, -OR<sub>4</sub>, -OCOR<sub>4</sub>, siendo R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> iguales o diferentes seleccionados entre hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, opcionalmente sustituido.

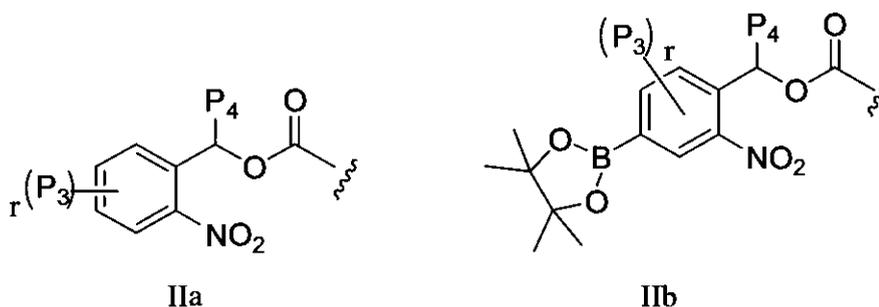
25 En una realización particular, el ión lantánido se selecciona entre Eu<sup>+3</sup> y Tb<sup>+3</sup>.

En una realización particular, el agente quelante se selecciona entre el ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), 4,7,10-Tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetra(ácido metilén fosfónico) (DOTP), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclo-dodecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA).

En la presente invención, el término “grupo protector fotolábil” se define como un grupo protector cuya unión a una molécula se rompe o libera mediante la exposición a luz de una longitud de onda apropiada. Grupos protectores fotolábiles, así como las condiciones para su preparación y posterior desprotección, son conocidos en el estado de la técnica (e.g. G. C. R. Ellis-Davies, *Nature Methods*, 2007, **4**, 619–628, S. R. Adams and R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Physiol.*, 1993, **55**, 755–784, Mayer G, Heckel A., *Angew Chem Int. Ed. Engl.*, 2006, **45**(30), 4900-21) e incluyen, por ejemplo, derivados de o-nitrobencilo, derivados de benzoína, derivados de fenacilo, etc.

Preferiblemente, en la presente invención el grupo protector fotolábil se desprotege mediante irradiación con luz UV (preferiblemente de una longitud de onda de entre 200 y 400 nm, más preferiblemente  $\geq 365$  nm), preferiblemente con una potencia de entre 5 y 10 W, más preferiblemente de 8 W.

En una realización particular, el grupo protector fotolábil se selecciona de entre las siguientes estructuras:



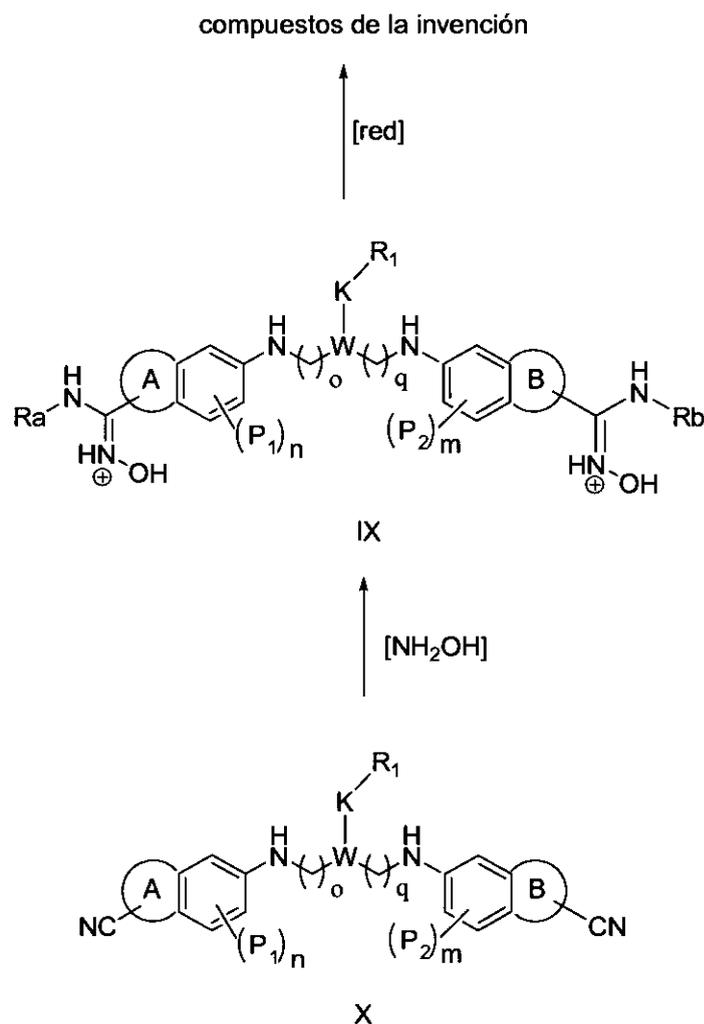
donde cada uno de P<sub>3</sub> y P<sub>4</sub> se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>, heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub> y heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub> opcionalmente sustituidos, NO<sub>2</sub>, CN, halógeno, -OR', -SR', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -OS(O)<sub>2</sub>R', -N(R')(R''), -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)N(R')(R''), -OC(O)R' y -N(R')C(O)R''; donde cada R' y R'' se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>, heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub> y heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub> opcionalmente sustituidos; o dos grupos P<sub>3</sub> forman, junto con el anillo de fenilo al que están unidos, un grupo heterociclo, y r se selecciona de 1, 2, 3 y 4.

25

#### Síntesis de los compuestos de la invención

Los compuestos de la presente invención se pueden realizar siguiendo una secuencia especial de reacciones siguiendo condiciones conocidas en el estado de la técnica. Así, por ejemplo, el grupo amidínio de los compuestos de fórmula I de la invención se

pueden obtener mediante reducción de un grupo  $-C-(NH(OH))-NH_2$  (amidoximas, *Synthetic Communications* 1996, 26(23) 4351-4367) en un compuesto de fórmula IX, el cual a su vez se obtiene mediante tratamiento de un grupo nitrilo (compuestos de fórmula X) con cloruro de hidroxilamina:

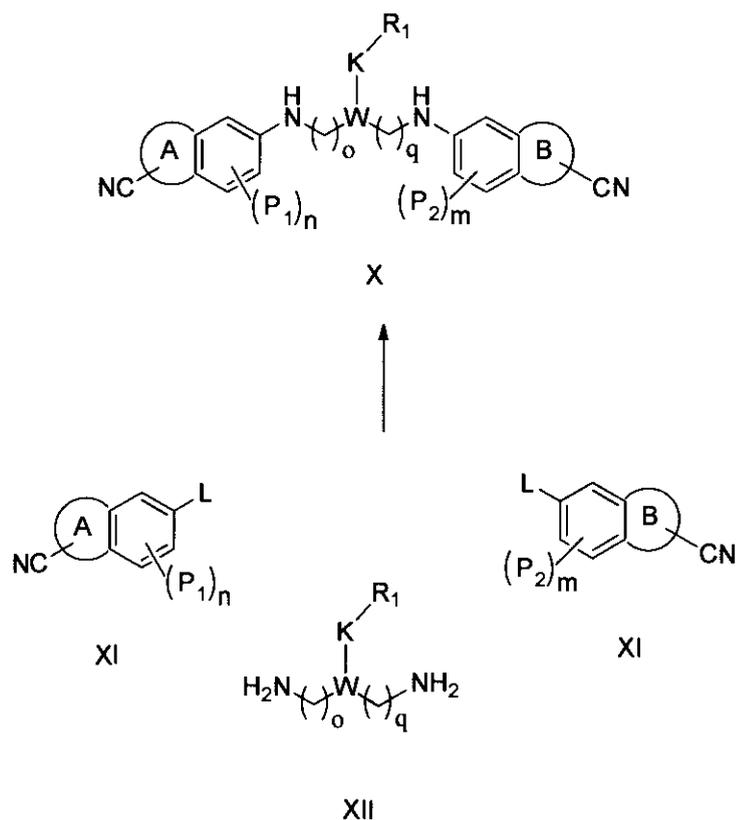


5

Existen multitud de condiciones para efectuar la reducción que conduce a los compuestos de fórmula I, únicamente limitadas por la compatibilidad con otros grupos funcionales presentes en la molécula. El experto en la materia conoce las condiciones apropiadas compatibles con distintos grupos funcionales. Así por ejemplo, en el caso de que existan grupos alqueno o alquino en los compuestos de fórmula I sensibles a ciertas condiciones de reducción, se pueden buscar otras compatibles. Ejemplos no limitativos de tales condiciones son la hidrogenación en AcOH/EtOH en presencia de Pd/C (Ismail M. A., Brun R., Wenzler T., Tanious F. A., Wilson W. D., Boykin D. W. *Bioorg. Med. Chem* 2004, 12(20), 5405-5413).

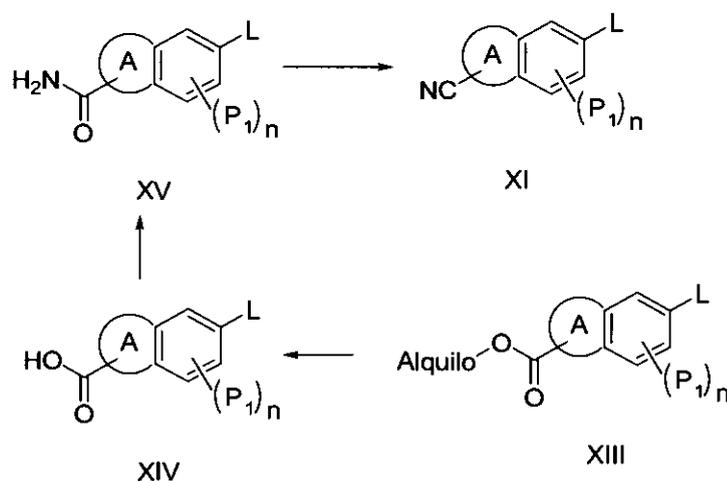
Condiciones apropiadas para la introducción del grupo fluoróforo son conocidas para el experto y existen gran cantidad en la literatura. Algunos ejemplos no limitativos son: *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 5518–5520, *Chem. Sci.*, **2012**, 3, 2383, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9199-9208, *Angew Chem Int Ed Engl.* **2012**, 51, 2443-2447, *Org Lett.* **2011**, 13, 5937-5939, *J Am Chem Soc.* **2012**, 134, 3720-3728, o *J Am Chem Soc.* **2008**, 130 (41): 13518–13519.

Los compuestos de fórmula X se obtienen mediante el acoplamiento de los compuestos aromáticos con el grupo nitrilo incorporado de fórmula (XI) con un compuesto de fórmula (XII) (linker). La reacción puede ser de tipo nucleófilo en donde el grupo saliente (L) puede estar en el compuesto de fórmula XI tal y como se muestra en el esquema debajo, o puede estar en el compuesto de fórmula XII, estando el grupo amino en el compuesto de fórmula XI. Alternativamente, L puede ser un grupo aldehído (-C(=O)H) realizándose el acoplamiento mediante una aminación reductora (March, J. “Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanism and Structure”, Wiley-Interscience, cuarta Edición, reacción 6-15, pág. 898; Klyuev and Khidekel, *Russ. Chem. Rev* **1980**, 49, 14-27, Rylander, *Catalytic Hydrogenation over Platinum Metals* pp 291-303, Academic Press, New York, 1967).



Ejemplos no limitativos para el acoplamiento de compuestos de fórmula XI y XII, por ejemplo para hacer compuestos de fórmula Ib ó Ic, pueden encontrarse en *Journal of Organic Chemistry* 76(5) 1333-1341, **2011**. Condiciones y compuestos apropiados para esta transformación también pueden encontrarse en *Inorganic Chemistry* 43(13) 3965-3975, **2004** y *European Journal of Organic Chemistry* 28, 4777-4792, **2009**.

El compuesto de fórmula XI puede obtenerse comercialmente con el grupo nitrilo o como algún derivado de ácido, en cuyo caso conviene normalmente transformarlo en nitrilo antes de la reacción con XII. Esto puede hacerse mediante métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, un éster de ácido de fórmula XIII se puede transformar en ácido de fórmula XIV mediante métodos conocidos en el estado de la técnica (March, J. "Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanism and Structure", Wiley-Interscience, cuarta Edición, página 378, reacción 0-10), tales como el tratamiento en medio básico acuoso. A su vez, el ácido de fórmula XIV se puede transformar en una amida de fórmula XV a través de cloruros de acilo o anhídridos de ácido, según los métodos descritos en March, J. "Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanism and Structure", Wiley-Interscience, cuarta Edición., página 417, reacción 0-52 y página 418, reacción 0-53, la cual se transforma en nitrilo (March, J. "Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanism and Structure", Wiley-Interscience, cuarta Edición., página 1041, reacción 7-39, Yamato, Sugasawa, *Tetrahedron Lett.*, **1970**, 4383; Appel, Kleinstuck y Ziehn, *Chem. Ber.*, **1971**, 104, 1030; Harrison, Hodge y Rogers, *Synthesis* **1977**, 41).



Estrategias similares a las descritas arriba pueden encontrarse en *Chem. Sci.*, **2012**, 3, 2383, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 7541–7544 o *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 5518–5520.

Los compuestos de la invención pueden llevar grupos fotolábiles acoplados al grupo amidinio (grupos Ra y Rb, por ejemplo grupos de fórmula IIa o IIb), los cuales pueden acoplarse siguiendo los métodos conocidos por el experto en la materia, tales como los descritos en los ejemplos 1 a 4 de ES 2 396 076 A1.

- 5 A partir de un compuesto en el que K-R<sub>1</sub> es IVb-h se puede obtener otro en el K-R<sub>1</sub> es IVi-n, mediante la reacción click entre una azida y un alqueno o alquino siguiendo las condiciones habituales conocidas por el experto en la materia (ver por ejemplo las condiciones descritas en Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB., *Angew Chem Int. Ed. Eng.,l* **2001**, *40*(11), 2004-2021; V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596-2599 o en F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 210-216). Por ejemplo, un compuesto de fórmula I con un fragmento de fórmula IVk puede obtenerse a partir del correspondiente compuesto con un fragmento de fórmula IVg mediante reacción con una azida de fórmula R'-N<sub>3</sub>.
- 10
- 15 En una realización particular primero se prepara el grupo imidinio a partir de un compuesto de fórmula XI, y se protege o incorpora el grupo fotolábil de fórmula Ra y/o Rb antes de acoplarlo con un compuesto de fórmula XII, y obtener directamente los compuestos de la invención.

## 20 Tinción de mitocondrias

La presente invención también se dirige a un método para teñir mitocondrias o un componente mitocondrial, que comprende incubar una muestra, donde dicha muestra comprende mitocondrias o un componente mitocondrial, con una solución acuosa de un compuesto de fórmula I tal y como se han definido anteriormente, donde dicho

25 compuesto de fórmula I está en una cantidad suficiente para teñir mitocondrias o un componente mitocondrial y la incubación tiene lugar durante un tiempo suficiente para detectar fluorescencia.

En una realización particular, dicho método comprende además una etapa de fijación.

En otra realización particular, dicho método comprende además una etapa de permeabilización. La detección de fluorescencia puede llevarse a cabo tras la etapa de

30 incubación, y/o tras la etapa de fijación y/o tras la etapa de fluorescencia.

La cantidad del compuesto de fórmula I requerido para la tinción de mitocondrias en células vivas es generalmente igual o superior a 1microM; típicamente entre 1 y 5

microM. El tiempo de incubación generalmente es de entre 20 y 60 minutos, típicamente de entre 30 y 40 minutos.

El método anteriormente descrito permite además incorporar reactivos adicionales. En una realización particular, dicho método comprende además añadir un reactivo  
5 adicional a la muestra, donde dicho reactivo adicional es un reactivo que produce una respuesta detectable debido a un componente celular específico, sustancia intracelular, o una condición celular. El reactivo adicional puede comprender una proteína, una secuencia de aminoácidos, un anticuerpo marcado y/o un oligonucleótido marcado.

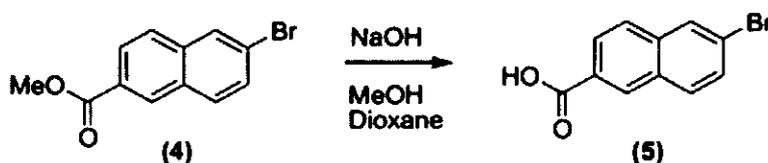
La invención se dirige además a un kit que comprende un compuesto de fórmula I. Los  
10 compuestos de fórmula I pueden encontrarse en forma de disolución, por ejemplo en agua y/o DMSO, o como sólido en polvo, pellets, granulado etc. Cabe destacar la ventaja de que los compuestos de fórmula I son solubles en agua y estables en dicha disolución.

15 A continuación se ilustra la invención con algunos ejemplos, aunque éstos no deben de interpretarse como una limitación de la misma.

### Ejemplos

**Ejemplo 1.** Preparación de 6,6'-[1,3-propanodi-il-di(imino)]dinaftaleno carboximida-  
20 damida.

1.1. Preparación del ácido 6-bromonaftaleno-2-carboxílico.



Una suspensión de 6-bromonaftaleno-2-carboxilato de metilo (4) (500 mg, 1.88 mmol) en dioxano (9 mL) y MeOH (9 mL) a temperatura ambiente se agitó hasta que se  
25 disolvió todo el sólido. KOH (318 mg, 5.66 mmol, 3 e) se añadió lentamente sobre la disolución y la mezcla se calentó a 50 °C toda la noche, se enfrió a temperatura ambiente y se trató con HCl 2M hasta pH 3 con el fin de precipitar el producto, que fue filtrado, lavado con agua y secado a vacío para proporcionar ácido 6-bromonaftaleno-2-carboxílico (5) como un polvo blanco (427 mg, 1.70 mmol, 90%).

30 <sup>1</sup>H RMN δ (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7.71 (dd, J = 8.8, 1.9 Hz, 1H), 7.97-8.93 (m, 2H) 8.08 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.28 (s, 1H), 8.61 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR δ (DMSO-d<sub>6</sub>): 121.7 (C),

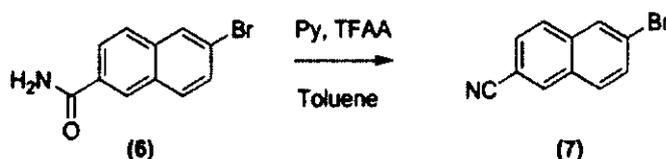
126.3 (CH), 127.4 (CH), 128.6 (C), 129.6 (CH), 129.8 (CH), 130.4 (CH), 130.7 (C), 131.4 (CH), 135.9 (C), 167.1 (C). ESI-MS:  $[M+H]^+$  calcd. para  $C_{11}H_6BrO_2$  248.9546 encontrado 248.9542.  $C_{11}H_7BrO_2$  (M.W. 251.0761).

### 1.2. Preparación de 6-bromonaftalen-2-carboxamida.

5 Una suspensión de ácido 6-bromonaftaleno-2-carboxílico (5, 251 mg, 1 mmol) en tolueno (10 mL) se trató con  $SOCl_2$  (1189.7 mg, 10 mmol) y DMAP (23 mg, 0.188 mmol), y se calentó a reflujo 2 h. El exceso de disolvente y de  $SOCl_2$  se eliminó mediante destilación bajo presión reducida. El precipitado se disolvió en  $CH_2Cl_2$  (25 mL) a temperatura ambiente y se burbujó con gas amoníaco seco durante 30 min. La  
10 mezcla se concentró para proporcionar un sólido blanco, el cual se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de sílice (1% MeOH/ $CH_2Cl_2$ ) para proporcionar 6 como un sólido blanco (114 mg, 0.46 mmol, 46%).

$^1H$  RMN  $\delta$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 7.51 (s, 1H), 7.70 (dd,  $J = 8.8, 1.9$  Hz, 1H), 7.95-8.00 (m, 3H), 8.15 (s 1H), 8.27 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 8.49 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR  $\delta$  (DMSO-  
15  $d_6$ ): 121.4 (C), 126.0 (CH), 127.5 (CH), 128.3 (CH), 130.0 (CH), 130.2 (CH), 131.2 (C), 131.6 (CH), 132.7 (C), 135.7 (C), 168.2 (C). ESI-MS:  $[M+H]^+$  calcd. para  $C_{11}H_9BrNO$  249.9862 encontrado 249.9857.  $C_{11}H_8BrNO$  (M.W. 250.0913).

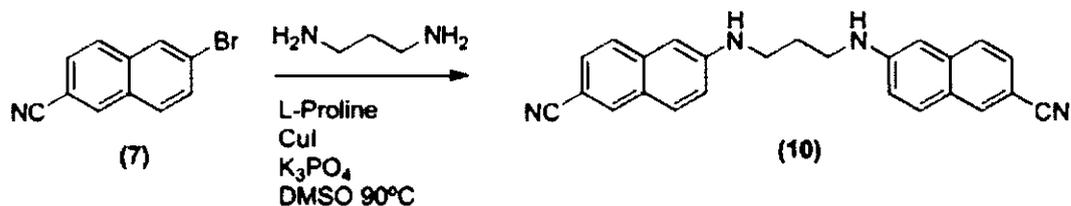
### 1.3. Preparación de 6-bromonaftalen-2-carbonitrilo.



20 Sobre una disolución de 6-bromonaftalen-2-carboxamida (6, 84 mg, 0.336 mmol) y piridina (53.4 mg, 0.675 mmol) en dioxano a 0 °C se añadió TFAA gota a gota (77.5 mg, 0.369 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. El crudo se vertió en agua y se extrajo con EtOAc (3  $\times$  50 ml). Las fases acuosas combinadas se  
25 lavaron con agua, se secaron con  $Na_2SO_4$ , se concentraron y se purificaron mediante cromatografía flash sobre gel de sílice (30% AcOEt/hexanos) para proporcionar 7 como un polvo blanco (50 mg, 0.215 mmol, 64%).

$^1H$  RMN  $\delta$  (400 MHz,  $DCCl_3$ ): 7.64 (dd,  $J = 8.5, 1.3$  Hz, 1H), 7.69 (dd,  $J = 8.8, 1.8$  Hz, 1H), 7.77 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.84 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.20 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR  $\delta$  ( $DCCl_3$ ): 109.9 (C), 118.8 (C), 123.6 (C), 127.5 (CH), 128.3 (CH), 129.9 (CH),  
30 130.2 (CH), 130.7 (C), 131.2 (CH), 134.0 (CH), 135.5 (C). ESI-MS:  $[M+H]^+$  calcd. para  $C_{11}H_7BrN$  231.9756 encontrado 231.9761.  $C_{11}H_6BrN$  (M.W. 232.0760).

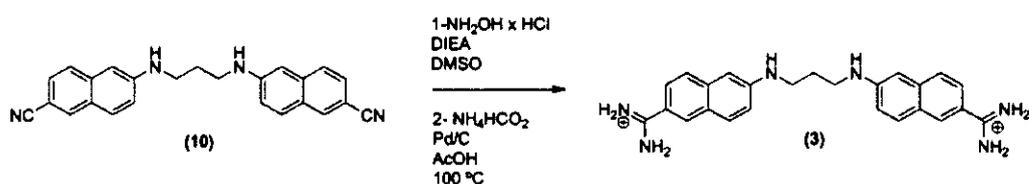
1.4. Preparación de 6-({3-[(6-ciano-naftalen-2-il)amino]propil} amino)-naftalen-2-carbonitrilo.



Una mezcla de 6-bromonaftalen-2-carbonitrilo (7, 373 mg, 1.60 mmol), propano-1,3-diamina (52.9 mg, 0.714 mmol),  $\text{K}_3\text{PO}_4$  (700 mg, 5 mmol), L-Prolina (68 mg, 0.50 mmol) y CuI (68 mg, 0.5 mmol) se disolvió en 3.6 mL de DMSO y se calentó a 90 °C durante 20 h. La mezcla fría se particionó entre agua y AcOEt, y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 × 40 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de NaCl, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentraron a presión reducida. El aceite residual se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de sílice (60 % AcOEt/hexanes) para proporcionar el dinitrilo deseado (10) como un sólido marrón (236.5 mg, 0.63 mmol, 88%).

$^1\text{H}$  RMN  $\delta$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 1.99 (p,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.30 (dd,  $J = 12.3, 6.6$  Hz, 4H), 6.63 (t,  $J = 5.2$  Hz, 2H), 6.78 (d,  $J = 1.8$  Hz, 2H), 7.12 (dd,  $J = 8.9, 2.2$  Hz, 2H), 7.47 (dd,  $J = 8.5, 1.6$  Hz, 2H), 7.61 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.71 (d,  $J = 8.9$  Hz, 2H), 8.18 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  ( $\text{DMSO-d}_6$ ): 27.2 ( $\text{CH}_2$ ), 40.3 ( $\text{CH}_2$ ), 101.5 (CH), 101.8 (C), 119.5 (CH), 120.0 (C), 124.8 (C), 126.1 (CH), 126.4 (CH), 129.1 (CH), 133.5 (CH), 137.0 (C), 149.2 (C). ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd. para  $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{N}_4$  377.1761 encontrado 377.1761.  $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_4$  (M.W. 376.4531).

1.5. Preparación de 6,6'-[1,3-propanodi-il-di(imino)]dinaftaleno carboximidamida (Compuesto (3)).



Se disolvió hidrocloreto de hidroxilamina (279 mg, 4 mmol) en DMSO anhidro (2 mL) bajo atmósfera de argón. Se añadió lentamente DIEA (646 mg, 5 mmol) a temperatura ambiente. Tras agitar la mezcla 30 min, se añadió el dinitrilo 10 (75 mg, 0.2 mmol) sobre la mezcla de reacción. La mezcla resultante se calentó toda la noche a 55 °C. Tras

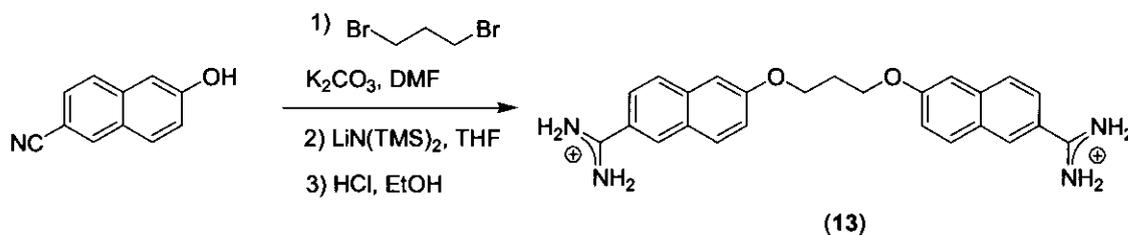
comprobar mediante RP-HPLC analítica que todo el material de partida se había transformado en el producto deseado, la mezcla se purificó mediante cromatografía preparativa de fase reversa (gradiente: 5% B 5 min, 5% to 50 % B 30 min). Se recolectaron las fracciones apropiadas, se concentraron y liofilizaron. El sólido aislado se identificó como el intermedio deseado.

La Bis-(benzaminoxima) intermedia, formiato de amonio (22.7 mg, 0.36 mmol) y Pd/C (10%, 22 mg) se mezclaron con AcOH glacial (1.5 mL) y se calentaron a 110 °C en atmósfera de argón. El material de partida fue consumido después de 4h (RP-HPLC analítica) y la muestra se enfrió y se filtro sobre celita. Se añadieron 2 volúmenes de H<sub>2</sub>O sobre el filtrado para llevar a cabo la purificación mediante cromatografía preparativa de fase reversa (gradiente: 5% B 5 min, 5% to 65 % B 30 min). Se recolectaron las fracciones apropiadas, se concentraron y liofilizaron para proporcionar **3** como un sólido amarillo (0.072 mmol, 46 mg, 36%).

<sup>1</sup>H RMN δ (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 2.01 (p, J = 6.7 Hz, 2H), 3.32 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 7.14 (dd, J = 8.9, 2.0 Hz, 1H), 7.62 (dd, J = 8.8, 1.5 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 8.94 (s, 4H), 9.16 (s, 4H). <sup>13</sup>C NMR δ (DMSO-d<sub>6</sub>): 27.8 (CH<sub>2</sub>), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 101.8 (CH), 119.4 (C), 120.1 (CH), 124.2 (CH), 125.0 (C), 126.1 (CH), 129.8 (CH), 130.4 (CH), 138.5 (C), 149.8 (C), 165.7 (C). ESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> calcd. para C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>N<sub>6</sub> 411.2292 encontrado 411.2295. C<sub>29</sub>H<sub>28</sub>F<sub>6</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (M.W.: 638.5608).

## Ejemplo 2. Preparación de derivado oxigenado.

### 2.1. Preparación de 1,3-Bis(6-amidinonaftalen-2-iloxi)propano.



A una disolución agitada de 4-cianofenol (169 mmol) en DMF se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anhidro (414 mg, 3 mmol). Después de 30 min se añadió 1,3-dibromopropano (80.8 mg, 0.4 mmol) y la reacción se agitó a 50 °C 24 horas. La mezcla se se particionó entre agua y AcOEt, y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 × 50 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y

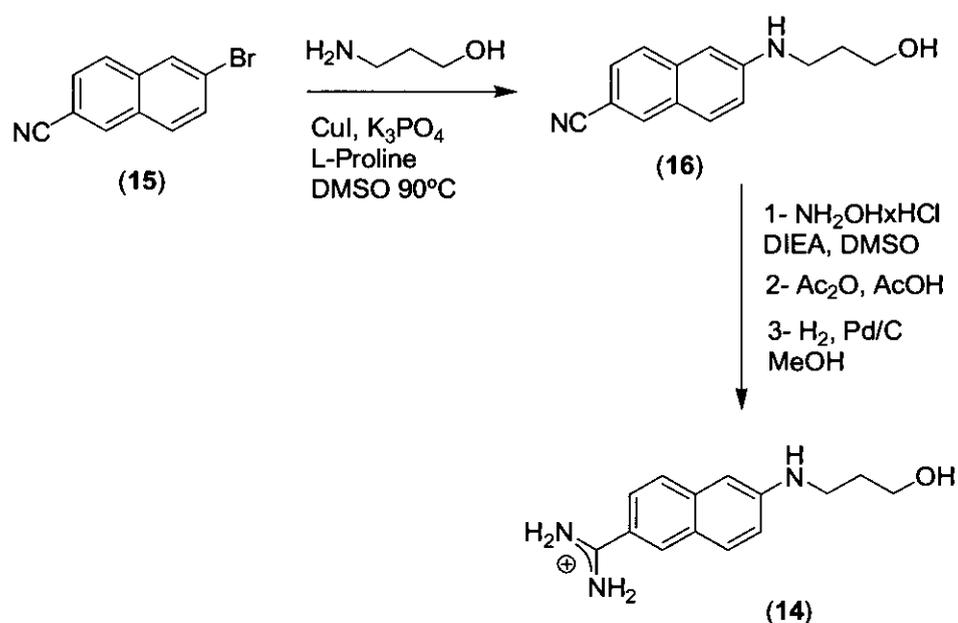
se concentraron a presión reducida para proporcionar un sólido blanco identificado como el compuesto deseado **12** (321mg, 1.9 mmol) que se utilizó en la siguiente reacción sin más purificación.

5 A una disolución de dicho bisnitrilo (**12**), 67.3 mg, 0.178 mmol) en THF bajo atmósfera de argón a 0 °C se añadió 1 mL de LiN(TMS)<sub>2</sub> 1M en THF (149 mg, 0.89 mmol) y la disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. A continuación se enfrió a 0 °C y se acidificó con HCl etanólico (1.25 M). Tras agitar 4h, se eliminó el disolvente mediante presión reducida. El residuo se disolvió en DMF se purificó mediante cromatografía preparativa de fase reversa (gradiente: 5% B 10 min, 5% to 55  
10 % B 30 min.) Se recolectaron las fracciones apropiadas, se concentraron y liofilizaron para proporcionar **13** como un sólido blanco (54 mg, 0.084 mmol, 50%).

<sup>1</sup>H NMR δ (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 2.37 (p, J = 6.1 Hz, 2H), 4.38 (t, J = 6.2 Hz, 4H), 7.36 (dd, J = 9.0, 2.5 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 7.79 (dd, J = 8.7, 1.9 Hz, 2H), 8.00 (s, 2H), 8.02 (s, 2H) 8.43 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 9.27 (s, 4H), 9,36 (s, 4H). <sup>13</sup>C NMR  
15 δ (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 28.3 (CH<sub>2</sub>), 64.6 (CH<sub>2</sub>), 106.7 (CH), 120.3 (CH), 122.8 (C), 124.1 (CH), 127.0 (C), 127.3 (CH), 129.1 (CH), 130.7 (CH), 136.8 (C), 158.6 (C), 165.6 (C). ESI-MS: [M+H]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 413.1972 found 413.1793. C<sub>29</sub>H<sub>26</sub>F<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (M.W. 640.5304).

### 20 **Ejemplo 3.** Preparación de derivado nitrogenado (Comparativo)

Con el objeto de realizar estudios comparativos se preparó el compuesto 6-((3-hidroxipropil)amino)-2-naftimidamida (**14**) de acuerdo con la secuencia que se indica a continuación en el Esquema 1:



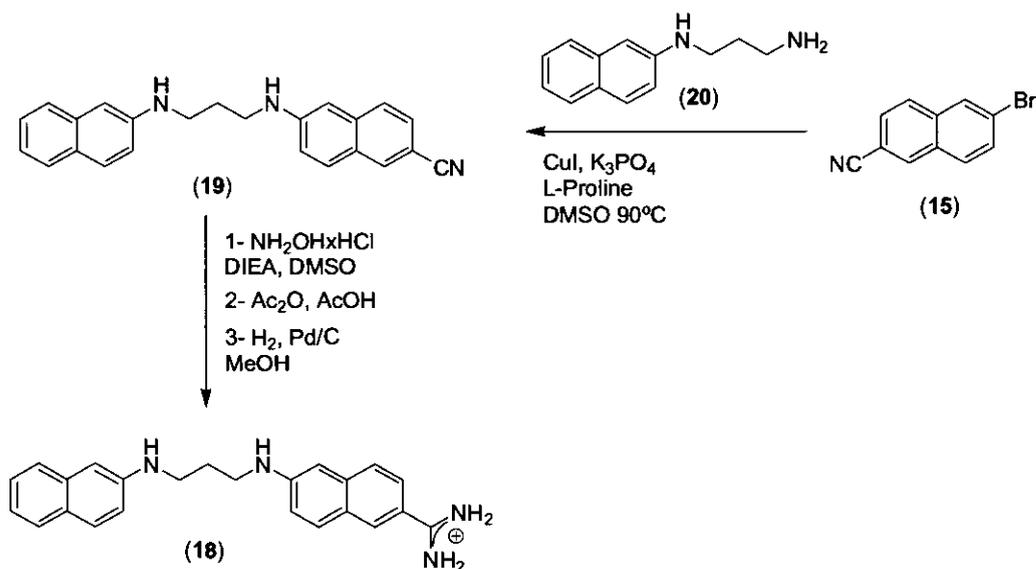
Esquema 1

Mediante la reacción de 6-bromonafthalenno-2-carbonitrilo (15) con exceso de 3-aminopropan-1-ol (aproximadamente 9 equivalentes) en presencia de  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , L-Prolina y CuI, y DMSO como disolvente se preparó 6-(3-hidroxiopropilamino)naftalen-2-carbonitrilo (16). Para ver condiciones para esta reacción ver *Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70, 5164-5173, *Organic Letters* **2003**, Vol 5, No. 6 793-796, *Organic Letters* **2002**, Vol 4, No 4. 581-584 o *Chem. Comm.*, **2009**, 1715-1717. En tres etapas a partir de este último se obtuvo 6-((3-hidroxiopropil)amino)-2-naftimidamida (14): (i) tratamiento con hidroxilamina y base; (ii) acilación con anhídrido acético y (iii) hidrogenación catalítica con paladio.

$^1\text{H NMR } \delta$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 1.78 (p,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 3.20 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.55 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 6.77 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.10 (dd,  $J = 8.9, 2.3$  Hz, 1H), 7.63 (dd,  $J = 8.7, 2.0$  Hz, 1H), 7.70 (d,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 7.73 (d,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 8.23 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H), 9.02 (s, 2H), 9.16 (s, 2H).  $^{13}\text{C NMR } \delta$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 31.5 ( $\text{CH}_2$ ), 39.5 ( $\text{CH}_2$ ), 58.4 ( $\text{CH}_2$ ), 101.2 (CH), 118.8 (C), 119.6 (CH), 123.6 (CH), 124.4 (C), 125.6 (CH), 129.3 (CH), 129.9 (CH), 138.1 (C), 149.5 (C), 165.3 (C). ESI-MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd. for  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_1$  244.1444 found 244.1438.  $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3$  (M.W. 357.3276).

**Ejemplo 4.** Preparación de derivado nitrogenado monofuncionalizado (comparativo)

También con fines comparativos se preparó el 6-({3-[(naftalen-2-il)amino]propil}amino)naftalen-2-carboximidamida (**18**) siguiendo el esquema descrito en el Esquema 2:



5

Primero se preparó el 6-({3-[(naftalen-2-il)amino]propil}amino)naftalen-2-carbonitrilo (**19**) haciendo reaccionar 6-bromonaphthalene-2-carbonitrile con el compuesto de fórmula (**20**) en presencia de  $K_3PO_4$ , L-Prolina y  $CuI$ , y utilizando DMSO como disolvente. Siguiendo una secuencia análoga a la ya descrita en el ejemplo anterior se preparó en tres etapas a partir de 6-({3-[(naftalen-2-il)amino]propil}amino)naftalen-2-carbonitrilo (**19**) 6-({3-[(naftalen-2-il)amino]propil}amino)naftalen-2-carboximidamida (**18**): (i) tratamiento con hidroxilamina y base; (ii) acilación con anhídrido acético y (iii) hidrogenación catalítica con paladio.

15  $^1H$  NMR (400 MHz,  $MeOD-d_4$   $\delta$ ): 2.20-2.09 (m, 2H), 3.41 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 3.63-3.54 (m, 2H), 6,83 (s, NH), 7.08 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.41 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.43-7.52 (m, 4H), 7.58-7.66 (m, 2H), 7.73 (dd,  $J = 8.9, 4.3$  Hz, 1H), 7.80 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.85 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.92 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 8,04 (s, NH), 8.18 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (63 MHz,  $MeOD-d_4$   $\delta$ ): 27.2 ( $CH_2$ ), 41,4 ( $CH_2$ ), 48.7 ( $CH_2$ ), 120.3 (CH), 120.7 (C), 120.9 (CH), 121.0 (C), 124.1 (CH), 124.3 (CH), 126.9 (CH), 127.6 (CH), 127.9 (C), 128.3 (CH), 128.4 (CH), 128.9 (CH), 129.7 (CH), 130.4 (CH), 131.1 (C), 131.3 (CH), 131.4 (CH), 135.1 (C), 140.0 (C), 150.6 (C), 168.2 (C). ESI-MS:  $[M+H]^+$  calcd. for  $C_{24}H_{25}N_4$  369.2074, encontrado: 369.2077.  $C_{26}H_{25}F_3N_4O_2$  (M.W. 482.4975).

20

**Ejemplo 5.** Internalización, fluorescencia y localización celular

El día antes de los experimentos de internalización celular, las células se sembraron en placas de doce pocillos que contenían cubreobjetos de vidrio (15 mm). Las imágenes se  
5 obtuvieron con una cámara digital DP-71 montada sobre en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Las imágenes fueron procesadas (recortadas, cambio de tamaño, contraste global y ajuste de brillo) con Adobe Photoshop (Adobe Systems).

Los parámetros espectroscópicos de los canales fluorescentes son los siguientes:

- Canal azul: excitación ultravioleta U-MWU2: filtro de excitación 360 a 370 nm, filtro  
10 de emisión a 420 nm y espejo dicróico a 400 nm.
- Canal verde: excitación azul U-MWB2: filtro de excitación 460 a 490 nm, filtro de emisión a 520 nm y espejo dicróico a 500 nm.
- Canal rojo: excitación verde U-MNG2: filtro de excitación 530 a 550 nm, filtro de  
emisión a 590 nm y espejo dicróico a 570 nm.

15 5  $\mu$ M del compuesto (3) se incubaron en monocapas de fibroblastos embrionarios de pollo (Chicken Embryo Fibroblasts, CEF) en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) durante 45 minutos a 37 °C. Las células se lavaron a continuación tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se observaron directamente bajo el microscopio de fluorescencia sin más fijación (canal azul). Las  
20 células tratadas mostraron emisión de fluorescencia en el rango esperado para El Compuesto (3), lo que demuestra que el compuesto puede penetrar la membrana de las células vivas.

La fluorescencia del Compuesto (3) muestra un patrón filamentoso citosólico coherente con la localización mitocondrial (figura 2A, imagen de la izquierda). Para confirmar  
25 esta posibilidad, se cotiñeron las células con el marcador mitocondrial comercial MitoTracker®, Invitrogen (figura 2B, imagen central) y se encontró que ambos marcadores muestran patrones de etiquetado completamente superponibles, lo que demuestra que el Compuesto (3) se dirige a la mitocondria y constituye un marcador fluorescente novedoso para este orgánulo (figura 2C, panel derecho)

30 Para confirmar que el Compuesto (3) se puede utilizar como un marcador mitocondrial universal, decidimos llevar a cabo el mismo experimento de la doble tinción descrito en la figura 1 con líneas celulares adicionales de diferentes orígenes. La figura 2 muestra

resultados representativos obtenidos con las líneas celulares: Vero, BHK, DF1 y HeLa. Todas ellas mostraron patrones de tinción similares a los obtenidos con CEF.

Conclusión: El Compuesto (3) presenta una satisfactoria capacidad de internalización celular y acumulación selectiva en las mitocondrias. Sus propiedades espectroscópicas lo convierten en un marcador azul fluorescente para este orgánulo celular. Este marcaje fluorescente mitocondrial ha sido demostrado en diferentes líneas celulares de diferente procedencia, como de mamífero (humano, hamster o mono) o de ave (pollo). Este patrón es reproducible tanto en líneas celulares inmortalizadas como en cultivos primarios. El Compuesto (3) se constituye como un marcador mitocondrial fluorescente universal.

#### **Ejemplo 6. Fotoestabilidad y decoloración**

Los experimentos anteriores demuestran que el Compuesto (3) se puede utilizar en las células vivas como un marcador mitocondrial universal, lo que a su vez sugiere que podría ser utilizado también en los experimentos “time-lapse”. Como condición, la sonda o marcador no sólo tiene que ser capaz de entrar en la célula, sino también ha de ser lo suficientemente fotoestable para tolerar irradiaciones repetidas (o de larga exposición) por lo que su resistencia a la decoloración (en inglés “photobleaching”) debe ser mínima.

Habiendo demostrado su capacidad para atravesar la membrana celular, decidimos comprobar y comparar la estabilidad del Compuesto (3) con marcadores mitocondriales específicos y comerciales. Para ello, las células Vero se incubaron con 5  $\mu\text{M}$  Compuesto (3), 2  $\mu\text{M}$  Rodamina 123, o 500 nM MitoTracker en las condiciones previamente descritas. Cada muestra se irradió continuamente bajo la fuente de luz microscopio de fluorescencia emitida a través del objetivo de 100X, y las imágenes se recogieron después de tiempos de irradiación específicos. El colorante verde Rodamina123 (figura 4, fila superior) muestra una muy pobre fotoestabilidad, esta aparece casi completamente fotolizada a los 30 segundos de irradiación en esas condiciones. El MitoTracker® (figura 4, fila central) mostró una mayor resistencia a la decoloración, pero de nuevo el photobleaching se completó después de 60 seg. En contraste con la pobre fotoestabilidad de la Rodamina 123 y del MitoTracker, el Compuesto (3) apenas muestra degradación en su emisión después de 2 minutos en las

mismas condiciones, y todavía era claramente visible después de 8 minutos de irradiación (figura 4, fila inferior).

Conclusión: El Compuesto (3) presenta una elevada resistencia a la decoloración y gran fotoestabilidad a iguales condiciones de exposición y observación, siendo muchísimo superior a los marcadores mitocondriales comerciales como el Mitotracker® y la Rodamina123.

#### **Ejemplo 7. Viabilidad y citotoxicidad**

Después de comprobar la excelente fotoestabilidad y un marcaje selectivo hacia mitocondrias, el Compuesto (3) podría ser considerado perfectamente como un reactivo marcador in vivo para experimentos “time-lapse”, siempre y cuando no afectase a la viabilidad celular. Para comprobar su citotoxicidad, se incubó Compuesto (3) 5  $\mu$ M en células Vero como se describió anteriormente. Después de la incubación, se reemplazó el medio con DMEM fresco con 10% de FBS (Suero Fetal Bovino) y se incubaron las células a 37 ° C durante varios días.

Curiosamente, 24 horas después de la incubación con el colorante, la fluorescencia azul atribuida al Compuesto (3) no mostró el patrón filamentosos típico de las mitocondrias, pero en su lugar, toda la fluorescencia se concentró en el interior de vesículas esféricas, (Figura 5A, imagen izquierdo). Para confirmar que las mitocondrias no fueron corrompidas por la presencia del Compuesto (3), realizamos una tinción de dichas células con Rodamina123, que exclusivamente marca la mitocondria funcional. La fluorescencia verde asociada a la Rodamina123 demostró la presencia mitocondrial con una morfología filamentosos (Figura 5B, imagen central) típica de esta línea celular. Comprobamos como la fluorescencia de la Rodamina123 y la propia del Compuesto (3) no colocalizaban. (Figura 5C, imagen central).

A la hora de investigar la naturaleza de esas vesículas esféricas poseedoras de la fluorescencia derivada del Compuesto (3), se incubó Compuesto (3) 5  $\mu$ M en células Vero como se describió anteriormente. 30 minutos antes de ser visualizadas las células a diferentes tiempos, son incubadas con un marcador lisosomal comercial, LysoTracker Red ® (Invitrogen). La colocalización de la señal fluorescente demuestra como el Compuesto (3) se ha acumulado en el lisosoma. Esta forma de reciclaje es perfectamente conocida y justifica la no toxicidad del Compuesto (3) además de quedar reflejada la dinámica y reciclaje mitocondrial.

En un experimento paralelo, células donde se incubó Compuesto (3) 5 $\mu$ M durante 30 min y posteriormente se lavó con PBS, se dejó evolucionar durante 24 horas únicamente con Compuesto (3) fueron estudiadas por microscopía electrónica. Las imágenes demuestran como el Compuesto (3) no provoca ningún incremento en el número de  
 5 lisosomas presentes en el interior celular (figura 7, fotos 7C y D), dado que analizando la morfología y cuantía de los orgánulos resulta imposible diferenciar una célula expuesta al Compuesto (3) y otra que no (figura 7, fotos 7A y 7B).

Estos resultados sugieren que todo el Compuesto (3) internalizado se recicla a lisosomas a partir de la mitocondria sin afectar la viabilidad de cualquiera de las células expuestas.  
 10 El mismo patrón estaba presente a las 48 y 72 horas después de la incubación inicial con el tinte, pero la intensidad de la fluorescencia se redujo con el tiempo y fue indetectable en el quinto día. Como prueba irrefutable de la nula citotoxicidad celular, las células que habían sido tratadas con Compuesto (3) 48 y 72 horas antes se incubaron con azul de tripano (es un colorante que se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de  
 15 viabilidad, que permiten diferenciar células vivas de células muertas), y muy pocas células en los cultivos (indicado por flechas) se tiñeron por el colorante, lo que demuestra la viabilidad de las monocapas.

Conclusión: Después de cierto tiempo el Compuesto (3) es reciclado de la mitocondria al lisosoma sin afectar la función mitocondrial y sin fomentar el incremento en la  
 20 presencia de lisosomas en el citoplasma. La tinción con un colorante vital a un cultivo celular expuesto al Compuesto (3) 48 y 72 horas antes demuestra el bajo número de células muertas. Ambos datos demuestran la nula toxicidad celular del Compuesto (3).

### **Ejemplo 8. Relación Estructura-Actividad**

25 En la búsqueda de una relación estructura-actividad hemos sintetizado varios compuestos semejantes que tratan de mimetizar su estructura con algunas variaciones. Una vez sintetizados hemos estudiado su internalización celular y propiedades luminiscentes.

Se sintetizó el 6-{3-[(6-carbamimido-il-naftalen-2-il)oxi]propoxi}naftaleno-2-  
 30 carboximidamida (figura 9, superior) que consiste en el derivado oxigenado del compuesto 3, donde los nitrogénos exocíclicos del anillo del naftaleno son reemplazados por oxígenos. El 6-{3-[(6-carbamimido-il-naftalen-2-il)oxi]propoxi}naftaleno-2-carboximidamida se incubó a una concentración 5  $\mu$ M en

células Vero en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) durante 45 minutos a 37 ° C. Las células se lavaron a continuación tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se observaron directamente bajo el microscopio de fluorescencia (canal azul). Las células tratadas no mostraron emisión de fluorescencia en el rango esperado (figura 9B), lo que demuestra que el compuesto no debe internalizar eficientemente a través de la membrana de las células vivas.

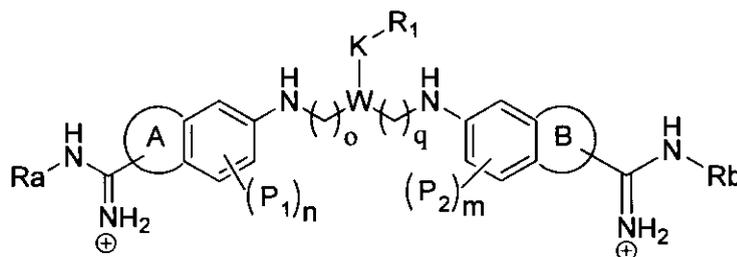
Para tratar de averiguar la necesidad de la presencia de las dos unidades de naftaleno, se sintetizó la 6-((3-hidroxiopropil)amino)-2-naftimidamida. La 6-((3-hidroxiopropil)amino)-2-naftimidamida se incubó a una concentración 5  $\mu$ M en células Vero en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) durante 45 minutos a 37 ° C. Las células se lavaron a continuación tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se observaron directamente bajo el microscopio de fluorescencia (canal azul). Las células tratadas mostraron una tenue emisión de fluorescencia en el rango esperado, de menor intensidad comparado con el Compuesto (3) en las mismas condiciones de observación (figura 10B), lo que demuestra que el compuesto parece no presentar dificultades en su internalización, pero si en su acumulación en el interior de la célula y en la mitocondria.

Finalmente sintetizamos el 6-({3-[(naphthalen-2-yl)amino]propyl}amino)naphthalene-2-carboximidamide (compuesto 18). En el evaluamos la influencia de los dos grupos amidinios. El Compuesto (18) a una concentración 1  $\mu$ M se incubó en células Vero en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) durante 45 minutos a 37 ° C. Las células se lavaron a continuación tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se observaron directamente bajo el microscopio de fluorescencia (canal azul). Las células tratadas mostraron una elevada intensidad en la emisión de fluorescencia en el rango esperado en las mismas condiciones de observación que el Compuesto (3) (Figura 11A). Una cotinción con el Mitotracker ® (figura 11B) demostró que su perfil de marcaje intracelular no corresponde con las mitocondrias como demuestra la superposición de ambas fotografías (figura 11C).

Conclusión: La presencia de la segunda unidad de naftaleno proporciona a las moléculas de la invención una sorprendente capacidad de acumulación celular, al tiempo que los grupos amidinios confieren una excelente selectividad en el marcaje mitocondrial.

**Reivindicaciones**

## 1. Compuesto de fórmula I



5

I

donde A y B se seleccionan cada uno independientemente de arilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos,

cada uno de n, m, o, q se selecciona independientemente de 1, 2, ó 3,

W se selecciona de entre enlace sencillo, alquilo, arilo y heteroarilo opcionalmente sustituidos,

10

R<sub>1</sub> se selecciona de entre hidrógeno, hidroxilo, -OR', -N(R')(R'')-, alquilo, alqueno, alquinilo, cicloalquilo, cicloalqueno, cicloalquino, arilo, heteroarilo, azido, tetrazino y un grupo fluoróforo aceptor,

K se selecciona de entre enlace sencillo, alquilo, -O-alquil-, -O-alquil-N(R')-, heterociclo y heteroarilo,

15

cada uno de R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> se selecciona independientemente de entre hidrógeno y un grupo protector fotolábil,

cada uno de P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>, heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub> y heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub> opcionalmente sustituidos, NO<sub>2</sub>, CN, halógeno, -OR', -SR', -S(O)R', -S(O)<sub>2</sub>R', -OS(O)<sub>2</sub>R', -N(R')(R''), -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)N(R')(R''), -OC(O)R' y -N(R')C(O)R'',

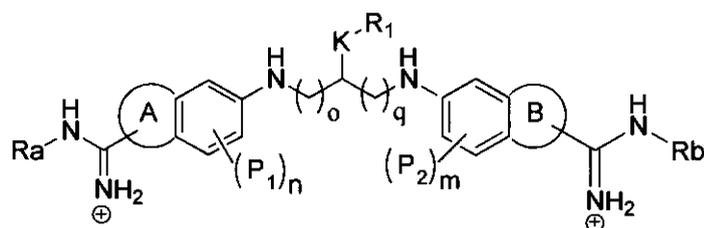
20

cada R' y R'' se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, cicloalquilo C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>, arilo C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub>, heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub> y heterociclo C<sub>3</sub>-C<sub>15</sub> opcionalmente sustituidos,

25

y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

## 2. Compuesto de fórmula Ia según la reivindicación 1,

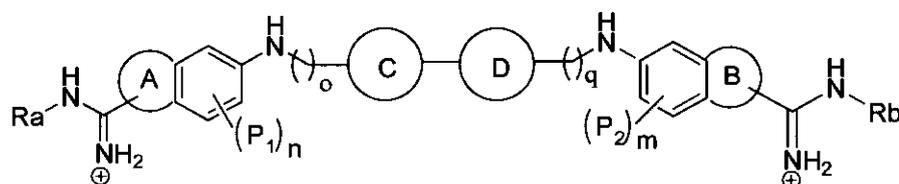


Ia

donde A, B, Ra, Rb, K, R<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o, q son como se han definido en la reivindicación 1, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

5

3. Compuesto de fórmula Ib según la reivindicación 1,

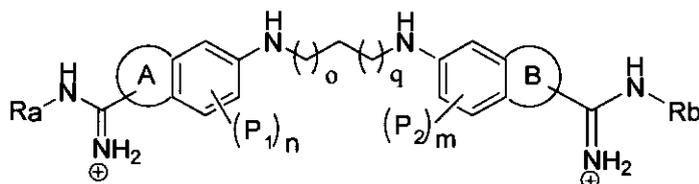


Ib

en donde A, B, Ra, Rb, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o y q son como se han definido en la reivindicación 1, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad, y en donde los anillos C y D son heterociclos.

10

4. Compuesto de fórmula Ie según la reivindicación 1,



Ie

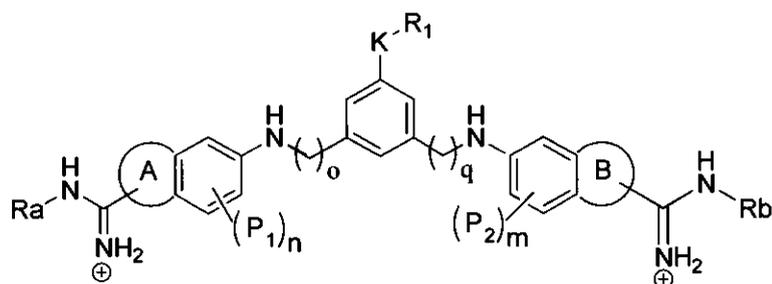
en donde A, B, Ra, Rb, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o, q son como se han definido en la reivindicación 1, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

15

5. Sal trifluoroacética de 6,6'-[1,3-propanodi-il-di(imino)]dinaftaleno carboximidamida.

6. Compuesto de fórmula Ih según la reivindicación 1,

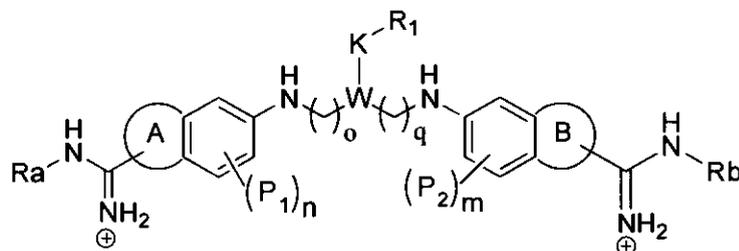
20

I<sub>h</sub>

donde A, B, Ra, Rb, K, R<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o, q son como se han definido en la reivindicación 1, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

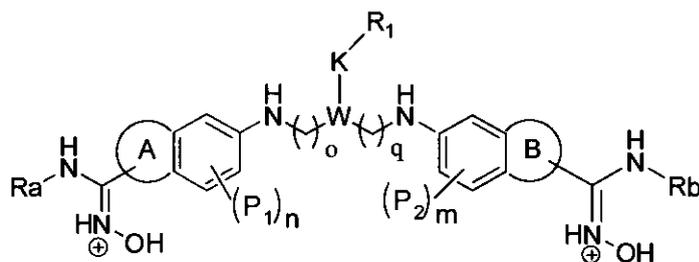
5

7. Procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula I,



I

que comprende la reducción de un compuesto de fórmula IX



IX

10

y opcionalmente el acoplamiento con un grupo protector fotolábil,

donde A, B, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o, q, W, K, R<sub>1</sub>, Ra, Rb son como se han definido en la reivindicación 1, y comprende al menos un anión orgánico o inorgánico para mantener la neutralidad.

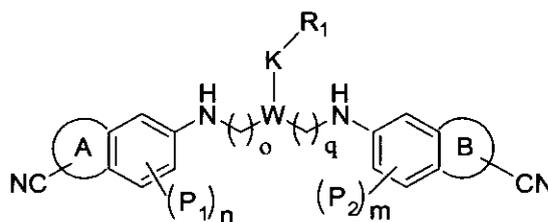
15

8. Kit para el estudio celular que comprende un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

9. Uso de un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, como reactivo de fluorescencia o agente de tinción.

20 10. Uso según la reivindicación 9, donde el reactivo es selectivo para mitocondrias.

11. Método para teñir mitocondrias o un componente mitocondrial, que comprende incubar una muestra, donde dicha muestra comprende mitocondrias o un componente mitocondrial, con una solución acuosa de un compuesto de fórmula I tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho compuesto de fórmula I está en una cantidad suficiente para teñir mitocondrias o un componente mitocondrial y la incubación tiene lugar durante un tiempo suficiente para detectar fluorescencia.
12. Método según la reivindicación 11, que comprende además una etapa de fijación.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, que comprende además una etapa de permeabilización.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde el tiempo de incubación es entre 20 y 60 minutos.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende además añadir un reactivo adicional a la muestra, donde dicho reactivo adicional es un reactivo que produce una respuesta detectable debido a un componente celular específico, sustancia intracelular, o una condición celular.
16. Método según la reivindicación 15, donde el reactivo adicional comprende una proteína, una secuencia de aminoácidos, un anticuerpo marcado y/o un oligonucleótido marcado.
17. Compuesto de fórmula IX tal y como se ha definido en la reivindicación 7.
18. Compuesto de fórmula X



- donde W, K, R<sub>1</sub>, A, B, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, m, n, o, q son tal y como se han definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

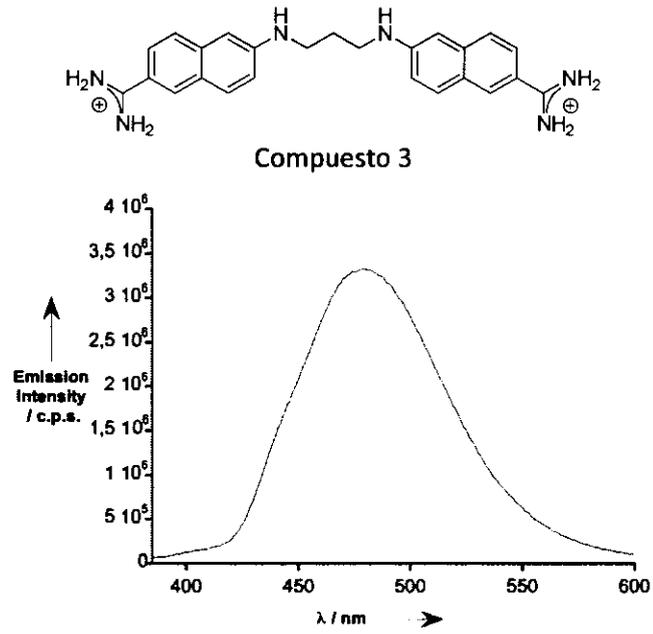


Figura 1

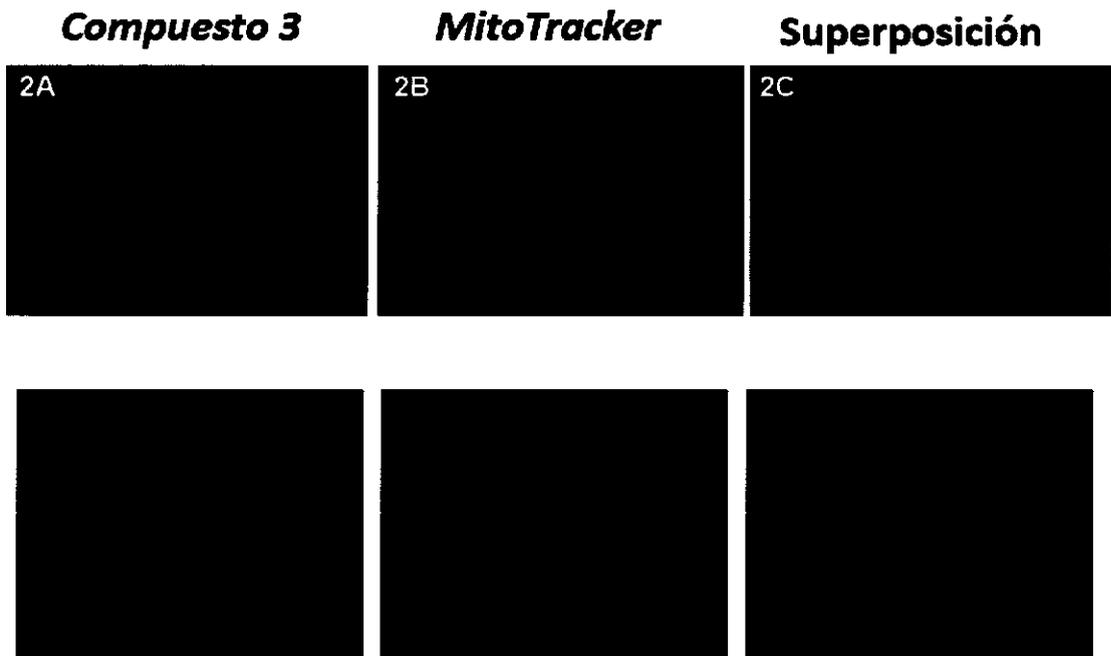


Figura 2

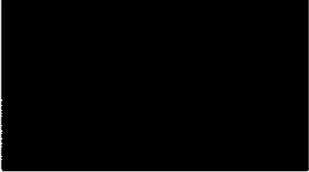
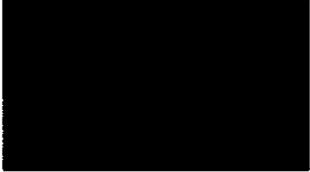
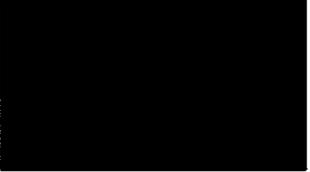
	<b>Compuesto 3</b>	<b>Mitotracker</b>	<b>Superposición</b>
<b>Vero</b>			
<b>BHK</b>			
<b>DF1</b>			
<b>HeLa</b>			

Figura 3

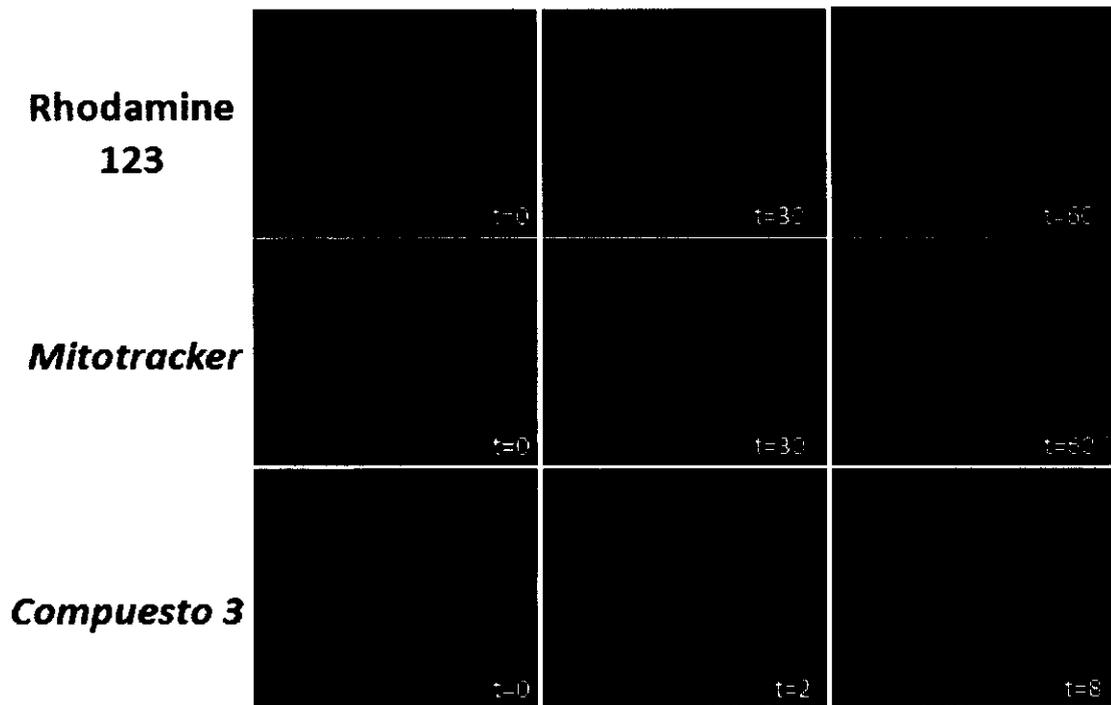


Figura 4



Figura 5

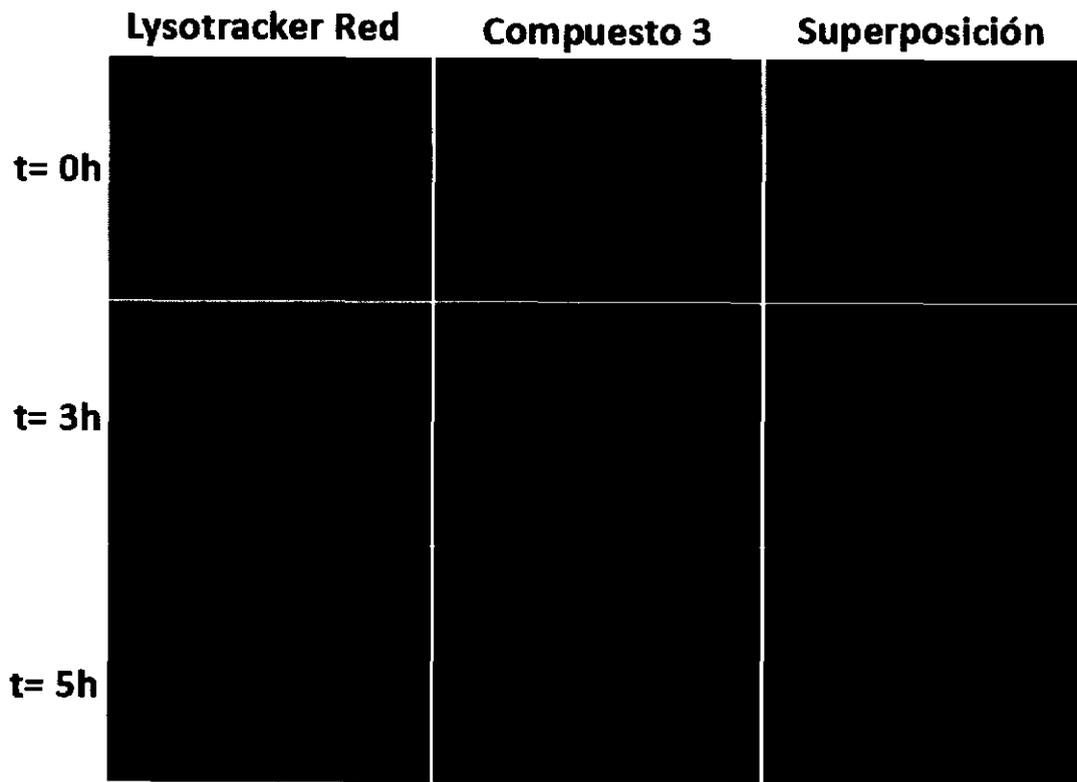


Figura 6

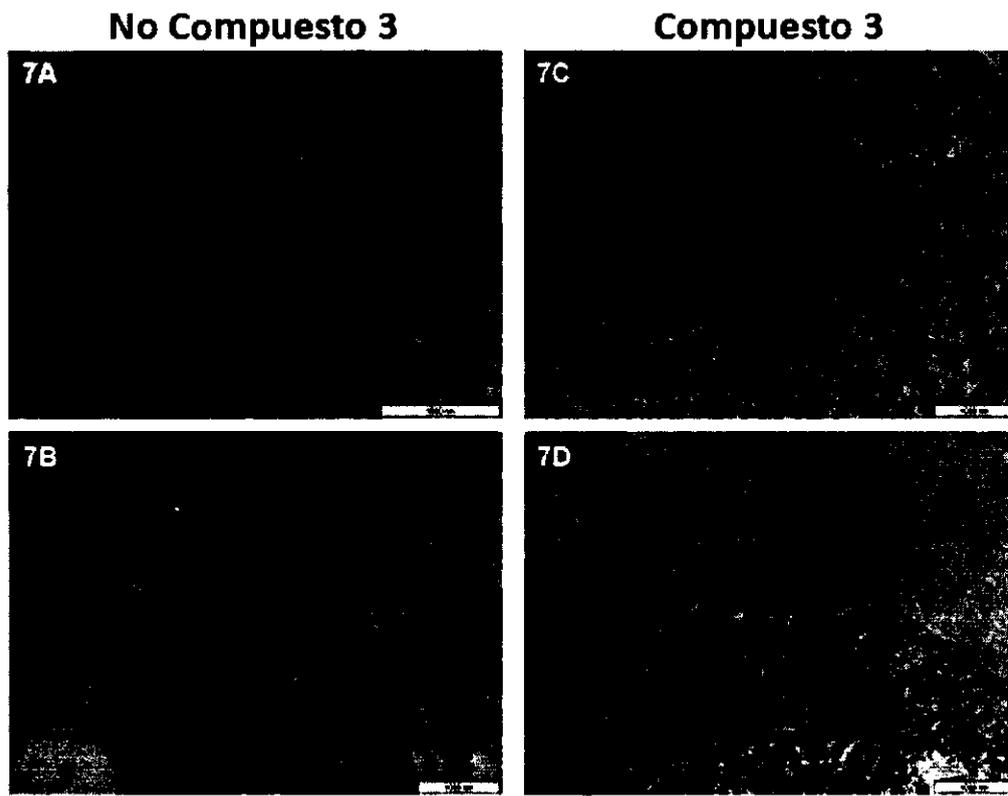
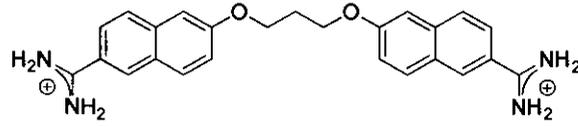


Figura 7



Figura 8



**Visible**

**Canal Azul**

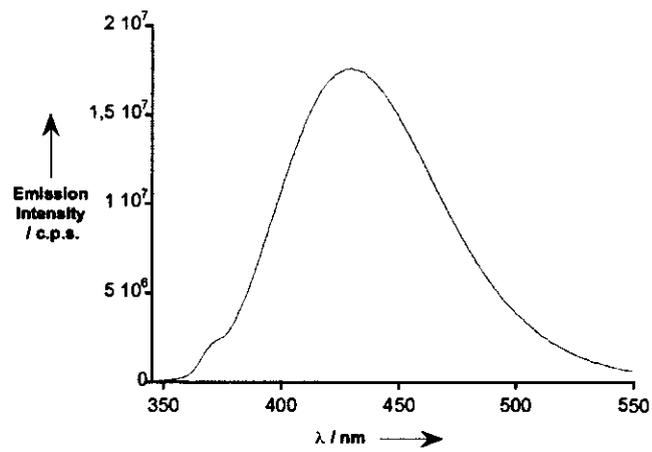
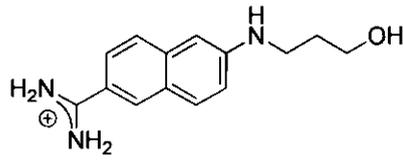
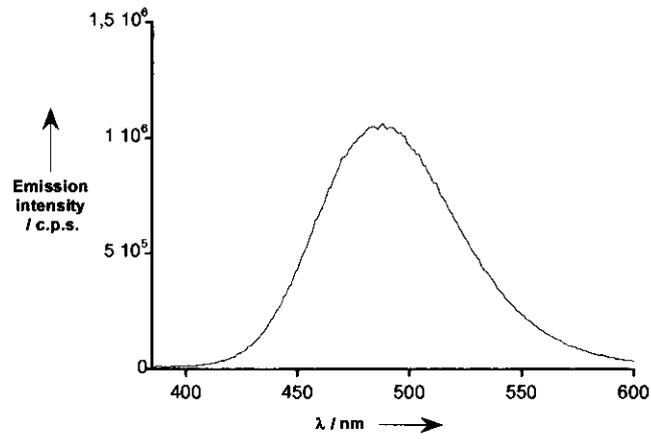
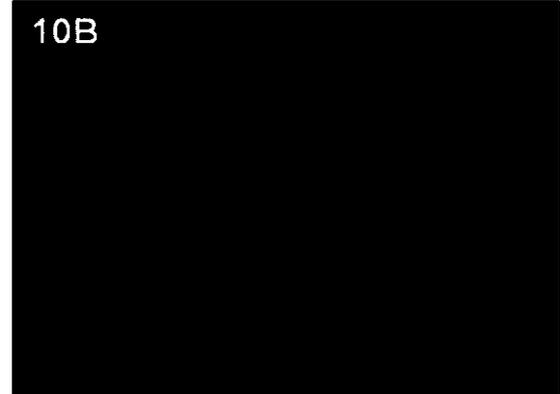


Figura 9



**Visible**

**Canal Azul**



**Figura 10**

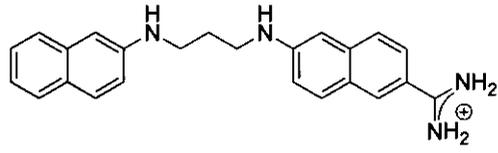


Figura 11