



Programa de Doctorado en Química Médica

**SÍNTESIS Y ESTUDIOS DE INTERACCIÓN
DE COMPUESTOS CON CAPACIDAD
DE UNIÓN AL ADN CUÁDRUPLE-G**

Tesis Doctoral presentada por

KATERINA DUSKOVA

Directoras:

DRA. LOURDES GUDE RODRÍGUEZ

DRA. MARÍA JOSÉ FERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ

Alcalá de Henares, 2015

El **Dr. D. Manuel Gómez Rubio**, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá **certifica**, que **Dña. Katerina Dusкова**, Licenciada en Farmacia por la Universidad Carolina Praga (República Checa), ha realizado en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá, bajo la dirección de la **Dra. Dña. Lourdes Gude Rodríguez** y de la **Dra. Dña. María José Fernández Domínguez**, el trabajo experimental recogido en la presente Memoria titulada:

**"Síntesis y estudios de interacción de compuestos
con capacidad de unión al ADN cuádruple-G"**

y autoriza su presentación para optar al grado de Doctor en Química Médica por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, firma el presente certificado.

Alcalá de Henares, Noviembre de 2015

Las abajo firmantes, **Dra. Dña. Lourdes Gude Rodríguez**, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá y **Dra. Dña. María José Fernández Domínguez**, Profesora Titular del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá **certifican**, que la Memoria presentada por **Dña. Katerina Dusko**va, con el título:

**"Síntesis y estudios de interacción de compuestos
con capacidad de unión al ADN cuádruple-G"**

ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá, y autorizan su presentación para optar al grado de Doctor en Química Médica por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, firman el presente certificado.

Alcalá de Henares, Noviembre de 2015

Fdo.: Dra. Lourdes Gude Rodríguez

Fdo.: Dra. María José Fernández Domínguez

Summary

One of the main goals of this doctoral thesis has been the synthesis and structural characterization of compounds capable of recognizing and stabilizing G-quadruplex DNA secondary structures. In particular, we have focused our work on the human telomeric DNA sequence, with the purpose of setting a basis for the discovery of novel anticancer compounds. Moreover, other of the main objectives has been the realization of a series of experiments aimed at studying the nature of G-quadruplex DNA/ligand interactions and at preliminary assessing the biological *in vitro* activity of the synthesized compounds, as well as of other compounds previously synthesized by other members of our research group.

First, different series of ligands based on the 2,2'-bipyridine, 1,10-phenanthroline and diquaternized 1,10-phenanthroline cores (figure 1) were synthesized. The 2,2'-bipyridine ligands were disubstituted with various side chains at the 4,4' positions (figure 1, **a**), while in the case of the 1,10-phenanthroline system, the heterocycle was disubstituted at 4 and 7 positions (figure 1, **a**). All side chains (R) contained as a terminal group either a guanidinium group or an aliphatic heterocycle, such as a morpholine, piperidine, piperazine or *N*-methylpiperazine. The length of the linker between the aromatic scaffold and the terminal group varied from 3 to 8 atoms.

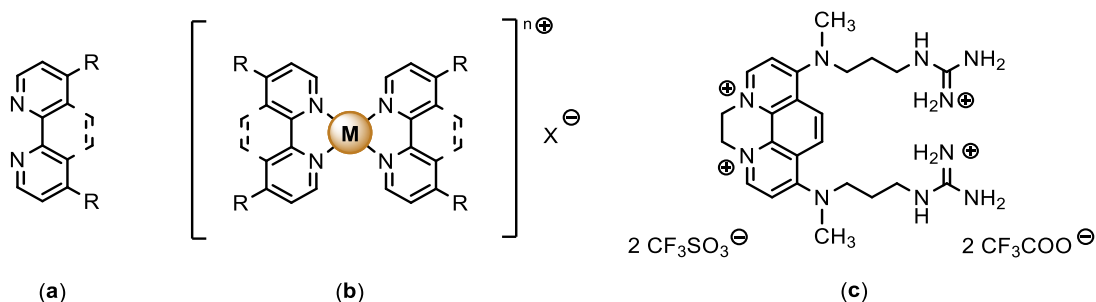


Figure 1. General structure of 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline ligands (**a**) and metal complexes (**b**) substituted with side chains R; **M** – Cu(II) or Ni(II); (**c**) - diquaternized 1,10-phenanthroline derivative

Afterwards, some metal complexes of Cu(II) or Ni(II) with 2,2'-bipyridine or 1,10-phenanthroline ligands (figure 1, **b**) were prepared and characterized by IR, UV-visible and high resolution mass spectrometry.

After that, DNA interaction and biological activity studies were held on the synthesized compounds as well as on other metal complexes previously synthesized in the laboratory. In all experiments, the interactions between the tested compounds and telomeric G-quadruplex DNA, with its general sequence (TTAGGG)_n, were studied, both under potassium or sodium-rich conditions. Different biophysical techniques were employed, such as a DNA melting assay monitored by fluorescence resonance energy transfer (FRET), circular dichroism, and fluorescence DNA probe displacement assay (FID assay). Competitive experiments were also held to determine the selectivity of the ligands in their binding to G-quadruplex structures *versus* duplex DNA. For this kind of experiments, techniques such as competitive equilibrium dialysis or the FRET melting assay in the presence of a competitor oligonucleotide were employed.

In addition, a complementary technique was utilized to establish the binding modes between several ligands and duplex DNA, as an attempt to gain an insight into the general recognition mode of nucleic acids by these compounds. The viscometric measurements were used to differentiate whether the interaction between the ligand and DNA occurred by intercalation, by groove binding to the double helix or by mixed binding mode (intercalation/groove binding).

Finally, during a three-month stay in the research group of Prof. Stephen Neidle (Biomedical Structure Group, School of Pharmacy, University College London) some biological activity assays were performed to preliminary assess the potential as anticancer agents of a small selection of ligands. On the one hand, the TRAP-LIG assay (*Telomere Repeat Amplification Protocol without ligand*) was used to test for *in vitro* inhibition of human telomerase. Simultaneously, a cytotoxicity test on several cancer cell lines was carried out by using the Sulforhodamine B short term cytotoxicity test. Both techniques were used to determine IC₅₀ values, the concentrations required for the 50% inhibition of telomerase activity (TRAP-LIG) or 50% inhibition of cell growth, in comparison with a control sample.

Glosario de abreviaturas

%DTO	Porcentaje de desplazamiento de naranja de tiazol
%TOU _x	Porcentaje del naranja de tiazol unido al ADN a concentración x de ligando
δ	Desplazamiento químico (ppm)
ε	Coefficiente de extinción (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
Δ	Reflujo
λ	Longitud de onda (nm)
(Boc) ₂ O	Di-(<i>terc</i> -butil)dicarbonato
ΔG	Variación de energía libre de Gibbs
ΔT _{1/2}	Incremento de la temperatura media de desnaturalización del ADN
¹³ C-HMBC	Espectro de correlación bidimensional ¹ H- ¹³ C a más de un enlace
¹³ C-HSQC	Espectro de correlación bidimensional ¹ H- ¹³ C a un enlace
¹³ C RMN	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
¹ H RMN	Resonancia magnética nuclear de ¹ H
360A	Compuesto de referencia como ligando selectivo de ADN cuádruple
A	Adenina
A549	Línea celular de carcinoma de pulmón
Ac	Acetato
ACX	Cebador inverso empleado en el ensayo TRAP-LIG
ADC ₀	Área bajo la curva de fluorescencia en ausencia de ligando
ADC _x	Área bajo la curva de fluorescencia a concentración x de ligando
ADN	Ácido desoxirribonucleico

ap.	Aparente
Ar	Arilo
ARN	Ácido ribonucleico
BI	Bisintercalante
Bn	Bencilo
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
BPC	Alto grado de pureza de agua (<i>Biotechnology Performance Certified</i>)
BSA	Albúmina de suero bovino
°C	Grado centígrado
C	Citosina
c	Cuadruplete
c _{ADN}	Concentración de ADN
CAN	Nitrato amónico cérico(IV)
c _b	Concentración de ligando dentro de la bolsa de diálisis
cm	Centímetro
c _u	Concentración de ligando unido al ADN
d	Doblete
DAPI	2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida
DBU	Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DC	Dicroísmo circular
DCF	4,7-Dicloro-1,10-fenantrolina
DCM	Diclorometano
DEPC	Agua tratada con dietilpirocarbonato
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMEM	Medio esencial mínimo modificado
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNTPs	Mezcla de nucleósido-trifosfatos
ds17	Oligonucleótido de ADN dúplex (17 pares de bases)
ds26	Oligonucleótido de ADN dúplex (26 pares de bases)
DTO	Desplazamiento de naranja de tiazol (<i>Thiazole orange displacement</i>)
EM	Espectrometría de masas
ESI	Ionización por electrospray (<i>ElectroSpray Ionization</i>)
Est. S	Selectividad estimada
Et	Etilo
Et ₂ O	Éter dietílico
EtOH	Etanol
F10T	Oligonucleótido de ADN dúplex (10 pares de bases) marcado con FAM y TAMRA
F21T	Oligonucleótido de ADN cuádruple-G (21 nucleótidos) marcado con FAM y TAMRA
FAB	Bombardeo con átomos rápidos (<i>Fast Atom Bombardment</i>)
FAM	6-Carboxifluoresceína
FID assay	Fluorescence DNA probe displacement assay
FN	Fluorescencia normalizada
FRET	Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)
G	Guanina
G4-FID	Ensayo de desplazamiento de ligandos fluorescentes
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
hTERT	Transcriptasa inversa, parte proteica de telomerasa humana (<i>human Telomerase Reverse Transcriptase</i>)
hTR	Componente ribonucleico de la telomerasa humana (<i>human Telomerase RNA component</i>)
IC ₅₀	Concentraciones necesarias para la inhibición del 50% de la actividad de la telomerasa (TRAP-LIG) o la inhibición del 50% crecimiento de células (SRB test)
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento (Hz)
k	Pendiente de la recta
K	Constante del viscosímetro (kg·m ⁻¹ ·s ⁻²)
K _a	Constante de asociación (M ⁻¹)
K _a (C)	Constante de asociación con el ADN cuádruple (M ⁻¹)
K _a (D)	Constante de asociación con el ADN dúplex (M ⁻¹)
kDa	Unidad de masa atómica (<i>kiloDalton</i>)
L	Ligando
m	Multiplete
m/z	Relación masa/carga
MCF7	Línea celular de carcinoma de pecho
MEM	Medio esencial mínimo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahercio
MI	Monointercalante
MIA-Pa-Ca-2	Línea celular de carcinoma de páncreas

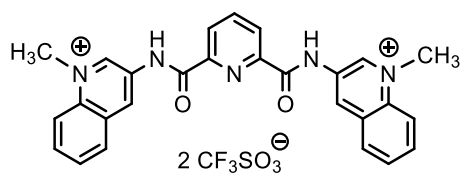
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MTT test	Ensayo de citotoxicidad celular con MTT
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
N.D.	No determinado
NIS	<i>N</i> -Yodosuccinimida
nm	Nanómetro
NOESY	Espectroscopia del efecto nuclear de Overhauser
nt	Nucleótidos
P	Parte
P.eb.	Punto de ebullición
PEG	Polietilenglicol
P.f.	Punto de fusión
PANC	Línea celular de carcinoma de páncreas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	Banco de Datos de Proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
Ph	Fenilo
ppm	Partes por millón
q	Quintuplete
QK	Mezcla de topologías híbridas formadas por la secuencia del oligonucleótido Tel-22 en condiciones iónicas de potasio (<i>Quadruplex hybrid topologies of Tel-22 formed in potassium rich conditions</i>)
QNa	Topología antiparalela formada por la secuencia del oligonucleótido Tel-22 en condiciones iónicas de sodio

(*Quadruplex anti-parallel topology of Tel-22 formed in sodium rich conditions*)

RCC4	Línea celular del carcinoma renal
Rdto.	Rendimiento
RMN	Resonancia magnética nuclear
S	Selectividad
s	Singlete
Sp18	Espaciador de 18 átomos que forma parte del oligonucleótido F10T
SPR	Resonancia de Plasmón de Superficie (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)
SRB	Sulforodamina B
T	Temperatura, Timina
t	Triplete
T _{1/2}	Temperatura media de desnaturalización del ADN
TAMRA	6-Carboxitetrametilrodamina
Taq polimerasa	Polimerasa extraída del <i>Thermus aquaticus</i>
^t BuOH	2-Metilpropan-2-ol
TCA	Ácido tricloroacético
TEA	Trietilamina
Tel-22	Oligonucleótido de 22 nucleótidos para formar el ADN cuádruple-G (secuencia telomérica)
^{tel} IC ₅₀	Concentraciones necesarias para la inhibición del 50% de la actividad de la telomerasa en el ensayo TRAP-LIG
TfA	Trifluoroacetato
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)

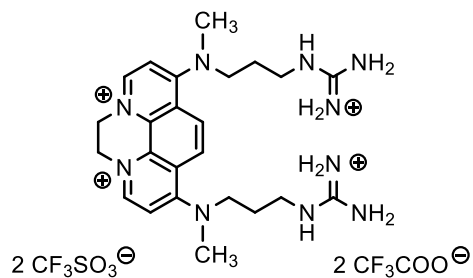
T_m	Temperatura media de desnaturalización del ADN
TO	Naranja de tiazol (<i>Thiazole orange</i>)
TOCSY	Espectroscopia de correlación total
TOF	Tiempo de vuelo (<i>Time of Flight</i>)
TRAP	Protocolo de amplificación de repeticiones de la secuencia telomérica (<i>Telomere Repeat Amplification Protocol</i>)
TRAP-LIG	Protocolo de amplificación de repeticiones de la secuencia telomérica en ausencia de ligando (<i>Telomere Repeat Amplification Protocol without ligand</i>)
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TS	Cebador empleado en el ensayo TRAP-LIG
u.m.	Unidades monoméricas
US	Ligando con modo de unión al surco del ADN dúplex
WI38	Línea celular de fibroblastos no cancerosas
μ_o	Viscosidad absoluta de una disolución de ADN
μ_x	Viscosidad absoluta de una disolución ADN-ligando
μM	Micromolar
$\bar{\nu}$	Número de onda (cm^{-1})

Glosario de estructuras

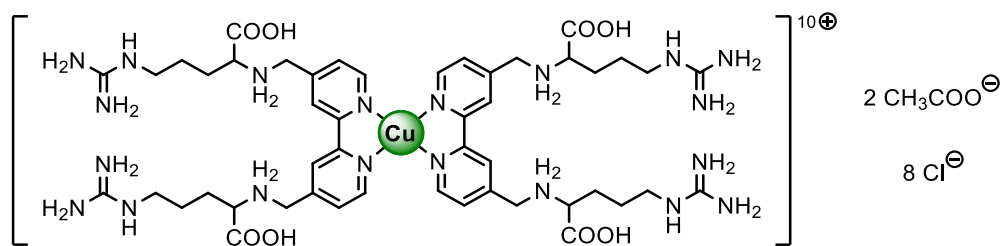


360A

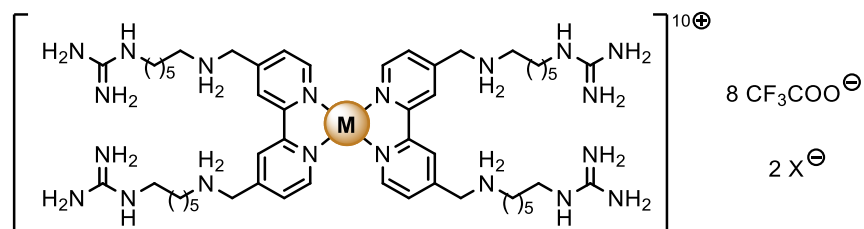
Ligando selectivo de ADN cuádruple-G
(compuesto de referencia)



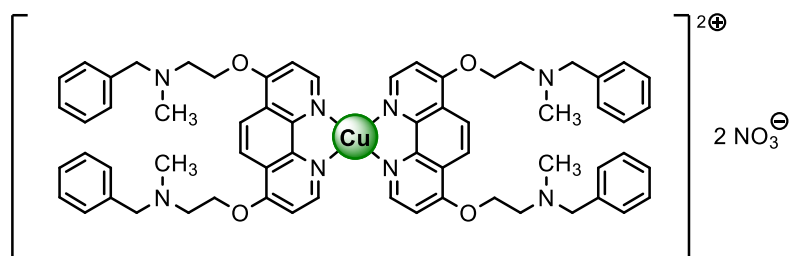
6



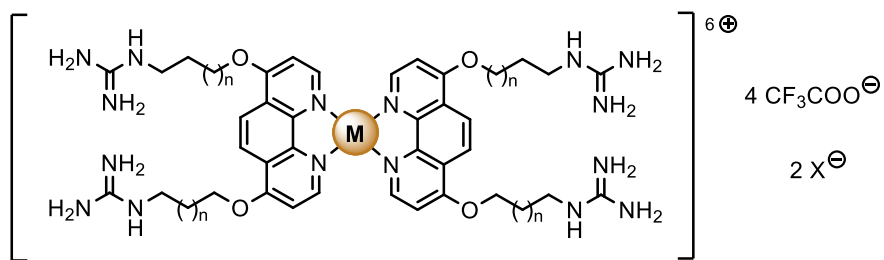
73



74: M = Cu(II), X = CH₃COO 75: M = Ni(II), X = NO₃



76

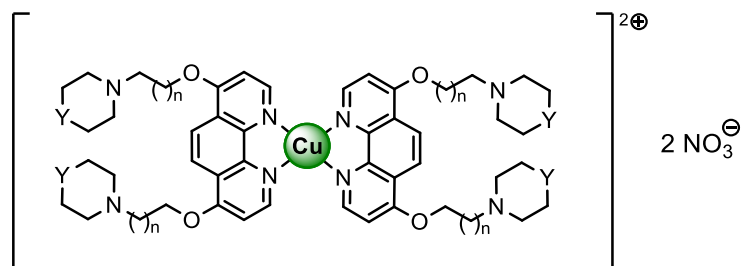


77: **M** = Cu(II), $n = 1$, $\text{X} = \text{NO}_3$

79: **M** = Ni(II), $n = 1$, $\text{X} = \text{NO}_3$

78: **M** = Cu(II), $n = 1$, $\text{X} = \text{CH}_3\text{COO}$

80: **M** = Cu(II), $n = 2$, $\text{X} = \text{NO}_3$

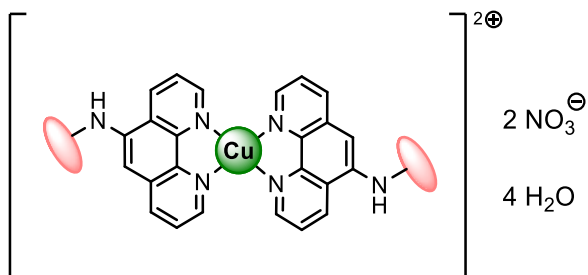
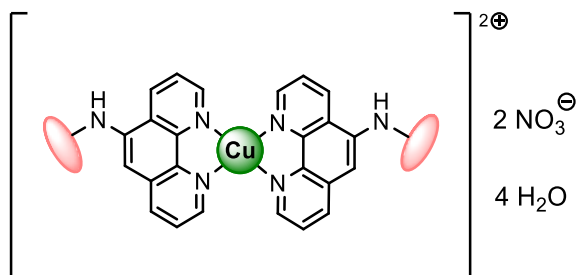


Y: CH_2 **81**: $n = 1$
82: $n = 2$
83: $n = 3$

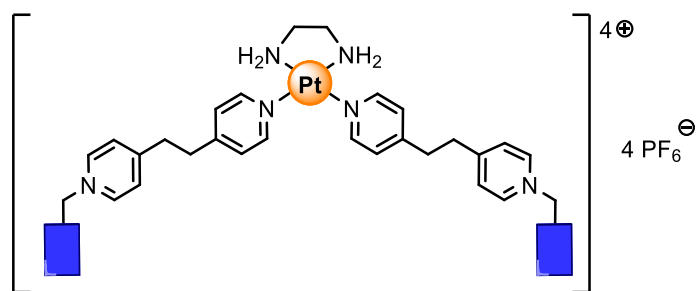
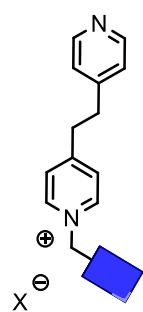
Y: O **84**: $n = 1$
85: $n = 2$
86: $n = 3$

Y: CH_3N **87**: $n = 1$
88: $n = 2$
89: $n = 3$

Y: $(\text{NH}_2)^{\oplus} \text{Cl}^{\ominus}$ **90**: $n = 1$
91: $n = 2$
92: $n = 3$

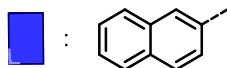


= D-glucosa(A), D-galactosa(B), D-manosa(C), L-ramnosa(D), L-fucosa(E)

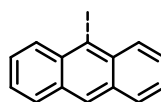


X: Cl, Br

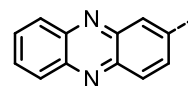
F: naftalen-2-il
G: antracen-9-il
H: fenazin-2-il



I: naftalen-2-il



J: antracen-9-il



K: fenazin-2-il

Índice

1. Introducción y objetivos	1
1.1 Introducción	3
1.2 Objetivos	7
1.3 Organización	13
2. Antecedentes	15
2.1 Ácido Desoxirribonucleico	17
2.1.1 Breve descripción del ADN	17
2.1.2 Modos de unión de ligandos de bajo peso molecular al ADN	19
2.1.2.1 <i>El fenómeno de la intercalación</i>	19
2.1.2.2 <i>Unión al surco</i>	21
2.1.3 ADN cuádruple-G	22
2.1.3.1 <i>La tétrada-G</i>	22
2.1.3.2 <i>El papel del ion metálico alcalino</i>	23
2.1.3.3 <i>El concepto de ADN cuádruple</i>	25
2.1.3.4 <i>Los cuádruples-G del ADN telomérico</i>	26
2.1.3.5 <i>Secuencia del ADN telomérico humano en un entorno</i> <i>de cationes de sodio</i>	29
2.1.3.6 <i>Secuencia del ADN telomérico humano en un entorno</i> <i>de cationes de potasio</i>	30
2.1.3.6.1 <i>Análisis cristalográfico</i>	30
2.1.3.6.2 <i>Estudios por Resonancia Magnética Nuclear</i>	31
2.1.4 <i>El ADN cuádruple-G telomérico y la telomerasa</i>	33
2.1.4.1 <i>Los telómeros</i>	33
2.1.4.2 <i>La telomerasa</i>	34
2.2 Ligandos de ADN cuádruple-G	36
2.2.1 <i>Antraquinonas y derivados</i>	37

2.2.2 Derivados de acridina	39
2.2.2.1 Derivados de acridinas disustituidas	40
2.2.2.2 Derivados de acridinas trisustituidas	42
2.2.3 Derivados policíclicos de acridina	44
2.2.4 Derivados de 1,10-fenantrolina	44
2.2.5 Otros compuestos policíclicos	49
2.2.6 Telomestatina y análogos	52
2.2.7 Porfirinas	53
2.2.8 Complejos metálicos	54
2.2.8.1 Complejos metálicos de porfirinas	55
2.2.8.2 Complejos de derivados de 1,10-fenantrolina	57
2.2.8.2.1 Complejos de platino(II)	57
2.2.8.2.2 Complejos de rutenio(II)	59
2.2.8.2.3 Complejos de cobre(II) o níquel(II)	60
2.2.8.3 Complejos que contienen unidades de piridina	63
2.2.8.3.1 Complejos de platino(II) y cobre(II)	63
2.2.8.3.2 Complejos de paladio(II)	64
2.2.8.4 Otros complejos metálicos	65
2.2.8.4.1 Complejo de Pt(II) con capacidad de unirse covalentemente al ADN cuádruple-G	65
2.2.8.4.2 Complejos de Ni(II), Zn(II) y V(II) con bases de Schiff	66
2.3 Técnicas para el estudio de interacciones ADN cuádruple- ligando y evaluación de la actividad biológica	67
2.3.1 Estudio de interacción por métodos espectroscópicos	68
2.3.1.1 Dicroísmo circular (DC)	68
2.3.1.2 Espectroscopia de Ultravioleta-visible (UV-vis)	70
2.3.1.3 Ensayo de desplazamiento de ligandos fluorescentes (G4-FID) ..	70
2.3.1.4 Espectrometría de masas (EM)	72

2.3.1.5 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	73
2.3.1.6 Determinación de la interacción entre el ligando y ADN por medida de la desnaturalización térmica	74
2.3.2 Estudios cinéticos y termodinámicos de la asociación ligando-ADN cuádruple-G	76
2.3.2.1 Resonancia de plasmón de superficie (SPR).....	76
2.3.2.2 Diálisis de equilibrio competitiva	77
2.3.3 Difracción de rayos X.....	78
2.3.4 Footprinting.....	79
2.3.5 Viscosimetría	79
2.3.6 Ensayo de la inhibición de la telomerasa	81
2.3.7 Ensayos en cultivo celular.....	82
3. Discusión de resultados	85
3.1 Síntesis 87	
3.1.1 Síntesis de un derivado de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada (6)	87
3.1.2 Síntesis de aminas secundarias derivadas de la 2,2'-bipiridina o de la 1,10-fenantrolina enlazadas a grupos guanidinio terminales.....	88
3.1.2.1 Síntesis de aminas derivadas de la 2,2'-bipiridina	89
3.1.2.2 Síntesis de las aminas derivadas de la 1,10-fenantrolina.....	93
3.1.3 Preparación de diéteres derivados de la 1,10-fenantrolina	95
3.1.3.1 Preparación de alcoholes precursores	96
3.1.3.1.1 Alcoholes sustituidos con sistemas aromáticos.....	96
3.1.3.1.2 Alcoholes incorporando un grupo guanidino	97
3.1.3.1.3 Alcoholes con heterociclos alifáticos	97
3.1.3.1.3.1 Alcoholes con anillos de piperidina, morfolina y N-metilpiperazina.....	97
3.1.3.1.3.2 Alcoholes de piperazina y metoxicarbonilpiperazina	98

3.1.3.2 Preparación de los éteres derivados de la 1,10-fenantrolina.....	101
3.1.3.2.1 Ligandos con sustituyentes aromáticos en las cadenas laterales.....	102
3.1.3.2.2 Ligandos con grupos guanidinio terminales.....	108
3.1.3.2.3 Ligandos con heterociclos alifáticos como grupos terminales.....	109
3.1.3.2.3.1 Ligandos con piperidina, morfolina o N-metilpiperazina en las cadenas laterales.....	109
3.1.3.2.2 Ligandos con piperazina en las cadenas laterales.....	111
3.1.4 Preparación de los complejos de coordinación de Cu(II) y Ni(II).....	114
3.1.4.1 Complejos derivados de la 2,2'-bipiridina.....	114
3.1.4.2 Complejos derivados de la 1,10-fenantrolina.....	116
3.2 Estudios de interacción ligando-ADN	120
3.2.1 Productos seleccionados.....	120
3.2.2 Técnicas empleadas para evaluar la interacción entre los distintos ligandos y el ADN	125
3.2.2.1 Técnicas utilizadas para evaluar la interacción entre los ligandos y el ADN cuádruple-G.....	126
3.2.2.1.1 Medidas de la interacción ligando-ADN por desnaturalización térmica.....	126
3.2.2.1.1.1 Desnaturalización térmica del ADN por FRET.....	126
3.2.2.1.1.2 Desnaturalización térmica del ADN por FRET competitivo.....	131
3.2.2.1.2 Estudio de la interacción por medidas espectroscópicas	135
3.2.2.1.2.1 Dicroísmo circular (DC).....	135
3.2.2.1.2.2 Ensayo de desplazamiento de ligandos fluorescentes (G4-FID)	144
3.2.2.1.3 Estudios termodinámicos entre el ligando y el ADN cuádruple-G	152

3.2.2.1.4 Viscosimetría.....	156
3.2.2.1.5 Ensayo directo de inhibición de la telomerasa	160
3.2.2.1.6 Ensayos con células en cultivo.....	162
4. Parte experimental.....	167
4.1 Síntesis 169	
4.1.1 Materiales y métodos.....	169
4.1.2 Procedimientos de síntesis	170
4.2 Estudios de interacción y actividad biológica	244
4.2.1 Estudios de interacción ligando-ADN por desnaturalización térmica	244
<i>4.2.1.1 Desnaturalización térmica del ADN por FRET</i>	<i>244</i>
<i>4.2.1.2 Desnaturalización térmica del ADN por FRET competitivo.....</i>	<i>246</i>
4.2.2 Estudio de la interacción por medidas espectroscópicas	247
<i>4.2.2.1 Medidas de interacción por dicroísmo circular</i>	<i>247</i>
<i>4.2.2.2 Ensayo de desplazamiento de ligandos fluorescentes (G4-FID).....</i>	<i>248</i>
4.2.3 Estudios cinéticos y termodinámicos entre ligandos y ADN cuádruple-G.....	250
4.2.4 Viscosimetría	252
4.2.5 Estudios de la actividad biológica	254
<i>4.2.5.1 Ensayo de citotoxicidad con sulforodamina B.....</i>	<i>254</i>
<i>4.2.5.2 Protocolo de amplificación de repeticiones del oligonucleótido con la secuencia telomérica (TRAP-LIG)</i>	<i>256</i>
5. Conclusions	259
5.1 Synthetic achievements	261
5.2 In vitro DNA-interaction studies & biological activity studies.....	266
Anexos.....	279

Anexo I	281
Anexo II	311

1. Introducción y objetivos

1.1 Introducción

El ácido desoxirribonucleico, abreviado como ADN, contiene las instrucciones genéticas empleadas en el desarrollo y en el funcionamiento de todos los organismos vivos y de algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria. Los segmentos específicos de ADN que contienen esta información se denominan genes, pero el resto de secuencias del ADN tienen, asimismo, motivos estructurales o ejercen funciones en la regulación del uso de la información genética.^[1] En los organismos vivos, el ADN no suele existir como una molécula individual, sino como una pareja de moléculas estrechamente asociadas. Las dos cadenas de nucleótidos que constituyen el ADN se enroscan sobre sí mismas, formando la conocida doble hélice.

Aparte de la estructura canónica de la doble hélice (de tipo B), el ADN puede adoptar varias estructuras secundarias no canónicas. Hasta el día de hoy han sido descritas, como mínimo, diez de estas estructuras (de tipo no-B) que se pueden formar bajo condiciones fisiológicas apropiadas. Estas estructuras particulares representan, por ejemplo, la doble hélice del ADN tipo Z, la estructura intramolecular del ADN triple, la formación de la unión Holliday o los ADN cuádruples-G.^[2]

Sin duda, la última de las estructuras mencionadas, el ADN cuádruple-G, es actualmente la estructura más estudiada entre las estructuras no canónicas. Los cuádruples-G (figura 2, **a** y **b**) son estructuras secundarias del ADN formadas por cuatro hebras con secuencias ricas en guaninas. La auto-asociación entre las guaninas da lugar a tétradas – formaciones planas y cíclicas constituidas por cuatro guaninas unidas a través de ocho puentes de hidrógeno de tipo Hoogsteen (figura 2, **c**).^[3]

¹ B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, 5th edition, **2008**, ISBN 978 0 8153 4 05, Editorial Garland Science

² G. Wang, K. M. Vasquez, *DNA Repair*, **2014**, 19, 143 - 151

³ G. W. Collie, G. N. Parkinson, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 5867 - 5892

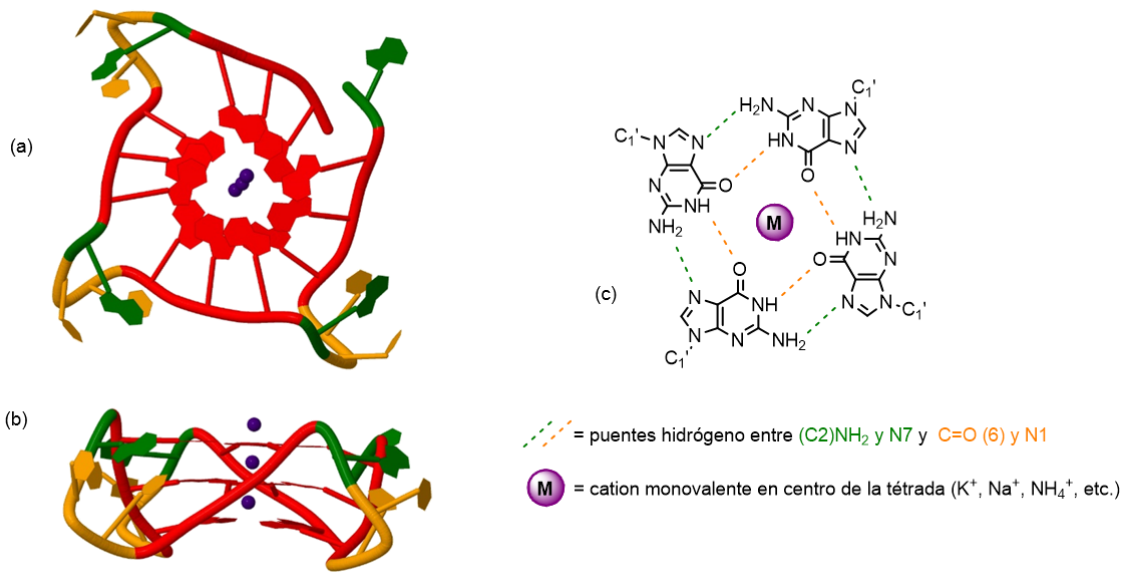


Figura 2. a – Visión vertical y b – visión lateral de la estructura del ADN cuádruple-G de secuencia telomérica (PDB 1KF1); c - cuatro guaninas agrupadas en una tétrada, estabilizada por 8 puentes de hidrógeno y por un catión monovalente en el centro

Dentro del genoma humano han sido descubiertas más de 716000 secuencias con alto contenido de guaninas, regiones con alta probabilidad de formación de estructuras cuádruples.^[4] Su localización y naturaleza evolutiva está altamente conservada, lo que indica la gran importancia de las funciones genómicas de estos cuádruples o cuadruplexos. Una de estas regiones ricas en guaninas en el genoma humano es la correspondiente a los extremos de los cromosomas, los telómeros. La función principal de estas regiones es permitir a la célula replicar los extremos cromosómicos sin pérdidas en la información genética, mantener la estabilidad de los cromosomas y proteger los extremos de los mismos frente a la unión con otros cromosomas.

La telomerasa humana es una ribonucleoproteína encargada de mantener la longitud de los telómeros mediante la adición de fragmentos repetitivos de ADN, con la secuencia (TTAGGG)_n. El complejo riboproteico está constituido por varios componentes, principalmente por una molécula de ARN de 451 nucleótidos (hTR), que incluye una plantilla de 11 nucleótidos, y por una transcriptasa inversa (hTERT), que cataliza la adición de las secuencias TTAGGG

⁴ V. S. Chambers, G. Marsico, J. M. Boutell, M. Di Antonio, G. P. Smith, S. Balasubramanian, *Nature Biotechnol.*, **2015**, *33*, 877 - 881

día se conoce que este tipo de ligandos son capaces de producir una respuesta rápida de muerte celular, en contraposición al lento efecto producido por los inhibidores clásicos de la telomerasa. Por ello, actualmente existe un gran interés en el estudio de nuevos ligandos selectivos de ADN cuádruple-G, aceptando como molécula diana terapéutica la propia estructura secundaria, ya que la unión de ligandos a la misma conduce a diferentes respuestas biológicas. Este hecho abre una prometedora vía para el descubrimiento de compuestos antitumorales más eficaces.^[7]

⁷ Selección de artículos de revisión recientes sobre el ADN cuádruple-G: **a)** M. L. Bochman, K. Paeschke, V. A. Zakian, *Nature Rev. Genet.*, **2012**, *13*, 770-780; **b)** Y. Chen, D. Yang, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **2012**, *50*, 17.5.1.-17.5.17; **c)** P. Murat, S. Balasubramanian, *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **2014**, *25*, 22-29

1.2 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis doctoral es la síntesis y caracterización estructural de distintos compuestos orgánicos y metalo-orgánicos dotados con la capacidad de interaccionar selectivamente con el ADN cuádruple-G, con el fin de obtener compuestos dirigidos a los telómeros humanos, lo que les puede conferir potencial actividad antitumoral. Uno de los posibles mecanismos de acción de los compuestos sintetizados podría implicar la inhibición de la telomerasa humana.

Para ello, se abordará, en primer lugar, la preparación de un derivado basado en el sistema de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada (figura 4), así como la síntesis de algunos complejos metálicos de Cu(II) o de Ni(II) con distintos derivados de la 2,2'-bipiridina y de la 1,10-fenantrolina. Estas estructuras se encuentran recogidas en las figuras 5 y 6.

En el primero de los casos, se persigue obtener un derivado en el que la 1,10-fenantrolina dicuaternizada se encuentre sustituida en las posiciones 4 y 7 de la fenantrolina con cadenas alifáticas que contienen grupos guanidinio (figura 4).

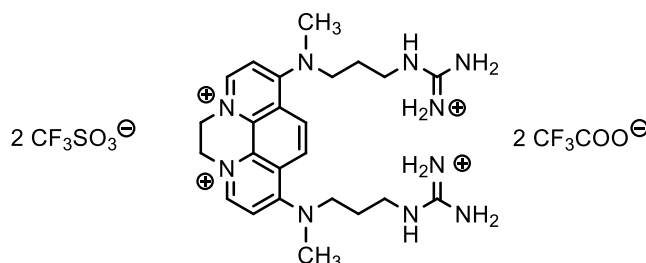


Figura 4. Ligando derivado de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada

Por otra parte, en este trabajo se aborda la preparación de complejos metálicos de cobre(II) y de níquel(II) con ligandos de 2,2'-bipiridina y con una estequiometría 2:1 ligando/metal. Los ligandos están sustituidos en las posiciones 4 y 4' de la 2,2'-bipiridina con distintas cadenas laterales alifáticas: una cadena de seis carbonos enlazada a un grupo guanidinio o la cadena correspondiente al α -aminoácido arginina (figura 5).

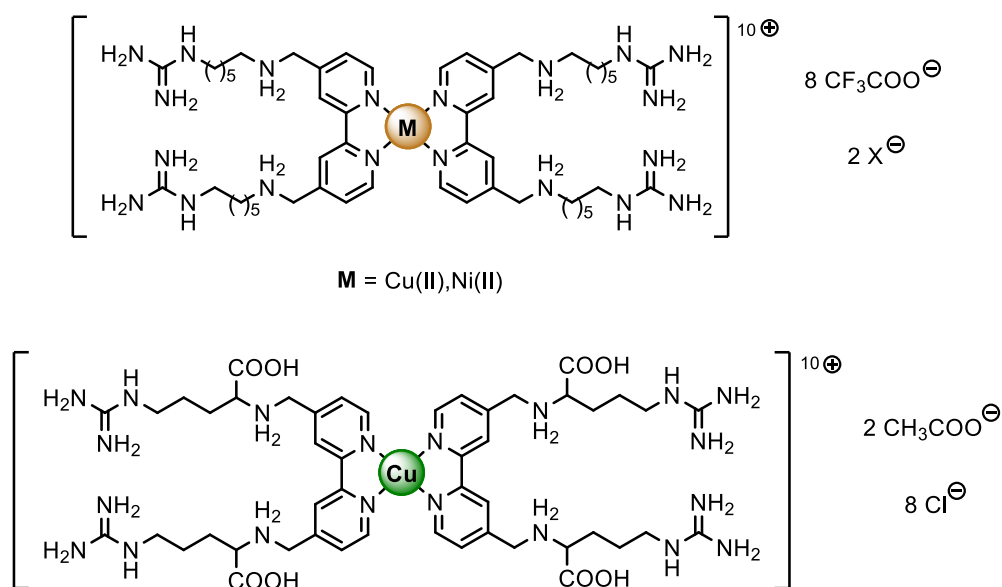


Figura 5. Estructuras generales de los complejos de Cu(II) y Ni(II) con ligandos de 2,2'-bipiridina sustituidos con distintas cadenas laterales en las posiciones 4,4'

Otro tipo de compuestos objetivo, los complejos metálicos de Cu(II) y de Ni(II) con derivados de la 1,10-fenantrolina, se representan en la figura 6. En este caso los ligandos de 1,10-fenantrolina se encuentran coordinados al átomo metálico mediante los pares de electrones libres de los nitrógenos en posiciones 1 y 10 de la fenantrolina. Los ligandos de fenantrolinas, además, están sustituidos en las posiciones 4 y 7 con cadenas alifáticas con una longitud correspondiente a dos, tres o cuatro átomos de carbono. En el extremo de las cadenas laterales se incorpora un grupo guanidinio, un grupo *N*-(bencil)-*N*-metilo o un heterociclo alifático como por ejemplo piperidina, morfolina, piperazina o *N*-metilpiperazina.

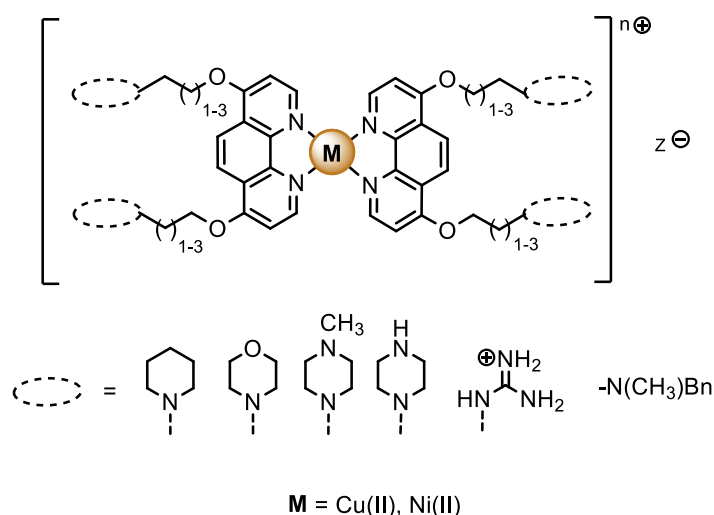


Figura 6. Estructuras generales de los complejos de Cu(II) o de Ni(II) con ligandos de 1,10-fenantrolina sustituidos con cadenas laterales en las posiciones 4,7

Las estructuras de los ligandos orgánicos y de los complejos metálicos basados en los sistemas de 2,2'-bipiridina y de 1,10-fenantrolina se diseñaron en base a varias consideraciones.^[8,9,10] En primer lugar, son sistemas que pueden interactuar fuertemente y selectivamente con el ADN, debido a que la superficie del mismo es lo suficientemente extensa para interactuar por fuerzas de apilamiento. En segundo lugar, las cargas positivas en el ligando dicuaternizado o la carga del átomo metálico, en el caso de los complejos, podrían estabilizar el potencial electrostático negativo creado por los grupos carbonilo de las guaninas que se orientan hacia el canal central de la estructura del cuádruple-G. Y, en tercer lugar, la presencia de cadenas laterales enlazadas por sus extremos a grupos guanidinio o a heterociclos alifáticos podría favorecer una interacción con las estructuras cuádruples de ADN por medio de interacciones electrostáticas o a través de enlaces de hidrógeno en los bucles y/o en los surcos. Por otra parte, hay que tener en consideración que estas cadenas tienen la función de aumentar la solubilidad de los complejos en medio acuoso.

⁸ S. M. Hampel, A. Sidibe, M. Gunaratnam, J.-F. Riou, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 6459 – 6463

⁹ C. M. Lombardo, I. S. Martínez, S. Haider, V. Gabelica, E. De Pauw, J. E. Moses, S. Neidle, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 9116 - 9118

¹⁰ S. Sparapani, S. M. Haider, F. Doria, M. Gunaratnam, S. Neidle, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 12263 - 12272

El segundo bloque de objetivos de este trabajo ha sido la realización de experimentos de interacción entre el ADN, fundamentalmente ADN cuádruple-G, y distintos compuestos orgánicos y metalo-orgánicos. La mayoría de los compuestos estudiados se prepararon en el contexto de la presente tesis doctoral, (figuras 4, 5 y 6) si bien algunos compuestos de los recogidos en este trabajo fueron sintetizados en colaboración con otros miembros del grupo de investigación (figuras 7 y 8).

En primer lugar nos planteamos el estudio de ligandos de 1,2-etilen-4,4'-bipiridina y de sus complejos de platino(II). Los ligandos se encuentran sustituidos en la posición 1 con diferentes sistemas aromáticos, como el naftaleno, el antraceno o la fenazina. Los complejos metálicos de platino(II) y etilendiamina contienen dos moléculas de ligando aromático por un átomo de platino(II), tal y como se muestra en la figura 7.

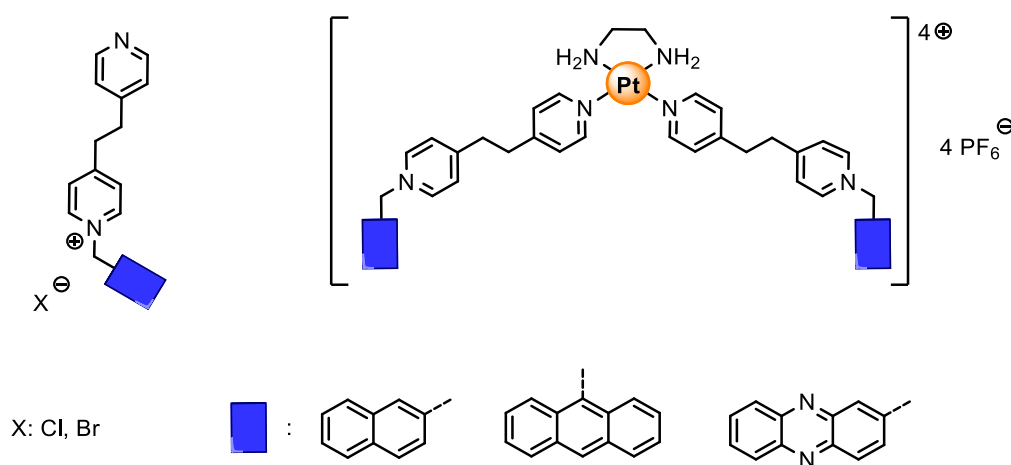


Figura 7. Ligandos de 1,2-etilen-4,4'-bipiridina conteniendo naftaleno, antraceno o fenazina y sus correspondientes complejos de Pt(II)

Otro tipo de compuestos objeto de estudio lo constituyen los complejos de cobre(II) basados en el heterociclo de 1,10-fenantrolina sustituida en la posición 5 con diferentes piranosilaminas. Para la serie D, se incorporan unidades de carbohidrato de D-glucosa, D-galactosa o D-manosa. Para la serie L, de L-ramnosa o L-fucosa. Dado que los ligandos sustituidos en la posición 5 son moléculas asimétricas, existen dos posibles estructuras de los complejos con cobre(II), las cuales se representan en la figura 8.

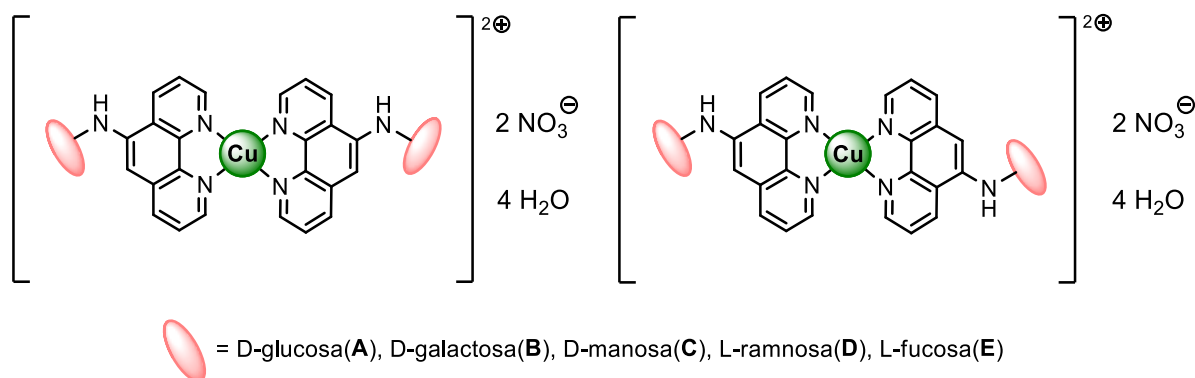


Figura 8. Estructura general de los complejos de Cu(II) con sistemas de 1,10-fenantrolina sustituidos en la posición 5 con diferentes piranosilaminas

Para el estudio de las interacciones ADN-ligando se propone la utilización de distintas técnicas biofísicas, como el dicroísmo circular, la diálisis de equilibrio competitiva, el ensayo de desplazamiento de ligandos fluorescentes unidos a cuádruple-G o el estudio de la desnaturalización térmica del ADN por FRET. Los experimentos se han centrado en estudiar, fundamentalmente, la secuencia de cuádruple-G de los telómeros humanos, en concreto la formada por el oligonucleótido de 22 bases (Tel-22) de secuencia $\text{AGGG}(\text{TTAGGG})_3$. (Excepcionalmente, para el caso de los ensayos de desnaturalización térmica por FRET, se ha empleado una secuencia de 21 bases, $\text{GGG}(\text{TTAGGG})_3$).

Asimismo, se ha propuesto el uso de la viscosimetría, como una técnica o herramienta complementaria para determinar el modo de unión entre los distintos ligandos y el ADN dúplex. La valoración viscosimétrica de disoluciones ADN-ligando es una experiencia sencilla que permite establecer si la interacción de un ligando con el ADN se produce por intercalación, por unión al surco o por unión electrostática externa, o si se trata de un modo de unión mixto (intercalación y/o unión al surco y/o unión externa).

En el marco de la obtención del título de Doctor con Mención Internacional, un objetivo esencial de este trabajo ha sido la realización de una estancia investigadora en un centro extranjero de prestigio. Por afinidad con la investigación desarrollada, se ha elegido para ello el grupo de investigación del

Profesor Stephen Neidle (*Biomedical Structure Group, School of Pharmacy, University College London*). Durante dicha estancia se han llevado a cabo algunos ensayos de inhibición de la telomerasa humana *in vitro*, fundamentalmente mediante el ensayo TRAP-LIG (del inglés, *Telomere Repeat Amplification Protocol without ligand*). El ensayo TRAP-LIG se diseñó por primera vez en el grupo de Profesor Neidle como una modificación del ensayo estándar TRAP (*Telomere Repeat Amplification Protocol*), que sirve para cuantificar la actividad de la telomerasa humana. Por otra parte, también se planteó como objetivo el realizar ensayos de citotoxicidad, como el ensayo con sulforodamina B (Ensayo de SRB), que se llevó a cabo en cultivo celular empleando varias líneas de células cancerosas. Las dos técnicas (TRAP-LIG y el ensayo SRB) permiten determinar los valores de IC₅₀ (concentraciones necesarias para la inhibición del 50% de la enzima telomerasa en el ensayo de TRAP-LIG o concentraciones necesarias para la inhibición del 50% crecimiento de células en el ensayo SRB) en estudios de actividad biológica con compuestos de interés.

1.3 Organización

Esta memoria se ha distribuido en 5 capítulos: la presente introducción, una sección de antecedentes bibliográficos, la discusión de resultados, la parte experimental y, por último, un resumen y conclusiones.

En la parte de antecedentes se recoge una breve introducción de la diana terapéutica estudiada en esta tesis doctoral: las estructuras secundarias de ADN cuádruple-G teloméricas, resaltando además otra diana asociada, la telomerasa humana. Posteriormente se realiza una breve revisión sobre algunos compuestos más representativos, clasificados por familias, que son capaces de interactuar con el ADN cuádruple G, con distintos grados de selectividad (muchos de estos compuestos también muestran afinidad por el ADN de doble hebra). Finalmente, se enumeran distintas técnicas para el estudio de la interacción entre ligandos y el ADN cuádruple-G, describiendo los fundamentos de algunas de ellas.

Por otra parte, el capítulo de discusión de resultados se ha dividido en dos partes, una primera parte relativa a la descripción de los procedimientos de síntesis y de caracterización de los compuestos obtenidos, y una segunda parte en la que se detallan los resultados de interacción y de actividad biológica.

La parte experimental recoge, asimismo, la síntesis y caracterización de los compuestos objetivo de esta tesis doctoral y los ensayos de interacción y actividad biológica llevados a cabo.

En el capítulo final se resumen los resultados obtenidos y se recogen las conclusiones más relevantes que se derivan del trabajo realizado.

2. Antecedentes

2.1 Ácido Desoxirribonucleico

2.1.1 Breve descripción del ADN

La vida depende de la capacidad de las células de almacenar, recuperar y traducir la información genética necesaria para mantener un organismo vivo. Esta información se transmite de una célula madre a sus células hijas en la división celular, y de una generación de un organismo a la siguiente a través de la reproducción del organismo y de las células. Estas "instrucciones" se almacenan dentro de cada célula viva en forma de genes, los elementos de información que contienen y que determinan las características de una especie en su conjunto. Tan pronto la genética surgió como una ciencia a principios del siglo XX, los científicos empezaron a interesarse por la estructura química de los genes. Todas las células en la Tierra, sin ninguna excepción conocida, almacenan su información hereditaria en la forma de cadenas poliméricas del ácido desoxirribonucleico, el ADN.^[1]

El ADN es una biomolécula relativamente sencilla, sobre todo desde el punto de vista de su composición. La unidad fundamental de la que se compone son los nucleótidos, entidades constituidas por la unión de una molécula de azúcar, concretamente una 2'-desoxirribosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato. Hay cuatro tipos de bases que pueden estar presentes en el ADN: adenina (A) y guanina (G), con esqueletos de purina, y citosina (C) y timina (T), que son pirimidinas. Los nucleótidos se encuentran unidos entre sí a través de los grupos fosfato que enlazan la posición 3'-OH del anillo de ribosa de un nucleótido con el 5'-OH del siguiente, originando así una cadena polinucleotídica que transcurre, por convenio, en el sentido 5'-3' y se dispone de manera paralela a la otra hebra, que transcurre en sentido opuesto, formando así una estructura global de doble hélice. La estructura mantiene las dos hélices enfrentadas debido a la formación de enlaces de hidrógeno entre las bases A-T y C-G (figura 9) y, especialmente, por la presencia de interacciones de apilamiento π entre pares de bases de consecutivos.

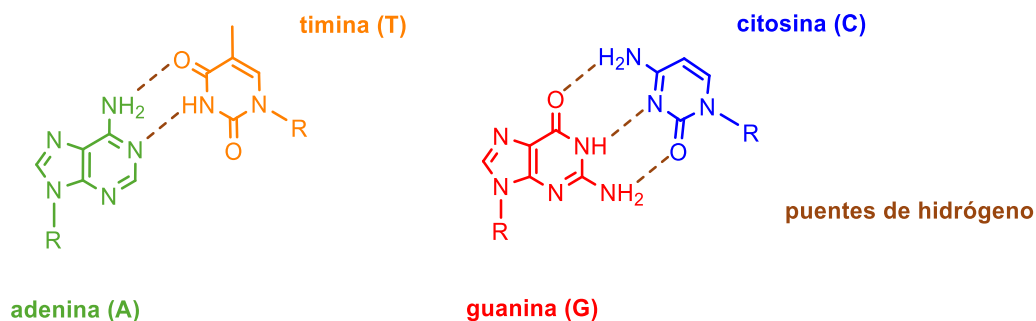


Figura 9. Apareamiento entre las bases de ADN: adenina con timina, por medio de dos puentes de hidrógeno y guanina con citosina, por medio de tres puentes de hidrógeno

Las bases se disponen hacia el interior de la estructura, mientras que el esqueleto fosfato cargado negativamente describe la hélice por el exterior definiendo los surcos característicos de la estructura: surco mayor y surco menor (figura 10).

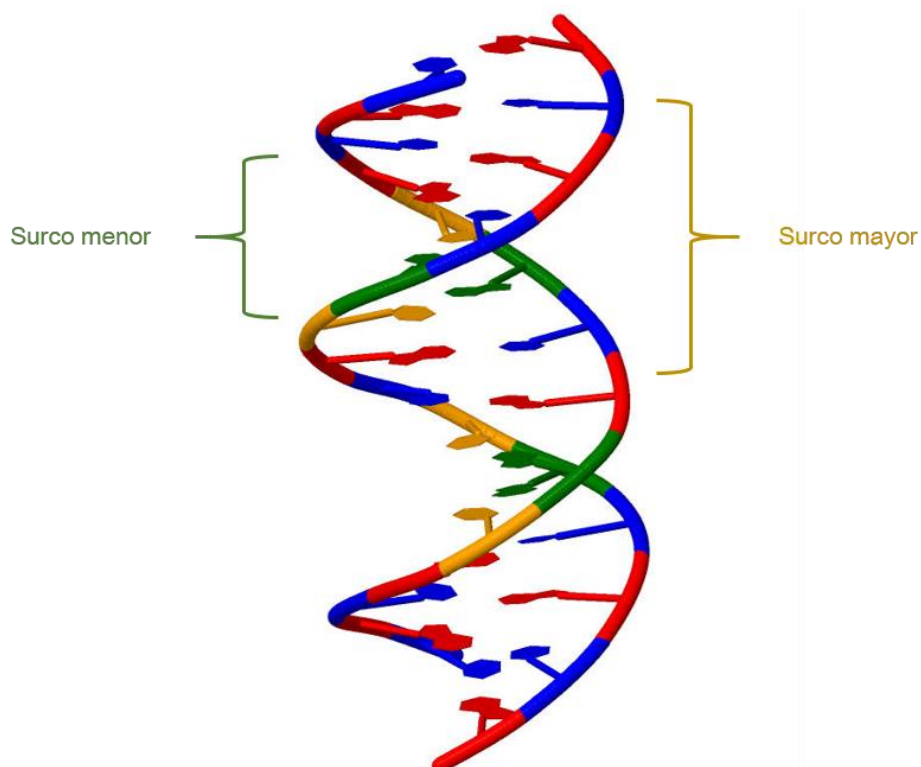


Figura 10. Surcos mayor y menor de la molécula de ADN dúplex (PDB 2M2C)^[11]

¹¹ A. Ghosh, R. K. Kar, J. Jana, A. Saha, B. Jana, J. Krishnamoorthy, D. Kumar, S. Ghosh, S. Chatterjee, A. Bhunia, *ChemMedChem*, **2014**, *9*, 2052 – 2058

En condiciones fisiológicas el ADN se encuentra preferentemente en la forma denominada B, que es la conformación a la que nos referiremos normalmente, salvo que se indique otra cosa. Existen, sin embargo otras dos conformaciones más, la forma A y la Z que, al igual que la B, se caracterizan por unos parámetros característicos de hélice.^[1]

2.1.2 Modos de unión de ligandos de bajo peso molecular al ADN

Los fármacos u otras moléculas capaces de unirse al ADN suelen presentar, fundamentalmente, dos maneras de interacción: covalente o no covalente. La unión no covalente es un tipo de unión reversible, que se puede producir por interacción electrostática, por unión al surco y por intercalación.^[12]

Por otra parte, la interacción covalente es un tipo de unión que puede o no ser irreversible y que en algunos casos puede incluso producir la rotura de la cadena del ADN. Ejemplos de este tipo de compuestos son distintos agentes alquilantes y algunos complejos de metales de transición.^[13]

2.1.2.1 El fenómeno de la intercalación

Como se mencionó anteriormente, el fenómeno de la intercalación es un tipo de interacción de carácter reversible que supone la inserción de una o más moléculas heterocíclicas aromáticas entre dos pares de bases contiguos en la doble hélice de la molécula de ADN.

El primer modelo de unión descrito fue el de Lerman^[14] y se puede definir como un modo de unión que supone la inserción del intercalante o cromóforo entre dos pares de bases adyacentes, a modo de sándwich. El modelo de intercalación de Lerman implica la inserción total o parcial del cromóforo entre dos pares de bases de ADN consecutivas, sin afectar al enlace de hidrógeno entre las bases que mantiene la estructura helicoidal (figura 11). En el sitio de

¹² L. Strekowski, B. Wilson, *Mutat. Res.*, **2007**, 623, 3 - 13

¹³ C. Zimmer, U. Wahnert, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **1986**, 47, 31 - 112

¹⁴ L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.*, **1961**, 3, 18 - 30

intercalación, se produce una separación entre los dos pares de bases para poder acomodar a la molécula del intercalante.

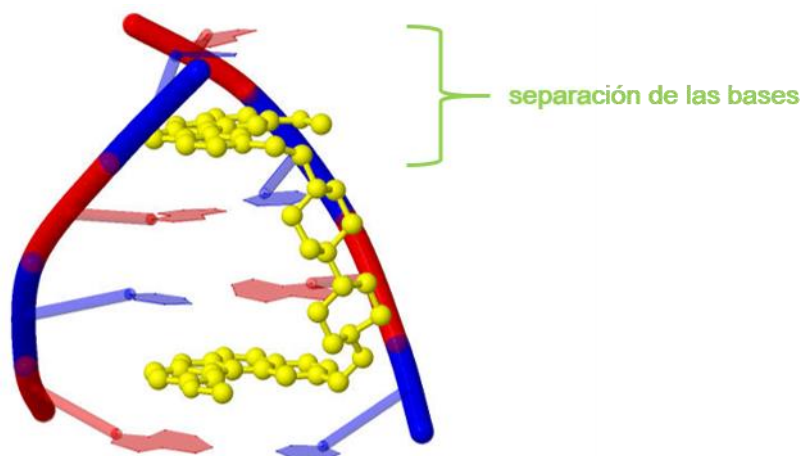


Figura 11. Agente anticanceroso, el bisintercalante ditercalinio, intercalado en una molécula de ADN (PDB 1D32)^[15]

Los intercalantes clásicos suelen ser moléculas con anillos aromáticos fusionados, con cargas positivas en las cadenas laterales y/o en el propio sistema aromático. Ejemplos clásicos de este tipo de compuestos son el hidrocloreto de proflavina, el bromuro de etidio y el yoduro de propidio (figura 12).^[12]

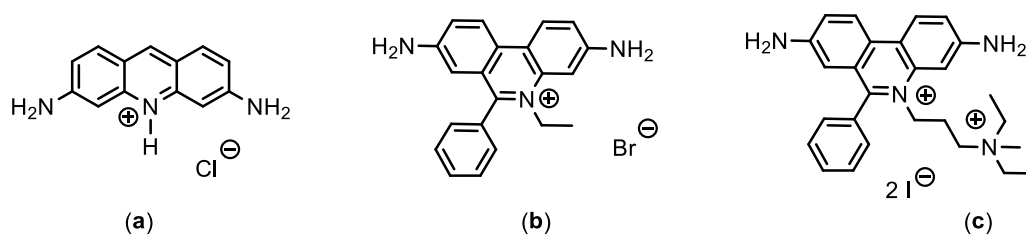


Figura 12. Ejemplos de ligandos intercalantes (a) hidrocloreto de proflavina, (b) bromuro de etidio, (c) yoduro de propidio

¹⁵ Q. Gao, L. D. Williams, M. Egli, D. Rabinovich, S. L. Chen, G. J. Quigley, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, 2422 - 2426

2.1.2.2 Unión al surco

Otro modo clásico de unión es el que presentan las moléculas que se asocian al ADN por los surcos (figura 13). Las principales fuerzas estabilizantes de dicha unión son las interacciones hidrofóbicas con la pared del surco, el establecimiento de enlaces de hidrógeno con los sustituyentes de las bases y las interacciones de van der Waals. Este tipo de compuestos suelen ser moléculas cargadas positivamente que presentan una estructura isohelicoidal con el surco.

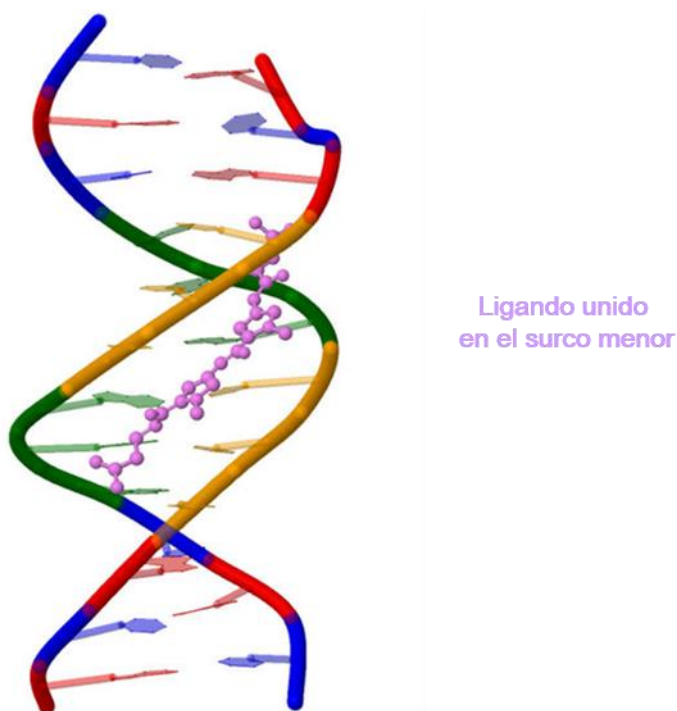


Figura 13. Molécula de netropsina unida en el surco del ADN (PDB 121D)^[16]

Como ejemplos representativos (figura 14) se pueden mencionar la distamicina, la netropsina (antibióticos antitumorales), o el compuesto DAPI (2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamida) y el compuesto Hoechst 33258, ambos marcadores fluorescentes de ácidos nucleicos. Estos compuestos contienen sistemas de anillos aromáticos no fusionados unidos por enlaces con

¹⁶ L. Tabernero, N. Verdaguer, M. Coll, I. Fita, G. A. Van Der Marel, J. H. Van Boom, A. Rich, J. Aymami, *Biochemistry*, **1993**, 32, 8403 - 8410

libertad torsional que permiten que las moléculas adopten la conformación apropiada para encajar la curvatura del surco menor del ADN.^[12]

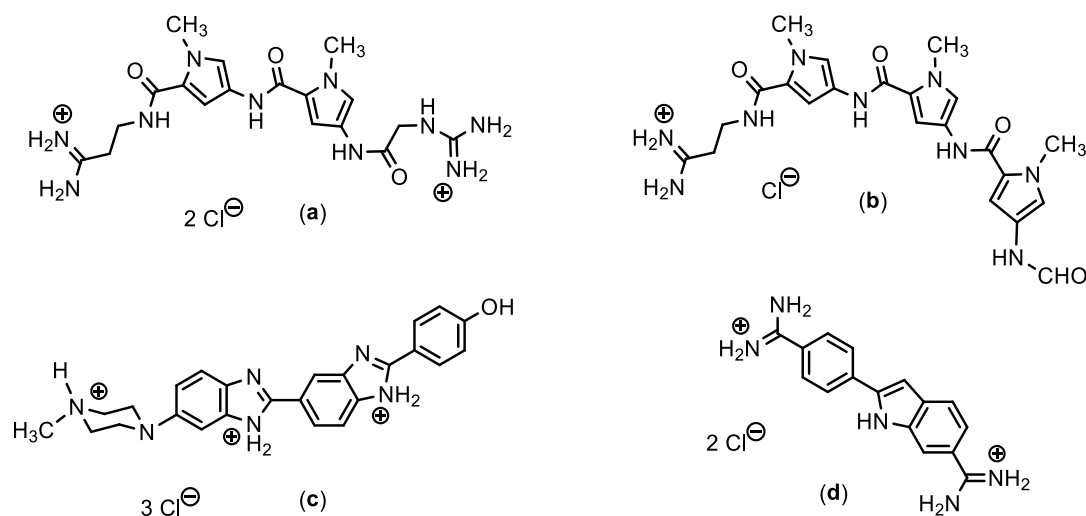


Figura 14. Ejemplos de ligandos que se unen al surco del ADN dúplex (a) netropsina, (b) distamicina A, (c) Hoechst 22358 y (d) 2-(amidinofenil)-1H-indol-6-carboxamidina (DAPI)

2.1.3 ADN cuádruple-G

2.1.3.1 La tétrada-G

Hace más de un siglo que I. Bang observó, por primera vez, que los ácidos nucleicos ricos en guaninas tienen propiedades físicas inusuales en disoluciones acuosas, concretamente su comportamiento como un gel.^[17] Posteriormente, se ha observado y descrito una agregación altamente ordenada de oligonucleótidos con desoxiguanosina. Los mismos autores también informaron de algunos de los primeros estudios espectroscópicos de estos ácidos nucleicos inusuales y mostraron que la absorbancia de los tri- d(pG)₃ y tetradexoxirribonucleótidos d(pG)₄ cambia con la temperatura para dar un punto de transición térmica (T_m) brusca, característica de una estructura secundaria altamente ordenada.^[18]

Estas observaciones fueron racionalizadas en términos estructurales por el estudio de difracción de rayos X en fibra, realizado sistemáticamente por Gellert,

¹⁷ I. Bang, *Biochem. Zeitschrift*, **1910**, 26, 293 - 311

¹⁸ R. K. Ralph, J. W. Connors, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.*, **1962**, 84, 2265 - 2266

Lipsett y Davies. Estos investigadores estudiaron fibras formadas a partir de disoluciones de monofosfatos de 3'- y 5'-guanosina, similares a los geles originales producidos unos 50 años antes por Bang. No era sorprendente que los patrones de difracción obtenidos mostraran una cierta similitud con la disposición helicoidal del ADN dúplex, resuelto una década antes por Franklin y Wilkins.^[19] Sobre la base de este descubrimiento, Gellert y colaboradores propusieron que el orden de la estructura y alta estabilidad aparente en estas hélices podrían ser explicadas por la presencia de enlaces de hidrógeno entre las guaninas.^[20]

La estructura y la distribución de cuatro guaninas con dos enlaces de hidrógeno entre cada par (figura 15) que forma una tétrada-G fue propuesta en el año 1956^[21] y confirmada casi 50 años después, por Davis.^[22,23]

2.1.3.2 El papel del ion metálico alcalino

En los primeros estudios sobre la auto-asociación de las guanosinas se observó un requerimiento especial en las disoluciones: la presencia de cationes monovalentes. Estos cationes estabilizan fuertemente las estructuras resultantes, que se diferencian notablemente de la estructura del ADN dúplex. En los primeros modelos de estructuras de oligonucleótidos basados en el motivo de la tétrada de cuatro guaninas^[24] se propuso la existencia de un canal central en el cual se podrían colocar moléculas de agua o distintos cationes (figura 15).

¹⁹ D. T. Zallen, *Nature*, **2003**, 425, 15 - 15

²⁰ M. Gellert, M. N. Lipsett, D. R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1962**, 48, 2013– 2018

²¹ J. Donohue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1956**, 42, 60 – 65

²² S. Neidle, *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*, 1st edition, **2012**, ISBN 978 0 12 375138 6, Editorial Elsevier

²³ J. T. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2004**, 43, 668 - 698

²⁴ F. B. Howard, T. H. Miles, *Biochemistry*, **1982**, 21, 6736 – 6745

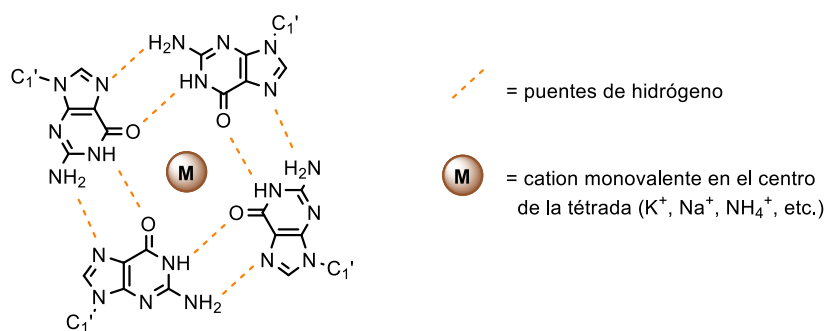


Figura 15. Estructura de la tétrada-G

Posteriormente fue confirmada esta propuesta y ampliada por la realización de numerosos estudios biofísicos y estructurales.^[25,26,27,28,29] De particular importancia biológica ha sido el descubrimiento de que la estabilidad de estas estructuras secundarias depende especialmente de la presencia y de las concentraciones fisiológicas de los cationes de sodio y de potasio. La capacidad de estabilizar las estructuras en el canal central es mayor para el caso del ión K^+ que para el ión Na^+ .

La ubicación precisa de un ion metálico en el canal depende de su radio iónico. Por ejemplo, los cationes de potasio son demasiado grandes para ser acomodados en el plano de una tétrada, pero pueden residir a una distancia equidistante entre dos tétradas sucesivas, mientras que el catión de sodio es lo suficiente pequeño para situarse en el plano de la tétrada, aunque no siempre se sitúa en esta disposición.^[30,31]

²⁵ Y. Oka, C. A. Thomas Jr., *Nucleic Acid Res.*, **1987**, *15*, 8877 - 8898

²⁶ D. Sen, W. Gilbert, *Nature*, **1988**, *334*, 364 - 366

²⁷ J. R. Williamson, M. K. Raghuraman, T. R. Cech, *Cell*, **1989**, *45*, 167 - 176

²⁸ C. C. Hardin, E. Henderson, T. Watson, J. K. Prosser, *Biochemistry*, **1991**, *30*, 4460 - 4472

²⁹ N. V. Hud, J. Plavec, capítulo de libro en S. Neidle, S. Balasubramanian: *Quadruplex Nucleic Acids*, 1st edition, **2006**, ISBN 978 0 85404 374 3, 100 - 130, Editorial Springer

³⁰ N. H. Campbell, D. L. Smith, A. P. Reszka, S. Neidle, D. O'Hagan, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 1328 - 1331

³¹ K. Phillips, Z. Dauter, A. I. Murchie, D. M. Lilley, B. Luisi, *J. Mol. Biol.*, **1997**, *273*, 171 - 182

2.1.3.3 El concepto de ADN cuádruple

La secuenciación del genoma humano reveló la presencia de varias regiones enriquecidas en guaninas.^[3] Dichas zonas son, por ejemplo, varios oncogenes o los extremos de los cromosomas eucarióticos, los telómeros. En estas regiones las hebras pueden formar tanto hélices continuas como estructuras compactas, denominadas cuádruples-G.^[26,32,33]

Los cuádruples-G se pueden construir a partir de una, dos o cuatro hebras de (ribo- o desoxirribo-) nucleótidos (figura 16). En términos generales, los cuádruples se pueden definir como estructuras formadas por un núcleo de, al menos, dos tétradas-G, estabilizadas por fuerzas de apilamiento entre las guaninas y por la presencia de los bucles. La combinación del número de tétradas apiladas, de la polaridad, longitud y la ubicación de los bucles da lugar a una variedad de distintos tipos de los cuádruples, tal y como se ha determinado experimentalmente.^[34,35,36]

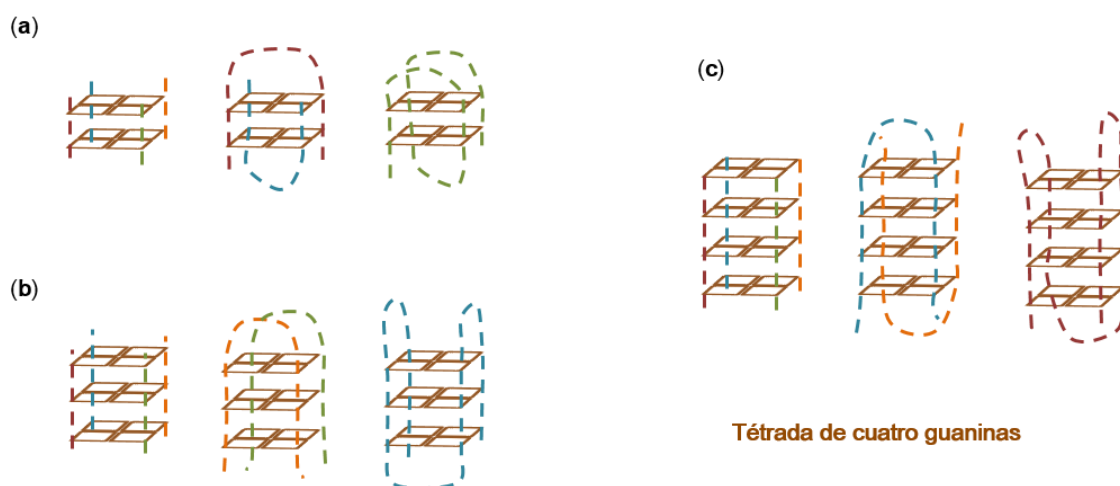


Figura 16. Estructuras secundarias de cuádruples mono-, bi- y tetramoleculares con dos (a), tres (b) o cuatro (c) tétradas de guaninas. Las cadenas de las moléculas diferentes están marcadas con colores rosa, naranja, verde y azul

³² E. Henderson, C. C. Hardin, S. K. Walk, I. Tinoco Jr., E. H. Blackburn, *Biochemistry*, **1987**, *51*, 899 - 908

³³ W. I. Sundquist, A. Klug, *Nature*, **1989**, *342*, 825 - 829

³⁴ V. Esposito, A. Galeone, L. Mayol, G. Oliviero, A. Virgilio, L. Randazzo, *Nucleos. Nucleot. Nucleic Acids*, **2007**, *26*, 1155 - 1159

³⁵ M. Črnugelj, N. V. Hud, J. Plavec, *J. Mol. Biol.*, **2002**, *320*, 911 - 924

³⁶ M. Črnugelj, P. Šket, J. Plavec, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 7866 - 7871

La disponibilidad del mapa del genoma humano, constituido por tres mil millones de nucleótidos, seguida de la secuenciación de muchos otros organismos, ha proporcionado numerosos datos de secuencias genómicas, a partir de las cuales se pueden buscar, de manera sistemática, regiones de ADN ricas en guaninas. De hecho, se han empleado varios análisis bioinformáticos para examinar la prevalencia de las potenciales secuencias de cuádruples en el genoma humano. Distintos estudios han revelado, que existen numerosas regiones en nuestro genoma que se pueden encontrar como ADN cuádruple.^[37,38,39] Actualmente se sabe que hay más de 716000 secuencias en el genoma humano con capacidad potencial de formar estructuras cuádruples.^[4]

2.1.3.4 Los cuádruples-G del ADN telomérico

Aunque se han descubierto un elevado número de secuencias que podrían formar estructuras secundarias de cuádruple-G, en esta tesis doctoral nos centraremos exclusivamente en la secuencia del ADN telomérico humano y en sus posibles estructuras secundarias.

El diseño de fármacos o de estudios con el objetivo de descubrir la actividad de una serie de compuestos hacia una diana terapéutica, normalmente requieren como punto de partida el conocer los datos estructurales de dicha diana. Hasta la fecha, no hay evidencia experimental que nos permita obtener suficiente información estructural como para describir directamente los telómeros humanos, en su ambiente biológico natural.

Entre los escasos estudios estructurales conocidos se pueden destacar, por ejemplo, la resolución cristalográfica de un oligonucleótido corto de ADN telomérico d(GGTTAGGGTTAG) con la proteína hPOT1. Esta estructura representa la hebra de ADN telomérico del extremo 3' en su conformación cristalizada (figura 17).^[40] En ausencia de la proteína POT1 (por ejemplo, cuando esta es desplazada por moléculas pequeñas que inducen la estabilización del ADN cuádruple) la hebra del extremo 3' tendrá la tendencia natural de formar la

³⁷ J. L. Huppert, S. Balasubramanian, *Nucleic Acid Res.*, **2005**, *36*, 144 - 156

³⁸ A. K. Todd, M. Johnston, S. Neidle, *Nucleic Acid Res.*, **2005**, *33*, 2901 - 2907

³⁹ A. K. Todd, *Methods*, **2007**, *43*, 246 - 251

⁴⁰ J. Nandamukar, T. R. Cech, E. R. Podell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, 651 - 656

estructura de cuádruple. Si, además en el interior celular se encuentran presentes iones potasio, se puede producir una estabilización del cuádruple muy fuerte.^[22]

La hebra del extremo 3' del ADN telomérico, que contiene por ejemplo 120 nucleótidos, consiste en 20 repeticiones de la secuencia 5'-(TTAGGG)-3'. Estas repeticiones pueden, en principio, formar hasta 5 cuádruples consecutivos. A fecha de hoy disponemos de numerosos estudios estructurales de cuádruples aislados con la secuencia telomérica humana, empleando resonancia magnética nuclear^[41,42,43] o cristalografía.^[44,45]

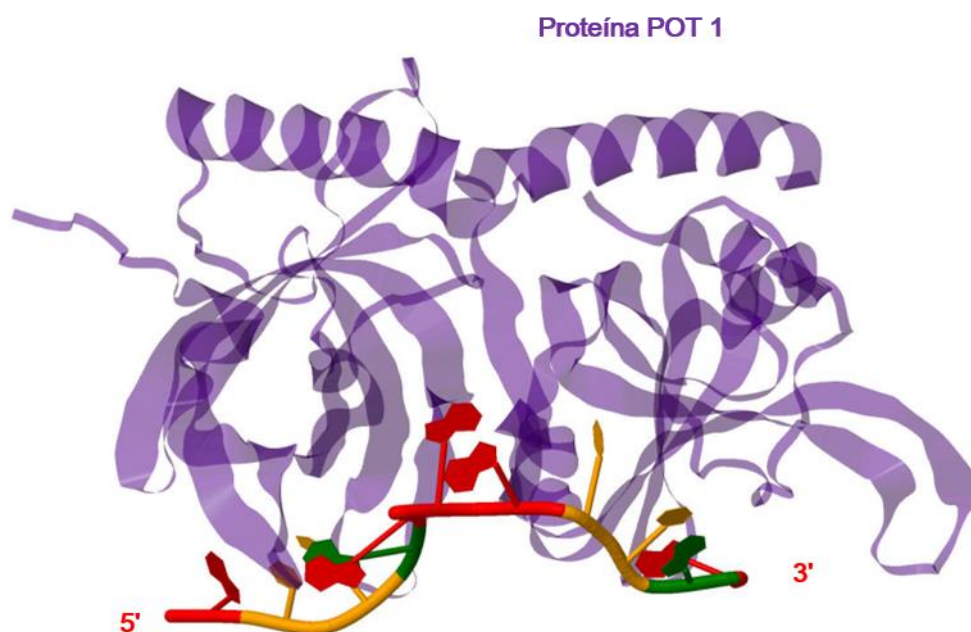


Figura 17. Estructura cristalina de un oligonucleótido corto de ADN telomérico con la proteína *hPOT1* (PDB 3KJP)^[45]

⁴¹ K. N. Luu, A. T. Phan, V. Kuryavyy, L. Lacroix, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 9963 - 9970

⁴² K. W. Lim, S. Amrane, S. Bouaziz, W. Xu, Y. Mu, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 4301 - 4309

⁴³ Z. Zhang, J. Dai, E. Veliath, R. A. Jones, D. Yang, *Nucleic Acids Res.*, **2010**, *38*, 1009 - 1021

⁴⁴ G. N. Parkinson, M. P. H. Lee, S. Neidle, *Nature*, **2002**, *417*, 876 - 880

⁴⁵ J. Nandakumar, T. R. Cech, E. R. Podell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, 651 - 656

Sin embargo, no se conoce exactamente cómo está organizada esta parte del ADN *in vivo*. Solo disponemos de algunos estudios de modelado molecular que proponen varias posibilidades de organización de dichas estructuras.^[46,47]

La secuencia repetitiva de 6 nucleótidos del ADN telomérico 5'-TTAGGG-3' puede formar cuádruples unimoleculares, bimoleculares y tetramoleculares.^[48] La mayor atención se ha centrado en el cuádruple unimolecular, formado por una hebra plegada sobre sí misma. Esta distribución intramolecular del ADN telomérico es la que se considera como la formación más probable en el extremo 3' del ADN telomérico. Cuádruples unimoleculares se pueden formar también a partir del ADN dúplex telomérico. El equilibrio en la doble cadena del ADN dúplex en principio no favorece la formación de los cuádruples, porque la cadena complementaria, rica en citosinas, tendría que formar el motivo-*i* (*i-motif*). La formación del motivo-*i* solo está favorecida a pH ácido. A pH fisiológico se podría observar la formación del motivo-*i* y de los cuádruples en presencia de moléculas pequeñas con capacidad de inducir el plegamiento y con alta selectividad hacia el ADN cuádruple (figura 18).^[49,50,51]

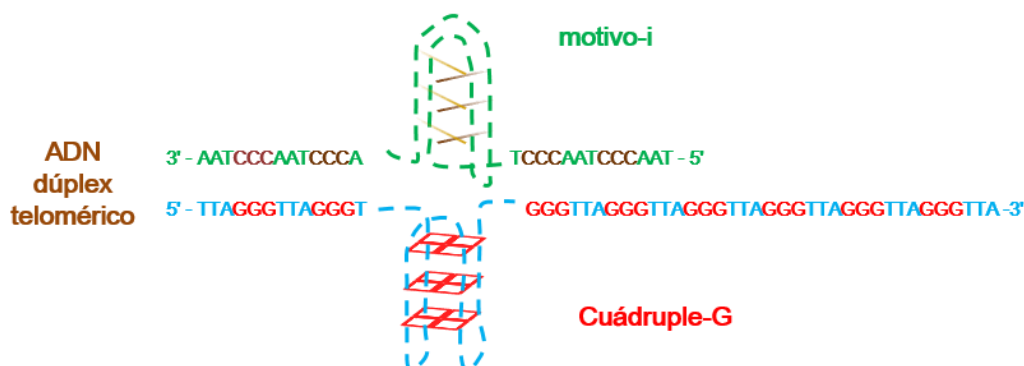


Figura 18. La formación de motivo-*i* y del cuádruple-G a pH ácido

⁴⁶ Y. Xu, T. Ishizuka, K. Kurabayashi, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2009**, *48*, 7833 - 7836

⁴⁷ A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, T. Bialis, R. A. Jones, D. Yang, *Nucleic Acid Res.*, **2006**, *34*, 2723 - 2735

⁴⁸ D. J. Patel, A. T. Phan, V. Kuryavyi, *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, 7429 - 7455

⁴⁹ A. Risitano, K. R. Fox, *Biochemistry*, **2003**, *42*, 6507 - 6513

⁵⁰ J. Zhou, C. Wei, G. Jia, X. Wang, Z. Feng, C. Li, *Biochimie*, **2009**, *91*, 1104 - 1111

⁵¹ P. L. T. Tran, J.-L. Mergny, P. Alberti, *Nucleic Acids Res.*, **2011**, *39*, 3282 - 3294

Los cuádruples monomoleculares del ADN telomérico están formados por tres tétradas de guaninas apiladas, y conectadas a través de los bucles de TTA. La morfología de la estructura secundaria depende en este caso del entorno catiónico en el cual se encuentra la secuencia del ADN telomérico. A continuación se describe la estructura secundaria de la secuencia 5'-(TTAGGG)_n-3' en el entorno de cationes de sodio o de potasio, ya que la misma secuencia se encuentra en topologías distintas, en función del tipo de ión predominante.

2.1.3.5 Secuencia del ADN telomérico humano en un entorno de cationes de sodio

La estructura secundaria de 22 nucleótidos de la secuencia del ADN telomérico d[AGGG(TTAGGG)₃] fue estudiada por 1D-RMN, 2D-RMN y modelado por métodos de dinámica molecular. Los análisis revelaron una conformación del cuádruple tipo "cesta", con bucles laterales y diagonales. La trayectoria continua del esqueleto azúcar-fosfato determina la topología general de la hebra como antiparalela. Esto significa que la dirección de la secuencia de tres guaninas en la estructura plegada supone una alternancia de forma sistemática 5'-3' - 3'-5' - 5'-3' - 3'-5' (figura 19).^[52]

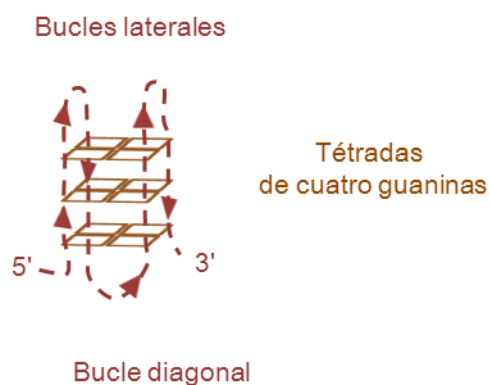


Figura 19. Conformación del cuádruple antiparalela

En la estructura del cuádruple del ADN telomérico, en un entorno de cationes de sodio, se puede observar una ubicación en el espacio interesante e importante de las dos adeninas del bucle. Las adeninas están colocadas encima de la tétrada externa del cuádruple y las interacciones de apilamiento existentes entre las guaninas y dichas adeninas contribuyen a la estabilización global de la estructura del cuádruple (figura 20).^[22]

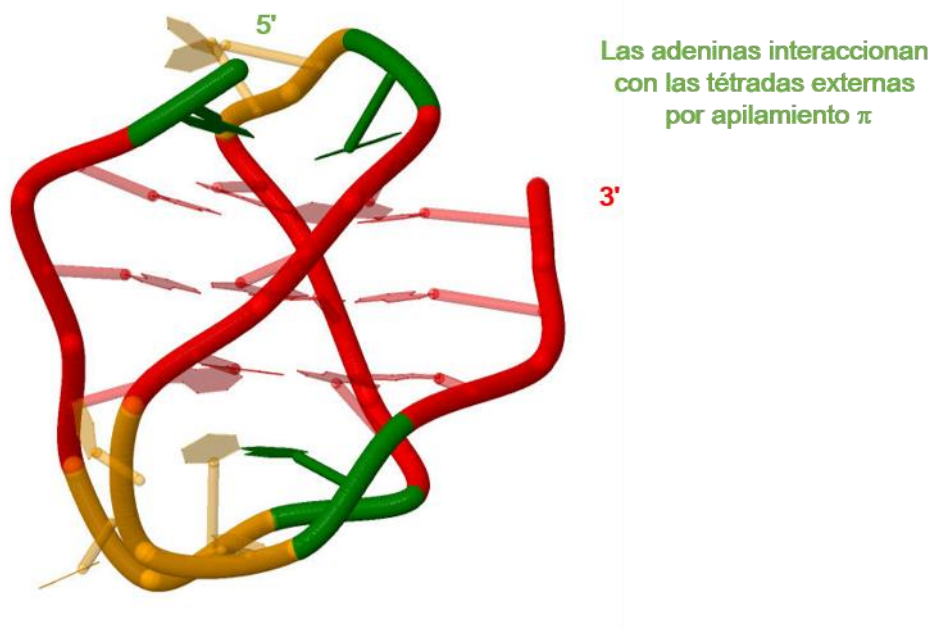


Figura 20. En la estructura del ADN cuádruple-G con la conformación antiparalela las adeninas están interactuando con las tétradas externas por apilamiento π (PDB 143D)^[52]

2.1.3.6 Secuencia del ADN telomérico humano en un entorno de cationes de potasio

2.1.3.6.1 Análisis cristalográfico

El mismo oligonucleótido con la secuencia del ADN telomérico d[AGGG(TTAGGG)₃] fue cristalizado^[44], y la estructura resuelta por difracción de rayos X. Sorprendentemente, los resultados revelaron que la estructura es parecida a la de un disco plano, con los tres bucles de TTA proyectándose hacia fuera del núcleo de las tétradas y con una disposición diagonal en las partes laterales de la estructura (figura 21). Además la dirección de la cadena, formada por el esqueleto azúcar-fosfato, tiene la topología general paralela.

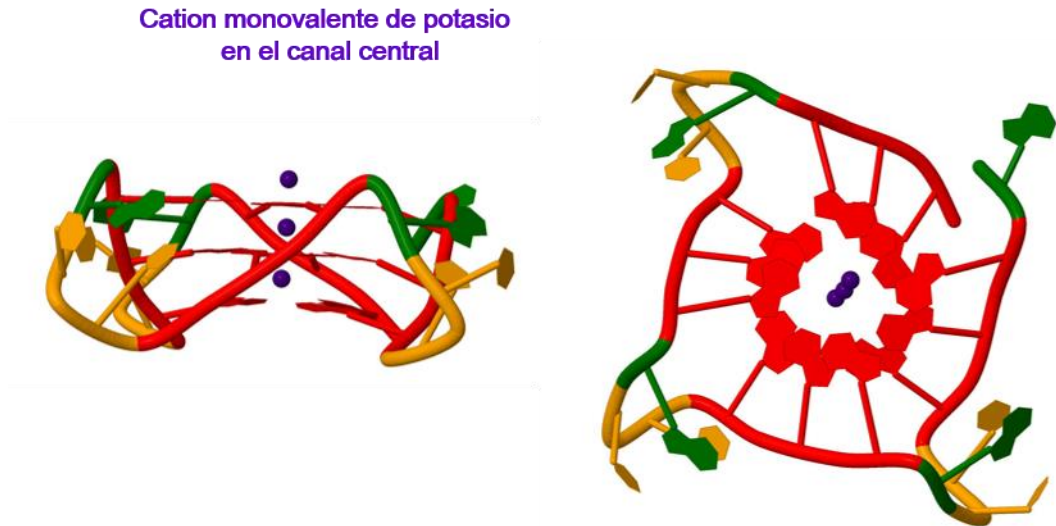


Figura 21. Conformación paralela del cuádruple-G obtenida por difracción de rayos X (PDB 1KF1). Todos los bucles adoptan una disposición diagonal en las partes laterales y con el catión de potasio estabilizando la estructura en el canal central

Además, en el mapa de densidad electrónica aparecieron tres cationes de potasio en el centro de la estructura. Dos de ellos estaban situados entre dos tétradas vecinales y el tercero en la parte externa de la tétrada del extremo 5' (figura 22).^[44]

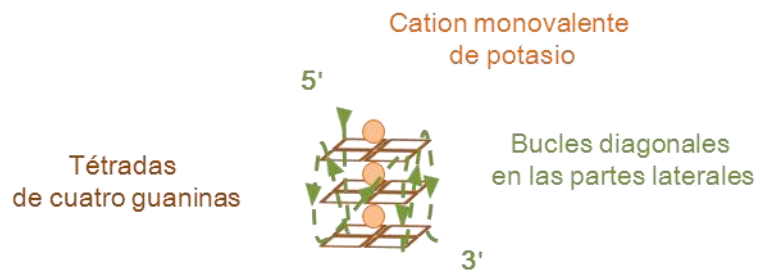


Figura 22. Conformación paralela - todas las secuencias de tres guaninas dentro de la hebra tienen siempre la misma orientación 5'-3'

2.1.3.6.2 Estudios por Resonancia Magnética Nuclear

Los primeros estudios por RMN del ADN telomérico en disoluciones de potasio han sido muy difíciles de interpretar debido a la presencia de más de una

especie en disolución. Este hecho se correlaciona bien con algunos resultados de estudios biofísicos con oligonucleótidos con secuencia del ADN telomérico humano en una disolución tampón con sales de potasio, a concentraciones milimolares de oligonucleótido.^[53] Posteriormente, se realizaron varios estudios por resonancia magnética nuclear en disoluciones diluidas y se describió una serie de diferentes topologías de los cuádruples del ADN telomérico en disolución de tampón de potasio^[22], como por ejemplo, las topologías antiparalelas (3 + 1) denominadas como híbrido-1 (3 + 1) o híbrido-2 (3 + 1) (figura 23). En ambos híbridos encontramos tres de las cuatro cadenas de tres guaninas que van en la orientación 5'-3', mientras solo una de ellas va en la orientación contraria, 3'-5'.^[47,54,55,56,57] El equilibrio entre el híbrido-1 y el híbrido-2 se encuentra bajo la influencia de la secuencia terminal en el extremo 3'. Por ejemplo, la secuencia GGG-3' terminal favorece fuertemente la formación del híbrido-1; y como tan solo un 5% de los telómeros humanos terminan con el tándem GGG-3' esto podría implicar que la forma predominante *in vivo* es la topología del híbrido-2.^[58]

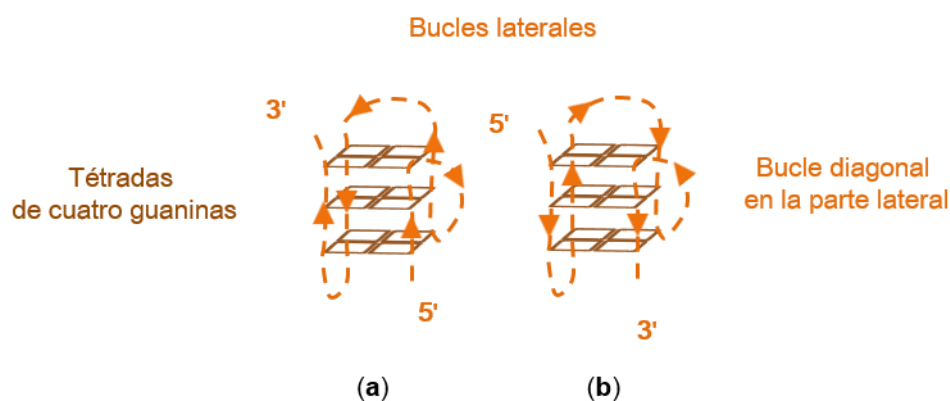


Figura 23. Las dos posibles topologías "antiparalelas" del cuádruple (3 + 1) obtenidas por RMN; **a** – híbrido-1, **b** – híbrido-2

⁵³ A. T. Phan, *FEBS J.*, **2009**, *277*, 1107 – 1117

⁵⁴ N. Zhang, A. T. Phan, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17277 – 17285

⁵⁵ J. Dai, M. Carver, C. Punchihewa, R. A. Jones, D. Yang, *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, 2445 – 2450

⁵⁶ A. T. Phan, V. Kuryavyi, K. N. Luu, D. J. Patel, *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, 6517 – 6525

⁵⁷ J. Dai, M. Carver, C. Punchilewa, A. Ambrus, D. Chen, R. A. Jones, D. Yang, *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, 2445 - 2450

⁵⁸ A. J. Sfeir, W. Chai, J. W. Shay, W. E. Wright, *Mol. Cell*, **2005**, *18*, 131–138

En un estudio reciente^[59] se analizó la secuencia telomérica en disolución de sales de potasio y PEG 200. Los resultados revelaron que la estructura y topología del oligonucleótido d[AGGG(TTAGGG)₃] es idéntica a la que se obtuvo por difracción de rayos X.^[47] En definitiva, los resultados podrían apoyar la teoría de que el cuádruple con la topología paralela puede estar presente en condiciones fisiológicas, mientras que las disoluciones de oligonucleótidos diluidas favorecen la formación de varias especies en equilibrio.

2.1.4 El ADN cuádruple-G telomérico y la telomerasa

2.1.4.1 Los telómeros

Los extremos de los cromosomas lineales se denominan telómeros - del griego *telos*, "final" y *meros*, "parte". Los telómeros son regiones de ADN no codificante, de secuencias altamente repetitivas, y cuya función principal es la de proteger los extremos de los cromosomas de procesos de recombinación no deseada, de fusión o del ataque de las nucleasas.

Los telómeros humanos contienen la repetición de una secuencia de seis nucleótidos 5'-(TTAGGG)_n-3' en forma de dúplex de ADN, típicamente en el intervalo de 3 hasta 15 kilobases, mientras que el extremo terminal 3' (15 – 200 nucleótidos) se encuentra en la forma de una única hebra. Esta hebra sencilla dada su secuencia rica en guaninas, puede dar lugar a estructuras secundarias cuádruple-G, tal y como se ha demostrado experimentalmente.^[4,22]

En una célula viva, los telómeros están rodeados de una gran variedad de proteínas teloméricas, designado como el complejo de "shelterin".^[60] El complejo de "shelterin" consiste en seis proteínas (figura 24) y, entre otras funciones, protege los telómeros frente a una reparación inapropiada del ADN.

⁵⁹ B. Heddi, A. T. Phan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 9824 – 9833

⁶⁰ T. de Lange, *Genes Develop.*, **2005**, *19*, 2100 - 2110

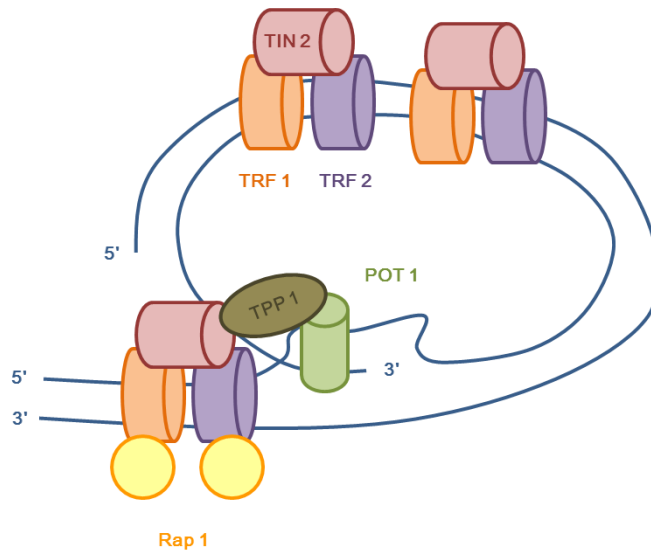


Figura 24. El complejo de "shelterin": seis proteínas TRF 1, TRF 2, TIN 2, TPP1, POT1 y Rap 1 protegen la zona de los telómeros de una reparación inapropiada

En ausencia de cualquier mecanismo de compensación, los telómeros en las células normales se acortan progresivamente y las células envejecen. La senescencia celular es el fenómeno por el cual las células diploides normales dejan de dividirse. En un cultivo celular, los fibroblastos pueden llegar a un máximo de 50 divisiones celulares antes de convertirse en senescentes. Este fenómeno se conoce como senescencia replicativa y es el resultado del máximo acortamiento de los telómeros hasta un punto crítico, el límite de Hayfflick.^[61] Al llegar a este límite las células dejan de dividirse y entran en el estado de senescencia, sin la posibilidad de replicación. Este estado de las células es normalmente irreversible, y además generalmente conducen a las células hacia la apoptosis.^[22]

2.1.4.2 La telomerasa

En el año 1985 C. W. Greider y E. H. Blackburn descubrieron que el protozoo ciliado *Tetrahymena* tenía la capacidad de alargar el ADN telomérico y de mantener la homeostasis del telómero, mediante la adición de las repeticiones

⁶¹ L. Hayfflick, P. S. Moorhead, *Exp. Cell Res.*, **1961**, 25, 585 – 621

de ADN teloméricas.^[62] Posteriormente fue aislado un complejo enzimático con esta actividad que se denominó telomerasa.

La telomerasa humana consta de dos subunidades principales: un componente proteico con la actividad de transcriptasa inversa (hTERT – *human Telomerase Reverse Transcriptase*) y un componente de ARN (hTR – *human Telomerase RNA component*), que incluye una plantilla de 11 nucleótidos y sirve como molde para sintetizar la secuencia telomérica repetitiva. La subunidad catalítica de la telomerasa es responsable de la adición de los desoxirribonucleótidos al extremo 3' del ADN telomérico en el sitio catalítico, que está situado cerca de la plantilla o secuencia guía del ARN hTR. Solo así puede ser eficiente la adición de los nucleótidos (figura 25).^[63]

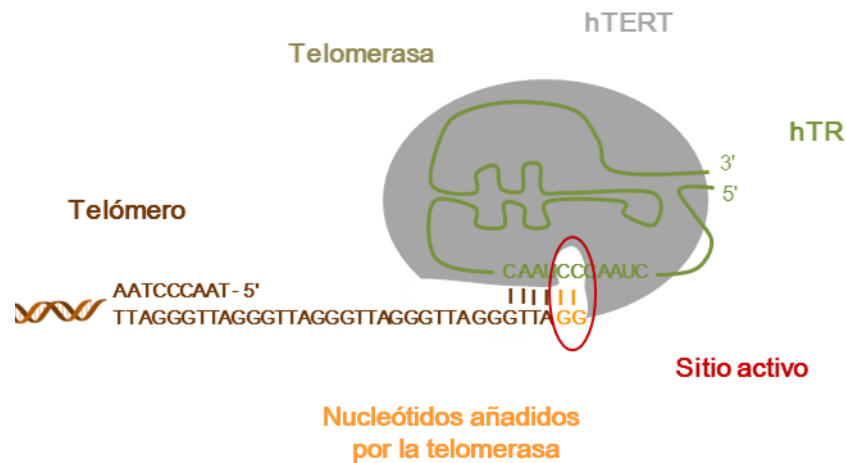


Figura 25. La telomerasa añade repeticiones de nucleótidos con la secuencia TTAGGG al final del extremo 3' del ADN telomérico

Se ha descrito que la actividad de la telomerasa humana es muy significativa en el 85-90% de las células cancerosas^[6,64] impidiendo que estas alcancen la etapa de senescencia o experimenten apoptosis. La telomerasa desempeña un papel clave en la "inmortalización" de las células y ha sido

⁶² C. V. Greider, E. H. Blackburn, *Cell*, **1985**, 43, 405 - 413

⁶³ T. de Lange, V. Lundblad, E. Blackburn, *Telomeres*, 2nd edition, **2006**, ISBN 0 87969 7342, Editorial Cold Spring Harbor Laboratory Press

⁶⁴ J.W. Shay, S. Bacchetti, *Eur. J. Cancer*, **1991**, 33, 787-791

identificada como uno de los factores esenciales para que una célula normal se convierta en una célula cancerosa e "inmortal".^[65]

Además, se conoce que la inhibición de la actividad catalítica de la telomerasa conduce a la pérdida progresiva de repeticiones TTAGGG en los telómeros e inhibe el crecimiento de las células cancerosas. Estos resultados apoyan firmemente la hipótesis de que la inhibición de la telomerasa junto con la "inducción del acortamiento" de los telómeros humanos puede constituir una prometedora estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer.

2.2 Ligandos de ADN cuádruple-G

Hace más de 17 años que se descubrió que ciertas moléculas pequeñas con afinidad hacia el ADN cuádruple-G pueden producir la inhibición de la función catalítica de la enzima telomerasa.^[66,67] Desde entonces se han descrito en la bibliografía un gran número de ligandos del ADN cuádruple-G.^[68,69,70,71] La interacción de un ligando con el ADN cuádruple-G se produce, en la mayoría de los casos, a través de interacciones de apilamiento π - π y de interacciones electrostáticas. Dicha interacción se suele producir interaccionando con las tétradas externas del cuádruple-G, aunque también es posible la unión a los surcos, bucles y/o una combinación de estos dos modos de unión. La intercalación del ligando entre las tétradas de guaninas no se considera viable, por la presencia de los cationes monovalentes en el canal central.^[72]

La mayoría de los ligandos descritos en la bibliografía poseen, en general, ciertas características comunes.^[69,70,71] Por ejemplo, muchos sistemas cuentan con la presencia de uno o más sistemas aromáticos policíclicos, con una amplia superficie plana, capaz de interaccionar con las tétradas del cuádruple-G. Otra de las características comunes es la presencia de los grupos cargados positivamente

⁶⁵ D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell*, **2011**, *144*, 646 – 654

⁶⁶ A. M. Zahler, J. R. Williamson, T. R. Cech, D. M. Prescott, *Nature*, **1991**, *350*, 718 - 720

⁶⁷ J. R. Harrison, S. M. Gowan, L. R. Kelland, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 2463 - 2468

⁶⁸ D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 627 – 636

⁶⁹ J. H. Tan, L. Q. Gu, J. Y. Wu, *Mini Rev. Med. Chem.*, **2008**, *8*, 1163 - 1178

⁷⁰ D. Yang, K. Okamoto, *Biophys. Chem.*, **2010**, *126*, 140 - 153

⁷¹ S. Ohnmacht, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, *24*, 2602 – 2612

⁷² C. M. Olsen, W. H. Gmeiner, L. A. Marky, *J. Phys. Chem. B.*, **2006**, *110*, 6962 – 6969

a pH fisiológico, generalmente en las cadenas laterales. Las interacciones electrostáticas entre los ligandos cargados positivamente y los grupos fosfato en los surcos y/o bucles del ADN cuádruple contribuyen notablemente a la estabilización de la estructura ADN-ligando. Además, si los ligandos disponen de un átomo cargado positivamente en el centro de la molécula, este puede estabilizar el potencial electrostático negativo creado por los grupos carbonilo de las unidades de guanina.^[8,9,10,22,68,73,74,75]

A continuación se recogen los ejemplos más representativos de ligandos de ADN cuádruple-G, divididos en categorías de acuerdo a su estructura química. La interacción y la actividad biológica de los ligandos presentados en este apartado se evalúan y comparan mediante el valor de $^{tel}IC_{50}$ o las constantes de asociación hacia el ADN. El valor $^{tel}IC_{50}$ representa la concentración del ligando necesaria para la inhibición del 50% de la telomerasa, correspondiente a una disminución del 50% de la actividad de la enzima en ausencia del ligando en el ensayo TRAP o TRAP-LIG. Por otra parte las constantes de asociación (K_a) permiten obtener tanto como la afinidad de los ligandos hacia el ADN cuádruple-G $K_a(C)$ o ADN dúplex $K_a(D)$, como la selectividad (S) hacia el ADN cuádruple en relación al ADN dúplex, calculada mediante el cociente $S = K_a(C)/K_a(D)$.

2.2.1 Antraquinonas y derivados

Las amidoantraquinonas fueron los primeros compuestos que demostraron una capacidad para inhibir la telomerasa mediante la estabilización de estructuras de ADN cuádruple-G.^[66,76] En la bibliografía se ha descrito una serie de derivados de antraquinonas disustituidas en distintas posiciones (1,4; 1,5; 1,8; 2,6 y 2,7) con varias cadenas laterales (figura 26).

⁷³ J. E. Reed, S. Neidle, R. Vilar, *Chem. Commun.*, **2007**, 42, 4366 – 4368

⁷⁴ J. E. Reed, A. J. P. White, S. Neidle, R. Vilar, *Dalton Trans.*, **2009**, 14, 2558 – 2568

⁷⁵ J. E. Reed, A. A. Arnal, S. Neidle, R. Vilar, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 5992 - 5993

⁷⁶ D. Sun, B. Thompson, B. E. Cathers, M. Salazar, S. M. Kerwin, J. O. Trent, T. C. Jenkins, S. Neidle, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 2113 – 2116

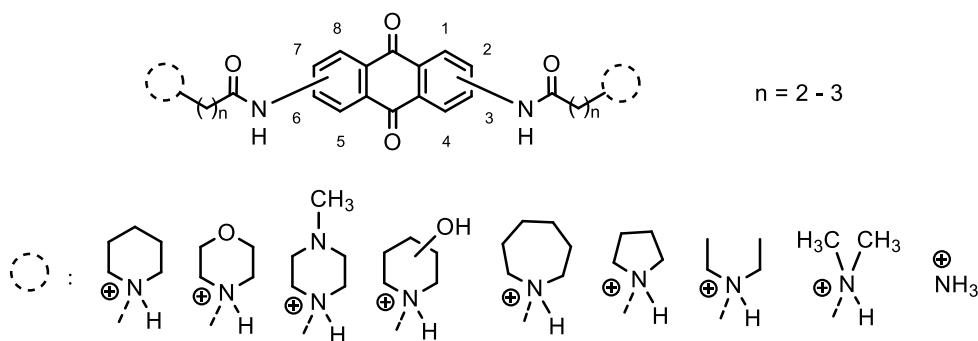


Figura 26. Estructura general de las amidoantraquinonas disustituidas

En este tipo de compuestos se ha confirmado la importancia de la presencia del anillo aromático de la antraquinona, sustituido con la funcionalidad amida y conteniendo cadenas laterales con grupos cargados positivamente. Todas estas características contribuyen considerablemente en la estabilización del ADN cuádruple, y son requisitos indispensables para producir la inhibición de la telomerasa.^[77,78,79] Estudios posteriores de modelado molecular, cristalográficos, biofísicos y de RMN confirmaron el modo de unión mediante el apilamiento de la parte aromática sobre las tétradas externas, y la interacción entre los grupos cargados positivamente de las cadenas laterales con los grupos fosfato en los surcos.^[77,80,81]

La mayoría de las amidoantraquinonas que poseen actividad inhibidora de la telomerasa muestran asimismo muchos efectos secundarios, como por ejemplo una citotoxicidad celular elevada. Los valores de ^{tel}IC₅₀ tanto para las células cancerosas como para las células sanas, son muy parecidos, entre 1 – 25 μM.^[66,82,83]

⁷⁷ P. J. Perry, S. M. Gowan, A. P. Rezska, P. Polucci, T. C. Jenkins, L. R. Kelland, S. Neidle, *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 3253 - 3260

⁷⁸ M. A. Read, A. A. Wood, J. R. Harrison, S. M. Gowan, L. R. Kelland, H. S. Dosanjh, *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4538 - 4546

⁷⁹ S. Neidle, R. J. Harrison, A. P. Rezska, M. A. Read, *Pharmacol. Therapeut.*, **2000**, *85*, 133 - 139

⁸⁰ M. A. Read, S. Neidle, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 13422 - 13432

⁸¹ V. P. Zambre, P. R. Murumkar, R. Giridhar, M. R. Yadav, *J. Mol. Graph. Model.*, **2010**, *29*, 229 - 239

⁸² G. Zagotto, C. Sissi, S. Moro, D. D. Ben, G. N. Parkinson, K. R. Fox, *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 354 - 361

⁸³ G. Zagotto, C. Sissi, L. Lucatello, C. Pivetta, S. A. Cadamuro, K. R. Fox, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 5566 - 5574

Posteriormente, se describió una serie de derivados de antraceno que demuestran un comportamiento más selectivo hacia las células cancerosas (figura 27).

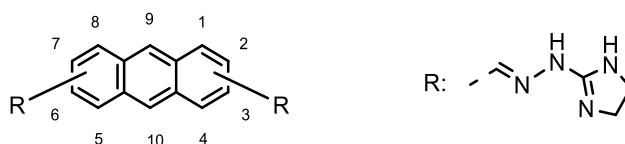


Figura 27. Derivados de antraceno disustituídos con cadenas laterales que contienen grupos 4,5-dihidro-1H-imidazol

Los derivados disustituídos en las posiciones 1 y 5 estabilizan selectivamente el ADN cuádruple, y los ensayos de citotoxicidad demostraron una diferencia importante entre la citotoxicidad encontrada para las células cancerosas y para las sanas.^[84]

2.2.2 Derivados de acridina

Los derivados de acridina fueron diseñados originalmente como una alternativa a las antraquinonas, con la ventaja de presentar una mejor solubilidad en medio acuoso.^[67] El nitrógeno del anillo central de las acridinas, como por ejemplo en el caso de la proflavina (3,6-diaminoacridina), está protonado a pH fisiológico.^[85] Este fenómeno, aparte de mejorar la solubilidad en agua aumenta la deficiencia electrónica en los anillos aromáticos, lo que conduce a una interacción por apilamiento más fuerte entre las acridinas y las tétradas externas del cuádruple.

⁸⁴ M. Folini, C. Pivetta, G. Zagotto, C. De Marco, M. Palumbo, N. Zaffaroni, C. Sissi, *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, *79*, 1781 – 1790

⁸⁵ A. Albert, *The Acridines*, 2nd edition, **1966**, Editorial John Wiley & Sons, Inc.

2.2.2.1 Derivados de acridinas disustituidas

Se ha preparado una serie de amidoacridinas 3,6-disustituidas, con cadenas laterales similares a las de la serie de antraquinonas antes mencionada (figura 28).^[30,86]

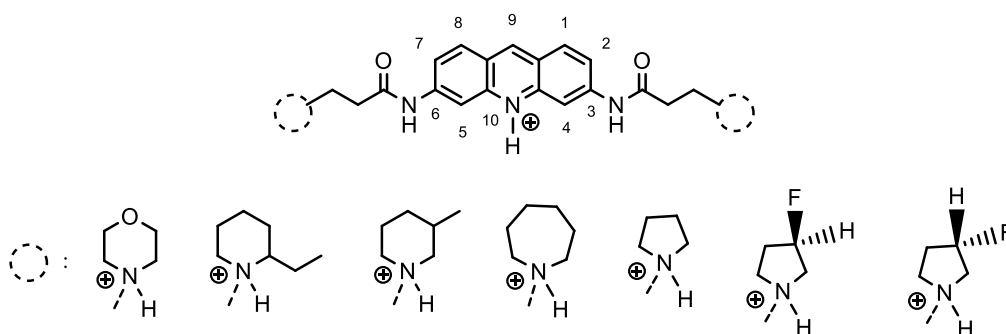


Figura 28. Derivados de amidoacridina disustituida en las posiciones 3 y 6

En esta serie de compuestos se observó una correlación entre la actividad antiproliferativa y la afinidad hacia las estructuras de ADN cuádruple. Al igual que ocurría en la serie de las antraquinonas, la presencia de las cadenas laterales cargadas positivamente es un requisito fundamental para observar actividad biológica.^[30,78,87]

Posteriormente, se han diseñado otros derivados de acridinas disustituidas, como por ejemplo, 4,5-bis(dialquilaminoalquil) acridinas como la mostrada a continuación.^[22,69,88]

⁸⁶ N. H. Campbell, M. Patel, A. B. Tofa, R. Ghosh, G. N. Parkinson, S. Neidle, *Biochemistry*, **2009**, *48*, 1675 - 1680

⁸⁷ S. M. Haider, G. N. Parkinson, S. Neidle, *J. Mol. Biol.*, **2003**, *326*, 117 - 125

⁸⁸ M. Laronze-Cochard, Y. M. Kim, B. Brassart, J.-F. Riou, J.-Y. Laronze, J. Sapi, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, *44*, 3880 - 3888

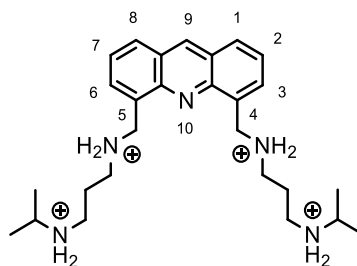


Figura 29. Estructura de 4,5-bis(dialquilaminoalquil) acridina

Esta serie de compuestos no presenta el grupo funcional amida, sin embargo, el valor de $^{tel}IC_{50}$ ($0,15 \mu M$) para el compuesto representado en la figura 29 es inesperadamente bajo.^[88]

Posteriormente, se describió otra serie de acridinas disustituidas en las posiciones 3 y 6 con el grupo 1,2,3-triazol (figura 30). Del mismo modo que en el compuesto anterior (figura 29), en este tipo de compuestos el nitrógeno en la posición 10 no se encuentra cargado positivamente.^[10,85]

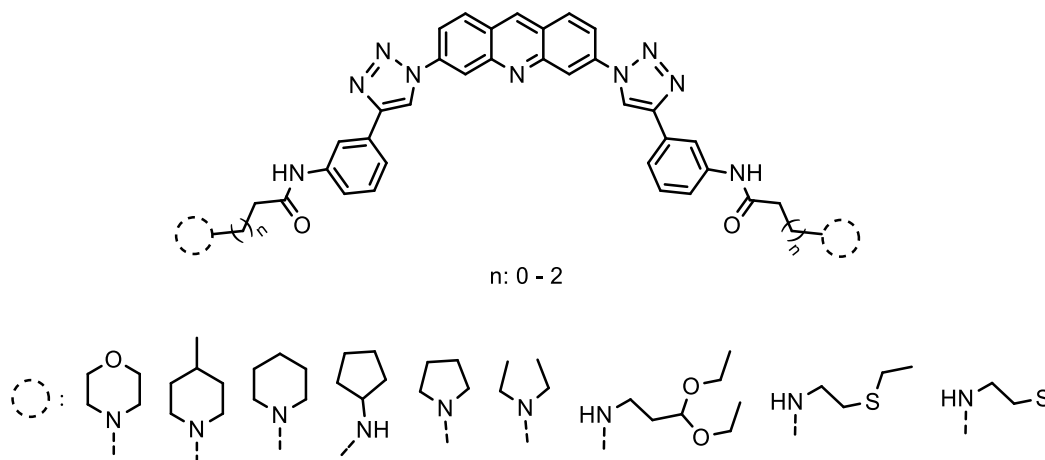


Figura 30. Derivados de acridina sustituida en las posiciones 3 y 6 con un anillo de triazol

La incorporación de los anillos del triazol supone un incremento de la superficie aromática del ligando, con lo que mejora la interacción por apilamiento entre las tétradas externas y el compuesto. Aunque el efecto de la estabilización del ADN cuádruple con el mejor compuesto de esta serie es muy significativo en

relación con el efecto producido sobre el ADN dúplex, el valor de $^{tel}IC_{50}$ ($35 \mu M$) obtenido para este compuesto es bastante elevado.^[10]

2.2.2.2 Derivados de acridinas trisustituidas

Para mejorar la selectividad de los derivados de acridina disustituidas en las posiciones 3 y 6 se incorporó al sistema un tercer sustituyente. La molécula denominada BRACO-19 (figura 31) fue diseñada por métodos de modelado molecular. La hipótesis de partida para el diseño sugirió que las tres cadenas laterales se podrían unir a tres surcos de la estructura del ADN cuádruple. Como la estructura del ADN dúplex dispone solamente de dos surcos, se postuló que la afinidad hacia este tipo de ADN debería disminuir.^[89,90]

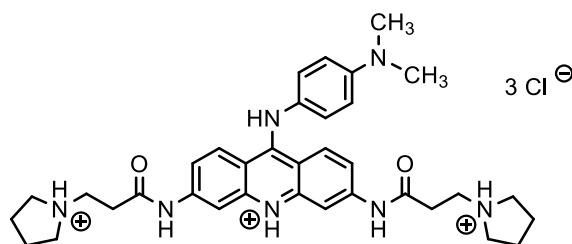


Figura 31. BRACO-19 es un derivado de acridina trisustituida en las posiciones 3, 6 y 9

El BRACO-19 ha demostrado experimentalmente una gran mejora en cuanto a afinidad hacia el ADN cuádruple-G y en cuanto a actividad inhibidora de la enzima telomerasa, en comparación con los precursores de acridina disustituidos. Los derivados disustituidos se unen tanto al ADN dúplex como al ADN cuádruple telomérico, con constantes de asociación muy parecidas. Las constantes de asociación del BRACO-19, determinadas por SPR, muestran una diferencia importante entre la afinidad de BRACO 19 hacia ADN cuádruple y hacia el dúplex. La K_a para el cuádruple es $1,6 \cdot 10^7 M^{-1}$ y la constante para el ADN dúplex es $5,0 \cdot 10^5 M^{-1}$. Además, el valor de $^{tel}IC_{50}$ encontrado para el compuesto

⁸⁹ M. A. Read, R. J. Harrison, B. Ramagnoli, F. A. Tanius, S. H. Gowan, A. P. Reszka, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 4844 - 4849

⁹⁰ R. J. Harrison, J. Cuesta, G. Chessari, M. A. Read, S. K. Basra, A. P. Reszka, J. Morell, S. M. Gowan, C. M. Incles, F. A. Taius, W. D. Wilson, L. R. Keland, S. Neidle, *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 4463 - 4476

BRACO-19 es de solo 60 nM. Los estudios *in vitro* e *in vivo* revelaron el efecto anticanceroso del compuesto BRACO-19 mediante la inhibición de la enzima telomerasa, concretamente mediante la reducción de la expresión de la unidad catalítica hTERT.^[22,91]

El desarrollo posterior de series de compuestos análogos al compuesto BRACO-19 se centró en la variación de los sustituyentes en la posición 9 de la acridina o en la modificación de las cadenas laterales en las posiciones 3 y 6 (figura 32).^[90,92,93,94]

A pesar de las numerosas modificaciones estructurales realizadas, ningún análogo del BRACO-19 ha demostrado una mejora significativa en la inhibición de la telomerasa *in vitro* o en los efectos antiproliferativos en cultivo celular o *in vivo*. Actualmente, el BRACO-19 se encuentra en fase clínica.^[95]

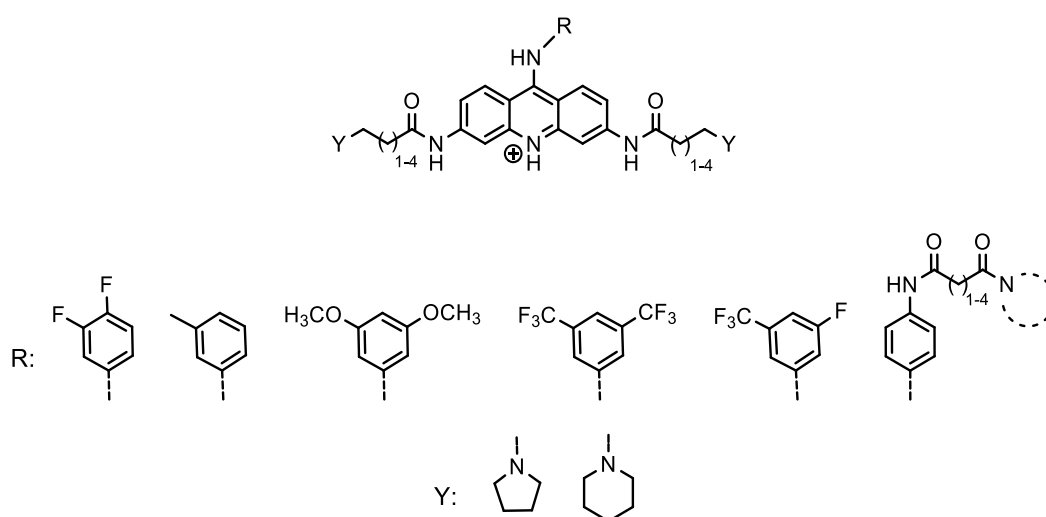


Figura 32. Compuestos análogos al BRACO-19

⁹¹ A. M. Burger, F. Dai, C. M. Schultes, A. P. Reszka, M. J. Moore, J. A. Double, S. Neidle, *Cancer Res.*, **2005**, *65*, 1489 – 1496

⁹² C. M. Schultes, B. Guyen, J. Cuesta, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 4347 - 4351

⁹³ M. J. Moore, C. M. Schultes, J. Cuesta, F. Cuenca, M. Gunaratnam, F. A. Tanious, W. D. Wilson, S. Neidle, *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 582 - 599

⁹⁴ C. Martins, M. Gunaratnam, M. Stuart, V. Makwana, O. Greciano, A. P. Reszka, L. R. Kelland, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 2293 – 2298

⁹⁵ A. Ali, S. Bhattacharya, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*, 4506 – 4521

2.2.3 Derivados policíclicos de acridina

Se han estudiado también distintos derivados policíclicos que contienen el núcleo de acridina, representando compuestos con una superficie aromática extendida, con el fin de reforzar la unión entre el ligando y las tétradas externas del ADN cuádruple-G por interacciones de apilamiento π - π . Se han descrito derivados de las sales de quino[4,3,2-k,l] acridinio, entre los cuales, el compuesto RHPS4 (figura 33), ha sido el compuesto más prometedor de la serie.

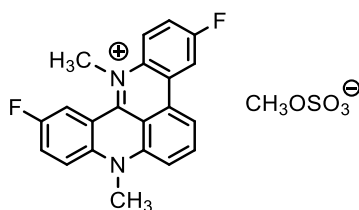


Figura 33. Derivado policíclico de acridina RHSP4

La constante de asociación del RHPS4 hacia el ADN cuádruple es $2,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ y la selectividad de ADN-cuádruple frente al ADN dúplex es aproximadamente de 8 veces (constante determinada por la valoraciones de fluorescencia).^[96,97]

2.2.4 Derivados de 1,10-fenantrolina

Otros ligandos de ADN cuádruple-G que han sido descritos con anterioridad son derivados de la 1,10-fenantrolina. Ni el sistema de 1,10-fenantrolina sin sustituir (figura 34, **a**) ni la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (figura 34, **b**) tienen afinidad apreciable hacia el ADN-cuádruple-G.^[98] Por otra parte, la presencia de grupos amino (figura 34, **c**) o cadenas laterales con aminas alifáticas (figura 34, **d**) en la molécula, aumenta considerablemente la interacción entre dichos ligandos y el ADN cuádruple-G.^[68,98]

⁹⁶ C. Leonetti, S. Amodei, C. D'Angelo, A. Rizzo, B. Benassi, A. Antonelli, R. Elli, M. F. G. Stevens, M. D'Incalci, G. Zupi, A. Biroccio, *Mol. Pharmacol.*, **2004**, 66, 1138 - 1146

⁹⁷ S. M. Gowan, R. Heald, M. F. Stevens, L. R. Kelland, *Mol. Pharmacol.*, **2001**, 60, 981 - 988

⁹⁸ Nielsen, M.C; Borch, J.; Ulven, T., *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 8241 - 8246

Las constantes de asociación, determinadas por SPR, de los derivados 35d se encuentra en el rango $1,2 - 1,9 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Desafortunadamente, los autores no mencionan la interacción de estos compuestos con el ADN dúplex. Probablemente estos compuestos no mostrarían mucha selectividad hacia el ADN cuádruple-G telomérico en relación al ADN dúplex, por su superficie relativamente poco extensa y las dos cadenas laterales no selectivas.^[98]

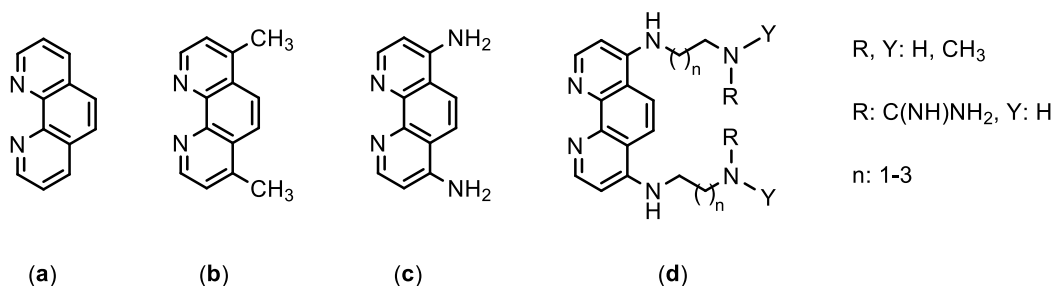


Figura 34. Derivados de la 1,10-fenantrolina (a) sustituidos en las posiciones 4 y 7 (b-d)

Uno de los intentos descritos para aumentar la superficie aromática del ligando es la sustitución de la 1,10-fenantrolina con anillos de triazol en las posiciones 2 y 9. Los triazoles están *N*-sustituidos con una cadena lateral alifática, con una longitud entre dos y cuatro carbonos y un grupo amino, guanidino o *N,N'*-bisisopropilguanidino terminal (figura 35).^[99]

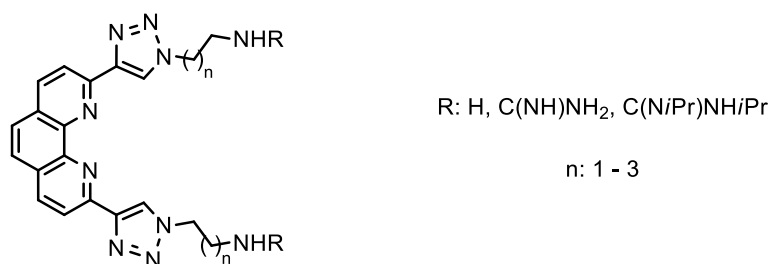


Figura 35. Derivados de la 1,10-fenantrolina sustituidos con triazoles y cadenas laterales alifáticas con un grupo amino, guanidino o *N,N'*-bisisopropilguanidino terminal

En este caso se encontró que la afinidad de estos compuestos aumentó considerablemente en comparación con los ligandos recogidos en la figura 34.

⁹⁹ M. C. Nielsen, A. F. Larsen, F. H. Abdikadir, T. Ulven, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 72, 119 - 126

Los ligandos con el mejor comportamiento en cada serie son los que contienen en la cadena lateral tres átomos de carbono ($n = 2$); y de los tres grupos terminales posibles aquellos derivados que contienen el grupo guanidino han demostrado mejor comportamiento como ligandos de ADN cuádruple-G. La constante de asociación del mejor compuesto de la serie hacia el ADN cuádruple-G es $1,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ y la selectividad del mismo ligando hacia el ADN-cuádruple telomérico en relación al ADN dúplex es de 19.^[99]

Otra manera de aumentar la superficie aromática supone la incorporación de anillos bencénicos a través de la funcionalidad amida en posiciones 2 y 9 de la 1,10-fenantrolina (figura 36).^[100]

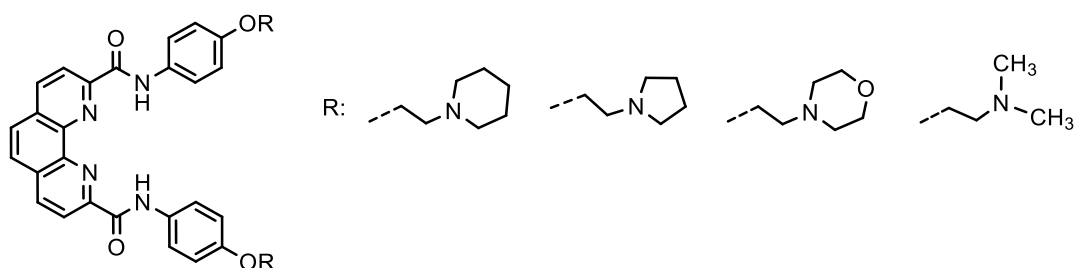


Figura 36. Derivados de la 1,10-fenantrolina con el anillo de benceno incorporado a la molécula a través del grupo amido en las posiciones 2 y 9 de la fenantrolina

Todos los ligandos, menos el derivado que contiene la morfolina como grupo terminal, tienen la capacidad de inhibir la telomerasa en el ensayo TRAP-LIG. Los valores de $^{tel}IC_{50}$ de los tres ligandos son aproximadamente de $2 \mu\text{M}$.^[100]

Otros autores han empleado un anillo de piridina, incorporando un grupo amido adicional entre la piridina y el grupo terminal (figura 37).^[101]

¹⁰⁰ L. Wang, Y. Wen, J. Liu, J. Zhou, C. Li, C. Wei, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 2648 - 2653

¹⁰¹ C. Wei, Y. Wang, M. Zhang, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 2355 - 2364

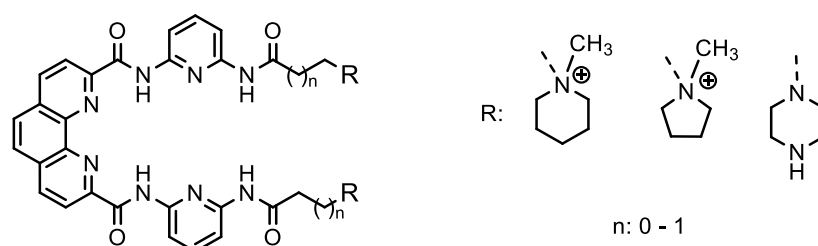


Figura 37. Derivados de la 1,10-fenantrolina con el anillo de piridina incorporado a la molécula a través del grupo amido en las posiciones 2 y 9 de la fenantrolina

El cambio realizado en la estructura de la molécula apenas ejerció efecto en la actividad inhibidora de la telomerasa. Los valores de $^{tel}IC_{50}$ en el ensayo TRAP-LIG de los tres ligandos son también aproximadamente de $2 \mu M$.^[101]

Por otra parte, también se han estudiado derivados de la 1,10-fenantrolina con una superficie más amplia tal y como se muestra en la figura 38. Estos derivados incorporan dos unidades de metilquinolinio unidas a la 1,10-fenantrolina mediante el grupo amido en las posiciones 2 y 9 de la fenantrolina.^[102] Algunas estructuras poseen además dos sustituyentes cargados positivamente en las segundas cadenas laterales adicionales en posiciones 4 y 7.^[103]

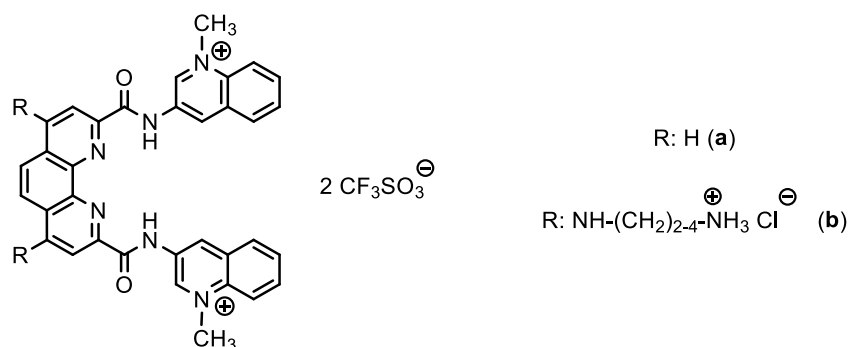


Figura 38. Derivados de la 1,10-fenantrolina con dos unidades de metilquinolinio unidas a la 1,10-fenantrolina mediante el grupo amido en las posiciones 2,9

¹⁰² A. De Cian, E. DeLemos, J.-L. Mergny, M.-P. Teulade-Fichou, D. Monchaud, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 1856 - 1857

¹⁰³ A. F. Larsen, T. Ulven, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 3546 - 3548

Sorprendentemente las cadenas laterales en las posiciones 4 y 7 (figura 38, **b**) empeoran la actividad inhibidora de los derivados tetrasustituidos en comparación con el derivado disustituido.^[104] El mejor compuesto de la serie es el derivado **38a** cuyo valor de $^{tel}IC_{50}$ alcanza tan solo un valor de 16 nM.^[102]

Otro grupo de derivados de la 1,10-fenantrolina con una superficie aromática extendida se representa en la figura 39. Se trata de derivados de 1,10-fenantrolina con un sistema aromático de fenilimidazol fusionado.^[105,106]

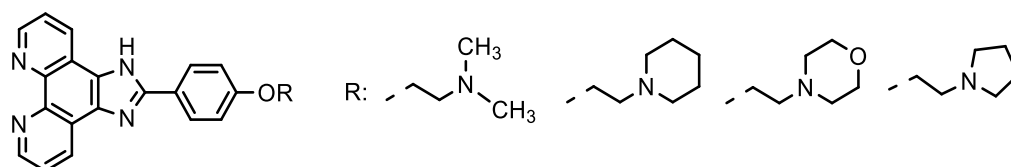


Figura 39. Derivados 4-(1H-imidazo[4,5-f]-1,10-fenantrolina-2-il)-4'-feniloxi con grupos de dimetilamino, piperidino, morfolino o pirrolidino en la cadena lateral

Las constantes de asociación de todos los compuestos anteriores son del orden de magnitud $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ (constantes de asociación obtenidas por la diálisis de equilibrio) y el valor $^{tel}IC_{50}$ del mejor compuesto de la serie (el dimetilderivado) es inferior a $7,5 \mu\text{M}$.^[105]

Otro ejemplo es el derivado recogido en la figura 40, un compuesto que resulta de la fusión de la 1,10-fenantrolina con dos anillos bencénicos y de la incorporación de dos cadenas laterales alifáticas poliamínicas.^[107]

¹⁰⁴ A. F. Larsen, M. C. Nielsen, T. Ulven, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 10892 - 10902

¹⁰⁵ C.-Y. Wei, J. H. Wang, Y. Wen, J. Liu, L.-H. Wang, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 3379- 3387

¹⁰⁶ S. Liao, Z. Zhang, Q. Wu, X. Wang, W. Mei, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*, 6503 - 6508

¹⁰⁷ J.-L. Mergny, L. Lacroix, M.-P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittat, M. Hoarau, P. B. Arimondo, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, J.-F. Riou, T. Garestier, C. Helene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 3062 - 3067

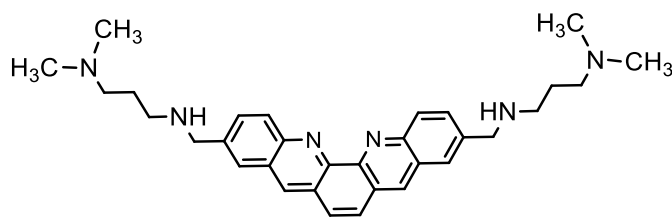


Figura 40. Dibenzo[*b,j*],10-fenantrolina sustituida en las posiciones 3 y 10

Este ligando presenta muy buena afinidad y selectividad hacia el ADN cuádruple-G. Su valor de inhibición $^{tel}IC_{50}$ es de 0,9 μM .^[107]

2.2.5 Otros compuestos policíclicos

El bromuro de etidio es un agente intercalante del ADN dúplex, cuya afinidad hacia el ADN cuádruple-G es muy baja.^[108] Sin embargo, se ha descrito una serie de análogos del bromuro de etidio (figura 41) con una superficie aromática extendida y con una afinidad mejorada hacia el ADN cuádruple-G.^[107,109,110]

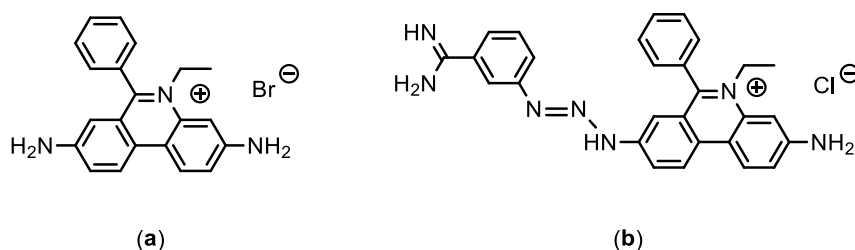


Figura 41. Bromuro de etidio (**a**) y el análogo con superficie extendida: cloruro de isometamidio (**b**)

El compuesto **41b**, es un fármaco contra la tripanosomiasis utilizado en medicina veterinaria,^[109,110] y es además un inhibidor de la telomerasa

¹⁰⁸ J. Ren, J. B. Chaires, *Biochemistry*, **1999**, *38*, 16067 - 16075

¹⁰⁹ F. Koepfel, J.-F. Riou, A. Laoui, P. Mailliet, P. B. Arimondo, D. Labit, O. Petitgenet, C. Helene, J.-L. Mergny, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29*, 1087 - 1096

¹¹⁰ F. Rosu, E. De Pauw, L. Guittat, P. Alberti, L. Lacroix, P. Mailliet, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, *Biochemistry*, **2003**, *42*, 10361 - 10371

relativamente potente, pero que no manifiesta la generalmente imprescindible selectividad hacia el ADN cuádruple.

Otro grupo de moléculas con capacidad de estabilizar el ADN cuádruple-G es el constituido por el alcaloide berberina^[111] (figura 42, **a**) y sus derivados. Con una amplia superficie aromática, la berberina interacciona fuertemente con el ADN cuádruple mediante interacciones de apilamiento π - π . La presencia del grupo naftilo en la estructura del análogo de la berberina (figura 42, **b**) aporta una mayor afinidad y selectividad de esta molécula hacia el ADN cuádruple. El grupo naftilo puede interactuar con el surco del ADN cuádruple, como lo hace el grupo anilino en el caso del compuesto BRACO-19.^[22,112]



Figura 42. Berberina (**a**) y su análogo (**b**) con el grupo naftilo incorporado

Las naftalenodiimidias tri- o tetrasustituidas representan otro grupo importante de ligandos del ADN cuádruple. La superficie de la parte aromática de estas moléculas corresponde aproximadamente a la superficie de la tétrada, y los tres o cuatro sustituyentes del sistema, que contienen heterociclos con uno o dos átomos de nitrógeno, aseguran la interacción con los surcos (figura 43).

¹¹¹ M. Franceschin, L. Rossetti, A. D'Ambrosio, S. Schirripa, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino, C. Schultes, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 1707 - 1711

¹¹² K. C. Gornall, S. Samosorn, B. Tanwirat, A. Suksamrarn, J. B. Bremner, M. J. Kelso, J. L. Beck, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 6602 - 6604

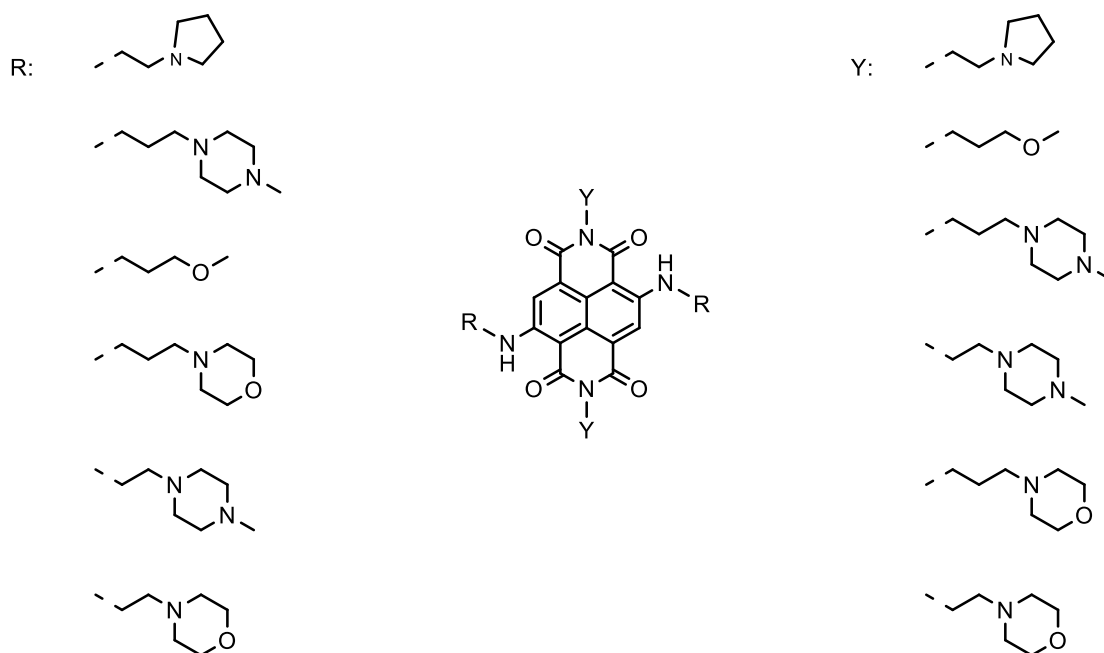


Figura 43. Derivados de naftalenodiimidias tetrasustituidas

El compuesto más activo de la serie es un inhibidor potente de la telomerasa y además ha demostrado una actividad antiproliferativa significativa. La inhibición del crecimiento de las células cancerosas se produce a concentraciones nanomolares.^[113,114]

Otro ligando que se une fuertemente al ADN cuádruple-G y además con elevada selectividad frente al ADN dúplex^[115] (aproximadamente 45 veces, valor obtenido en el ensayo G4-FID) es el derivado de piridina denominado **360A** (figura 44).

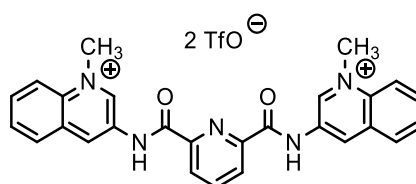


Figura 44. Ligando **360A** (2,6-*N,N'*-metil-quinolinio-3-il-piridinadicarboxamida)

¹¹³ F. Cuenca, O. Greciano, M. Gunaratnam, S. Haider, D. Munnur, R. Nanjunda, W. D. Wilson, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 1668 - 1673

¹¹⁴ S. Mpima, S. A. Ohnmacht, M. Berletta, J. Husby, L. C. Pett, M. Gunaratnam, S. T. Hilton, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 6162 - 6170

¹¹⁵ G. Pennarun, C. Granotier, L. R. Gauthier, D. Gomez, F. Hofschir, E. Mandine, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, P. Mailliet, F. D. Boussin, *Oncogene*, **2005**, *24*, 2917 - 2928

Este ligando del ADN cuádruple-G inhibe la telomerasa humana y además ocasiona la parada del crecimiento celular seguido por apoptosis masiva en las células de distintas líneas tumorales.^[115,116]

2.2.6 Telomestatina y análogos

La telomestatina (figura 45) es un producto natural macrocíclico, que contiene siete unidades del heterociclo oxazol y una de tiazol. La telomestatina tiene un centro quiral en su estructura, y fue aislado por primera vez a partir del organismo *Streptomyces anulatus*.^[117]

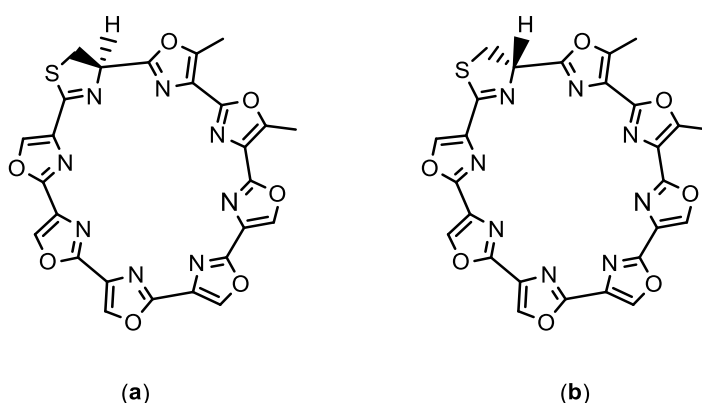


Figura 45. La telomestatina con la configuración R (a) y su estereoisómero S (b)

La telomestatina es un excelente ligando del ADN cuádruple-G y es uno de los inhibidores de la telomerasa más potentes que se conocen. Su valor de $^{tel}IC_{50}$ es de 58 nM.^[118,119,120,121] La única desventaja que presenta este compuesto es su escasa solubilidad en agua. Por este motivo, se han preparado y descrito varios análogos de la telomestatina, como los representados en la figura 46.

¹¹⁶ T. Lemarteleur, D. Gomez, R. Paterski, E. Mandine, P. Mailliet, J.-F. Riou, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, *323*, 802–808

¹¹⁷ K. Shin-ya, K. Wierzba, K. Matsuo, T. Ohtani, Y. Yamada, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 1262 - 1263

¹¹⁸ A. De Cian, G. Cristofai, P. Reichenbach, E. De Lemos, D. Monchaud, M. -P. Teulade-Fichou, K. Shin-ya, L. Lacroix, J. Lingner, J. -L. Mergny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 17347 - 17352

¹¹⁹ M. -Y. Kim, H. Vankayalapati, K. Shin-ya, K. Wierzba, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 2098 - 2099

¹²⁰ N. W. Luedtke, *Chimia*, **2009**, *63*, 134 - 139

¹²¹ T. Doi, K. Shibata, M. Yoshida, M. Takagi, M. Tera, K. Nagasawa, K. Shin-ya, T. Takahashi, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 387 - 393

Estos análogos de la telomestatina mantienen en su estructura las unidades del heterociclo oxazol, el tamaño de la estructura cíclica se corresponde prácticamente con el tamaño de la telomestatina y, además, en algunos casos, se incorporaron varios grupos amido. Sin embargo, y a pesar de las distintas modificaciones realizadas a partir de la molécula de telomestatina, no se ha conseguido obtener ningún compuesto análogo con propiedades mejoradas o incluso similares a las presentadas por la telomestatina.^[122,123,124,125]

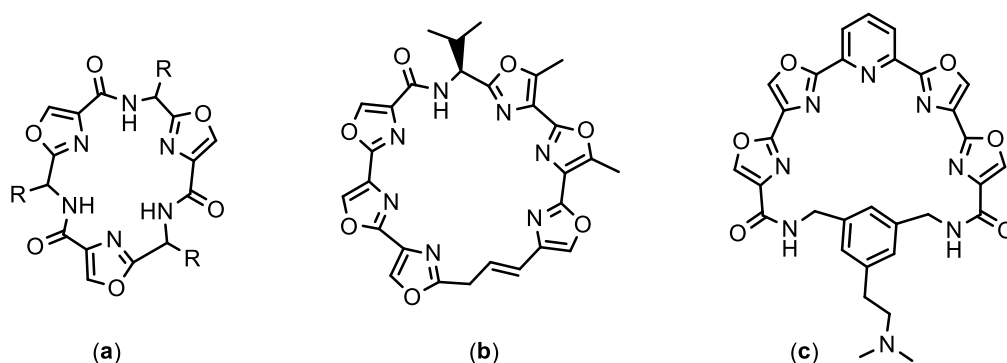


Figura 46. Análogos de la telomestatina - (a) trisoxazol cíclico; (b) hexaquisoxazol cíclico; (c) macrociclo con anillos de piridina y benceno

2.2.7 Porfirinas

Las porfirinas, de acuerdo con su estructura, podrían ser los ligandos ideales para el reconocimiento del ADN cuádruple-G. Su estructura contiene un sistema de dobles enlaces conjugados que forman un macrociclo de tamaño óptimo para una adecuada interacción con las tétradas-G mediante interacciones de apilamiento π - π . El primer derivado de porfirina analizado fue el tetracloruro de la tetra-*N*-metilpiridilporfirina, más conocido como TMPyP4 (figura 47).^[126]

¹²² K. Jantos, R. Rodriguez, S. Ladame, P. S. Shirude, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 13662 - 13663

¹²³ G. S. Minhas, D. S. Pilch, J. L. Kerrigan, E. J. LaVoie, J. E. Rice, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 3891 - 3895

¹²⁴ S. G. Rzuczek, D. S. Pilch, A. Liu, L. Liu, E. J. LaVoie, J. E. Rice, *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 3632 - 3644

¹²⁵ S. A. Ohnmacht, C. Ciancimino, G. Vignaroli, M. Gunaratnam, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 5351 - 5355

¹²⁶ N. V. Anantha, M. Azam, R. D. Sheardy, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 2709 - 2714

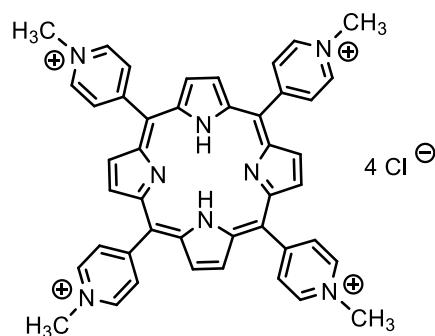


Figura 47. Estructura de la tetra-*N*-metilpiridilporfirina (TMPyP4)

Este compuesto se une al ADN cuádruple-G con baja selectividad (aproximadamente dos veces más fuerte que con el ADN dúplex). Posteriormente, se realizaron experimentos adicionales con el TMPyP4 y con varios análogos y se descubrieron numerosos efectos biológicos relevantes, como por ejemplo, *a*) actividad antitumoral, *b*) capacidad de inhibición de la telomerasa humana, con un valor de $^{tel}IC_{50}$ igual $6,5 \mu M$ y *c*) efectos sobre la influencia en la transcripción de algunos genes (*c-myc*).^[108,127,128,129] Posteriormente se describieron varios complejos metálicos de porfirinas, que resultaron ser notablemente más activos, y que se describirán en el siguiente apartado.

2.2.8 Complejos metálicos

Los complejos metálicos poseen una gama muy amplia de propiedades estructurales y electrónicas que pueden ser aprovechadas en el diseño de ligandos del ADN cuádruple-G. El átomo metálico en el centro de la molécula puede organizar a los ligandos en una geometría específica, óptima para la unión con las tétradas del ADN cuádruple.^[130]

¹²⁷ P. Wang, L. Ren, H. He, F. Liang, X. Zhou, Z. Tan, *Chembiochem*, **2006**, 7, 1155 - 1159

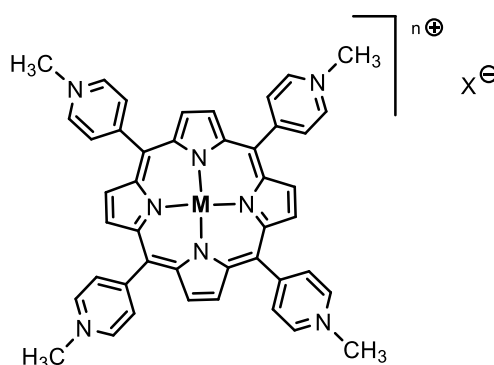
¹²⁸ C. L. Grand, H. Han, R. M. Muñoz, S. Weitman, D. D. Von Hoff, L. H. Hurley, D. J. Bearss, *Mol. Cancer. Ther.*, **2002**, 1, 565 - 573

¹²⁹ D. F. Shi, R. T. Wheelhouse, D. Sun, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.*, **2001**, 44, 4509 - 4523

¹³⁰ S. N. Georgiades, N. H. Abd Karim, K. Suntharalingam, R. Vilar, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 4020 - 4034

2.2.8.1 Complejos metálicos de porfirinas

Con relación a los complejos metálicos basados en la estructura de la porfirina, se ha preparado una serie de compuestos utilizando el ligando TMPyP₄, pero ninguno de esos complejos estudiados (figura 48) ha demostrado una mayor capacidad de inhibir la telomerasa que el propio ligando de partida.^[126,129,130,131] No obstante, se ha puesto de manifiesto que la presencia del ión metálico tiene un efecto significativo a nivel de la actividad biológica observada.



M: Mg(II), Mn(III), Mn(V)=O, Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Pd(II), Pt(II), In(III)

Figura 48. Complejos metálicos del ligando TMPyP₄

Los complejos metálicos de TMPyP₄ involucrando cationes metálicos relativamente pequeños y con una geometría plano-cuadrada (Cu(II)) o piramidal de base cuadrada (Zn(II)) produjeron una mayor inhibición de la telomerasa que en el caso de complejos que adoptan una geometría octaédrica (con iones como Fe(III), Mn(III), Mg(II)). Los complejos de TMPyP₄ con iones metálicos más grandes, como por ejemplo, Au(III), Pt(II) y algunos lantánidos han demostrado ser menos activos, probablemente porque el ion metálico se queda fuera del plano del ligando y se crea una barrera que no permite las interacciones por apilamiento entre el complejo metálico y la téttrada externa del cuádruple-G.^[22,131,132]

¹³¹ A. Maraval, S. Franco, C. Vialas, G. Pratviel, M. A. Blasco, B. Meunier, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 921 - 927

¹³² L. R. Keating, V. A. Szalai, *Biochemistry*, **2004**, *43*, 15891 -15900

Una mejora significativa en la selectividad de unión al ADN cuádruple frente a la unión al ADN dúplex se logró empleando complejos metálicos de porfirinas con un sistema de piridinas condensadas a cada uno de los anillos de pirrol (figura 49).^[133]

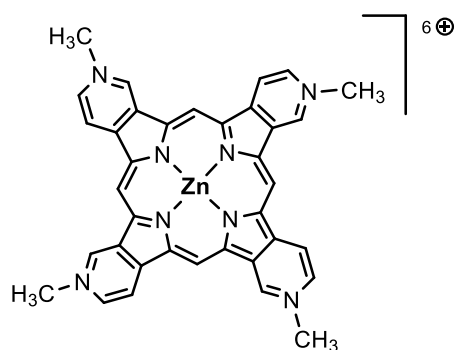


Figura 49. Complejo metálico de Zn(II) de porfirina con piridinas fusionadas a los anillos de pirrol

Posteriormente, se prepararon otros complejos metálicos de porfirinas sustituidas con distintas cadenas laterales tal y como se muestra en la figura 50.

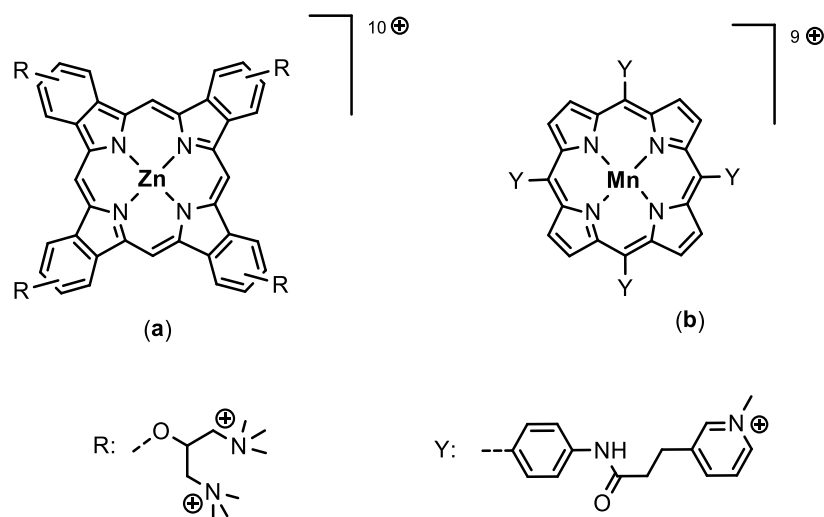


Figura 50. Porfirinas sustituidas con cuatro cadenas laterales

¹³³ D. P. N. Goncalves, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, J. K. M. Sanders, *Chem. Commun.*, **2006**, 45, 4685 - 4687

Ambos tipos de porfirinas (**50a**, **50b**) demostraron poseer una gran selectividad hacia el ADN cuádruple-G. La constante de asociación para el ADN cuádruple del compuesto **50b** es del orden de 10^8 M^{-1} , mientras que para el ADN dúplex es de tan solo 10^4 M^{-1} . La selectividad de este compuesto es debida, muy probablemente, a la presencia de cuatro cadenas laterales flexibles, que pueden representar un impedimento en la unión al ADN dúplex mientras que pueden favorecer la interacción del compuesto con el ADN cuádruple-G.^[134]

2.2.8.2 Complejos de derivados de 1,10-fenantrolina

2.2.8.2.1 Complejos de platino(II)

Desde el año 2007 se ha incrementado el interés en la preparación de complejos metálicos de platino(II) como nuevos inhibidores de la telomerasa humana. La geometría de los distintos complejos metálicos de platino(II) con ligandos aromáticos (como la 1,10-fenantrolina y la 2,2'-bipiridina) es plano-cuadrada (figura 51).^[73,74]

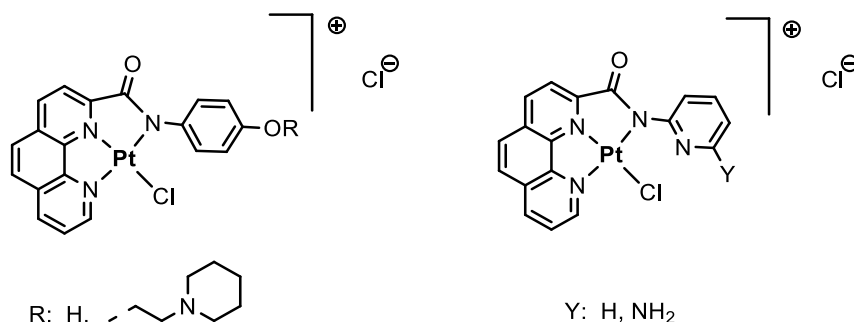


Figura 51. Complejos de platino(II) con ligandos de 1,10-fenantrolina

Estos complejos fueron diseñados empleando técnicas de modelado molecular y presentan una interacción óptima entre sus superficies aromáticas y la tetrada de guaninas del ADN cuádruple-G.^[73] El ion metálico se encuentra situado aproximadamente en el centro de la estructura del cuádruple-G, lo que le permite establecer interacciones con los oxígenos de los grupos carbonilo de las guaninas.

Otra familia de complejos de platino(II), diseñada por Che y colaboradores, se representa en la figura 52.^[135]

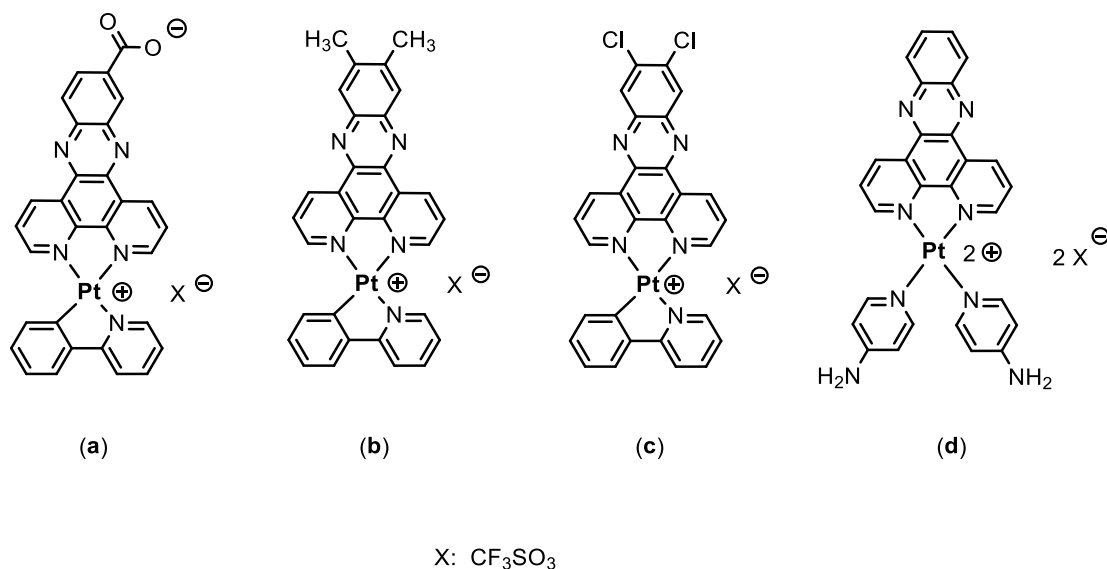


Figura 52. Complejos de platino(II) con el ligando dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina con diferentes sustituyentes

El compuesto más activo de toda esta serie ha resultado ser el **52a**, con una constante de asociación de aproximadamente 10^6 M⁻¹ para el ADN cuádruple y de 10^4 M⁻¹ para el ADN dúplex. Este compuesto produce asimismo la inhibición de la telomerasa humana, con un valor de ^{tel}IC₅₀ de 760 nM.^[135]

Los complejos metálicos de platino(II) sintetizados a partir de ligandos con una amplia superficie aromática han demostrado una alta afinidad hacia el ADN cuádruple-G. Por ejemplo, en el caso de los complejos de la figura 53, la constante de asociación para el compuesto **53a** es $1,75 \cdot 10^5$ M⁻¹, para el compuesto **53b** es $1,39 \cdot 10^6$ M⁻¹ y para el compuesto **53c** es $1,32 \cdot 10^7$ M⁻¹. Eso subraya la importancia de la incorporación de ligandos con una superficie aromática extendida. La diferencia en la selectividad de unión establecida para el ADN cuádruple y para el ADN dúplex es de, aproximadamente, dos órdenes de magnitud.^[136,137]

¹³⁵ D.-L. Ma, C.-M. Che, S.-Y. Yan, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 1835 - 1846

¹³⁶ R. Kieltyka, J. Fakhoury, N. Moitessier, H. F. Sleiman, *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 1145 - 1154

¹³⁷ K. J. Castor, J. Mancini, J. Fakhoury, N. Weill, R. Kieltyka, P. Englebienne, N. Avakyan, A. Mittermaier, C. Autexier, N. Moitessier, H. F. Sleiman, *ChemMedChem*, **2012**, *7*, 85 - 94

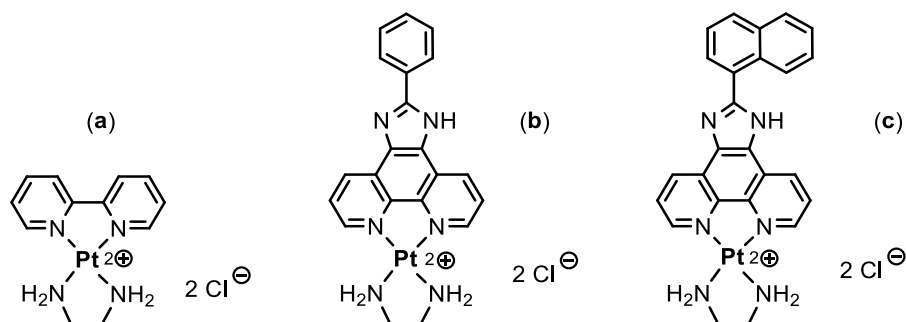


Figura 53. Complejos de platino(II) y etilendiamina con biperidina (a) o fenantrolina (b, c) sustituida con distintos anillos aromáticos

2.2.8.2.2 Complejos de rutenio(II)

Se ha descrito un gran número de complejos mononucleares^[138,139,140,141,142,143] y dinucleares^[144,145,146] de Ru(II) con ligandos de 2,2'-biperidina, 1,10-fenantrolina o derivados de 1,10-fenantrolina con la superficie aromática extendida. Algunos ejemplos se recogen en la figura 54.^[138-146]

Las constantes de asociación de los complejos de Ru(II) hacia el ADN cuádruple-G se encuentran en el rango $K_a = 10^4 - 10^6 \text{ M}^{-1}$.^[138-145] Es de destacar que estos compuestos no encajarían en una descripción clásica de ligandos de cuádruple-G considerando la falta de planaridad del compuesto impuesta por el tipo de coordinación de cada átomo metálico. Los valores de ${}^{\text{tel}}\text{IC}_{50}$, descritos en la bibliografía para alguno de estos compuestos metálicos reflejan actividad a concentraciones del orden micromolar.^[142,146]

¹³⁸ H.-J. Yu, L. Yu, Z.-F. Hao, Y. Zhao, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2014**, *124*, 187 - 193

¹³⁹ S. Shi, H.-L. Huang, X. Gao, J.-L. Yao, C.-Y. Lv, J. Zhao, W.-L. Sun, T.-M. Yao, L.-N. Ji, *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, *121*, 19 - 27

¹⁴⁰ Q. Yu, Y. Liu, J. Zhang, F. Yang, D. Sun, D. Liu, Y. Zhou, J. Liu, *Metallomics*, **2013**, *5*, 222 - 231

¹⁴¹ Q. Li, D. Sun, Y. Zhou, D. Liu, Q. Zhang, J. Liu, *Inorg. Chem. Comm.*, **2012**, *20*, 142 - 146

¹⁴² F. Yuan, X. Chen, Y. Zhou, F. Yang, Q. Zhang, J. Liu, *J. Coord. Chem.*, **2012**, *65*, 1246 - 1257

¹⁴³ Q. Li, J. Zhang, L. Yang, Q. Yu, Q. Chen, X. Qin, F. Le, Q. Zhang, J. Liu, *J. Inorg. Biochem.*, **2014**, *130*, 122 - 129

¹⁴⁴ C. Rajput, R. Rutkaite, L. Swanson, I. Haq, J. A. Thomas, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 4611 - 4619

¹⁴⁵ V. Gonzalez, T. Wilson, I. Kurihara, A. Imai, J. A. Thomas, *Chem. Commun.*, **2008**, *20*, 1868 - 1870

¹⁴⁶ S. Shi, S. Gao, T. Cao, J. Liu, X. Gao, J. Hao, C. Lv, H. Huang, J. Xu, T. Yao, *PLoS ONE*, **2013**, *8*, e84419

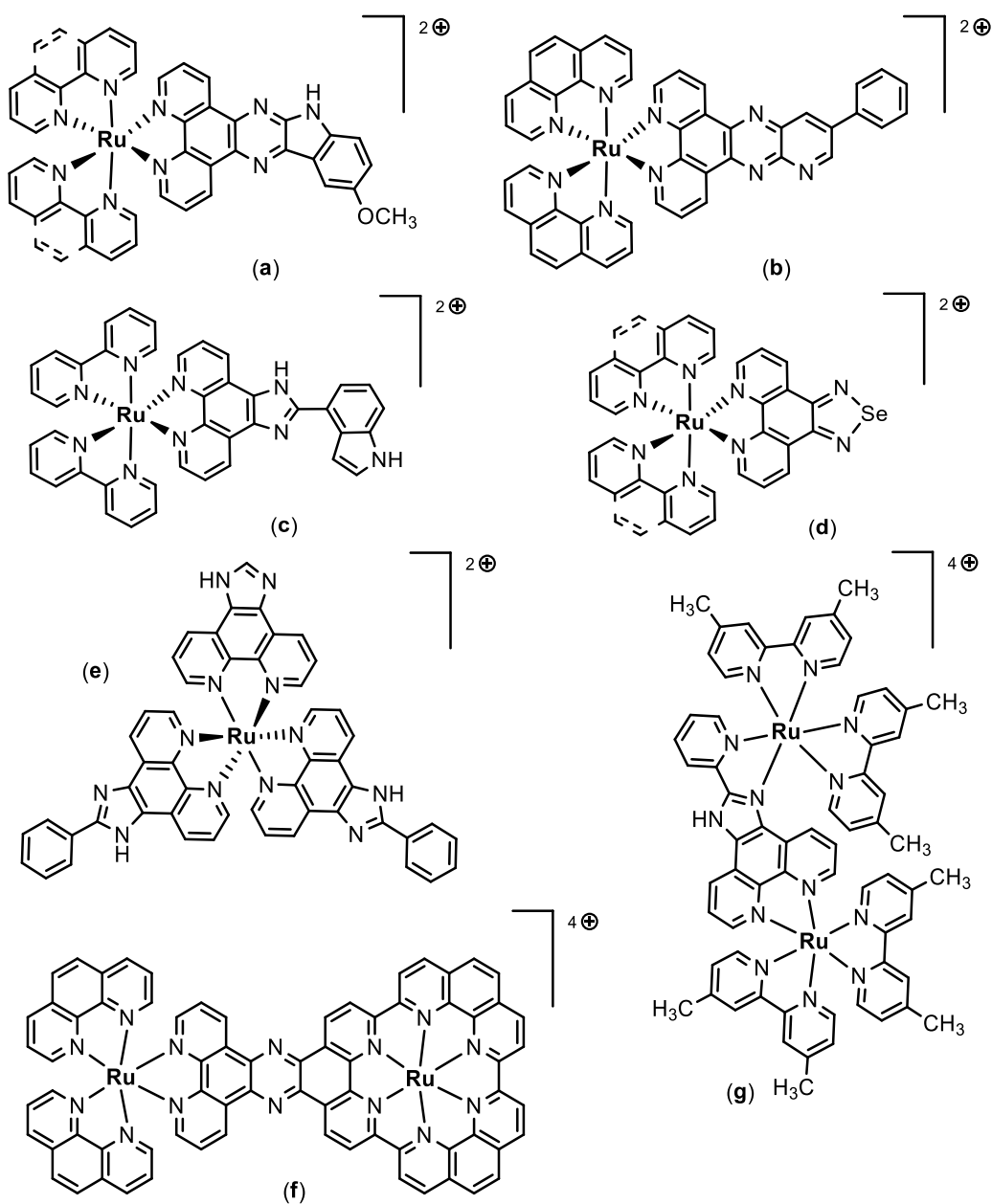


Figura 54. Selección de complejos de rutenio(II)

2.2.8.2.3 Complejos de cobre(II) o níquel(II)

Por otra parte se ha descrito una serie de ligandos con estructura de bis-1,10-fenantrolina y sus complejos de cobre(II) y níquel(II) (figura 55). La proporción molar relativa entre el átomo de metal y el ligando es 1:1 y la geometría del ligando debería favorecer la formación de un complejo plano con el metal

coordinado en el centro, lo que podría ayudar en la interacción con el ADN cuádruple-G.^[147,148]

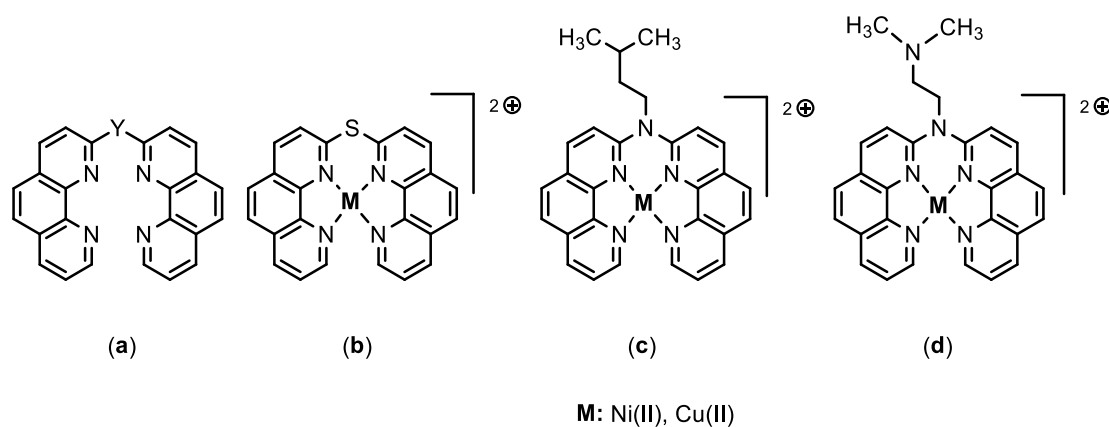


Figura 55: Estructura general del ligando de bis-1,10-fenantrolina (a) y sus tres complejos (b-d) con Cu(II) y Ni(II)

Ni los ligandos por sí mismos, ni los iones metálicos como Cu(II) o Ni(II) interaccionan con el ADN cuádruple-G. Sin embargo la combinación de ambos en un complejo metálico provoca la interacción entre el ADN cuádruple y dichos complejos. Los complejos de Ni(II) tienen un mejor comportamiento *in vitro* que los complejos de Cu(II) y los valores de ^{tel}IC₅₀ son inferiores a 1 μM para todos los complejos de Ni(II). Sorprendentemente en los ensayos de citotoxicidad en los cultivos celulares demuestran más efectividad los complejos de cobre(II).^[148]

Los mismos autores han descrito ejemplos adicionales de complejos de Ni(II) y de ligandos de la 1,10-fenantrolina monosustituida (figura 56).^[149,150]

¹⁴⁷ A. Artese, L. Parrotta, S. Alcaro, F. Ortuso, G. Costa, C. Sissi, *OJMC*, **2013**, *3*, 41 - 49

¹⁴⁸ S. Bianco, C. Musetti, A. Waldeck, S. Sparapani, J. D. Seitz, A. P. Krapcho, M. Palumbo, C. Sissi, *Dalton Trans.*, **2010**, *39*, 5833 - 5841

¹⁴⁹ C. Musetti, L. Lucatello, S. Bianco, A. P. Krapcho, S. A. Cadamuro, M. Palumbo, C. Sissi, *Dalton Trans.*, **2009**, *19*, 3657 - 3660

¹⁵⁰ C. Musetti, A. P. Krapcho, M. Palumbo, C. Sissi, *PLoS ONE*, **2013**, *8*, e58529

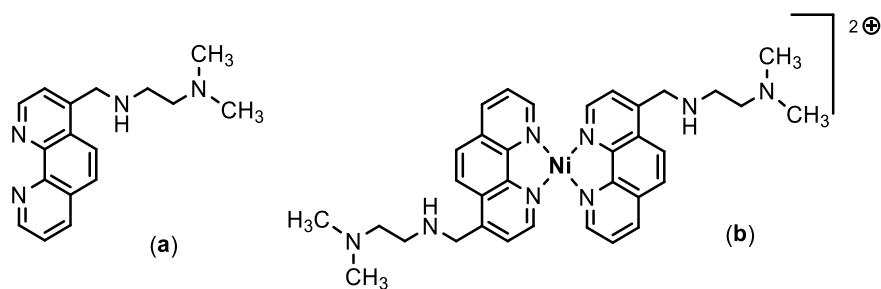


Figura 56. Ligando (a) y complejo (b) de Ni(II) con 1,10-fenantrolina sustituida en 4

La constante de asociación del complejo (**56b**) hacia el ADN cuádruple-G telomérico es $3,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Desafortunadamente, los autores no describen la posible selectividad hacia el ADN cuádruple frente al ADN dúplex ni la actividad biológica del complejo **56b**.^[149,150]

Otro grupo de investigación ha descrito la preparación de una familia de complejos de Ni(II) de la 2,2'-bipiridina, 1,10-fenantrolina o la 1,10-fenantrolina con la superficie aromática extendida (figura 57).^[151]

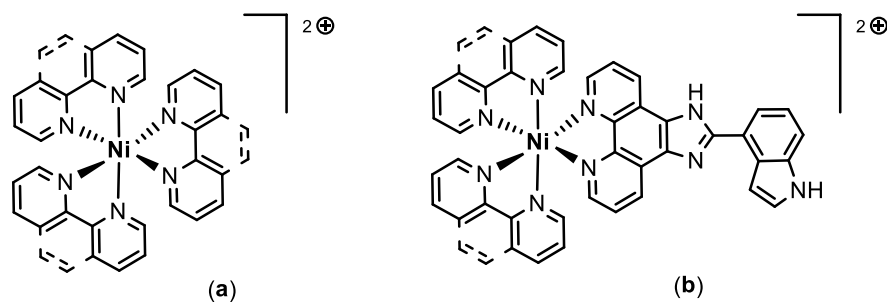


Figura 57: Complejos de Ni(II) de la 2,2'-bipiridina y de la 1,10-fenantrolina (a) o la 1,10-fenantrolina con la superficie aromática extendida (b)

La geometría de estos ligandos no es plana, y probablemente por eso, la actividad biológica no supone una mejora respecto a la demostrada por los complejos de níquel(II) descritos anteriormente.^[151]

¹⁵¹ M. Trajkovski, E. Morel, F. Hamon, S. Bombard, M.-P. Teulade-Fichou, J. Plavec, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 1 – 11

2.2.8.3 Complejos que contienen unidades de piridina

2.2.8.3.1 Complejos de platino(II) y cobre(II)

El macrociclo representado en la figura 58 interactúa fuertemente con el ADN cuádruple-G.^[152] Un anillo de piridina de cada unidad de bipyridina interactúa con la tetrada externa del cuádruple mediante interacciones de apilamiento, mientras el grupo etilendiamino interactúa con los grupos fosfato del ácido nucleico mediante enlaces de hidrógeno. El valor de $^{tel}IC_{50}$ es de 197 nM, y es una de las concentraciones de inhibición más bajas descritas en la bibliografía.^[134,152]

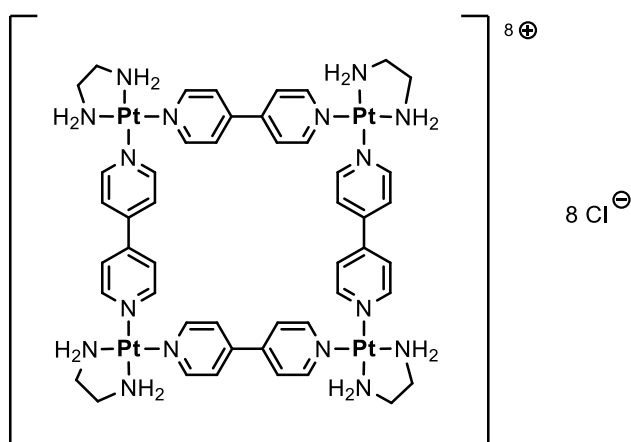


Figura 58. Complejo formado por cuatro átomos de Pt(II) y 4 moléculas de 4,4'-bipyridina

Los complejos de Pt(II) y Cu(II) de terpiridina (**59a**) son, en general, ligandos débiles del ADN cuádruple-G. Sin embargo, los complejos con el anillo de terpiridina sustituido con distintas cadenas laterales (figura 59, **b** y **c**) o los complejos bi-metálicos (**59d**) son capaces de producir un alto grado de estabilización de la estructura del ADN cuádruple-G.^[153,154,155]

¹⁵² R. Kiełtyka, P. Englebienne, J. Fakhoury, C. Autexier, N. Moitessier, H. F. Sleiman, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 10040 - 10041

¹⁵³ H. Bertrand, D. Monchaud, A. De Cian, R. Guillot, J.-L. Mergny, M.-P. Teulade-Fichou, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 2555 - 2559

¹⁵⁴ K. Suntharalingam, A. J. P. White, R. Vilar, *Inorg. Chem.*, **2009**, *48*, 9427-9435

¹⁵⁵ K. Suntharalingam, A. J. P. White, R. Vilar, *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 8371-8380

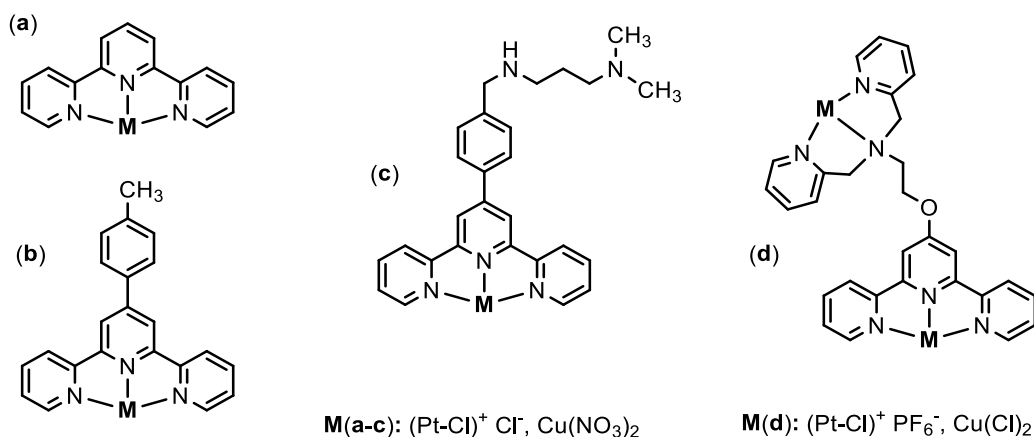


Figura 59. Complejos metálicos de Pt(II) y de Cu(II) con la terpiridina (a) y la terpiridina sustituida (b, c) con cadenas laterales o d – complejos bi-metálicos

La selectividad de unión encontrada para el ADN cuádruple en relación a la unión al ADN dúplex, en el caso de los complejos **59b** y **59c** de Cu(II), es de aproximadamente 20. Este valor de selectividad obtenido es tres veces superior a la obtenida para los mismos complejos de Pt(II). Esta diferencia se puede atribuir a la diferente geometría de los complejos metálicos. Además, conviene tener en consideración el hecho de que el complejo de Cu(II) contiene un quinto ligando en la esfera de coordinación, el grupo nitrato apical, que estéricamente impide su interacción con el ADN dúplex.^[153] El mismo efecto se observó con los complejos de Pt(II) y Cu(II) bi-metálicos (figura 59, **d**). La selectividad observada de los complejos hacia el ADN cuádruple-G, frente al ADN dúplex fue de 25 y 120 para los complejos de Pt(II) y Cu(II), respectivamente.^[154]

2.2.8.3.2 Complejos de paladio(II)

Los siguientes complejos de paladio(II) han sido sintetizados y estudiados como ligandos potenciales del ADN cuádruple-G. Los correspondientes análogos de platino(II), basados esta misma estructura, no han podido ser sintetizados (figura 60).^[74]

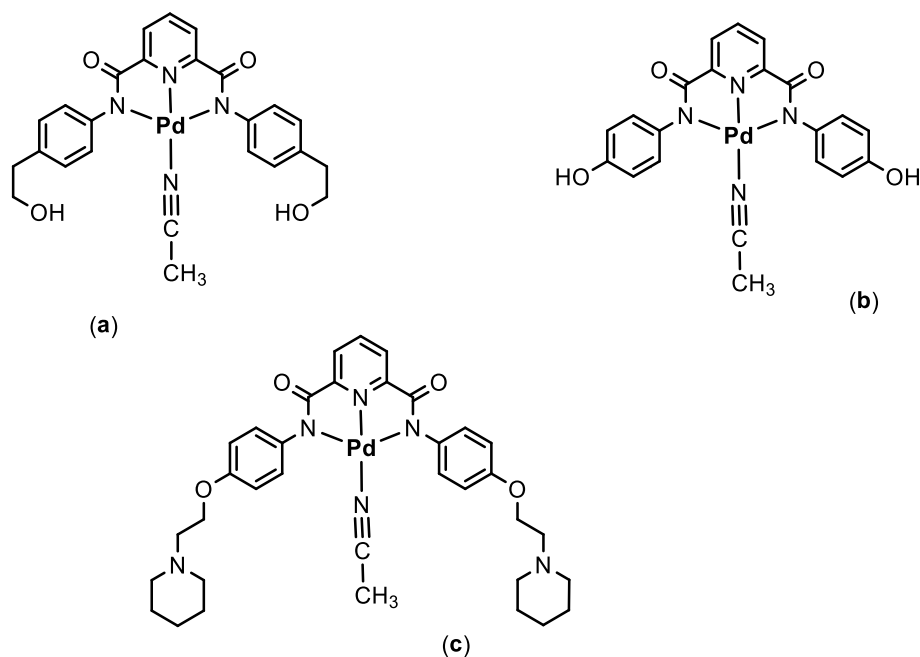


Figura 60. Complejos de Pd(II) con un ligando de piridina sustituida con *N*-fenilcarboxamidas en las posiciones 2 y 6

El único complejo de esta naturaleza que se une al ADN cuádruple-G con buena afinidad y selectividad moderada es el compuesto **60c**. Esto se debe a la presencia del anillo de piperidina en las cadenas laterales, que pueden interactuar con los bucles y con los surcos del ADN cuádruple.^[74]

2.2.8.4 Otros complejos metálicos

2.2.8.4.1 Complejo de Pt(II) con capacidad de unirse covalentemente al ADN cuádruple-G

Se han descrito complejos metálicos que son capaces de interactuar con el ADN cuádruple-G mediante interacciones covalentes y no covalentes simultáneamente. Este es el caso del complejo representado en la figura 61, un derivado de quinacridina, que interactúa por apilamiento π - π a través de los anillos aromáticos. A su vez, esta molécula contiene un espaciador con la unidad reactiva "Pt-Cl" que es capaz de unirse covalentemente con una guanina en la téttrade opuesta del cuádruple.^[156]

¹⁵⁶ H. Bertrand, S. Bombard, D. Monchaud, M.-P. Teulade Fichou, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2007**, 12, 1003 - 1014

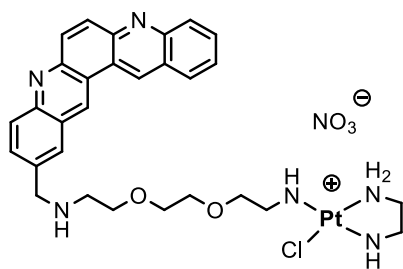


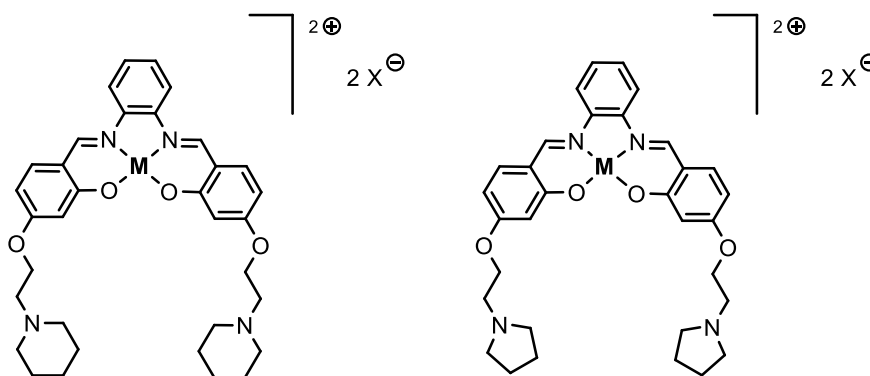
Figura 61. Un derivado de quinacridina con un espaciador y un grupo reactivo "Pt-Cl"

Los estudios realizados con este compuesto han puesto de manifiesto la existencia de los dos tipos de interacción, si bien no existen datos disponibles de la afinidad de este compuesto metálico hacia el ADN cuádruple-G.^[156]

2.2.8.4.2 Complejos de Ni(II), Zn(II) y V(II) con bases de Schiff

Finalmente, se han preparado y descrito un gran número de complejos metálicos empleando bases de Schiff como ligandos. Por ejemplo, diversos complejos de Ni(II), que cuentan con una estructura adecuada para su interacción con el ADN cuádruple-G. El complejo metálico adopta una geometría plano-cuadrada y puede interaccionar con las guaninas de las tétradas terminales mediante interacciones de apilamiento, mientras que el metal se puede situar encima del canal central del cuádruple y mimetizar el catión monovalente característico del medio fisiológico (figura 62).^[75,157]

¹⁵⁷ A. A. Arnal, J. Benet-Buchholz, S. Neidle, R. Vilar, *Inorg. Chem.*, **2008**, 47, 11910 – 11919



M: Ni(II), Zn(II)-H₂O, V(II)=O

Figura 62. Complejos representativos que contienen bases de Schiff

Los complejos de níquel de la figura 62 estabilizan notablemente al ADN cuádruple-G, se unen a él con una selectividad de más de 50 veces respecto al ADN dúplex y producen una inhibición de la telomerasa humana con valores de $telIC_{50} \sim 130$ nM, es decir, niveles de inhibición similares a los conseguidos con el compuesto BRACO-19.^[75,157]

2.3 Técnicas para el estudio de interacciones ADN cuádruple-ligando y evaluación de la actividad biológica

Para la evaluación de moléculas de pequeño tamaño con capacidad potencial de unirse al ADN cuádruple-G se han diseñado y utilizado distintos ensayos biofísicos, muchos de los cuales han supuesto la optimización y adecuación de los experimentos previamente aplicados para el estudio de la interacción entre ligandos y el ADN dúplex.^[158] Todos los métodos empleados son muy sensibles a la presencia de distintos cationes en el medio y a la composición del tampón, y este hecho es especialmente relevante cuando se realizan ensayos con oligonucleótidos con la secuencia telomérica.

¹⁵⁸ K. R. Fox, *Drug-DNA Interaction Protocols. Methods in Molecular Biology*, 2nd edition, 2010, ISBN 978 1 60327 417 3, Editorial Springer Science (Humana Press)

En este apartado se recogen los ejemplos más representativos de técnicas y métodos experimentales empleados comúnmente en los estudios de determinación de interacción entre el ADN (ADN cuádruple y dúplex, fundamentalmente) y distintos ligandos de bajo peso molecular. Una enumeración exhaustiva de todas las técnicas que pueden ser utilizadas para este tipo de estudios queda fuera del alcance de esta tesis doctoral.

2.3.1 Estudio de interacción por métodos espectroscópicos

Para el estudio de la interacción entre los ácidos nucleicos y los ligandos se pueden emplear distintos métodos: la espectroscopia de ultravioleta-visible, el dicroísmo circular, la espectrofluorimetría, la espectrometría de masas (ESI-MS, por ejemplo) o la resonancia magnética nuclear (RMN).

2.3.1.1 Dicroísmo circular (DC)

El dicroísmo circular es un método ampliamente utilizado para detectar y analizar fenómenos relacionados con la quiralidad de las moléculas. La importancia de esta técnica reside en que, por una parte, ofrece una observación quiral, es decir, consigue responder a la pregunta de si un sistema o sustancia determinada es quiral o no. El dicroísmo circular se puede emplear en numerosas aplicaciones bioquímicas, teniendo en cuenta que la mayoría de las macromoléculas, como por ejemplo, los ácidos nucleicos y las proteínas, son quirales y por consiguiente originan señales de dicroísmo circular. Además, las estructuras secundarias y terciarias de dichas macromoléculas presentan espectros de dicroísmo circular muy característicos y específicos.^[159]

En la bibliografía se describen una gran variedad de conformaciones que pueden adoptar las secuencias ricas en guaninas al constituir cuádruples-G.^[34,35,86] Los cuádruples unimoleculares del ADN telomérico están constituidos por tres tétradas de guaninas apiladas y conectadas a través de bucles de TTA. La morfología precisa de esta estructura secundaria depende de muchos factores, como por ejemplo, de la secuencia de nucleótidos de la concentración del

¹⁵⁹ N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody (editores), *Circular Dichroism: Principles and Applications 2nd edition*, **2000**, ISBN 978 0 471 33003 5, Editorial John Wiley & Sons, Inc.

oligonucleótido en la disolución y de las concentraciones de los cationes monovalentes en el medio, concretamente sodio o potasio. Si en la disolución predominan los cationes de sodio, el oligonucleótido suele adoptar la conformación antiparalela, que tiene forma de cesta (figura 63, en color azul). Si, por el contrario, en la disolución prevalecen cationes de potasio, se forman dos tipos de estructuras secundarias, designadas como "híbridos", (figura 63, en color naranja). En la figura 63 se representan dos espectros de dicroísmo circular para el oligonucleótido de secuencia telomérica, con sus máximos y mínimos característicos para cada conformación.

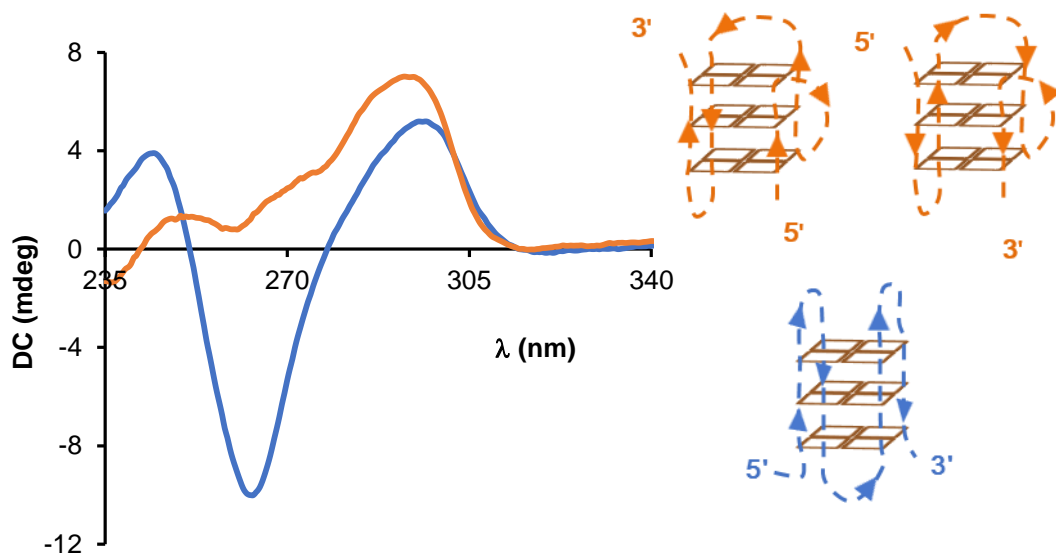


Figura 63. Espectros de DC del oligonucleótido Tel-22 5'-AGGG(TTAGGG)₃-3', *la conformación antiparalela (tampón de sodio) y el espectro de la hipotética mezcla de estructuras antiparalelas - híbridos (tampón de potasio)*

Aparte de los espectros característicos y específicos para cada topología, esta técnica puede utilizarse para observar los cambios producidos en el espectro de DC del ADN en presencia de un ligando, cambios que se manifiestan en algunos modos de interacción con el ADN cuádruple. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos cambios no siempre son muy significativos, aun existiendo interacción ADN-ligando, por lo que el DC se utiliza en muchas ocasiones para obtener una información cualitativa sobre las distintas topologías del cuádruple-

G y como técnica complementaria a otros ensayos de naturaleza más cuantitativa.^[160,161]

2.3.1.2 Espectroscopia de Ultravioleta-visible (UV-vis)

La espectroscopia de Ultravioleta-visible (UV-vis) se puede utilizar para la determinación de las constantes termodinámicas de asociación. El fundamento de esta técnica se basa en la diferencia que experimenta el espectro de absorción de un compuesto en función de que se encuentre en estado libre o bien unido al ácido nucleico. Si bien esta técnica se ha empleado mucho tradicionalmente, en la actualidad este método, generalmente, se usa de manera esporádica, ya que es relativamente lento, no es aplicable para todo tipo de compuestos y, normalmente, requiere grandes cantidades de oligonucleótido.^[162]

2.3.1.3 Ensayo de desplazamiento de ligandos fluorescentes (G4-FID)

El ensayo G4-FID se desarrolló en el grupo de investigación de M.-P. Teulade-Fichou, y se basa en el empleo de ligandos de ADN que no son fluorescentes en su estado libre, pero que al unirse a un ADN determinado son capaces de experimentar fluorescencia. Este es en un ensayo de evaluación de la interacción indirecto, pero sencillo y rápido, que adopta su nombre del inglés, *G-quadruplex Fluorescence Intercalator Displacement assay*.

Un ligando intercalante que se emplea comúnmente en esta técnica es el naranja de tiazol (TO, del inglés, *Thiazole orange*). El naranja de tiazol no es fluorescente cuando se encuentra libre en disolución, mientras que cuando está unido al ADN cuádruplex o al ADN dúplex, emite una fluorescencia característica. Esta fluorescencia se registra en el intervalo 510 – 750 nm, y posteriormente se mide el área bajo la curva de emisión obtenida experimentalmente. A continuación, se añaden a la misma disolución alícuotas del ligando estudiado

¹⁶⁰ S. Paramasivan, I. Rujan, P. H. Bolton, *Methods*, **2007**, 43, 324 - 331

¹⁶¹ A. I. Karsisiotis, N. M. Hessari, E. Novellino, G. P. Spada, A. Randazzo, M. Webba da Silva, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2011**, 50, 10645 - 10648

¹⁶² R. Kieltyka, P. Englebienne, N. Moitessier, H. Sleiman, *G-Quadruplex DNA, Methods and Protocols*, **2010**, 223 - 255, ISBN 978 1 58829 950 5, Editorial Springer (Humana Press)

(figura 64, **a** y **b**) y se vuelve a registrar el espectro de emisión generado, calculando el valor del área bajo la nueva curva, que generalmente será inferior al valor obtenido inicialmente (figura 64, **c** y **d**). De esta forma, se puede determinar en cada punto de la valoración el porcentaje de desplazamiento del naranja de tiazol producido por el ligando al unirse al ADN (figura 64, **e**).

Como compuesto de referencia para este ensayo se empleó el ligando sintético **360A**, un potente ligando de ADN cuádruple-G. Es importante tener en cuenta que, dado que la interacción se evalúa de manera indirecta, esta técnica no es apropiada para aquellos ligandos que se unen a los ácidos nucleicos de un modo distinto a como lo hace el naranja de tiazol, puesto que pueden producirse falsos negativos. De igual modo, no es adecuado para compuestos cuya fluorescencia intrínseca pueda interferir con la fluorescencia producida por el naranja de tiazol.^[163]

¹⁶³ Selección de artículos sobre el ensayo G4-FID: **a**) D. Monchaud, C. Allain, C., M.-P. Teulade-Fichou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 4842-4845; **b**) D. Monchaud, C. Allain, H. Bertrand, N. Smargiasso, F. Rosu, V. Gabelica, A. De Cian, J.-L. Mergny, M.-P. Teulade-Fichou, *Biochimie*, **2008**, *90*, 1207-1223; **c**) D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou, *G-Quadruplex DNA, Methods and Protocols*, **2010**, 257 – 271, ISBN 978 1 58829 950 5, Editorial Springer (Humana Press) **d**) P. L. T. Tran, E. Largy, F. Hamon, M.-P. Teulade-Fichou, J.-L. Mergny, *Biochimie*, **2011**, *93*, 1288-1296; **e**) E. Largy, F. Hamon, M.-P. Teulade-Fichou, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 3419-3427

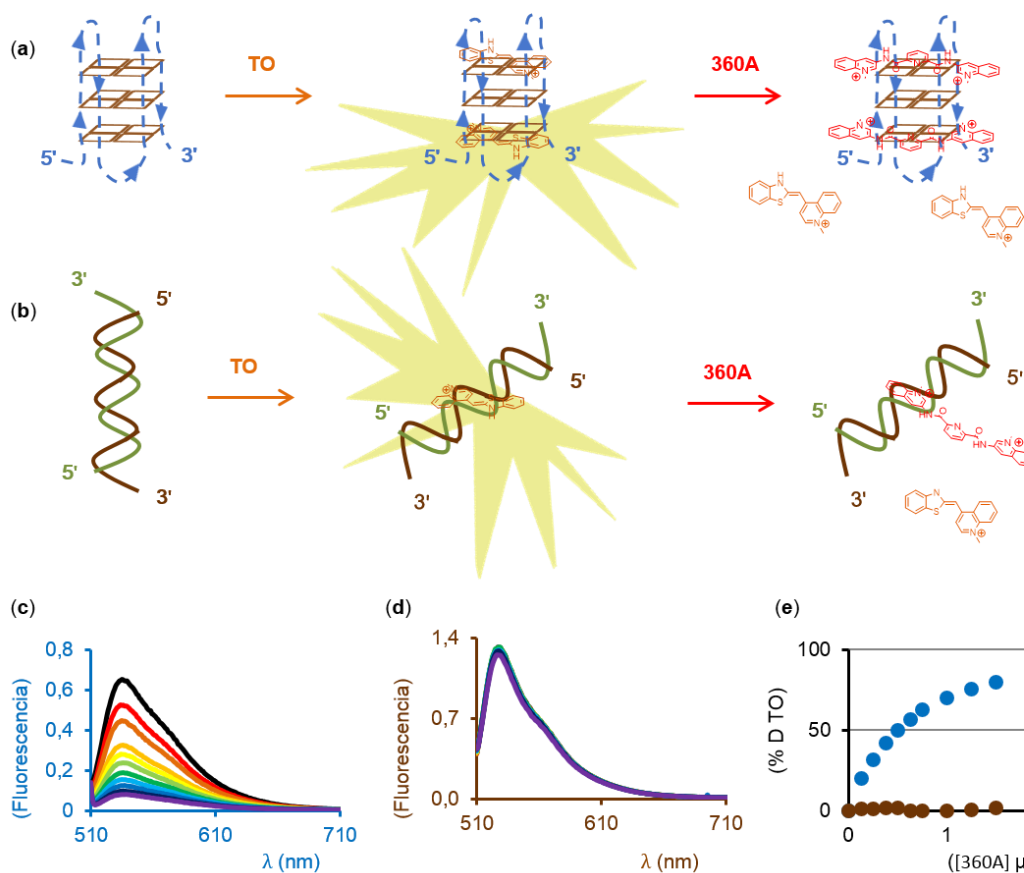


Figura 64. **a, b** - Procedimiento general del experimento G4-FID: la sonda fluorescente (TO) unida al ADN cuádruple-G (**a**) o el ADN dúplex (**b**) emite fluorescencia tras su excitación; al añadir alícuotas de ligando (**360A** - compuesto referencia) disminuye la fluorescencia emitida por el TO; **c, d** - espectros de emisión de fluorescencia obtenido para el ADN cuádruple-G (**c**) y para el ADN dúplex (**d**); disolución de ADN + TO (en color negro); ADN + TO + **360A** a distintas concentraciones; **e** - el porcentaje del naranja de tiazol desplazado (% DTO) por el ligando **360A**

2.3.1.4 Espectrometría de masas (EM)

La espectrometría de masas empleando una fuente de ionización de electrospray (ESI-MS, del inglés, *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*) es un método que permite el análisis de especies moleculares y los fenómenos de asociación o disociación que éstos pueden experimentar. La aplicación de este método en el análisis de la interacción existente entre un ligando y el ADN cuádruple-G es relativamente reciente.^[164] Varios estudios han demostrado que por ESI-MS se pueden determinar, por ejemplo, las constantes de asociación

¹⁶⁴ F. Rosu, E. De Pauw, V. Gabelica, *Biochimie*, **2008**, *90*, 1074 - 1087

ADN-ligando y los valores obtenidos de esta manera han resultado ser comparables con los valores de las constantes de asociación determinadas mediante el empleo de otras técnicas.

La desventaja de esta técnica es que requiere la ausencia absoluta de cationes monovalentes de K^+ y de Na^+ en el medio, por eso se realiza normalmente en un tampón que contiene sales de amonio (acetato amónico).^[164,165,166]

2.3.1.5 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La RMN en disolución es complementaria a la difracción de rayos X ya que la primera permite estudiar la orientación de las hebras en el oligonucleótido plegado, la estructura tridimensional de las distintas topologías de los cuádruples^[36] o la interacción entre ligandos y los cuádruples-G en disolución.^[151,167]

Los experimentos estándar en 1D o en 2D se realizan en aparatos potentes, de un mínimo de 14,1 T (600 MHz). Los protones del oligonucleótido correspondiente a los grupos N-H de las guaninas, que participan en los enlaces tipo Hoogsteen, aparecen en la zona del espectro entre 10 y 12 ppm. El resto de protones de la estructura se asignan, si es posible, mediante distintos experimentos 2D, como NOESY, TOCSY o ^{13}C -HSQC.^[36,151,167]

Al añadir el compuesto estudiado a la disolución del oligonucleótido se observan en el espectro las nuevas señales del mismo. Adicionalmente, algunas señales del oligonucleótido y del ligando se ensanchan y otras cambian de desplazamiento. La zona donde aparecen estos cambios delimita la región estructural de interacción entre el compuesto y el oligonucleótido estudiado.^[151]

¹⁶⁵ V. Gabelica, *Methods Mol. Biol.*, **2010**, 613, 89 - 101

¹⁶⁶ C. M. Lombardo, I. S. Martínez, S. Haider, V. Gabelica, E. De Pauw, J. E. Moses, S. Neidle, *Chem. Commun. (Camb.)*, **2010**, 46, 9116 - 9118

¹⁶⁷ S. Cosconati, L. Marinelli, R. Trotta, A. Virno, S. De Tito, R. Romagnoli, B. Pagano, V. Limongelli, C. Giancola, P. G. Baraldi, L. Mayol, E. Novellino, A. Randazzo, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 6425 - 6433

2.3.1.6 Determinación de la interacción entre el ligando y ADN por medida de la desnaturalización térmica

La desnaturalización térmica producida en un ADN de doble hélice conforme se incrementa la temperatura de la muestra se manifiesta con un cambio brusco de la absorbancia, medida típicamente a 260 nm. Este cambio brusco es característico para la transición producida al pasar de la forma de doble hélice a dos hebras de ADN individuales. Este fenómeno también se puede observar en las disoluciones de ADN cuádruple, donde además el valor de la temperatura de desnaturalización es un indicador de la estabilidad térmica de cada estructura secundaria particular.^[168] Además, en el caso del ADN cuádruple se produce una variación característica a 295 nm, lo que supone una evidencia inequívoca de la presencia de la estructura de ADN cuádruple en la disolución analizada.^[162]

Desnaturalización térmica del ADN por FRET

Una variante de la técnica dentro de los métodos de determinación de la interacción mediante la desnaturalización térmica del ADN se basa en el empleo del fenómeno FRET o transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (del inglés, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). En este caso, el oligonucleótido que contiene la secuencia de cuádruple-G se encuentra ligado en sus extremos a dos marcadores fluorescentes. Normalmente, en el extremo 5' se encuentra el fluoróforo donador FAM (6-carboxifluoresceína) y en el extremo 3' el aceptor TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).^[169,170] De este modo, cuando los dos fluoróforos están próximos en el espacio, lo que sucede cuando el cuádruple se encuentra en una conformación plegada, la emisión de la fluorescencia por parte del fluoróforo donador está inactivada por el aceptor (*quencher*). Durante el transcurso del experimento, el aumento de la temperatura produce el desplegamiento de la estructura secundaria del ADN cuádruple y, consecuentemente, los fluoróforos se alejan suficientemente y aparece una intensa señal de emisión del fluoróforo. La curva de desnaturalización de ADN

¹⁶⁸ P. A. Rachwall, K. R. Fox, *Methods*, **2007**, *43*, 291 – 301

¹⁶⁹ J.-L. Mergny, J.-C. Maurizot, *ChemBioChem*, **2001**, *2*, 124 - 132

¹⁷⁰ A. Guedin, L. Lacroix, J. -L. Mergny, *Methods Mol. Biol.*, **2010**, *613*, 25 - 35

tiene una forma sigmoidea y con el valor característico $T_{1/2}$ (temperatura de desnaturalización media) – representando el punto medio entre la forma de ADN completamente plegada y desplegada (figura 65).

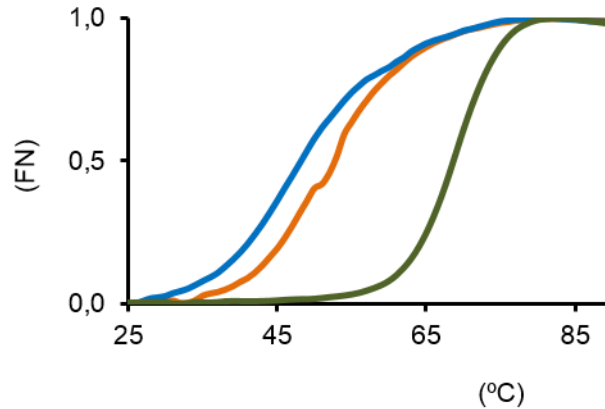


Figura 65. Curva de desnaturalización de una estructura de ADN cuádruple-G (F21T) en condiciones de sodio ($T_{1/2}=49$ °C), potasio ($T_{1/2}=53$ °C) y ADN dúplex (F10T) ($T_{1/2}=69$ °C); FN – fluorescencia normalizada

En presencia de un ligando que establezca la estructura del cuádruple se produce una variación de $T_{1/2}$. De esta forma, el efecto que produce un ligando se relaciona con un valor característico $\Delta T_{1/2}$, que varía en función de las concentraciones del ligando presente en el medio. La concentración estándar de ligando utilizada en este tipo de experimentos es $1 \mu\text{M}$, y la concentración del ADN telomérico suele ser $0,2 \mu\text{M}$.^[22]

Entre las ventajas que se pueden resaltar de esta técnica se encuentran su alta sensibilidad y la baja cantidad del oligonucleótido marcado requerido. Además, esta técnica es susceptible de ser aplicada en los métodos de cribado de alto rendimiento, empleando frecuentemente termocicladores para PCR a tiempo real y realizando el ensayo en un formato de placa multipocillo.

La técnica también es adecuada para la estimación de la selectividad de unión de ligando al ADN cuádruple-G, en relación a otro tipo de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el experimento se puede llevar a cabo añadiendo, después de la valoración del efecto del ligando en el valor de $T_{1/2}$ del cuádruple-G, un segundo ADN no marcado con fluoróforo, y observando si se produce competición en la

unión del ligando a los dos tipos de ADN, manifestado o no por un nuevo cambio en $\Delta T_{1/2}$. El segundo ácido nucleico empleado suele ser el ADN de timo de ternera o secuencias cortas de ADN dúplex.^[171]

Por otro lado, es conveniente resaltar, como posible inconveniente de la técnica, el que esta resulta inadecuada en aquellos casos en los que el ligando, en lugar de estabilizar el ADN cuádruple-G interaccione con los fluoróforos del mismo.^[172,173,174]

2.3.2 Estudios cinéticos y termodinámicos de la asociación ligando-ADN cuádruple-G

Los estudios de cinética y la determinación de los parámetros termodinámicos asociados a la interacción entre ligandos y el ADN cuádruple-G se pueden abordar por utilización de distintos métodos, como por ejemplo, la resonancia de plasmón de superficie o la calorimetría isotérmica. Dentro de este grupo de técnicas incluimos también la diálisis de equilibrio competitiva, ya que permite obtener las constantes de asociación K_a entre el ligando y el ADN.

2.3.2.1 Resonancia de plasmón de superficie (SPR)

Mediante la técnica de SPR (del inglés, *Surface Plasmon Resonance*) se pueden obtener datos muy relevantes para la comprensión del fenómeno de interacción entre el ligando y el ADN como, por ejemplo, constantes de velocidad, constantes de asociación (K_a), la variación de energía libre de Gibbs (ΔG) o la estequiometría de la reacción, entre otros. En esta técnica se emplean detectores ópticos y se basa en la detección del ángulo de difracción de la superficie con receptores o biomoléculas inmovilizadas, en presencia o ausencia del ligando, que fluye en contacto con la especie inmovilizada (figura 66), en este caso oligonucleótidos de ADN cuádruple. Entre las ventajas de este método se pueden

¹⁷¹ A. Granzhan, D. Monchaud, N. Saettel, A. Guedin, J.-L. Megny, M.-P. Teulade-Fichou, *J. Nucleic Acids*, **2010**, ID 460561, 1 - 11

¹⁷² R. A. Darby, M. Sollogoub, C. McKeen, L. Brown, A. Risitano, M. Brown, C. Barton, T. Brown, K. R. Fox, *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, e39

¹⁷³ B. Guyen, C. M. Schultes, P. Hazel, J. Mann, S. Neidle, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 981 - 988

¹⁷⁴ C. M. Schultes, B. Guyen, J. Cuesta, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 4347 - 4351

destacar la posibilidad de trabajar a concentraciones bajas del oligonucleótido y la posibilidad de obtener datos termodinámicos y cinéticos precisos.^[175]

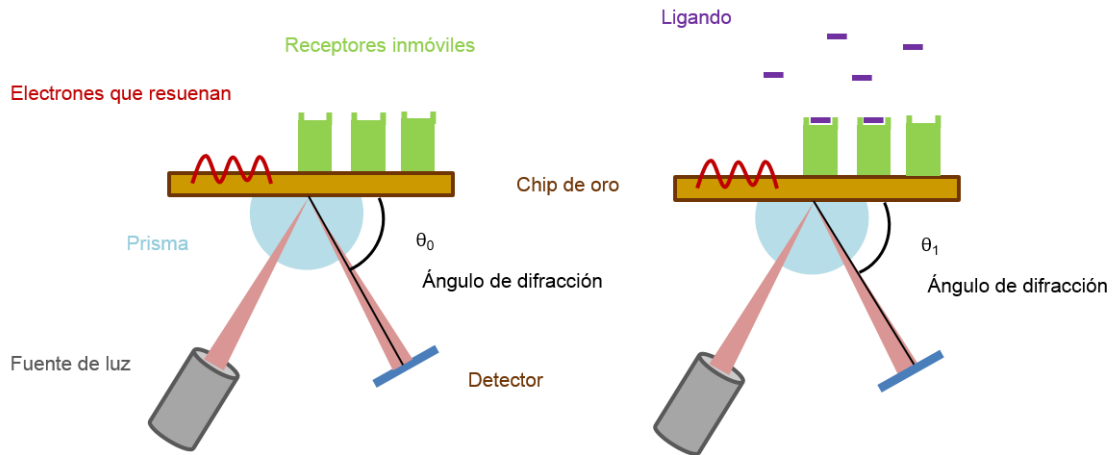


Figura 66. Resonancia de plasmón de superficie – el fundamento de la técnica: cambio del ángulo de difracción después de la unión del ligando al receptor inmóvil; θ_0 – ángulo de difracción en ausencia del ligando; θ_1 – ángulo de difracción en presencia del ligando

2.3.2.2 Diálisis de equilibrio competitiva

La diálisis de equilibrio competitiva es un método cuantitativo que permite determinar constantes de asociación aparentes (K_a) y también realizar una estimación del valor de la selectividad de unión del ligando frente a distintos ácidos nucleicos. Desde un punto de vista experimental, distintos tipos de ADN se introducen en bolsas de diálisis que se sumergen en una disolución de ligando de concentración conocida. Estas membranas son semipermeables, permitiendo el libre paso del ligando, pero no del ácido nucleico. Una vez alcanzado el equilibrio, se miden las concentraciones de ligando, por espectrofotometría UV-visible, en cada bolsa de diálisis y también la concentración de ligando libre en el dialisato. La concentración de ligando determinada en cada bolsa de diálisis, tras la adición de un detergente, supone la concentración total de ligando. Esta concentración de ligando suele ser considerablemente superior a la del dialisato, en función de la afinidad y selectividad del ligando hacia cada ácido nucleico

¹⁷⁵ Y. Liu, W. D. Wilson, *Methods Mol. Biol.*, **2010**, 613, 1 - 23

concreto. La concentración de ligando unido se puede calcular por sustracción de la concentración de ligando libre de la concentración total, y a partir de estos datos se determina una constante de asociación aparente.^[176]

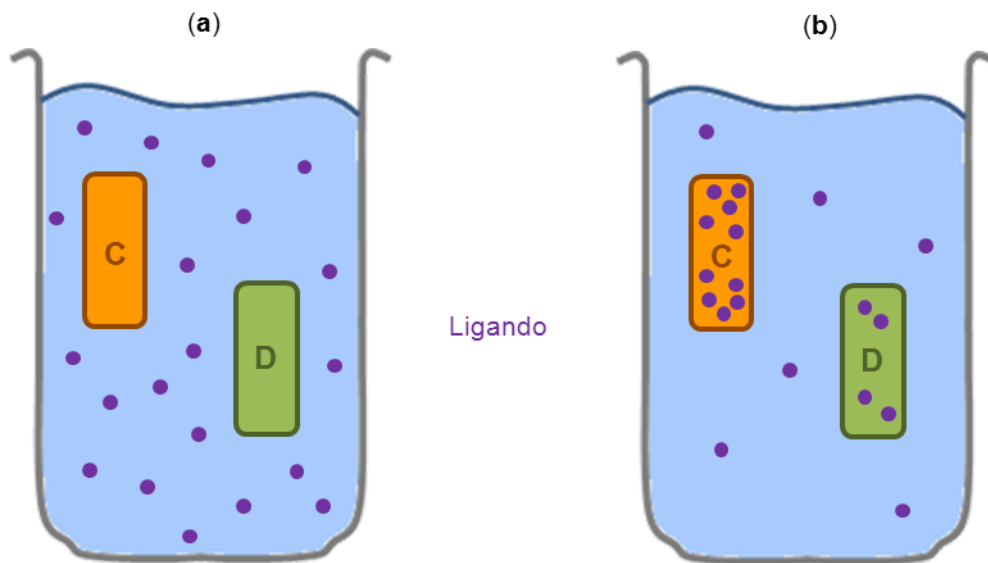


Figura 67. Diálisis de equilibrio competitiva – vaso de precipitados con dos bolsas semipermeables, que contienen disoluciones con distintos tipos de ADN: **C** = cuádruple, **D** = dúplex. Las bolsas están sumergidas en una disolución de ligando tamponada (a): a tiempo 0 horas y (b) a tiempo 24 horas

2.3.3 Difracción de rayos X

La difracción de rayos X es el principal método de obtención de información estructural en el estudio de proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas. El análisis de estas moléculas quirales requiere un análisis muy complejo para ajustar el patrón de difracción obtenido experimentalmente a las posibles estructuras moleculares. El Banco de Datos de Proteínas (*Protein Data Bank*, PDB, www.rcsb.org) contiene información estructural de infinidad de proteínas y/o ácidos nucleicos, tanto libres como en presencia de distintos

¹⁷⁶ P. Ragazzon, J. B. Chaires, *Methods*, 2007, 43, 313 – 323

ligandos, y obtenida por difracción de rayos X o por resonancia magnética nuclear.^[177,178]

2.3.4 Footprinting

La técnica de *footprinting* emplea agentes que son capaces de cortar la cadena de ADN en lugares específicos. Si un ligando está unido a la molécula del ácido nucleico en alguno de los sitios del corte, protege la cadena del ADN en ese punto, alterando el patrón de corte del mismo. Posteriormente, se analiza la identidad y longitud de los fragmentos de ADN cortados para obtener información sobre los sitios específicos de unión entre el ligando y el ADN cuádruple-G.^[179]

2.3.5 Viscosimetría

La viscosimetría es una técnica sencilla que se puede emplear para determinar el modo de unión entre un ligando y el ADN. Actualmente solo se puede aplicar para el estudio de interacciones con ADN dúplex, y no con cuádruple, pero se incluye en este apartado por ser una técnica complementaria que se utiliza para establecer modos de unión entre ligandos y ADN. La unión no covalente del ligando a la doble hélice se puede producir mediante un mecanismo de intercalación, mediante su unión a los surcos, mediante unión externa o, en determinadas ocasiones, mediante una combinación de los distintos modos de unión. Una manera de diferenciar entre ligandos típicamente intercalantes y aquellos que se unen al surco o externamente es analizar la variación de la viscosidad de una disolución de ADN con la adición de alícuotas sucesivas de ligando. Este método es relativamente sencillo en cuanto a su ejecución experimental.^[180] Cuando un ligando intercalante se une al ADN, se produce la inserción de una o más moléculas (cromóforos) del ligando entre dos pares de bases contiguas en la doble hélice de la biomolécula. En consecuencia, se produce

¹⁷⁷ G. W. Collie, R. Promontorio, G. N. Parkinson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 2723 - 2731

¹⁷⁸ G. W. Collie, S. Neidle, *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 2959 - 2974

¹⁷⁹ D. Sun, L. H. Hurley, *G-Quadruplex DNA, Methods and Protocols*, **2010**, 65 - 79, ISBN 978 1 58829 950 5, *Editorial Springer (Humana Press)*

¹⁸⁰ G. Cohen, H. Eisenberg, *Biopolymers*, **1969**, *8*, 45-55

un incremento neto de la longitud total de la hélice, junto con un aumento de la viscosidad de la disolución. Por otra parte, cuando se produce la unión en el surco o al esqueleto fosfato, el ligando no requiere espacio extra entre las bases nucleicas, con lo cual la longitud de la molécula permanece inalterada, y no se producen cambios significativos en la viscosidad global.

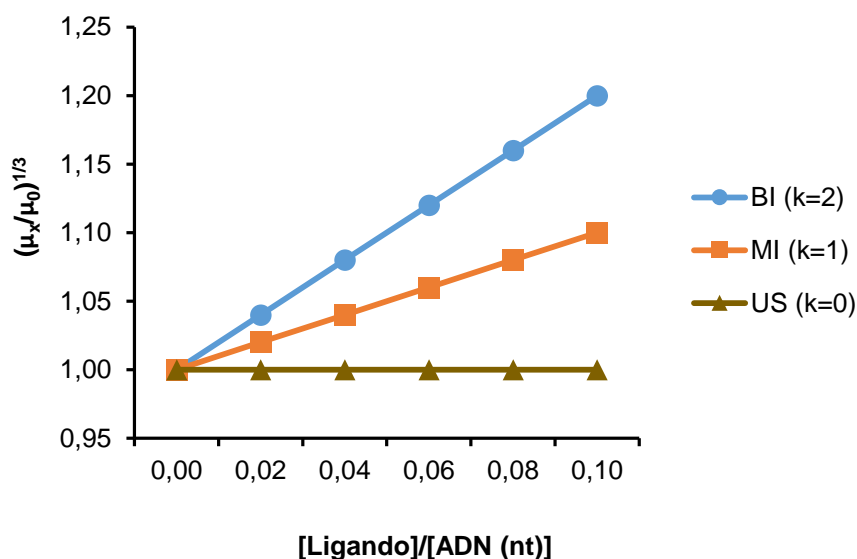


Figura 68. Gráfica que representa la viscosidad relativa $(\mu_x/\mu_o)^{1/3}$ frente a la relación $[\text{Ligando}]/[\text{ADN (nt)}]$, μ_x - viscosidad absoluta de la disolución ADN-ligando; μ_o - viscosidad absoluta de la disolución de ADN; BI: bisintercalante, la pendiente $k=2$; MI: monointercalante clásico, la pendiente $k=1$; US: ligando con modo de unión externo o que se une a surcos, $k = 0$

Los valores de la viscosidad relativa $(\mu_x/\mu_o)^{1/3}$ se representan en una gráfica frente a la relación $[\text{Ligando}]/[\text{ADN (nt)}]$ y se realiza un ajuste lineal de los datos obtenidos. De este modo, aquellos compuestos que se comportan como monointercalantes clásicos dan lugar a correlaciones lineales con un valor de la pendiente próximo a 1, mientras que aquellos compuestos que se unen a los surcos y, por tanto, no se insertan entre los pares de bases, originan un ajuste lineal caracterizado por una pendiente de la recta prácticamente igual a cero. Por otra parte, los compuestos denominados bisintercalantes, es decir, aquellos que insertan dos unidades aromáticas entre los pares de bases del ADN, se

caracterizan porque los datos se ajustan a una recta de pendiente próxima a 2 (figura 68).^[181,182]

2.3.6 Ensayo de la inhibición de la telomerasa

Un ensayo muy utilizado tradicionalmente para llevar a cabo la evaluación de la actividad de la telomerasa *in vitro* es el protocolo de amplificación de repeticiones de la secuencia telomérica, TRAP (del inglés, *Telomere Repeat Amplification Protocol*).^[6] El ensayo TRAP consiste en dos etapas: una primera en la que la enzima presente en el extracto celular ejerce su función catalítica, adicionando la secuencia TTAGGG a un oligonucleótido; y una segunda etapa en la que se produce la amplificación de los productos de ADN obtenidos en la etapa anterior por medio de la enzima Taq polimerasa, mediante un proceso de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR (del inglés, *Polymerase Chain Reaction*). Finalmente, los fragmentos de ADN amplificados se separan por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida y se cuantifica la actividad de la enzima telomerasa en función de la cantidad de ADN extendido en el ensayo. Los resultados obtenidos con esta técnica se expresan por medio de los valores de IC₅₀, en concreto, a través de valores de ^{tel}IC₅₀. Este parámetro representa las concentraciones de ligando necesarias para producir una inhibición del 50% de la enzima y se corresponde a una disminución del 50% de las bandas de ADN obtenidas en el ensayo, en relación al control positivo en ausencia de ligando.

Este protocolo es aplicable para evaluar la actividad inhibidora de la telomerasa por parte de una gran variedad de compuestos químicos, si bien existen limitaciones. Por ejemplo, para el caso de ligandos de bajo peso molecular que inducen el plegamiento del ADN cuádruple o estabilizan su estructura secundaria, se puede producir de manera indirecta, una aparente inhibición de la actividad de la telomerasa.

¹⁸¹ T. A. Fairley, R. R. Tidwell, I. Donkor, N. A. Naiman, K. A. Ohemeng, R. J. Lombardy, J. A. Bentley, M. Cory, *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 1746 - 1753

¹⁸² Y. Kubota, K. Hashimoto, K. Fujita, M. Wakita, E. Miyanoana, Y. Fujisaki, *Biochim. Biophys. Acta*, **1977**, *478*, 23 - 32

Protocolo TRAP-LIG

El ensayo TRAP modificado (TRAP-LIG) incorpora una etapa adicional al procedimiento estándar TRAP: la eliminación del ligando después de la actuación enzimática y de manera previa a la etapa de PCR. Se ha demostrado por varios grupos de investigación que la presencia del ligando en la fase de la amplificación del ADN por la Taq polimerasa, especialmente si se trata de un ligando estabilizador de estructuras cuádruples, puede influir en los resultados obtenidos de $^{tel}IC_{50}$, magnificando los valores reales de inhibición. Por ese motivo, para obtener la concentración de inhibición $^{tel}IC_{50}$ verdadera, es importante llevar a cabo la eliminación del ligando antes de la etapa de amplificación.^[183,184]

2.3.7 Ensayos en cultivo celular

Independientemente de que normalmente se evalúe el efecto biológico producido por los ligandos estabilizadores de cuádruple-G mediante ensayos de inhibición de la telomerasa, hoy en día está comúnmente aceptado que la unión de este tipo de ligandos al ADN cuádruple puede producir distintas respuestas biológicas, a través de mecanismos de acción diferentes, por lo que resulta interesante determinar la actividad biológica de manera global. Una de las pruebas *in vitro* más comunes es el estudio de la toxicidad celular o citotoxicidad. La citotoxicidad se puede medir mediante distintas pruebas o ensayos, como por ejemplo, el test MTT^[185] o el ensayo de citotoxicidad con la sulforodamina B (en inglés, el SRB test).^[186]

Ensayo de Citotoxicidad con la Sulforodamina B

El ensayo de citotoxicidad con la sulforodamina B (SRB) se emplea para determinar la cantidad de células supervivientes tras su incubación con un compuesto determinado. Este método se ha optimizado para realizar el cribado

¹⁸³ D. Gomez, J.-L. Mergny, J.-F. Riou, *Cancer Res.*, **2002**, *62*, 3365 – 3368

¹⁸⁴ J. Reed, M. Gunaratnam, M. Beltran, A. P. Reszka, R. Vilar, S. Neidle, *Anal. Biochem.*, **2008**, *380*, 99 – 105

¹⁸⁵ M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan, *Biotechnol. Annu. Rev.*, **2005**, *11*, 127 - 152

¹⁸⁶ C. Leonetti, M. Scarsella, G. Riggio, A. Rizzo, E. Salvati, M. D'Incalci, M. Staszewsky, L. Frapolli, M. F. Stevens, A. Stoppacciaro, M. Mottolese, B. Antoniani, E. Gilson, G. Zupi, A. Biroccio, *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*, 7284 – 7291

de citotoxicidad de los compuestos frente a células adherentes en un formato de placa multipocillo.

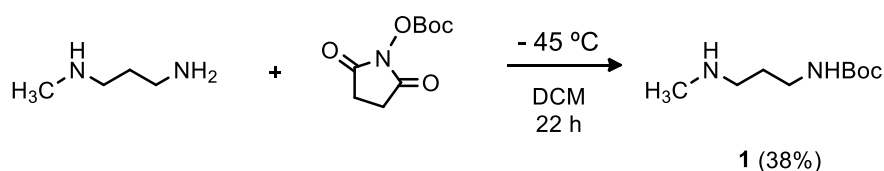
Esta técnica es un ensayo colorimétrico, y se basa en la cuantificación de un colorante que se encuentra ligado a las proteínas de las células que se mantienen vivas en el experimento. En este caso, transcurrido el período de incubación con el compuesto objeto de estudio, se determina la cantidad de sulforodamina B presente por el valor de absorbancia a 540 nm. La absorbancia normalizada se representa en una gráfica frente a la concentración del compuesto estudiado, y posteriormente se determina el valor de concentración de inhibición del crecimiento de las células, IC_{50} . IC_{50} representa la concentración del compuesto a la que se alcanza una intensidad de absorbancia normalizada igual al 50% de la muestra de control (control positivo). Como control positivo se utiliza una muestra de este ensayo realizada en ausencia de compuesto.^[186]

3. Discusión de resultados

3.1 Síntesis

3.1.1 Síntesis de un derivado de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada (6)

En primer lugar, se ha llevado a cabo la síntesis de un derivado de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada y disustituida con cadenas laterales en las posiciones 4 y 7 de la fenantrolina. Como cadena lateral, y en una primera aproximación, se partió de un espaciador de *N*-metil-propilen-1,3-diamina, protegido con un grupo Boc. Este derivado, el compuesto **1**, se preparó de acuerdo al procedimiento recogido en el siguiente esquema de reacción.^[187]



Esquema 1. Preparación del compuesto **1**

La síntesis se llevó a cabo a baja temperatura (- 45 °C) obteniéndose el producto deseado con rendimiento medio-bajo (38%) debido a la alta reactividad de la *N*-(*tert*-butoxicarbonilo) succinimida y a la presencia de otro grupo funcional reactivo en la molécula, lo que condujo a la obtención del producto di-protegido como producto secundario.^[187]

A continuación, se abordó la síntesis del producto **6**, que contiene en su estructura grupos guanidinio terminales, a partir del producto **1** y a través de una serie de etapas que se resumen en el esquema 2. La funcionalización con el grupo guanidinio se llevó a cabo empleando condiciones previamente descritas.^[188] Los rendimientos obtenidos en cada paso fueron elevados, de tal manera que el rendimiento global de la secuencia de reacciones fue del 54%.

¹⁸⁷ S. P. Rannard, N. J. Davis, *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 2117 - 2120

¹⁸⁸ B. J. Coe, N. R. M. Curati, E. C. Fitzgerald, *Synthesis*, **2006**, *1*, 146 - 150

3.1.2.1 Síntesis de aminas derivadas de la 2,2'-bipiridina

En primer lugar, se utilizó para la síntesis de los compuestos objetivo una amina primaria, la L-arginina (figura 69), un α -aminoácido comercial, que contiene en su estructura el grupo guanidino terminal.

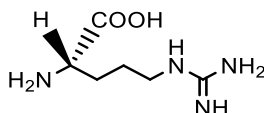


Figura 69. El α -aminoácido L-arginina

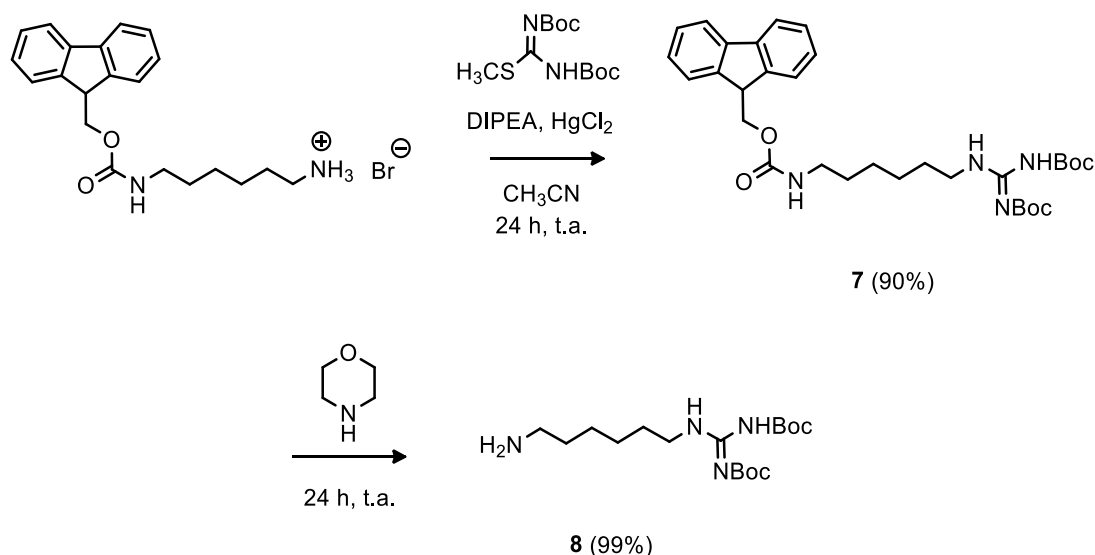
En segundo lugar, se procedió a la síntesis de la amina primaria **8**, tal y como se muestra en el esquema 3. Para ello, primero se preparó el compuesto **7** que incorpora en su estructura un grupo guanidino terminal protegido con dos grupos *tert*-butoxicarbonilo (Boc).^[189,190] La desprotección del grupo Fmoc (Fluorenilmetoxicarbonilo) y la obtención del producto **8** se realizó utilizando o bien la base morfolina^[189,191], como disolvente y como reactivo desprotector, o bien el octano-1-tiol y DBU (diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno) como catalizador, en THF.^[189,192] Las dos estrategias para desproteger el grupo Fmoc del producto **7** demostraron ser eficaces, pero la mezcla de reacción obtenida de la desprotección con morfolina resultó más fácil de purificar. El rendimiento global de los dos pasos de reacción fue del 89%.

¹⁸⁹ P. G. M. Wuts, T. W. Green, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th edition, **2007**, Editorial John Wiley & Sons, Inc.

¹⁹⁰ L. Lebreton, J. Annat, P. Derrepas, P. Dutartre, P. Renaut, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 277 - 290

¹⁹¹ T. Vuljanic, K.-E. Bergquist, H. Clausen, S. Roy, J. Kihlberg, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 7983 - 8000

¹⁹² J. E. Sheppeck II, H. Kar, H. Hong, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 5329 - 5333

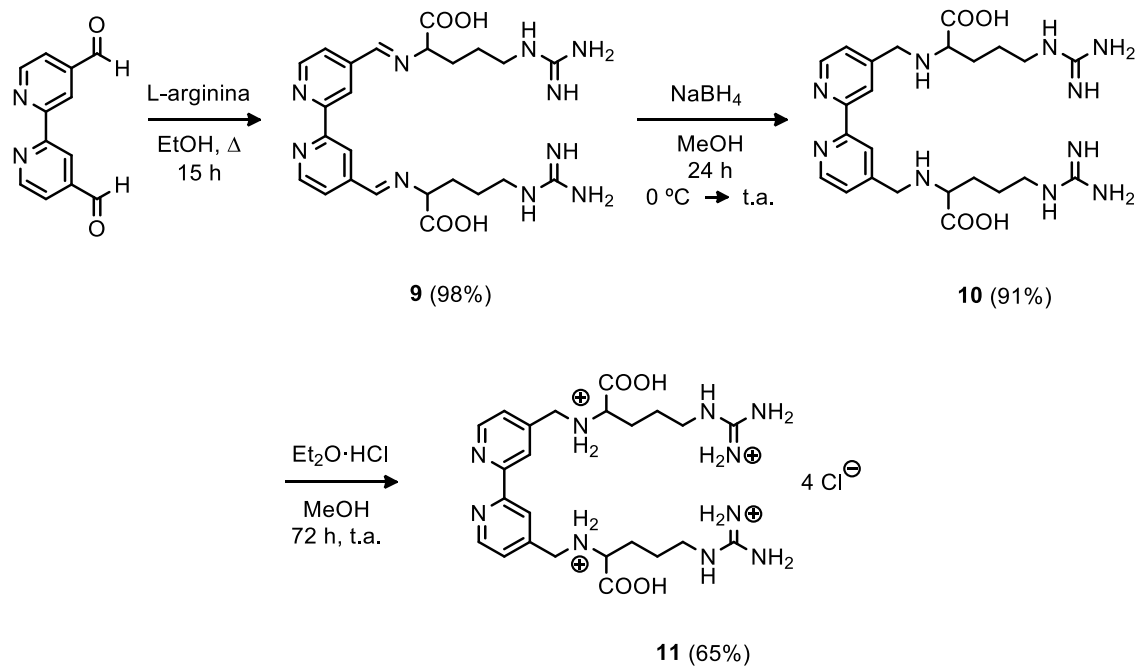


Esquema 3. Síntesis de la 6-aminohex-1-il-bis(terc-butoxicarbonil)guanidina (**8**)

A continuación se procedió a la síntesis de los dos tipos de iminas y su posterior reducción a las aminas secundarias.^[193]

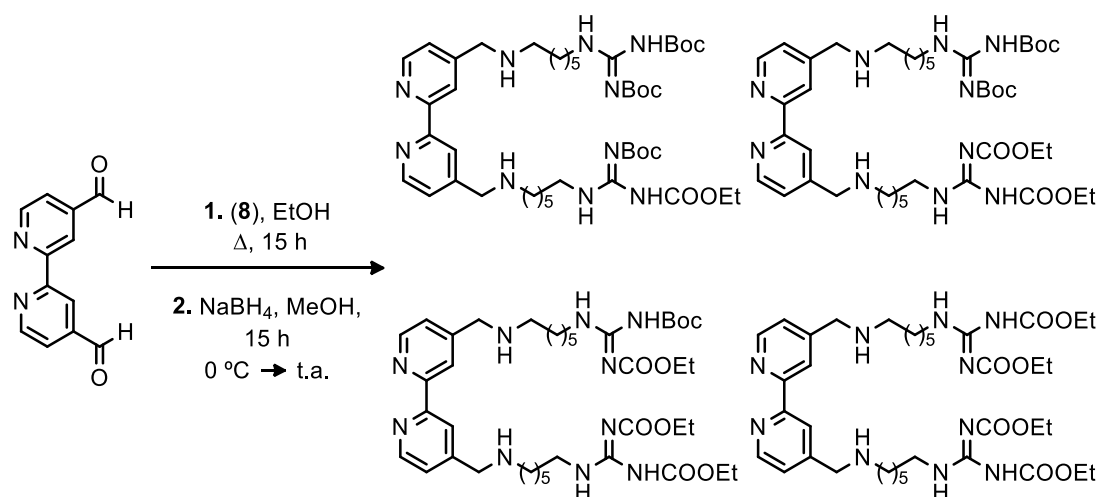
En primer lugar se prepararon los derivados de la 2,2'-bipiridina con el aminoácido L-arginina (esquema 4). La mezcla de la L-arginina y del producto 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxaldehído, en etanol, se calentó a reflujo durante 22 horas y al filtrar la mezcla de reacción, se obtuvo la correspondiente imina **9**. A continuación este producto se suspendió en metanol y se redujo a la amina correspondiente con borohidruro de sodio. Finalmente, el producto deseado **11** se aisló en forma de tetracloruro mediante tratamiento con una disolución de cloruro de hidrógeno en éter dietílico. El rendimiento global de la reacción entre la L-arginina y el 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxaldehído fue del 58%.

¹⁹³ A. F. Abdel-Magid, K. G. Carson, B. D. Harris, C. A. Maryanoff, R. D. Sha, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 3849 - 382



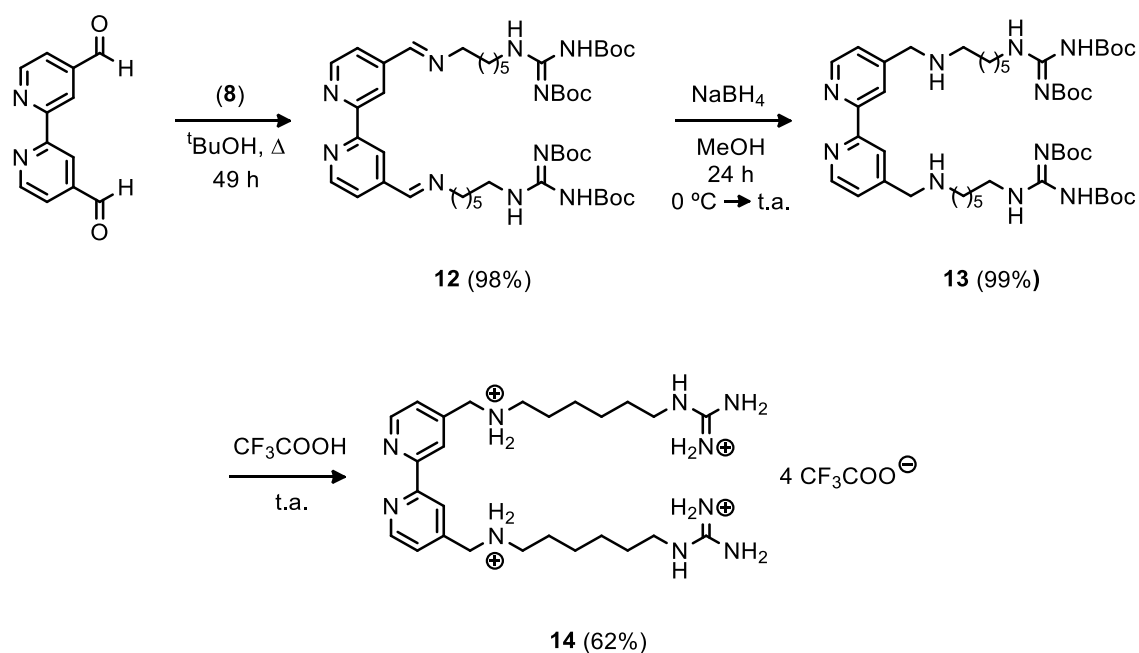
Esquema 4. Síntesis del derivado de 2,2'-bipiridina con L-arginina

Por otra parte, la condensación entre el 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxaldehído y la 6-aminohex-1-il-bis(*terc*-butoxicarbonil)guanidina (**8**) se realizó en las mismas condiciones experimentales que la condensación anterior. Sorprendentemente en este caso no se aisló el producto esperado **12** sino una mezcla de productos de transesterificación. En este caso observamos que los grupos *terc*-butoxi se intercambiaban lentamente durante la condensación por grupos etoxi (esquema 5).



Esquema 5. Mezcla de productos obtenidos durante la reacción entre el compuesto **8** y el 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxaldehído

En vista a los resultados obtenidos, se cambió el disolvente empleado en la primera etapa, sustituyendo etanol por 2-metilpropan-2-ol, con el objetivo de desfavorecer el intercambio de grupos mencionado. El resto de condiciones experimentales se mantuvo igual que para la condensación con la L-arginina.^[193] De esta manera, al desproteger los cuatro grupos protectores Boc del producto **13** empleando ácido trifluoroacético se aisló sin dificultad el producto final **14** como una tetrasal (trifluoracetato) y con un rendimiento global del 61% (esquema 6).

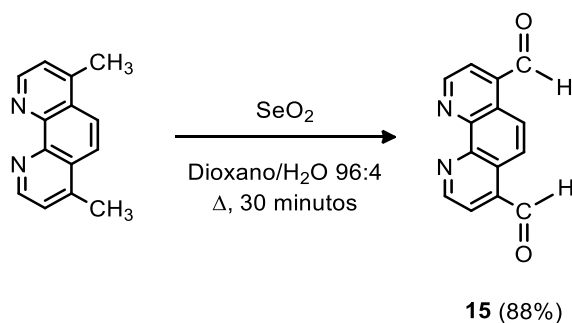
Esquema 6. Síntesis del producto **14**

3.1.2.2 Síntesis de las aminas derivadas de la 1,10-fenantrolina

Por otra parte, y de modo análogo a las reacciones anteriormente descritas, se llevó a cabo la preparación de otras aminas, por condensación entre el α -aminoácido L-arginina o la amina **8** con el 1,10-fenantrolina-4,7-dicarboxaldehído. Para ello, se sintetizó en primer lugar el 1,10-fenantrolina-4,7-dicarboxaldehído (**15**) a partir de la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina comercial por oxidación con dióxido de selenio en una mezcla de disolventes dioxano/agua (96:4), a reflujo, durante 4 horas (Esquema 7).^[194,195] El rendimiento de esta reacción fue del 88%.

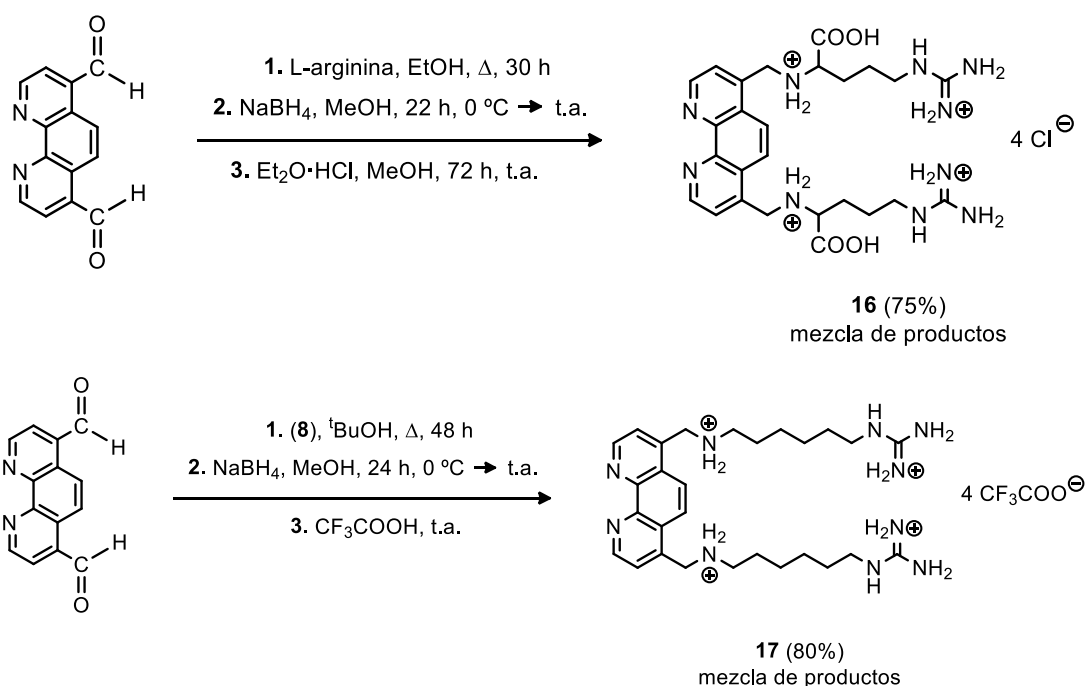
¹⁹⁴ X. Yu, H. Lin, H. Lin, *Trans. Met. Chem.*, **2008**, *33*, 829 – 834

¹⁹⁵ T. Higashi, K. Inami, M. Mochizuki, *J. Heterocyclic Chem.*, **2008**, *45*, 1889 - 1892



Esquema 7. Oxidación de la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina al 1,10-fenantrolina-4,7-dicarboxaldehído (**15**)

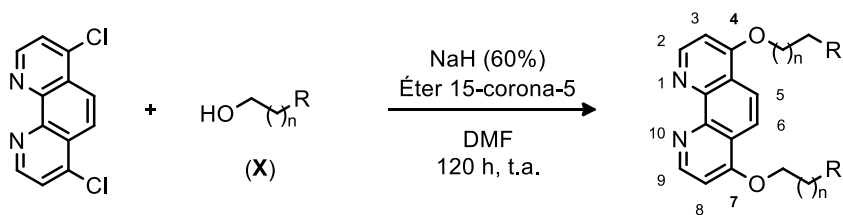
La siguiente secuencia de reacciones se realizó en un único matraz y sin aislar los productos intermedios, por su inestabilidad. Desafortunadamente, no se pudo aislar y purificar, en ninguno de los casos, ni el producto **16** ni el **17**, obteniéndose mezclas de reacción complejas, contaminadas con gran cantidad de sales, lo que complicó la obtención de los productos puros. Distintos intentos de purificación - lavado con distintos disolventes o purificación mediante diálisis - resultaron infructuosos. El porcentaje de los productos finales obtenidos se determinó por ^1H -RMN, y el rendimiento global estimado fue del 75% para el producto **16**, y del 80% para el producto **17** (esquema 8).



Esquema 8. Síntesis de los productos 16 y 17

3.1.3 Preparación de diéteres derivados de la 1,10-fenantrolina

El proceso de síntesis de los diéteres derivados de la 1,10-fenantrolina, sustituida en las posiciones 4 y 7, se abordó por reacción entre la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y un alcohol (**X**), en presencia de hidruro de sodio y éter 15-corona-5, en *N,N*-dimetilformamida anhidra, dando lugar a los ligandos precursores de los complejos metálicos objetivo (esquema 9). En este caso la longitud de la cadena espaciadora entre el átomo de oxígeno y el grupo funcional es variable, con cadenas alquílicas conteniendo dos, tres o cuatro átomos de carbono ($n = 1-3$).



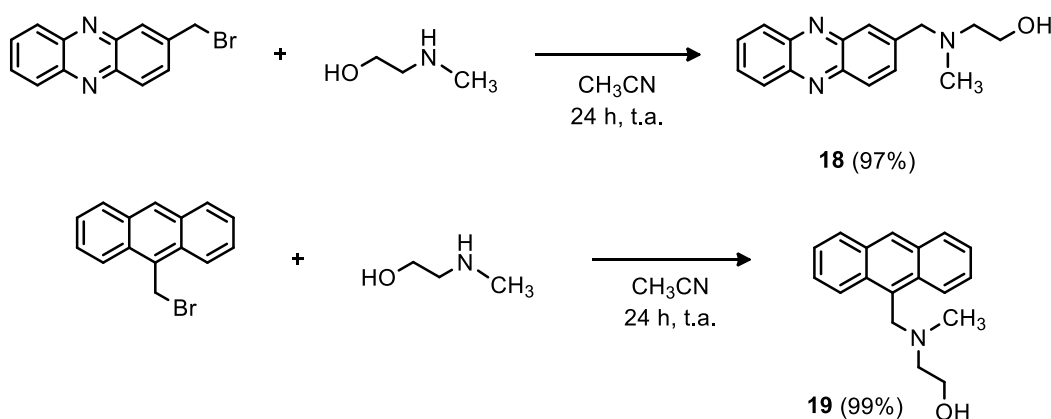
Esquema 9. Síntesis de diéteres derivados de la 1,10- fenantrolina, sustituida en las posiciones 4 y 7; **X** – estructura genérica del alcohol

Para ello, se llevó a cabo en primer lugar a la síntesis de varios tipos de alcoholes precursores (compuestos **X** en el esquema 9). La preparación de estos alcoholes se realizó empleando distintos restos R, donde R representa un sistema aromático, un grupo guanidinio o un heterociclo alifático.

3.1.3.1 Preparación de alcoholes precursores

3.1.3.1.1 Alcoholes sustituidos con sistemas aromáticos

Para la síntesis de los alcoholes incorporando una unidad aromática se eligieron los sistemas de fenazina (**18**) y de antraceno (**19**) (esquema 10).^[196] Los rendimientos de reacción obtenidos en estas reacciones fueron prácticamente cuantitativos para los productos **18** y **19** (97% y 99%, respectivamente).

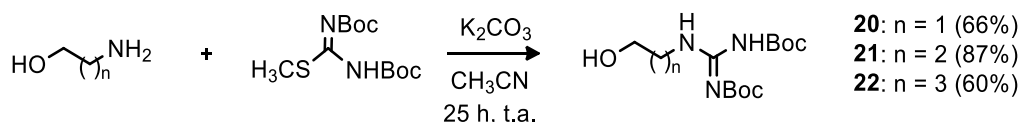


Esquema 10. Síntesis de alcoholes con sustituyentes aromáticos (**18** y **19**)

¹⁹⁶ N. Puri, E. Zamaratski, C. Sund, J. Chattopadhyaya, *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 10409 - 10432

3.1.3.1.2 Alcoholes incorporando un grupo guanidino

Otra familia de alcoholes estudiada incluye en su estructura un grupo guanidino terminal, protegido con dos grupos Boc, tal y como se recoge en el esquema 11. Los productos se obtuvieron por reacción entre un aminoalcohol (2-aminoetan-1-ol, 3-aminopropan-1-ol o 4-aminobutan-1-ol) y 1,3-bis(terc-butoxicarbonil)-2-metilisotiourea, en presencia de K_2CO_3 en acetonitrilo a temperatura ambiente durante 25 horas. Los rendimientos para esta reacción fueron moderados 66% y 60% en el caso de productos **20** y **22**, respectivamente, y elevado (87%) para el producto **21**.^[189]



Esquema 11. Síntesis de alcoholes con el grupo guanidino terminal protegido con grupos Boc

3.1.3.1.3 Alcoholes con heterociclos alifáticos

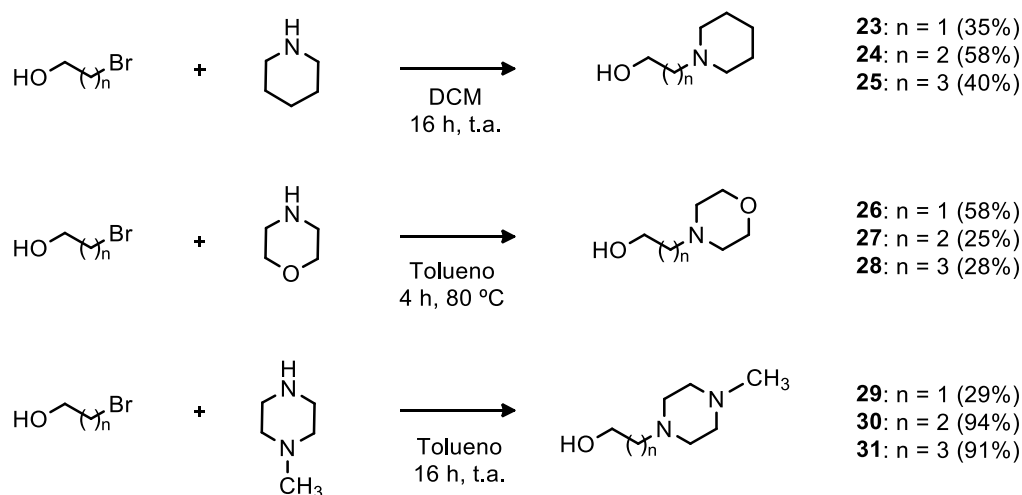
El último grupo de alcoholes sintetizados para la preparación de los éteres incluía la incorporación de sistemas heterocíclicos alifáticos en su estructura. Para llevar a cabo este tipo de reacciones se eligieron las aminas piperidina, morfolina, piperazina y *N*-metilpiperazina.

3.1.3.1.3.1 Alcoholes con anillos de piperidina, morfolina y *N*-metilpiperazina

La síntesis de los alcoholes que contienen el heterociclo de piperidina, morfolina o *N*-metilpiperazina se realizó a partir del alcohol monobromado y el heterociclo en cuestión, siguiendo las procedimientos previamente descritos en la bibliografía.^[197,198] Las condiciones experimentales para estas síntesis y sus rendimientos se recogen en el esquema 12.

¹⁹⁷ A. J. Davenport, D. J. Hallett, F. Marlin, M. Gemkow, *WO 2009121812 A1*, **2009**

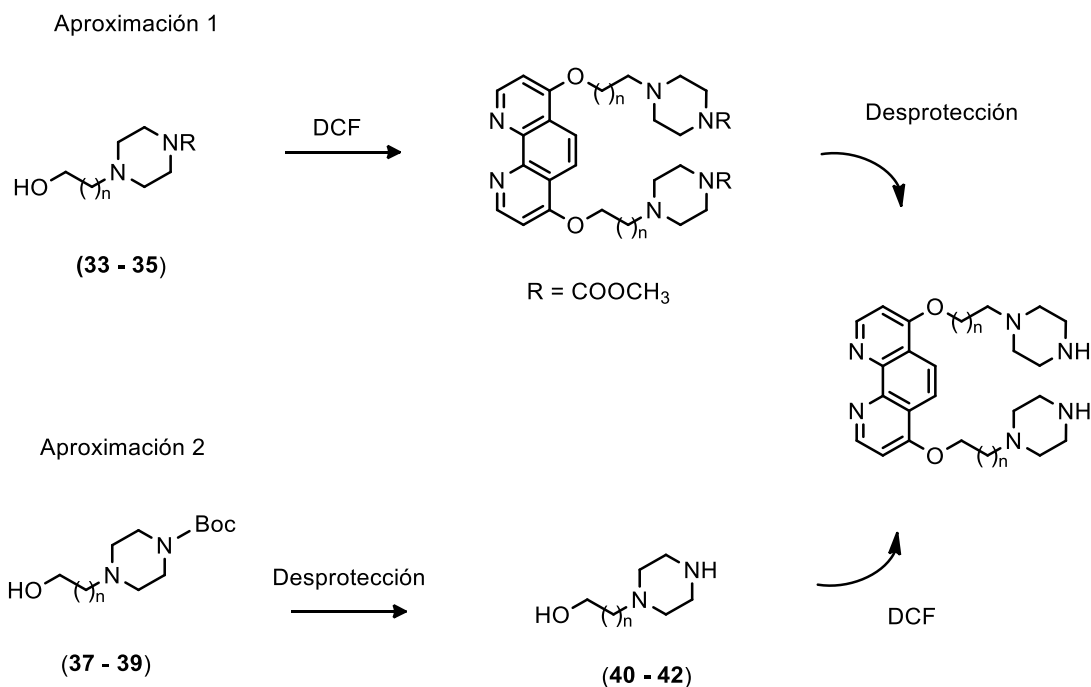
¹⁹⁸ J. Ehlert, T. Herz, R. Krauss, M. Kubbutat, M. Lang, W. Saeb, C. Schaechtele, S. Tasler, F. Totzke, U. Zirrgiebel, *EP 1746096*, **2007**



Esquema 12. Síntesis de alcoholes con anillos de piperidina (**23–25**), morfolina (**26–28**) o *N*-metilpiperazina (**29–31**)

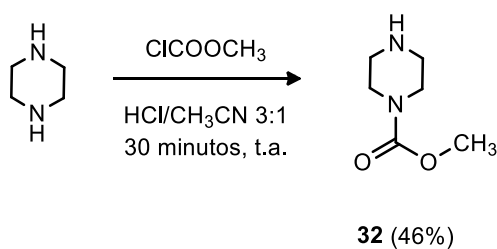
3.1.3.1.3.2 Alcoholes de piperazina y metoxycarbonilpiperazina

Para la preparación de los éteres de 1,10-fenantrolina que contienen en su estructura el heterociclo alifático piperazina, se emplearon dos estrategias distintas. Primero, se abordó la síntesis del alcohol, con un grupo amino de la piperazina previamente protegido como metil éster, para llevar a cabo luego la preparación de los ligandos con la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina, y efectuar finalmente la desprotección del grupo amino de la piperazina (esquema 13, aproximación 1). Por otra parte, se estudió la viabilidad de desproteger primero el nitrógeno de la piperazina, en este caso protegido con Boc, y preparar el ligando deseado por reacción con la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina (DCF) (esquema 13, aproximación 2).



Esquema 13. Dos aproximaciones a la síntesis de derivados de 1,10-fenantrolina incorporando piperazinas en sus cadenas laterales; DCF = 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina

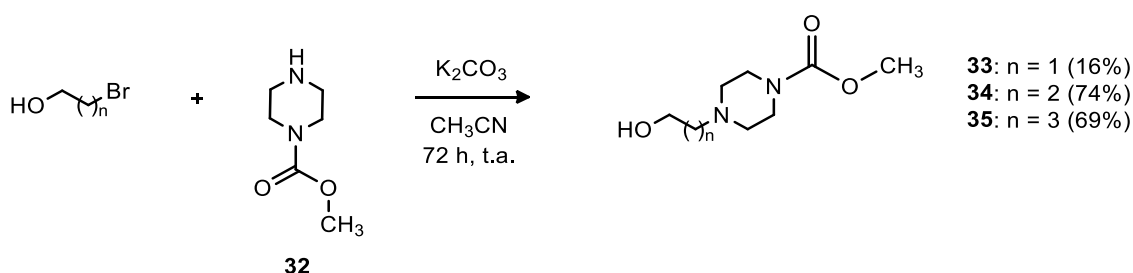
En lo que respecta a la primera ruta, para la síntesis de los alcoholes con piperazina (**33** – **35**), se llevó a cabo la preparación del metil éster del ácido piperazina-1-carboxílico (compuesto **32**),^[199] tal y como se muestra en el esquema 14. El rendimiento obtenido del producto **32** fue del 46%.



Esquema 14. Síntesis del metil éster del ácido piperazina-1-carboxílico (**32**)

¹⁹⁹ A. G. Taveras, C. J. Aki, R. W. Bond, C. Jianping, M. Dwyer, J. A. Ferreira, C. Jianhua, Y. Younong, J. J. Baldwin, K. Bernd, L. Ge, J. R. Merritt, K. H. Nelson, L. Rokosz, L. Menos, *US2004/0097547 A1*, **2004**

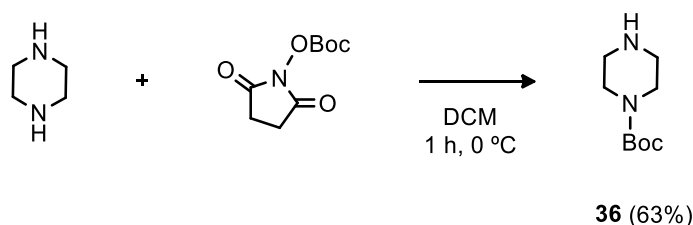
Con el producto **32** así preparado, a continuación se abordó la síntesis de los alcoholes **33**, **34** y **35** deseados, tal y como se muestra en el esquema 15.^[200]



Esquema 15. Síntesis de los alcoholes **33** - **35**

Los rendimientos de los alcoholes obtenidos para la aproximación 1 variaron desde el 16%, en el caso de derivado de etanol, hasta un 74 y un 69% para los derivados propanol y butanol, respectivamente.

En cuanto a la segunda aproximación, la primera etapa de la síntesis consistió en la preparación de la piperazina monoprottegida con Boc (producto **36**), tal y como se recoge en el esquema 16.^[201]



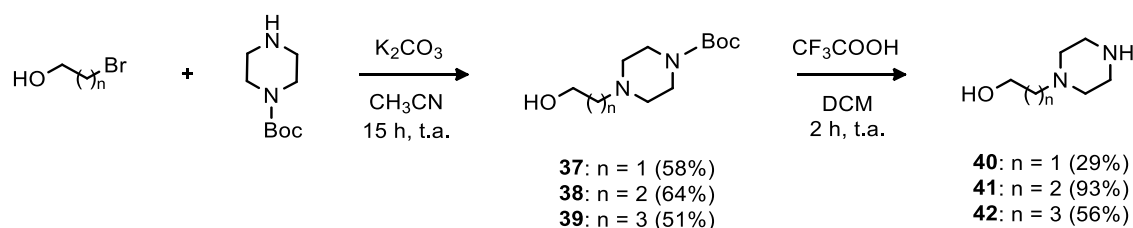
Esquema 16. Síntesis del *tert*-butil éster del ácido piperazina-1-carboxílico

Una vez protegida la piperazina se prepararon los correspondientes alcoholes intermedios, los compuestos **37** - **39**, que a continuación se

²⁰⁰ S. Li, H. Wang, J. Xiao, X. Zhang, L. Wang, Z. Zheng, W. Zhong, Y. Xie, X. Li, X. Zhou, G. Zhao, X. Wang, *WO 2012016510*, **2012**

²⁰¹ P. E. Thompson, J.-A. Pinson, I. G. Jennings, Z. Zheng, *WO2014005182 A1*, **2014**

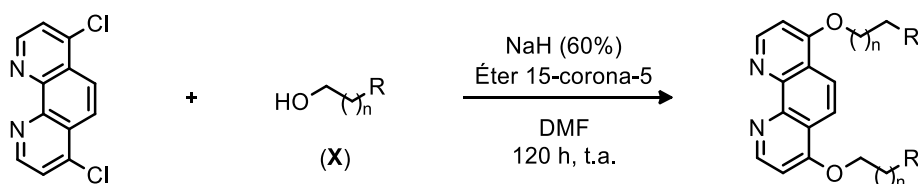
desprotegieron con ácido trifluoroacético, dando lugar a los alcoholes **40** - **42** finales (esquema 17).^[202]



Esquema 17. Preparación de los alcoholes que contienen en su estructura el heterociclo de piperazina monosustituida (**40** - **42**)

3.1.3.2 Preparación de los éteres derivados de la 1,10-fenantrolina

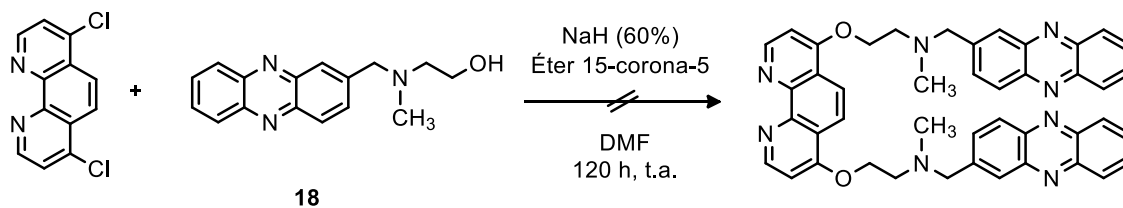
A partir de los alcoholes preparados y descritos en los apartados anteriores, se procedió a la síntesis de los diéteres de la 1,10-fenantrolina, sustituida en las posiciones 4 y 7 que constituirán los ligandos finales a partir de los cuales se sintetizarán los complejos metálicos de Cu(II). La síntesis de estos ligandos se abordó mediante una reacción de sustitución nucleófila entre la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina comercial y el alcohol correspondiente (**X**), en presencia de hidruro de sodio y éter 15-corona-5, empleando *N,N*-dimetilformamida anhidra como disolvente y llevando a cabo la reacción a temperatura ambiente por un tiempo prolongado (esquema 18). Los resultados obtenidos fueron dispares, para los distintos tipos de alcoholes estudiados, como se discute a continuación.



Esquema 18. Síntesis de diéteres de la 1,10-fenantrolina sustituida en las posiciones 4 y 7; **X** - estructura general de alcoholes de partida

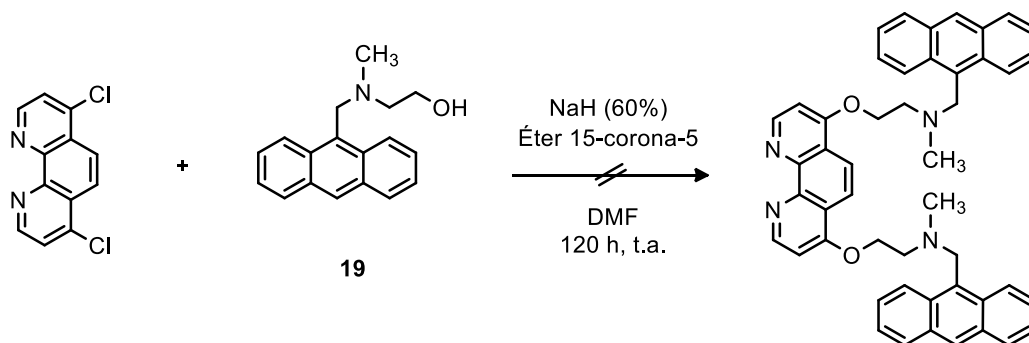
3.1.3.2.1 Ligandos con sustituyentes aromáticos en las cadenas laterales

En el primero de los casos, que implica la reacción entre el alcohol derivado de la fenazina **18** y la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina (esquema 19), no se obtuvieron los resultados esperados. No sólo no se detectó la formación del producto deseado sino que se obtuvo una mezcla de reacción muy compleja de la que no se pudieron aislar ni identificar sus numerosos componentes.



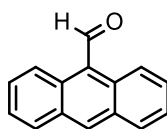
Esquema 19. Reacción infructuosa entre el alcohol **18** y la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina

Del mismo modo, para el caso del alcohol **19**, que incorpora en su estructura una unidad de antraceno, tampoco se observó la formación del producto de dialquilación deseado (esquema 20).



Esquema 20. Reacción infructuosa entre el alcohol **19** y la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina

Además, para esta reacción en lugar de obtener el producto deseado la reacción condujo a la obtención del producto **43**, el antraceno-9-carboxaldehído (figura 70), con un rendimiento del 99%.

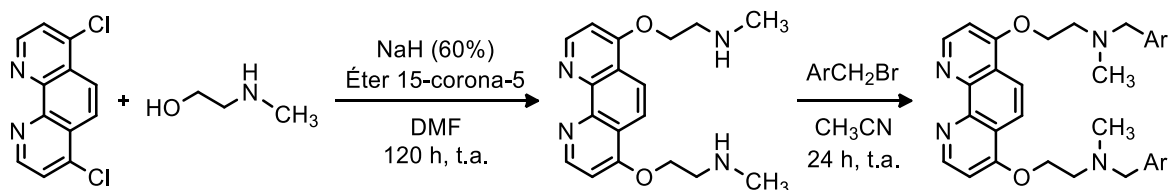


43

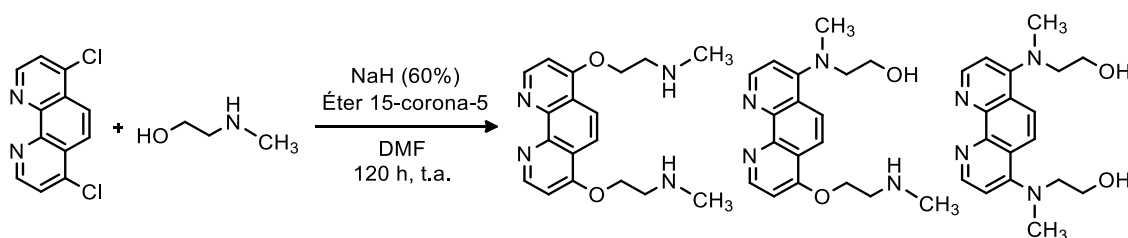
Figura 70. Antraceno-9-carboxaldehido

Ante el fracaso obtenido en los casos anteriores, nos planteamos abordar la obtención de estos productos modificando la ruta de síntesis. El primer planteamiento consistió en llevar a cabo la reacción entre la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y el 2-(*N*-metilamino)etan-1-ol, obteniendo así el diamino derivado de la fenantrolina para posteriormente hacerlo reaccionar con el bromometil derivado del antraceno o de la fenazina (esquema 21, aproximación). Sin embargo, también en esta aproximación los resultados fueron decepcionantes, aunque no del todo inesperados: la reacción entre la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y el alcohol condujo, muy probablemente, tal y como demostró la realización de estudios de RMN 2D, a una mezcla de productos como consecuencia del ataque nucleófilo por parte del nitrógeno del grupo amino, además del producto deseado, tal y como se recoge en el esquema 21.

Aproximación



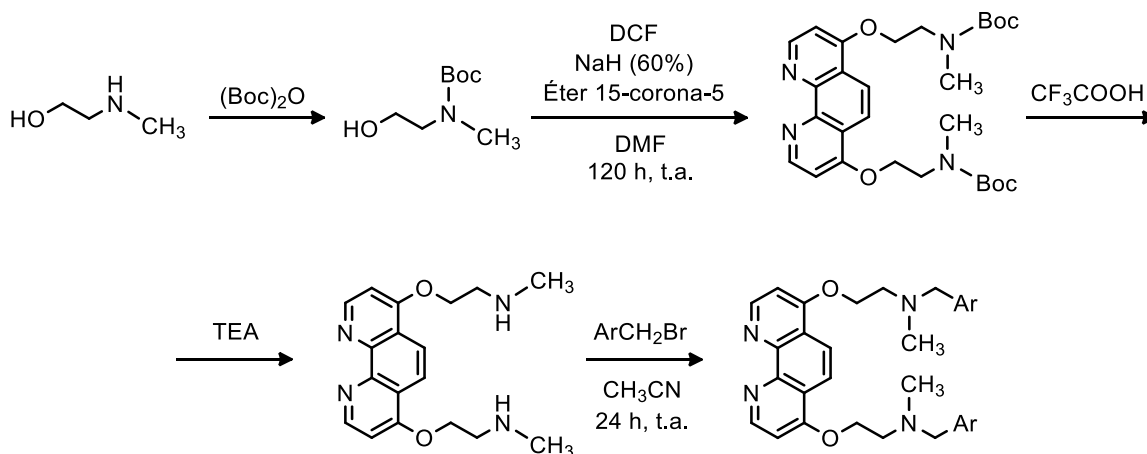
Resultado obtenido



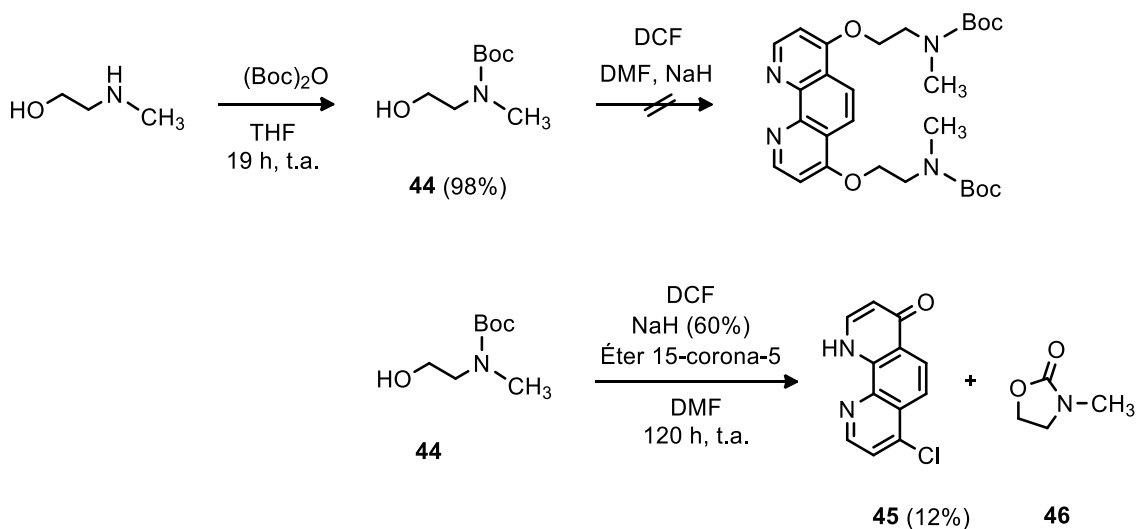
Esquema 21. Nuevo planteamiento de síntesis y resultados obtenidos para la obtención de diéteres incorporando sistemas aromáticos; Ar = antraceno-9-il o fenazina-2-il

Otro planteamiento que utilizamos para la obtención de estos productos, basado en el resultado anterior, supuso la misma secuencia sintética pero a partir de los derivados con el grupo amino convenientemente protegido para evitar la formación de los productos resultantes de la *N*-alquilación (esquema 22).

Aproximación



Resultado obtenido



Esquema 22. Segundo planteamiento y resultados obtenidos para la preparación de ligandos con las unidades de antraceno o fenazina incorporadas; $(\text{Boc})_2\text{O}$ – Di-(*tert*-butil)dicarbonato; DCF – 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina

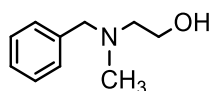
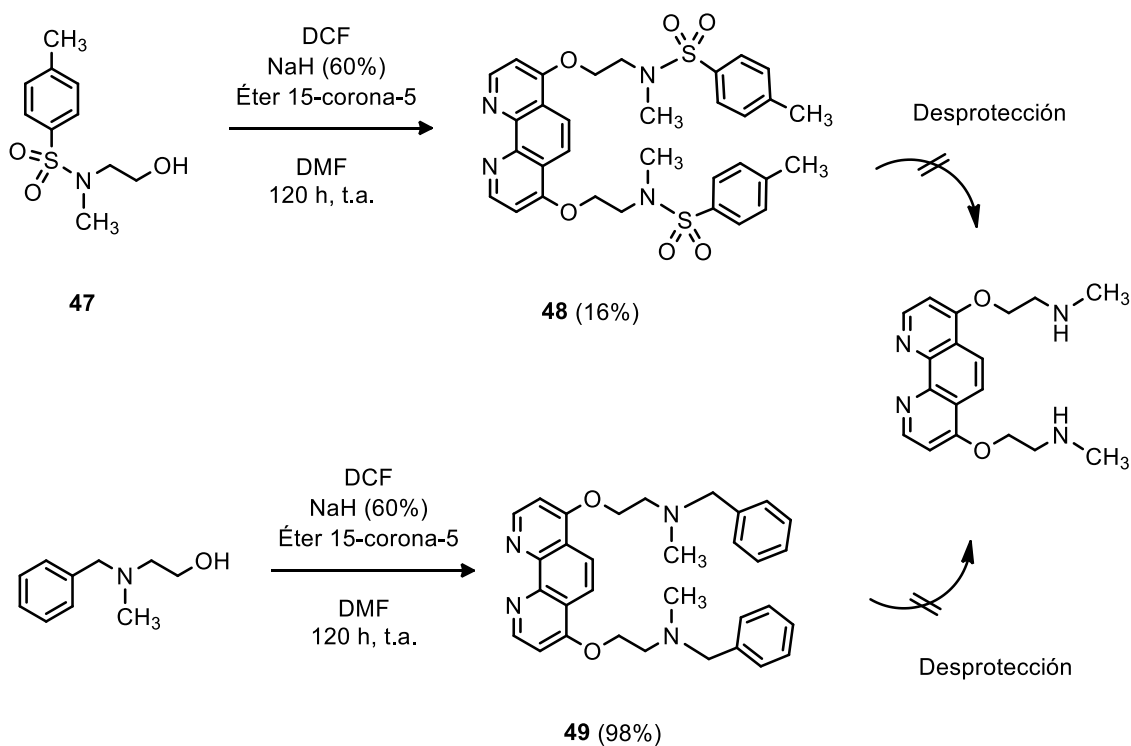


Figura 71. 2-(N-bencil-N-metilamino)etan-1-ol

Cuando se llevaron a cabo las reacciones de dialquilación los resultados fueron dispares. En el caso del producto **48**, este se obtuvo con un rendimiento del 16% mientras que para el derivado **49** la reacción fue prácticamente cuantitativa (98%) (esquema 24).

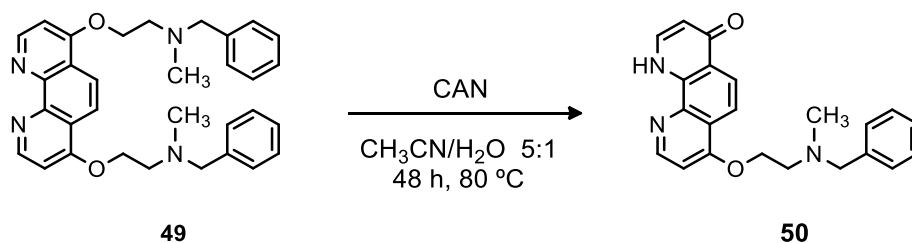


Esquema 24. Preparación de **48** y **49**, e intentos de desprotección;

DCF – 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina

Sin embargo, cuando se intentó llevar a cabo la desprotección de los derivados **48** y **49**, en ninguno de los casos se pudo obtener el producto deseado

puro. El derivado **48** se intentó desproteger con Red-Al,^[205,206] en tolueno seco a reflujo, pero se obtuvo una mezcla del producto deseado y de productos de descomposición. Por otra parte, para el producto **49** se intentó desproteger el grupo bencilo de distintas maneras: por reacción con hidrazina, Pd/C (10%) en etanol a reflujo; por reacción con CAN^[207] ((NH₄)₂Ce(NO₃)₆) a temperatura ambiente, o a 80 °C (esquema 25) o por tratamiento con NIS^[208] (*N*-yodosuccinimida), en diclorometano y a temperatura ambiente. En ninguno de los intentos llevados a cabo se observó producto resultado de la desprotección del grupo bencilo. En el ensayo de desprotección con CAN fue posible aislar el producto **50**, como resultado de la descomposición del producto de partida (esquema 25).



Esquema 25. Descomposición del producto **49**

A la vista de los resultados anteriores, y llegados a este punto, se decidió abandonar los intentos de obtener este tipo de ligandos de 1,10-fenantrolina enlazada a sistemas aromáticos. Sería interesante, sin embargo, en un trabajo futuro, revisar de nuevo este tipo de reacciones y abordar condiciones de síntesis alternativas. Para los últimos tipos de compuestos, por ejemplo, se podría abordar la desprotección del grupo bencilo mediante hidrogenación en presencia de catalizadores de paladio(II) o con HBr del 48%.^[189]

²⁰⁵ H. O. House, D. G. Koepsell, W. J. Campbell, *J. Org. Chem.*, **1972**, *37*, 1003 - 1011

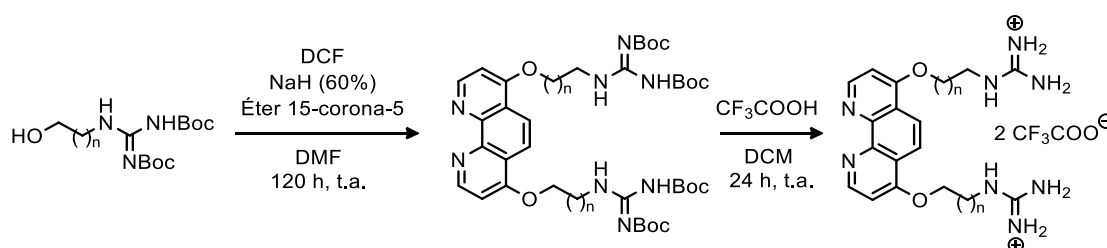
²⁰⁶ D. F. Taber, T. D. Neubert, A. L. Rheingold, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 12416 - 12417

²⁰⁷ S. D. Bull, S. G. Davies, P. M. Kelly, M. Gianotti, A. D. Smith, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2001**, 3106 - 3111

²⁰⁸ E. J. Grayson, B. G. Davis, *Org. Lett.*, **2005**, *7*, 2361 - 2364

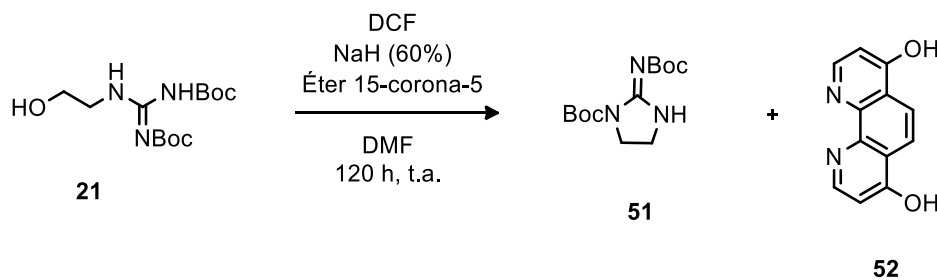
3.1.3.2.2 Ligandos con grupos guanidinio terminales

Otra familia de ligandos estudiada es la constituida por productos derivados de la 1,10-fenantrolina, enlazada a cadenas alquílicas que contienen grupos guanidinio terminales. Para abordar la síntesis de estos compuestos, en primer lugar se prepararon los alcoholes, con cadenas alquílicas de distinta longitud unidas a un grupo guanidino protegido, tal y como se describió en un apartado anterior. A partir de los alcoholes se propuso la preparación de los correspondientes ligandos siguiendo el procedimiento sintético recogido en el esquema 26.



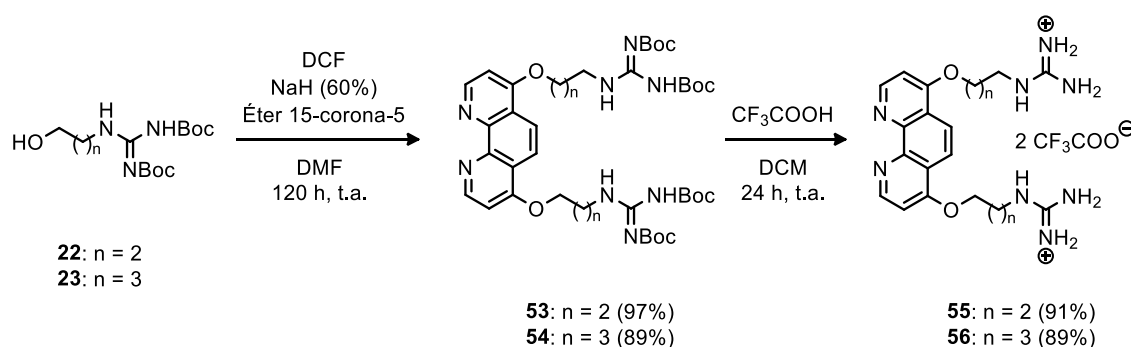
Esquema 26. Síntesis de los diéteres de la 1,10-fenantrolina que incorporan en sus cadenas laterales grupos guanidinio

A partir del alcohol **21** (esquema 27) no se pudo obtener el ligando requerido por esta vía, porque el alcóxido que se origina en el medio de la reacción experimentó una reacción de ciclación dando lugar a un compuesto cíclico de 5 eslabones, el 2-[(*tert*-butoxicarbonil)imino]imidazolidina-1-carboxilato de *tert*-butilo (compuesto **51**). Por otra parte, al elaborar la reacción en el medio acuoso se aisló, además del producto **51**, un producto resultante de la hidrólisis de la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina, tal y como se representa en el esquema 27.



Esquema 27. Productos obtenidos a partir del alcohol **21**

Sin embargo, en el caso de los alcoholes **22** y **23**, en los que la cadena alquílica tiene una longitud correspondiente a 3 y 4 átomos de carbono, respectivamente, sí fue posible obtener los ligandos deseados.^[209] Las reacciones para ambos derivados transcurrieron con elevados rendimientos, tal y como se representa en el esquema 28. Se consiguió obtener los ligandos deseados (esquema 28) con el rendimiento global, desde el producto comercial, de un 77% para el ligando **55** y de un 48% para el compuesto **56**.



Esquema 28. Preparación de diéteres de la 1,10-fenantrolina que contienen en su cadena lateral grupos guanidinio

3.1.3.2.3 Ligandos con heterociclos alifáticos como grupos terminales

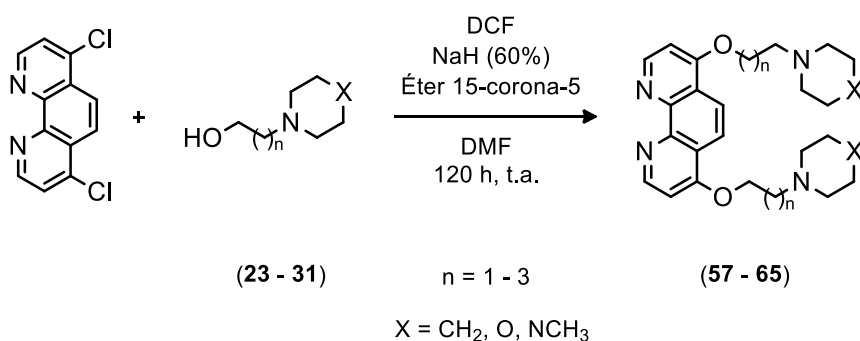
La siguiente familia de compuestos estudiada, y la más numerosa, es la constituida por éteres derivados de la 1,10-fenantrolina conteniendo heterociclos alifáticos como grupos terminales. Los heterociclos elegidos fueron la piperidina, la morfolina, la piperazina y la *N*-metilpiperazina.

3.1.3.2.3.1 Ligandos con piperidina, morfolina o *N*-metilpiperazina en las cadenas laterales

La síntesis de estos derivados se realizó a partir de los alcoholes previamente preparados (**23** - **31**), empleando un procedimiento análogo al utilizado con las familias anteriores, por reacción de los alcoholes con la 4,7-

²⁰⁹ A. S. Ripka, R. S. Bohacek, D. H. Rich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, *8*, 357 - 360

dicloro-1,10-fenantrolina, en presencia de hidruro de sodio y éter 15-corona-5, en DMF anhidra y a temperatura ambiente (esquema 29).



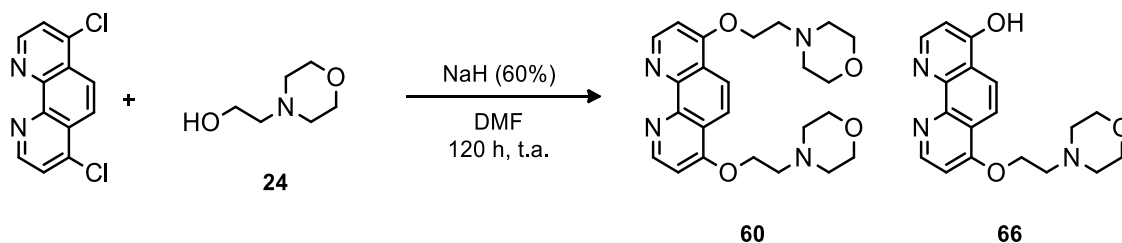
Esquema 29. Síntesis de ligandos con piperidina, morfolina o N-metilpiperazina en las cadenas laterales

Los rendimientos para la obtención de los ligandos obtenidos en esta etapa sintética, generalmente elevados, así como los rendimientos globales de la ruta sintética (a partir de los productos comerciales) se recogen en la tabla 1.

Tabla 1.	X	n	Rendimiento	Producto (Rdto. global)
Piperidina	CH ₂	1	68%	57 (24%)
	CH ₂	2	76%	58 (44%)
	CH ₂	3	80%	59 (32%)
Morfolina	O	1	80%	60 (46%)
	O	2	76%	61 (19%)
	O	3	68%	62 (19%)
N-metilpiperazina	CH ₃ N	1	77%	63 (22%)
	CH ₃ N	2	76%	64 (71%)
	CH ₃ N	3	69%	65 (63%)

Tabla 1. Rendimientos de la síntesis de ligandos con piperidina, morfolina o N-metilpiperazina en las cadenas laterales

La síntesis del compuesto **60** (espaciador etilénico y morfolina, tabla 1) se abordó, adicionalmente, en las mismas condiciones que están descritas en el esquema 29, pero en ausencia de éter 15-corona-5. Este ensayo, así como la experiencia acumulada en el equipo de investigación en este tipo de reacciones, demostraron que la presencia del éter 15-corona-5 en el medio de reacción, por su función de quelación del catión de sodio en el hidruro de sodio, juega un papel determinante. Como se puede observar en el esquema 30, la reacción en ausencia de éter corona condujo a la obtención de una mezcla de dos productos, el producto de dialquilación (**60**) y el de monoalquilación-hidrólisis (**66**). Estos productos se pudieron aislar y separar por extracción líquido-líquido, aprovechando que el grupo hidroxilo del producto **66** tiene cierto carácter ácido: una extracción con diclorometano y tratamiento con una disolución acuosa de hidróxido de sodio favorece la solubilidad de **66** en la fase acuosa, mientras el producto **60** se aísla a partir de la fase orgánica. A efectos comparativos, el rendimiento de la reacción de preparación del compuesto **60**, en ausencia de éter 15-corona-5 es del 58%, frente al 80% en presencia del mismo.



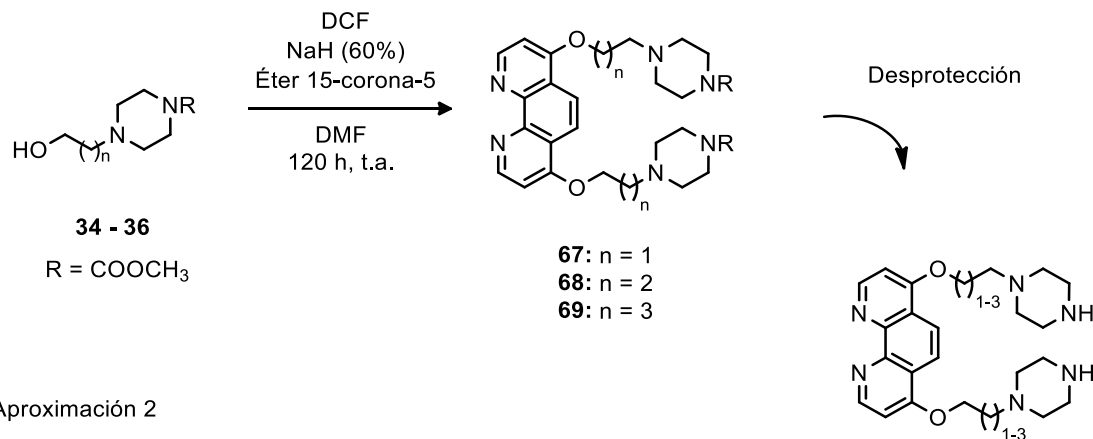
Esquema 30. Ensayo de síntesis de diéteres de la 1,10-fenantrolina en ausencia de éter 15-corona-5

3.1.3.2.2 Ligandos con piperazina en las cadenas laterales

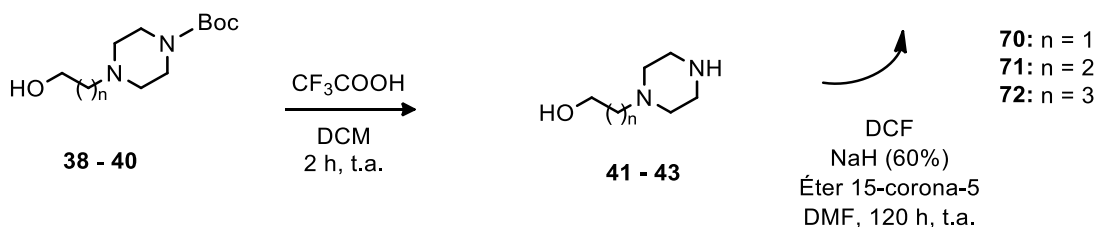
Como se ha mencionado anteriormente, para la síntesis de ligandos que contienen unidades de piperazina en sus cadenas laterales se emplearon dos estrategias de síntesis – primero, la síntesis del alcohol con el grupo amino de la piperazina protegido (**34** - **36**), la preparación del ligando con la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y la posterior desprotección del grupo amino de la piperazina (esquema 31, aproximación 1); y segundo, la síntesis de alcoholes con grupo

amino no protegido (**41** - **43**) y la preparación posterior del ligando deseado (esquema 31, aproximación 2).

Aproximación 1



Aproximación 2



Esquema 31. Síntesis de ligandos con piperazina en las cadenas laterales (**70** - **72**)

En la aproximación 1 se optó por un grupo protector distinto al grupo Boc, el grupo metoxicarbonilo, ya que se precisa evitar la formación de productos secundarios. Por otro lado, en la aproximación 2 se empleó el grupo protector Boc, ya que en este caso se realizaba la sustitución nucleófila ya sin el grupo protector, y no hay riesgo de formación de productos secundarios por ciclación. Afortunadamente, cuando se emplearon las condiciones elegidas en la segunda aproximación, se obtuvieron en todos los casos productos de *O*-alquilación, y no se detectaron los productos resultantes de la *N*-alquilación.

Los rendimientos en la preparación de los ligandos (**70-72**), empleando las dos vías sintéticas planteadas, así como los rendimientos globales se recogen en la tabla 2.

Tabla 2.	Producto (Rdto.)	Producto (Rdto.)	Producto (Rdto.)	Producto (Rdto. global)
Aproximación 1	34 (16%)	67 (88%)	70 (20%)	70 (1%)
	35 (74%)	68 (82%)	71 (19%)	71 (5%)
	36 (69%)	69 (85%)	72 (20%)	72 (5%)
Aproximación 2	38 (58%)	41 (29%)	70 (78%)	70 (8%)
	39 (64%)	42 (93%)	71 (76%)	71 (28%)
	40 (51%)	43 (56%)	72 (78%)	72 (14%)

Tabla 2. Rendimientos de la síntesis de ligandos con piperazina en las cadenas laterales obtenidos por dos métodos de síntesis

Para la etapa de desprotección, en la primera aproximación sintética, se realizaron varios ensayos:

- A) ácido clorhídrico 1%, metanol, a 70 °C, 4 horas^[210]
- B) ácido clorhídrico 37%, reflujo, 12 horas^[210]
- C) hidrazina, hidróxido de potasio en etanol, reflujo, 24 horas^[211]
- D) hidróxido de bario en agua-etanol 1:1, a 80 °C, 24 horas^[212]

Empleando las condiciones ácidas (A y B) no se observó en la mezcla de reacción el producto deseado y, en ambos casos, se pudo recuperar el producto de partida. Utilizando las condiciones C se obtuvieron productos de descomposición, en lugar del producto deseado. Las mejores condiciones experimentales fueron las designadas como D (hidróxido de bario en una mezcla de agua-etanol 1:1 a 80 °C, 24 horas). La única desventaja de esta reacción ha sido la dificultad de aislar los ligandos deseados (**70** – **72**) puros, y por eso los rendimientos obtenidos por esta vía de síntesis no superan el 20%. Los rendimientos globales de los productos **70** – **72** obtenidos por la aproximación 1

²¹⁰ D. Nemeckova, B. Andelova, P. Pazdera, *International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, **2009**

²¹¹ T. Shono, Y. Matsumura, K. Uchida, K. Tsubata, A. Makino, *J. Org. Chem.*, **1984**, *49*, 300 – 304

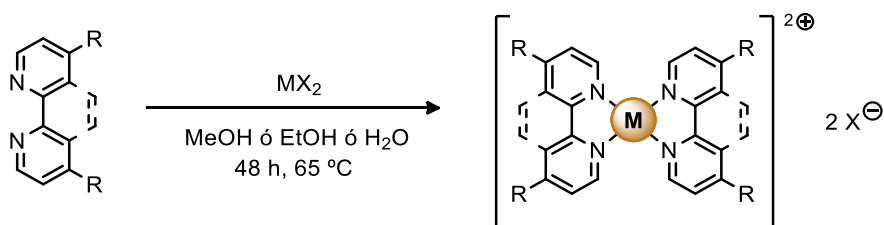
²¹² D. Nemeckova, Y. S. Mary, C. Y. Panickerc, H. T. Vargheseb, C. Van Alsenoyd, M. Prochazkova, P. Pazdera, *J. Mol. Struct.*, **2015**, *1094*, 210 - 236

son, en todos los casos, bajos (20% en la etapa final y en el intervalo 1 – 5% para el global de la síntesis).

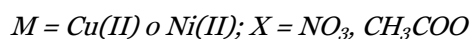
Sin embargo, la aplicación de la segunda aproximación ha permitido la obtención de todos los productos deseados, de manera eficaz en cuanto pasos de reacción, y con rendimientos globales de entre el 8 y el 28%.

3.1.4 Preparación de los complejos de coordinación de Cu(II) y Ni(II)

Como etapa final en la preparación de ligandos de ADN cuádruple-G, y a partir de los derivados descritos en los apartados anteriores, se llevó a cabo la síntesis de una serie de complejos metálicos de cobre(II) o de níquel(II). El procedimiento general para la obtención de estos complejos metálicos es el siguiente: reacción entre 2 equivalentes molares de ligando y 1 equivalente de la correspondiente sal metálica, a partir de las especies perfectamente disueltas en metanol, etanol o agua, según el caso. En la mayoría de los casos los reactivos se mantienen con agitación a 65 °C, durante 48 horas (esquema 32).



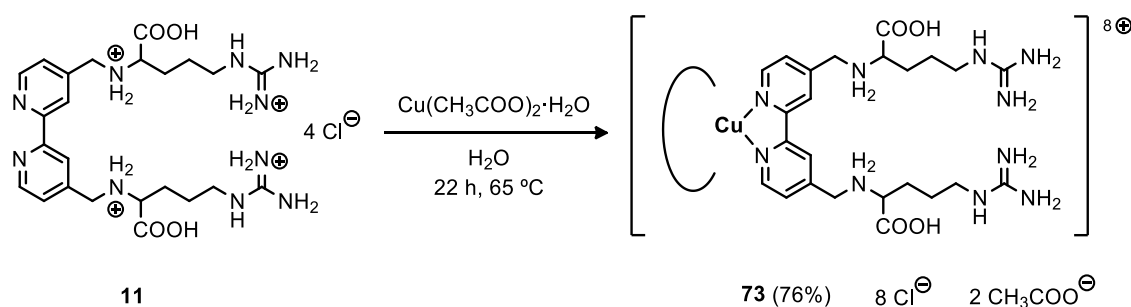
Esquema 32. Esquema genérico para la preparación de los complejos metálicos;



3.1.4.1 Complejos derivados de la 2,2'-bipiridina

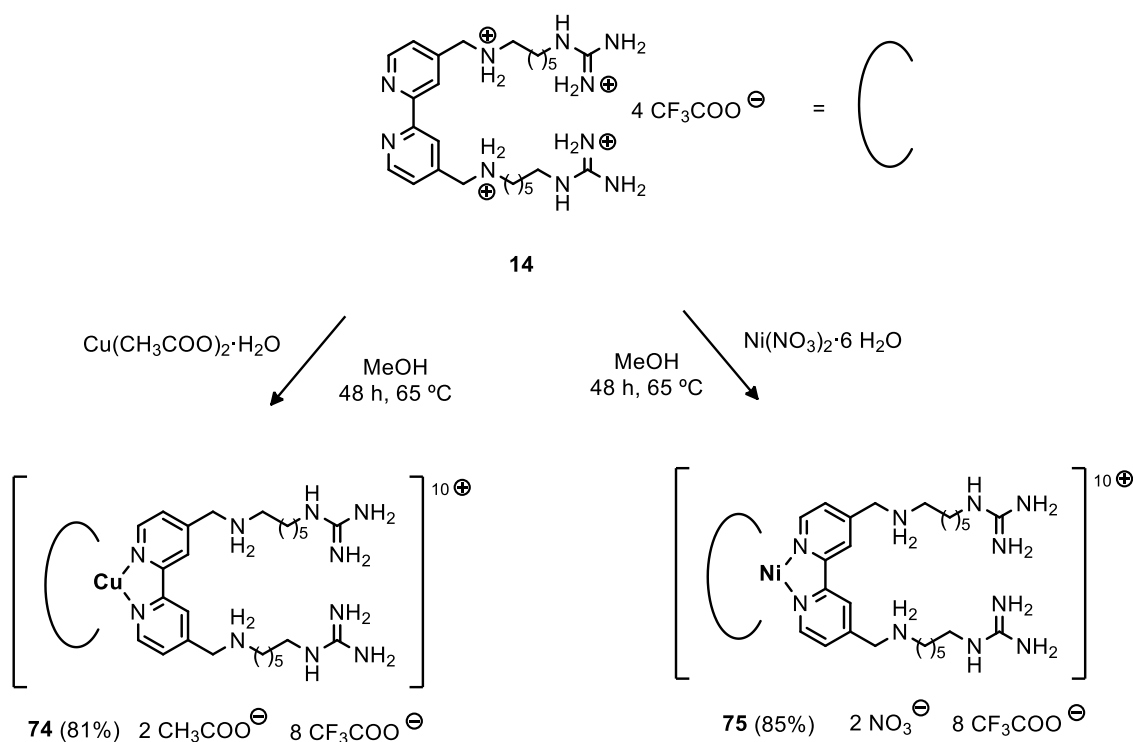
Los complejos **73**, **74** y **75**, todos ellos derivados de la 2,2'-bipiridina, se prepararon a partir de los ligandos **11** o **14**. Por motivos de solubilidad del ligando, el complejo **73** se preparó en agua y ha representado el único ejemplo en el que el tiempo de reacción es inferior a 48 horas. Después de 22 horas de

calentamiento a 65 °C y por precipitación con éter frío se obtuvo el complejo **73** como un sólido verde (esquema 33).



Esquema 33. Preparación del complejo **73**; C = ligando

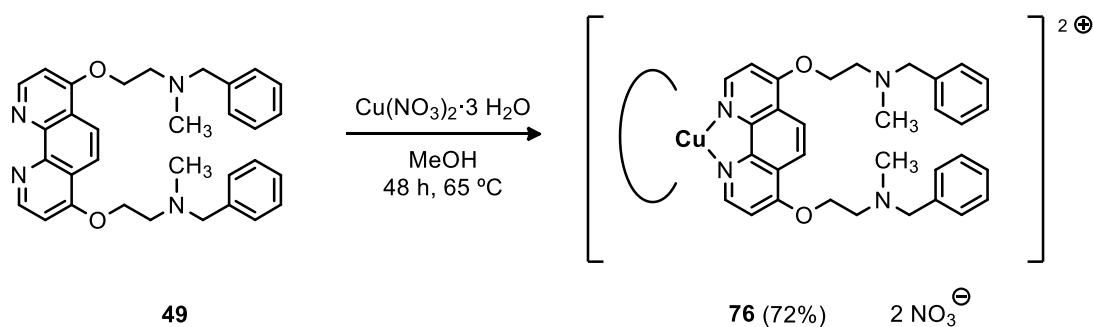
Por otra parte, los complejos **74** y **75** fueron preparados empleando el tiempo de reacción estándar – 48 horas en metanol a 65 °C. A partir del ligando **14** se obtuvo el complejo **74**, de color verde brillante, y el complejo **75** con aspecto de arena brillante. Los rendimientos en la etapa final de complejación para todos los complejos (**73** – **75**) fueron elevados y oscilaron entre el 76 y el 85%.



Esquema 33. Preparación del complejos **74** y **75**; C = ligando

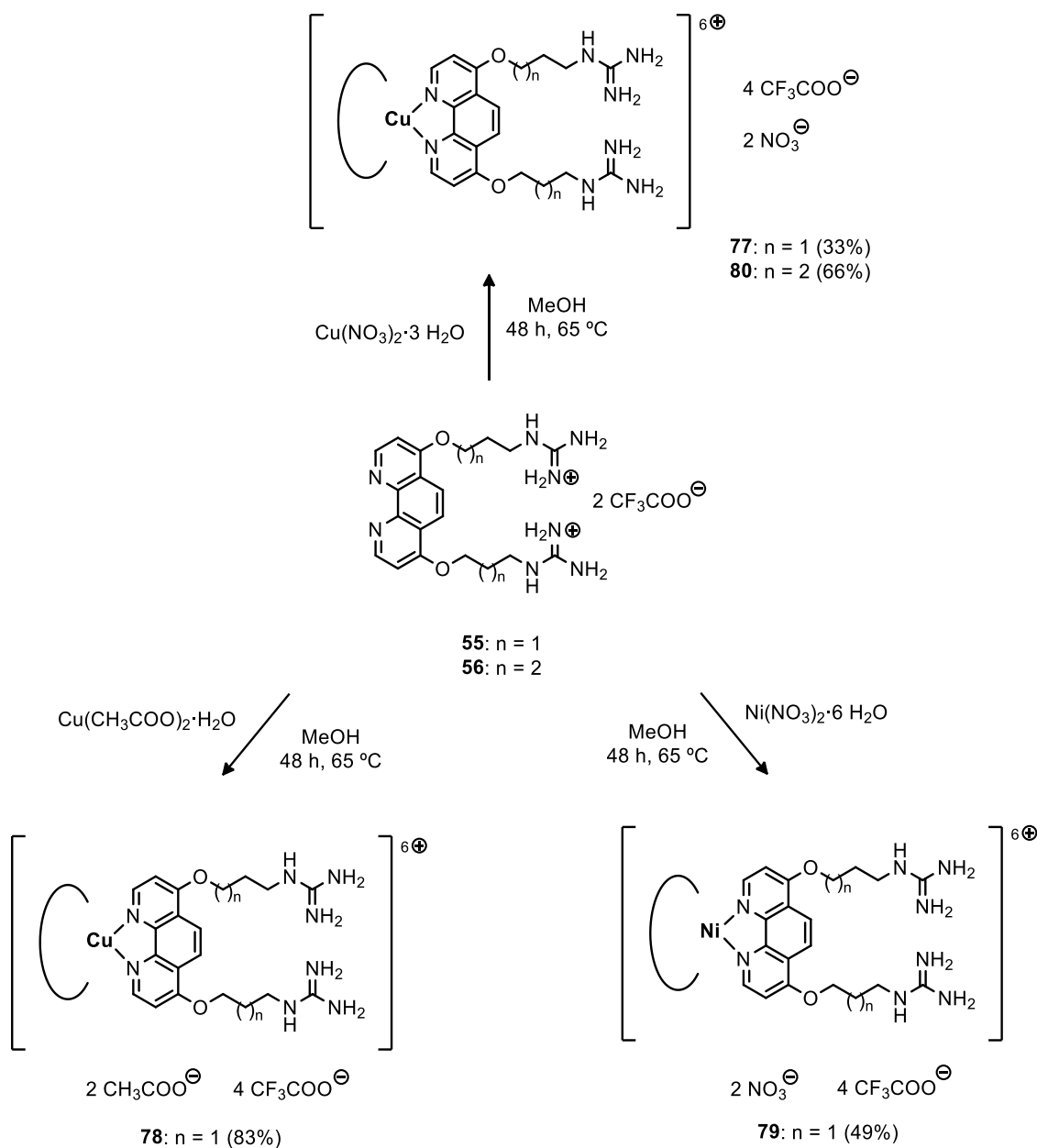
3.1.4.2 Complejos derivados de la 1,10-fenantrolina

En primer lugar, se preparó el complejo **76**. Este complejo es el único ejemplo de complejo metálico que contiene unidades aromáticas (cuatro anillos de benceno) en sus cadenas laterales. Aunque sintetizar el complejo **76** no era el objetivo primario en este trabajo, se aprovechó que el grupo bencilo es un grupo protector muy estable y se sintetizó el complejo **76** a partir del ligando **49**, tal y como se representa en el esquema 34.



Esquema 34. Preparación del complejos **76**; C = ligando

Por otra parte, la familia de complejos metálicos derivados de la 1,10-fenantrolina enlazada a través de cadenas alquílicas a grupos guanidinio (compuestos **77** - **80**) se obtuvo a partir de los ligandos **55** y **56**. Los rendimientos y las estructuras de los complejos obtenidos se recogen en el esquema 35. Como cabía esperar los complejos de cobre(II) **77**, **78** y **80** se caracterizan por una coloración verde intensa brillante, mientras que el complejo de níquel(II) **79** presenta una coloración marrón claro, también con aspecto cristalino.

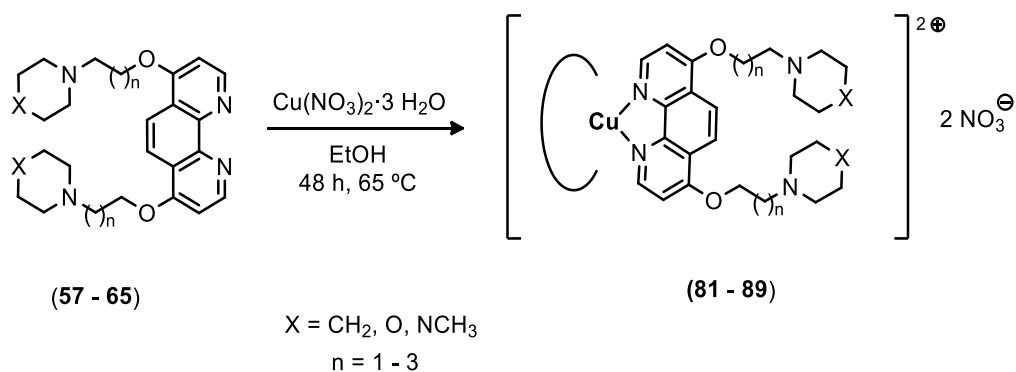


Esquema 35. Complejos metálicos obtenidos a partir de los ligandos **55** y **56**; C = ligando

Y por último, el grupo de complejos de cobre(II) más numeroso es el formado por los derivados de la 1,10-fenantrolina disustituida en las posiciones 4 y 7 con éteres y con heterociclos alifáticos como grupos terminales (**81–92**).

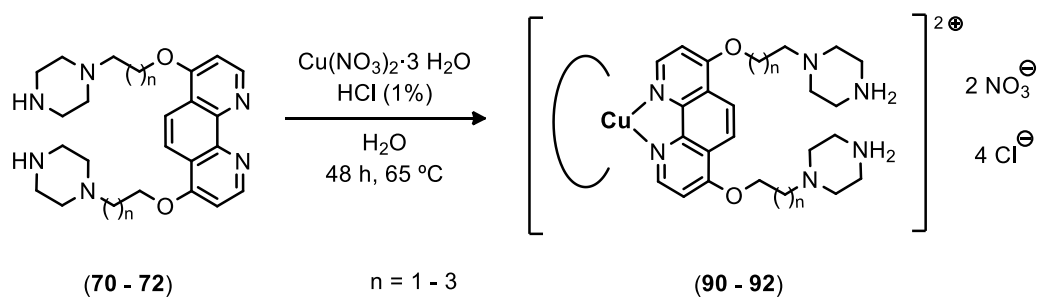
Los complejos que contenían piperidina (**81 – 83**), morfolina (**84 – 86**) y *N*-metilpiperazina (**87 – 89**) en sus cadenas laterales fueron preparados después de calentar las disoluciones etanólicas de los ligandos correspondientes a 65 °C,

durante 48 horas. Tras la precipitación de los complejos resultantes con éter frío se obtuvieron los productos deseados como sólidos verdes de aspecto cristalino (esquema 36). Los derivados con la cadena más larga – los complejos **83**, **86** y **89** fueron los que presentaron una coloración más intensa en cada serie.



Esquema 36. Preparación de complejos metálicos **81 - 89**; C = ligando

Por otro lado, los complejos que contenían en su estructura el sistema de piperazina (**90** – **92**) se prepararon, por motivos de solubilidad, a partir de disoluciones acuosas de los ligandos correspondientes calentando a 65 °C. Además, se añadió al medio de reacción una disolución de 4 equivalentes molares de ácido clorhídrico por cada 1 equivalente del ligando (esquema 37). Esta modificación se incluyó con el objetivo de prevenir la complejación del metal por los nitrógenos de la piperazina, que de esta manera quedan parcialmente protonados en el medio ácido. Tras 48 horas de reacción, se evaporó el disolvente de la reacción y los complejos obtenidos, solubles solamente en agua, se lavaron con cantidad abundante de metanol. De esta forma se obtuvieron los complejos deseados como sólidos verdes claros.



Esquema 37. Preparación de complejos metálicos **90 - 92**; C = ligando

Los rendimientos de la etapa de complejación para los compuestos pertenecientes a esta familia varían entre el 65 y el 83%, y se recogen en la tabla 3.

Tabla 3.	X	n	Producto Rendimiento (%)
Piperidina	CH ₂	1	81 (78%)
	CH ₂	2	82 (77%)
	CH ₂	3	83 (70%)
Morfolina	O	1	84 (82%)
	O	2	85 (83%)
	O	3	86 (72%)
N-metilpiperazina	CH ₃ N	1	87 (83%)
	CH ₃ N	2	88 (76%)
	CH ₃ N	3	89 (72%)
Piperazina	(NH ₂) ⁺ Cl ⁻	1	90 (73%)
	(NH ₂) ⁺ Cl ⁻	2	91 (69%)
	(NH ₂) ⁺ Cl ⁻	3	92 (65%)

Tabla 3. Rendimientos obtenidos de los complejos de cobre(II) a partir de los ligandos que incorporan heterociclos alifáticos en las cadenas alifáticas

En cuanto a la caracterización de los complejos finales obtenidos, hay que tener en cuenta que los complejos de Cu(II) son compuestos paramagnéticos. Los complejos preparados en esta tesis doctoral no pueden ser caracterizados empleando resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C o ^{19}F -RMN. Por otra parte, no todos los complejos de Ni(II) son paramagnéticos, dependiendo de la configuración electrónica entorno al átomo central y del tipo de ligando en la esfera de coordinación del metal. Desafortunadamente, ese no ha sido el caso de los complejos de Ni(II) descritos en este trabajo. Los complejos metálicos fueron caracterizados por espectrometría de masas de alta resolución, infrarrojo y espectroscopia de UV-visible.

Por otra parte se han llevado a cabo numerosos intentos de cristalización en distintas condiciones, con el objetivo de poder caracterizar estos compuestos metálicos por difracción de rayos-X. Desafortunadamente, los esfuerzos realizados hasta la fecha han resultado infructuosos y, en aquellos casos en los que se han obtenido cristales, como el caso del complejo **77**, estos no resultaron tener un tamaño adecuado o no resultaron ser de calidad suficiente.

3.2 Estudios de interacción ligando-ADN

Los estudios de interacción se realizaron con algunos de los productos sintetizados y descritos en esta tesis doctoral y, adicionalmente, con algunos productos sintetizados en colaboración con los miembros del grupo de investigación. Los productos seleccionados se recogen a continuación y los resultados obtenidos, utilizando cada una de las técnicas, se discutirán conjuntamente.

3.2.1 Productos seleccionados

Para la realización de estudios de interacción ligando-ADN se han seleccionado los siguientes productos:

Derivado de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada (6)

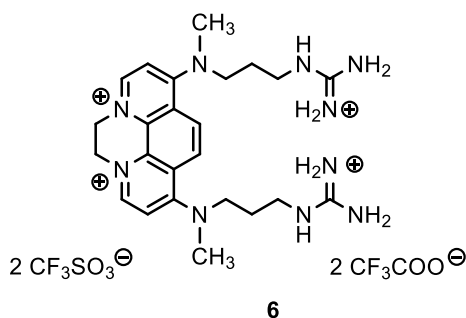


Figura 72. Compuesto **6**

Complejos de cobre(II) y de níquel(II) de derivados de la 2,2'-bipiridina (73-75) con poliaminas en las cadenas laterales

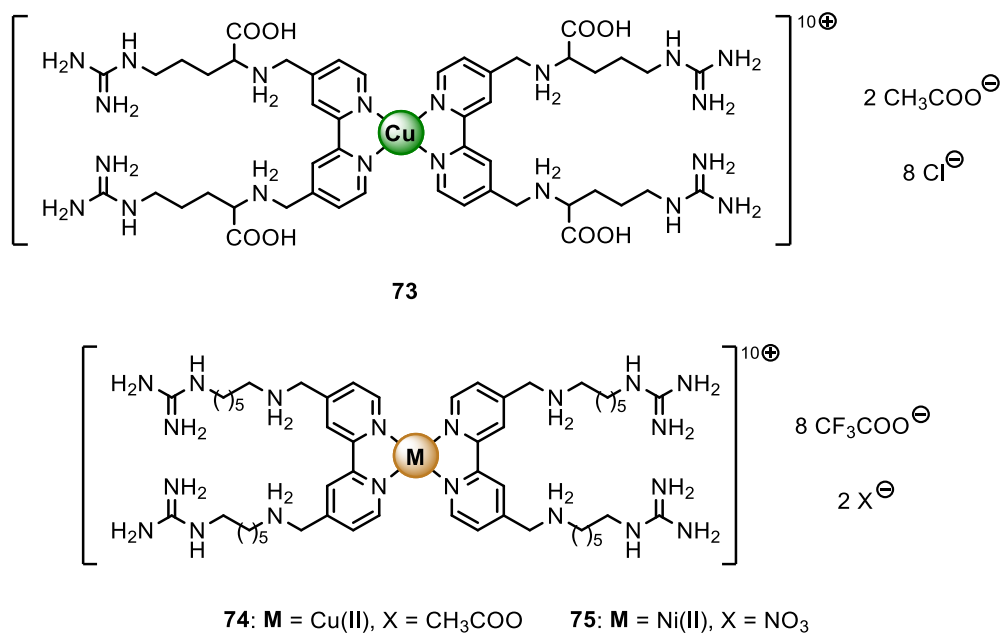


Figura 73. Complejos de cobre(II) **73**, **74** y de níquel(II) **75** - derivados de la 2,2'-bipiridina que contienen en las cadenas laterales arginina(**73**) o cadenas alifáticas de seis carbonos(**74**, **75**)

Complejos de coordinación de los derivados de la 1,10-fenantrolina (76-92)

Derivado 76 con anillos aromáticos en las cadenas laterales

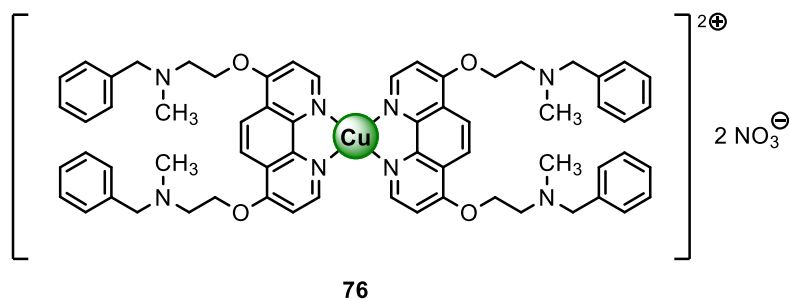


Figura 74. Complejo de cobre(II) con cuatro grupos fenilo en las cadenas laterales (76)

Derivados de éteres con grupos guanidinio terminales (77, 79, 80)

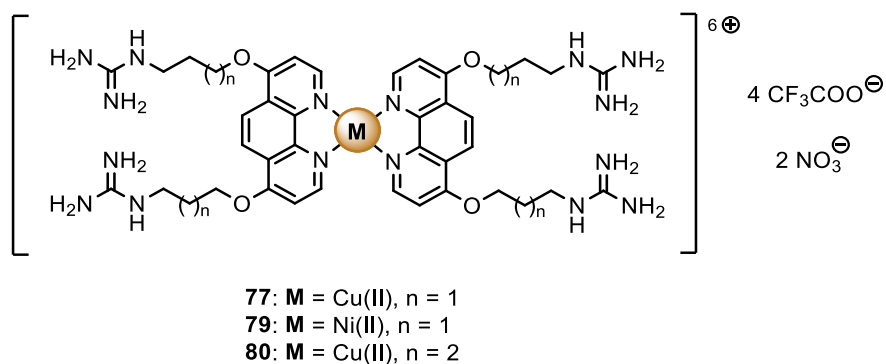


Figura 75. Complejos de cobre(II) 77 y 80 o de níquel(II) 79 con grupos guanidinio en las cadenas laterales

Derivados de éteres con heterociclos alifáticos como grupos terminales (81-92)

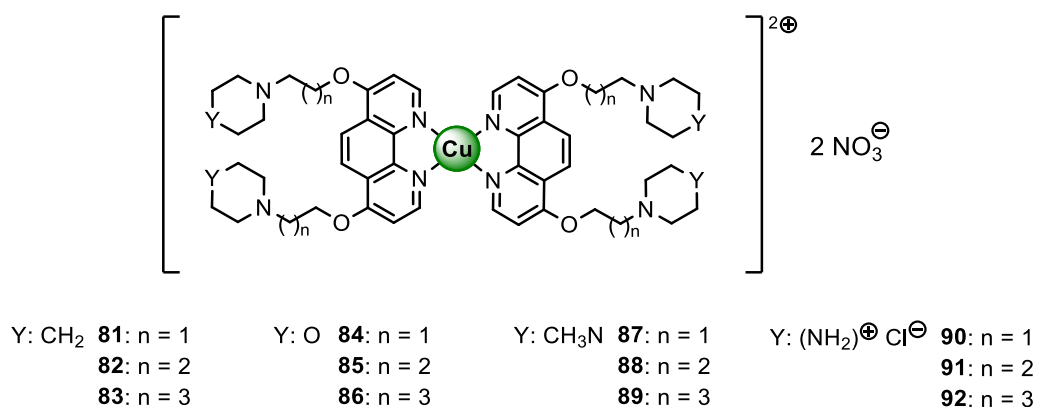


Figura 76. Estructura general de los complejos que contienen en sus cadenas laterales heterociclos alifáticos: piperidina (**81-83**), morfolina (**84-86**), N-metilpiperazina (**87-89**) y piperazina (**90-92**)

Tabla 4.	X	n	Producto
Piperidina	CH ₂	1	81
	CH ₂	2	82
	CH ₂	3	83
Morfolina	O	1	84
	O	2	85
	O	3	86
N-metilpiperazina	CH ₃ N	1	87
	CH ₃ N	2	88
	CH ₃ N	3	89
Piperazina	(NH ₂) ⁺ Cl ⁻	1	90
	(NH ₂) ⁺ Cl ⁻	2	91
	(NH ₂) ⁺ Cl ⁻	3	92

Tabla 4. Complejos de cobre(II) **81 – 92** con distintos heterociclos y diferente longitud de la cadena alifática lateral

Compuestos preparados en colaboración con los miembros del grupo de investigación (A-K)

Paralelamente, se realizaron varios estudios de interacción entre el ADN y distintos ligandos sintetizados en colaboración con los miembros del grupo de investigación.

Complejos de cobre(II) con *N*-piranosilaminas de la 1,10-fenantrolina-5-*il* (A-E)

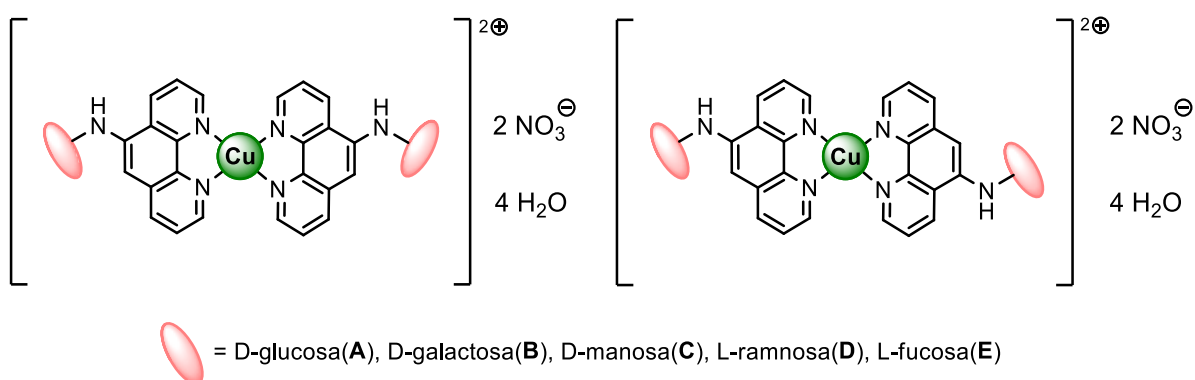


Figura 77. Estructuras de los complejos de cobre(II) con *N*-glicosilaminas de la 1,10-fenantrolina sustituida en la posición 5 (A-E)

Derivados de 1,2-etilen-4,4'-bipiridina sustituidos con unidades aromáticas (F-K)

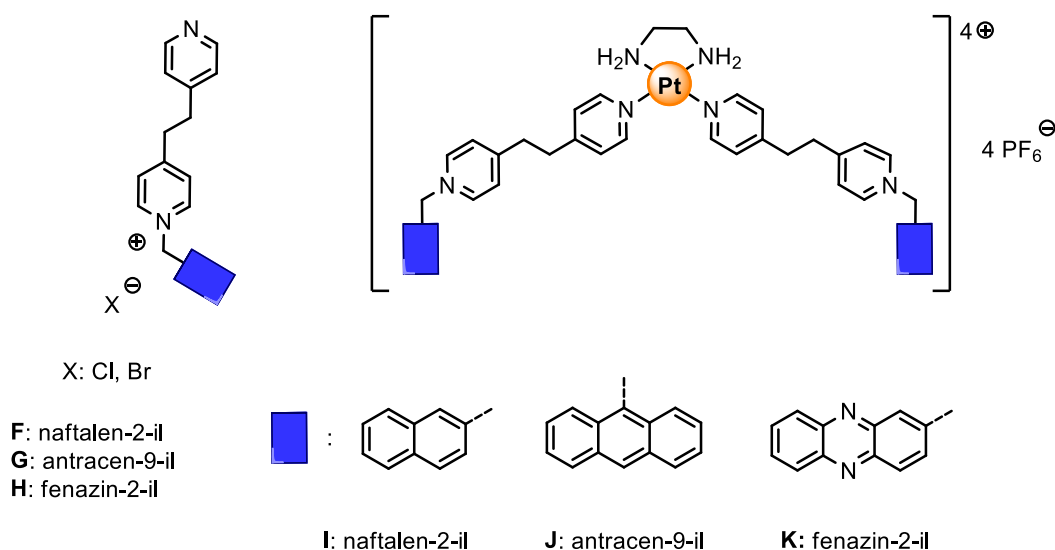


Figura 78. Ligandos de 1,2-etilen-4,4'-bipiridina con naftaleno (F), antraceno (G) y fenazina (H) y sus complejos de platino(II) I-K

3.2.2 Técnicas empleadas para evaluar la interacción entre los distintos ligandos y el ADN

En esta tesis doctoral nos hemos centrado mayoritariamente en la obtención de ligandos orgánicos y metalo-orgánicos con capacidad de reconocimiento hacia el ADN cuádruple-G. Para evaluar la interacción entre los ligandos y el ADN se realizaron los experimentos con ADN cuádruple-G formado a partir de la secuencia telomérica humana (TTAGGG)_n. Los experimentos se llevaron a cabo en distintas condiciones iónicas, en presencia de iones potasio o sodio, ya que dicha secuencia de ADN presenta distinta conformación y topología en función de las condiciones iónicas empleadas. Además, se seleccionaron algunos compuestos que demostraron una buena interacción preliminar con el ADN cuádruple-G y se realizaron con ellos, adicionalmente, experimentos de interacción competitivos. En estos ensayos, además del ADN cuádruple-G y del ligando se adicionó un oligonucleótido de ADN dúplex, con el fin de realizar una estimación preliminar de la posible selectividad de unión del ligando a una

estructura de ADN concreta, comparando generalmente la unión al ADN cuádruple-G con la posible unión al ADN dúplex.

Finalmente, y como técnica complementaria, se empleó la viscosimetría para llevar a cabo un estudio de interacción entre los ligandos y el ADN dúplex. La unión no covalente del ligando a la doble hélice se puede producir mediante un mecanismo de intercalación, mediante su unión a los surcos, mediante una unión externa de tipo electrostático o mediante combinación de los distintos modos de unión. La viscosimetría sirve, entre otras cosas, para determinar si un ligando actúa como intercalante del ADN, si se une a los surcos o al esqueleto fosfato, o si es un ligando con un modo de unión mixto.

3.2.2.1 Técnicas utilizadas para evaluar la interacción entre los ligandos y el ADN cuádruple-G

Para el estudio de las interacciones ligando-ADN cuádruple-G se emplearon distintas técnicas, como la desnaturalización térmica del ADN observada mediante transferencia de energía de fluorescencia por resonancia (FRET), el estudio de interacción a través de dicroísmo circular (DC) o el ensayo de desplazamiento de ligandos fluorescentes unidos a cuádruple-G. Además, con algunos compuestos que demostraron una buena interacción, se realizaron experimentos competitivos como la diálisis de equilibrio competitiva o la desnaturalización térmica del ADN por FRET en presencia de una secuencia de ADN dúplex competidora.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación, divididos en apartados, en función de la técnica empleada.

3.2.2.1.1 Medidas de la interacción ligando-ADN por desnaturalización térmica

3.2.2.1.1.1 Desnaturalización térmica del ADN por FRET

El ensayo de desnaturalización térmica observada por FRET se empleó para analizar la capacidad de los compuestos sintetizados de estabilizar la estructura del ADN cuádruple-G y del ADN dúplex.^[173,213] Para este experimento

²¹³ D. Renciuik, J. Zhou, L. Beaurepaire, A. Guedin, A. Bourdoncle, J.-L. Mergny, *Methods*, **2012**, *57*, 122-128

se emplearon oligonucleótidos marcados con distintas moléculas fluorescentes en cada uno de sus extremos 3' y 5'. La secuencia del oligonucleótido utilizada para el ADN cuádruple-G, designada como F21T es 5' – FAM - GGG(TTAGGG)₃ – TAMRA - 3', mientras que la secuencia utilizada en el caso del ADN dúplex, F10T, es 5' - FAM – TAT AGC TA TA/Sp18/TA TA GCT ATA – TAMRA - 3'. La etiqueta fluorescente del extremo 5' es el fluoróforo donador FAM (6-carboxifluoresceína) y la etiqueta del extremo 3' que actúa como fluoróforo aceptor es TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).^[169,170]

Los experimentos se llevaron a cabo con la secuencia del ADN dúplex F10T en condiciones iónicas de sodio y con el oligonucleótido F21T preparado en dos condiciones iónicas (tampón de sodio y de potasio),^[214] siempre manteniendo la suma de concentración iónica igual a 110 mM. El experimento se realizó en formato multiplaca de 96 pocillos con un volumen para cada muestra igual a 50 µL. La concentración de ADN se mantuvo constante en todos pocillos (0,2 µM), mientras que el rango de concentraciones para el ligando fue 0 – 10 µM (ligandos A-E) y 0 - 1 µM, para el resto de los ligandos. Una vez preparadas las disoluciones se procedió a incrementar la temperatura, en un aparato de PCR cuantitativa, entre 25 °C y 95 °C, registrando el valor de fluorescencia a cada grado de temperatura.^[214]

En la estructura plegada, los dos fluoróforos se encuentran muy próximos en el espacio y no se registra fluorescencia, mientras que en el estado desplegado, los fluoróforos están alejados entre sí y se puede detectar una señal de fluorescencia. Al registrar la fluorescencia del oligonucleótido marcado en el rango de las temperaturas de 25 a 95 °C se obtiene una curva sigmoidea, típica para la desnaturalización térmica de los ácidos nucleicos. El punto medio entre la desnaturalización completa y el plegamiento completo se denomina temperatura media de desnaturalización: T_m ó $T_{1/2}$. En términos de la fluorescencia normalizada (FN; señal de fluorescencia máxima = 1 y señal de fluorescencia mínima = 0) el valor de $T_{1/2}$ representa la temperatura de desnaturalización

²¹⁴ D. Gomez, A. Guedin, J.-L. Mergny, B. Salles, J.-F. Riou, M.-P. Teulade-Fichou, P. Calsou, *Nucleic Acids Res.*, **2010**, *38*, 7187 – 7198

aparente, definida como la temperatura a la que la fluorescencia normalizada alcanza el valor de 0,5.^[173,213]

Si un ligando estabiliza una estructura de ADN, la temperatura de desnaturalización ($T_{1/2}$) se incrementa en comparación con una disolución de ADN en ausencia de ligando. De la misma manera, un compuesto puede favorecer el plegamiento de ADN desde el estado desplegado o desnaturalizado. En este caso se dice que induce el plegamiento, lo que produce un desplazamiento de $T_{1/2}$ hacia valores más elevados.^[173,213]

El posible grado de estabilización de los cuádruples en condiciones de sodio o de potasio, o del ADN dúplex, encontrado experimentalmente, se recoge en la tabla 5, mediante el valor $\Delta T_{1/2}$ – la diferencia entre la temperatura media de desnaturalización del oligonucleótido en presencia ($1 \mu\text{M}$) o ausencia de ligando. Como compuesto referencia para este ensayo se ha empleado, como en otros experimentos, el ligando selectivo de ADN cuádruple-G **360A**, cuyos resultados se recogen en la figura 79 y en la tabla 5.^[215]

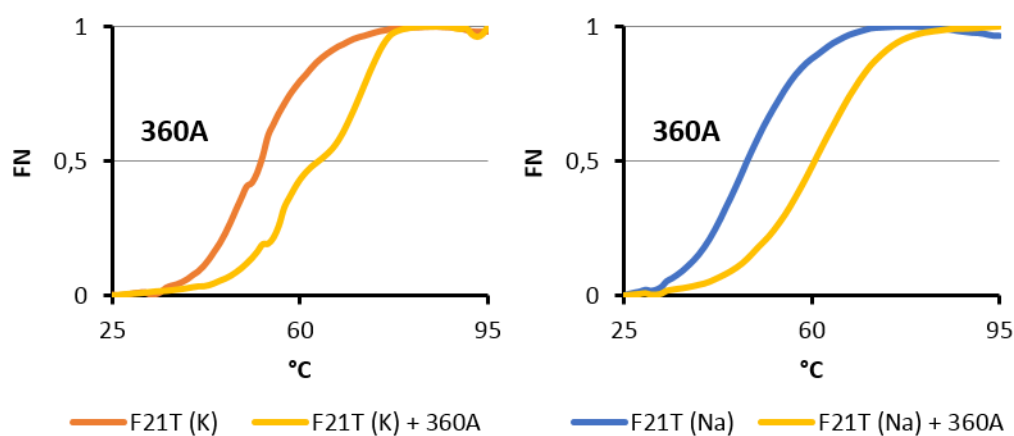


Figura 79. Curva de desnaturalización de las distintas estructuras del ADN cuádruple-G (F21T) en condiciones iónicas de *potasio* ($T_{1/2}=53 \text{ }^\circ\text{C}$) y de *sodio* ($T_{1/2}=49 \text{ }^\circ\text{C}$), con el valor $\Delta T_{1/2}$ para el ligando **360A** ($1 \mu\text{M}$) de $12 \text{ }^\circ\text{C}$ en ambos casos; FN – fluorescencia normalizada

En la tabla 5 se recogen los valores de $\Delta T_{1/2}$ para todos los productos a la concentración de referencia de $1 \mu\text{M}$ y de $10 \mu\text{M}$ para los productos **A-E** en su

²¹⁵ D. Monchaud, P. Yang, L. Lacroix, M.-P. Teulade-Fichou, J.-L. Mergny, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 4858 - 4861

interacción con el ADN (0,2 μ M). Se empleó ADN cuádruple-G (F21T) en condiciones iónicas de potasio o sodio y ADN dúplex (F10T). Todos los experimentos se realizaron, como mínimo, por duplicado y la tabla 5 recoge el valor promedio de las determinaciones acompañado del valor de desviación estándar.

Entre los ligandos estudiados a través de este ensayo nos encontramos con ligandos-estabilizadores débiles, con valores de $\Delta T_{1/2}$ (a concentración del ligando 1 μ M), para las dos estructuras del ADN cuádruple-G, inferiores a 10°C. Este es el caso de los ligandos **55**, **73 – 76**, **81 – 90** y **A – E**. Por otra parte, nos encontramos con ligandos-estabilizadores fuertes, como el compuesto de referencia **360A** y los compuestos sintetizados **6**, **77 – 80**, **91** y **92**, que dieron lugar a valores de $\Delta T_{1/2}$ (a concentración del ligando 1 μ M) iguales o mayores de 10°C para, al menos, una de las dos estructuras de ADN cuádruple-G.

Producto	$\Delta T_{1/2}$ (°C)F21T (K)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)F21T (Na)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)F10T
360A	12,0 ± 0,0	11,7 ± 0,7	N.D.
6	13,8 ± 0,5	3,5 ± 1,4	0,5 ± 0,0
55	1,3 ± 0,4	0,8 ± 0,4	0,0 ± 0,0
58	0,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
73	0,5 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
74	3,5 ± 0,0	1,8 ± 0,4	1,3 ± 0,4
75	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
76	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0
77	12,8 ± 0,3	9,8 ± 2,9	3,3 ± 0,9
79	20,8 ± 0,9	19,3 ± 2,5	6,5 ± 1,0
80	14,3 ± 0,9	13,9 ± 2,7	2,0 ± 0,0
81	0,7 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
82	9,5 ± 0,4	4,0 ± 0,4	0,3 ± 0,4
83	0,3 ± 0,3	0,8 ± 0,7	0,0 ± 0,0
84	0,1 ± 0,1	1,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
85	5,7 ± 0,0	4,5 ± 1,0	0,0 ± 0,0
86	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,8	0,0 ± 0,0
87	6,0 ± 0,3	6,3 ± 0,4	1,0 ± 0,0
88	7,4 ± 0,4	5,5 ± 0,4	0,0 ± 0,0
89	0,5 ± 0,0	1,1 ± 0,4	0,0 ± 0,0
90	3,0 ± 0,4	2,8 ± 0,4	0,0 ± 0,0
91	15,0 ± 0,6	9,4 ± 1,4	1,5 ± 0,0
92	10,0 ± 0,8	6,0 ± 0,4	2,0 ± 0,0
A	11,0 ± 0,0 ^a	18,0 ± 0,7 ^a	2,0 ± 0,0 ^a
B	10,2 ± 0,4 ^a	17,2 ± 0,7 ^a	2,5 ± 0,7 ^a
C	14,4 ± 0,7 ^a	22,0 ± 0,4 ^a	3,5 ± 0,7 ^a
D	7,9 ± 0,7 ^a	29,0 ± 1,8 ^a	4,5 ± 2,0 ^a
E	8,9 ± 0,7 ^a	20,0 ± 0,4 ^a	0,5 ± 0,0 ^a

Tabla 5. Valores de $\Delta T_{1/2}$ para los ligandos seleccionados y distintos ADN: *cuádruple-G F21T* en tampón de potasio; *cuádruple-G F21T* en tampón de sodio y *ADN dúplex F10T*; a – los valores de $\Delta T_{1/2}$ de los productos A-E se calcularon a una concentración de 10 μ M

En la mayoría de los compuestos examinados en el ensayo de desnaturalización térmica del ADN por FRET, se observó un valor de $\Delta T_{1/2}$ mayor para las estructuras del ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de potasio. Los mejores estabilizadores del ADN han resultado ser aquellos compuestos que incorporan en su estructura el grupo guanidinio terminal, como los compuestos **6**, **79**, **80** y **81** u otros grupos cargados positivamente, como la piperazina en el caso de los compuestos **91** y **92**. Además, en el caso de la familia de los complejos **81** – **92** se observó sistemáticamente una mayor estabilización de las estructuras del ADN cuádruple por aquellos compuestos que contienen una cadena lateral entre la 1,10-fenantrolina y el heterociclo alifático (piperidina - **82**, morfolina - **85**, *N*-metilpiperazina - **88** y piperazina - **91**) de 4 átomos. Por otro lado, ni los ligandos **55** y **58**, ni los complejos metálicos de las 2,2'-bipiridinas disustituidas (**74** – **76**) presentaron una estabilización significativa del ADN.

Estos resultados podrían confirmar la importancia de la presencia de una superficie aromática extendida, que presentan los complejos metálicos de las 1,10-fenantrolinas, así como la relevancia de la presencia de átomos cargados positivamente, tanto en el centro de la molécula como en los grupos terminales de las cadenas laterales. Además, se observó, que la longitud óptima para la cadena lateral que conecta la 1,10-fenantrolina con el grupo terminal es la que corresponde a 4 átomos (un espaciador de 3 átomos de carbono).

3.2.2.1.1.2 Desnaturalización térmica del ADN por FRET competitivo

Una variante del experimento anterior consiste en la adición, además de las secuencias de ADN marcadas con etiquetas fluorescentes, de alícuotas de una secuencia oligonucleotídica no marcada, en exceso estequiométrico, y que pueda actuar como competidora. El protocolo experimental es idéntico al ya descrito, pero incorporando el oligonucleótido competidor, de modo que tras el registro de la fluorescencia en el rango de temperaturas comprendido entre 25 °C y 95 °C, se realiza una comparación entre los valores de temperaturas medias de desnaturalización ($T_{1/2}$) obtenidos en presencia y ausencia del ADN competidor. Típicamente, se trata de la adición de una secuencia de ADN dúplex a la disolución de la secuencia del cuádruple F21T. En nuestro caso empleamos como

secuencia competidora el oligonucleótido ds26 (5'- CAA TCG GAT CGA ATT TCG ATC CGA TTG - 3').^[171,216]

Entre todos aquellos compuestos con los cuales se realizaron ensayos de desnaturalización por FRET, se eligieron los productos **6**, **77**, **79**, **80**, **91** y **92** cuyo valor de $\Delta T_{1/2}$ igualaba o superaba los 10 °C en su unión al cuádruple-G, en condiciones iónicas de potasio. El experimento se realizó con el oligonucleótido F21T en las **condiciones de potasio y sodio**, en ausencia y en presencia de la secuencia competidora no marcada ds26, a concentraciones de 3 y 10 μM , lo que supone un gran exceso estequiométrico en relación a la concentración inicial de 0,2 μM del cuádruple-G. Los resultados se recogen en las **figura 80, para el ADN F21T en condiciones iónicas de potasio** y en la **figura 81, para el ADN F21T en condiciones iónicas de sodio**.

Como compuesto de referencia se empleó el ligando **360A**. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y en las gráficas se representan los valores medios de $\Delta T_{1/2}$ obtenidos.

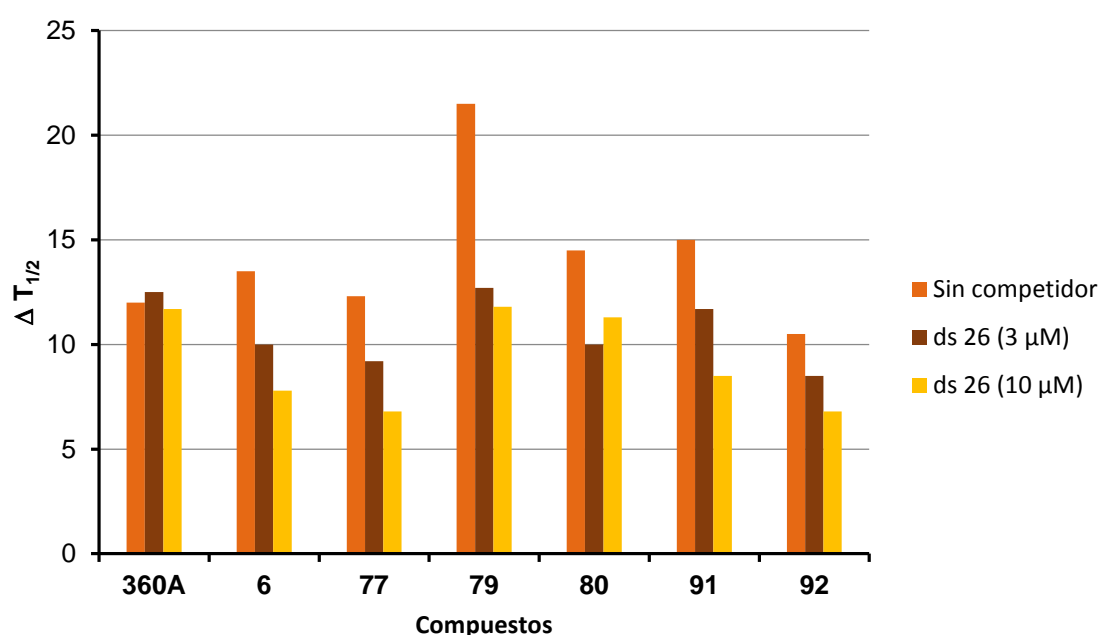


Figura 80. Variación de $\Delta T_{1/2}$ del F21T en condiciones iónicas de potasio en presencia del oligonucleótido competidor ds26, a 3 μM y a 10 μM

²¹⁶ A. De Cian, L. Guittat, K. Shin-ya, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, *Nucleic Acids Symposium Series*, **2005**, 49, 235 – 236

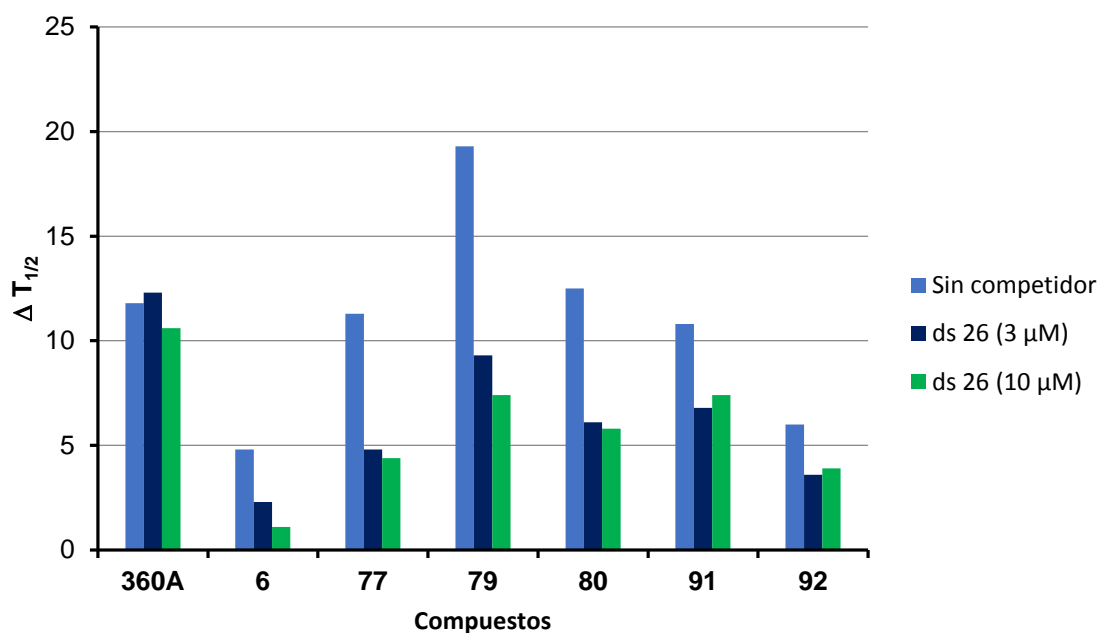


Figura 81. Gráfica de variación de $\Delta T_{1/2}$ del F21T en condiciones iónicas de sodio en presencia del oligonucleótido competidor ds26, a 3 μM y a 10 μM

Con todos los compuestos examinados en el ensayo de desnaturalización térmica del ADN por FRET en presencia del oligonucleótido competidor ds26 se observó un valor de $\Delta T_{1/2}$ mayor para las estructuras del ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de potasio.

Por otra parte, de los datos obtenidos y de los cambios de la temperatura media de desnaturalización observados se puede calcular un valor de selectividad FRET_{S} , tal y como se muestra en la fórmula 1. Si el valor de la selectividad de los ligandos FRET_{S} se aproxima a 1, los ligandos se consideran que muestran una alta selectividad hacia el ADN cuádruple-G. Los valores de la selectividad FRET_{S} para los compuestos seleccionados se recogen en la tabla 6, para las condiciones iónicas de potasio y en la tabla 7, para las condiciones en las que F21T se encuentra en un tampón de sodio.^[171]

$$\text{FRET}_{\text{S}} = \Delta T_{1/2} (\mathbf{10 \mu\text{M ds26}}) / \Delta T_{1/2} (\mathbf{\text{sin ds26}}) \text{ (fórmula 1)}$$

F21T (K)	$\Delta T_{1/2}$ (10 μM ds26) ($^{\circ}$C)	$\Delta T_{1/2}$ (sin ds26) ($^{\circ}$C)	FRET_S
360A	11,7 \pm 0,7	12,0 \pm 0,0	0,98
6	7,8 \pm 0,6	13,5 \pm 0,7	0,58
77	6,8 \pm 0,8	12,8 \pm 0,4	0,53
79	11,8 \pm 0,7	21,5 \pm 0,4	0,55
80	11,3 \pm 1,6	14,5 \pm 0,5	0,78
91	8,5 \pm 0,5	15,0 \pm 2,1	0,59
92	6,8 \pm 0,3	10,5 \pm 0,7	0,65

Tabla 6. Valores de la selectividad **FRET_S** para los compuestos seleccionados en condiciones iónicas de potasio

F21T (Na)	$\Delta T_{1/2}$ (10 μM ds26) ($^{\circ}$C)	$\Delta T_{1/2}$ (sin ds26) ($^{\circ}$C)	FRET_S
360A	10,6 \pm 0,3	11,8 \pm 0,7	0,90
6	1,1 \pm 0,3	4,8 \pm 0,0	0,23
77	4,4 \pm 1,0	11,3 \pm 1,4	0,39
79	7,4 \pm 0,3	19,3 \pm 0,0	0,38
80	5,8 \pm 0,7	12,5 \pm 1,8	0,46
91	7,4 \pm 1,0	10,8 \pm 0,0	0,69
92	3,9 \pm 0,6	6,0 \pm 0,4	0,65

Tabla 7. Valores de la selectividad **FRET_S** para los compuestos seleccionados en condiciones iónicas de sodio

El compuesto referencia **360A** mostró una selectividad excelente hacia el ADN cuádruple-G, como cabía esperar. El valor **FRET_S** obtenido experimentalmente para el ligando **360A** es 0,98 y 0,90 para las condiciones iónicas en potasio y sodio, respectivamente. En comparación, los ligandos ensayados no han mostrado una selectividad tan elevada como el compuesto de referencia. Sin embargo, los resultados son más que aceptables, sobre todo en el caso del compuesto **80**, que en condiciones iónicas de potasio muestra una elevada selectividad, cercana a 0,8. Los valores de **FRET_S** para los compuestos en

condiciones de tampón de potasio varían entre 0,53 y 0,78, mientras en las condiciones del tampón en sodio bajó el rango de selectividad, comprendido entre 0,23 y 0,69, con la excepción de los compuestos **91** y **92** que mostraron una buena selectividad en el segundo caso. El compuesto que mostró un mejor comportamiento en las condiciones iónicas de potasio fue el **80**, mientras el compuesto que mostró una menor selectividad fue el **77**. Para las condiciones iónicas de sodio, el mejor comportamiento se le atribuye al compuesto **91**, mientras que la peor selectividad se obtuvo para el caso del compuesto **6**.

3.2.2.1.2 Estudio de la interacción por medidas espectroscópicas

3.2.2.1.2.1 Dicroísmo circular (DC)

El dicroísmo circular (DC) es un método ampliamente utilizado para detectar y analizar fenómenos relacionados con la quiralidad de las moléculas. Las estructuras secundarias y terciarias de las macromoléculas quirales, como por ejemplo los ácidos nucleicos o proteínas, presentan espectros de dicroísmo circular muy característicos y específicos.^[161]

Los cuádruples unimoleculares del ADN con la secuencia telomérica están formados por tres tétradas de guaninas apiladas y conectadas a través de bucles de TTA. La morfología precisa de esta estructura secundaria depende de muchos factores, como por ejemplo, de la secuencia y de la concentración del oligonucleótido en la disolución o de las concentraciones de los cationes monovalentes en el medio, concretamente de sodio o potasio.^[52,55,56,160,161,217]

Para llevar a cabo todos los estudios de dicroísmo circular se empleó un oligonucleótido de 22 nucleótidos (Tel-22: 5'-A(GGGTTA)₃GGG- 3') en condiciones iónicas de potasio o de sodio, y a pH = 7,2. Las dos estructuras distintivas del ADN-cuádruple plegado en condiciones iónicas diferentes (tampón de sodio o potasio) y sus espectros de dicroísmo circular obtenidos experimentalmente se recogen en la figura 82. Las formas de las curvas de DC

²¹⁷ I. Bessi, C. Bazzicalupi, C. Richter, H. R. A. Jonker, K. Saxena, C. Sissi, M. Chioccioli, R. A. Bilia, H. Schwalbe, P. Gratteri, *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 1109-1119

obtenidas y sus máximos a longitudes de onda características coinciden con los datos previamente descritos en bibliografía.^[55,56,217,218]

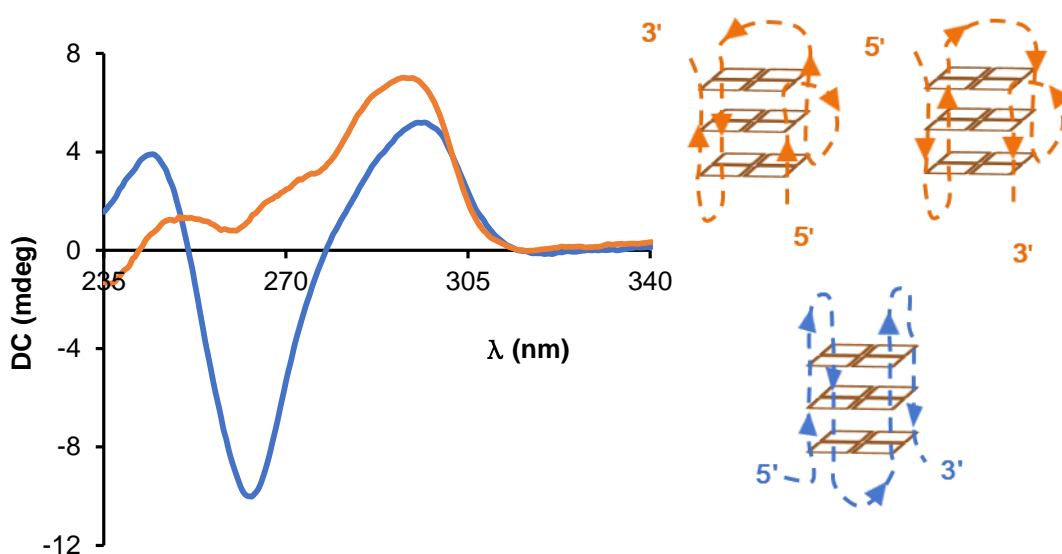


Figura 82. Espectros de DC del oligonucleótido Tel-22 5'AGGG(TTAGGG)₃-3', el espectro de la mezcla de estructuras obtenidas en el tampón de potasio (max. ~ 290 nm; min. ~ 260 nm; 0 ~ 240 nm)^[55,56,160,218] y el espectro de DC de la conformación obtenida en el tampón de sodio (max. ~ 295 nm; min. ~ 264 nm; max. ~ 245 nm)^[52,218]

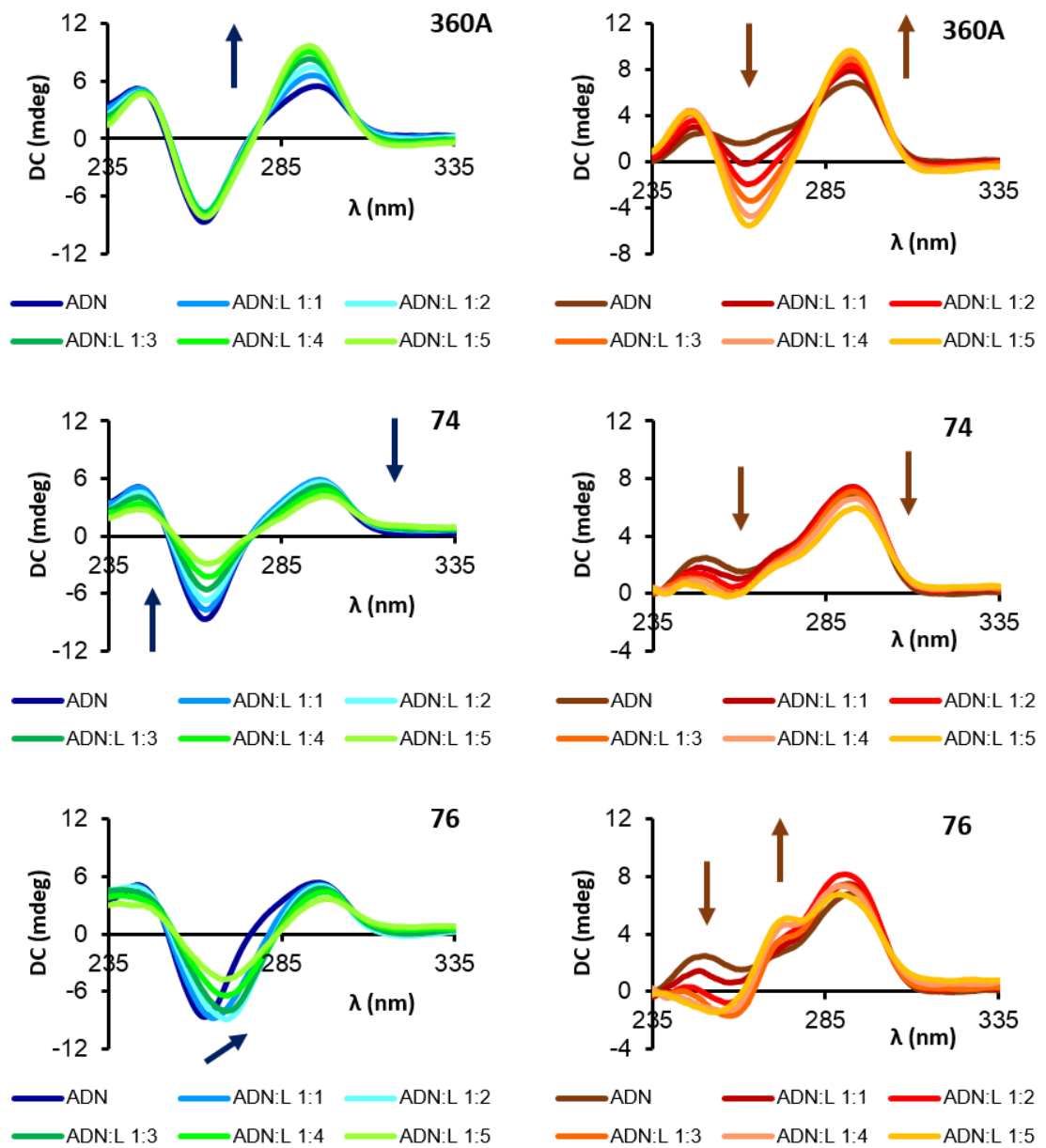
A continuación, se registraron espectros de las dos disoluciones de los cuádruples en presencia de los distintos ligandos sintetizados y se observaron los cambios producidos en el espectro de DC del ADN. Las proporciones molares entre el ADN y ligando (L) empleadas oscilaron entre 1:0 y 1:5 - ADN/L. Los cambios en los espectros manifiestan una interacción entre el ligando y ADN, pero hay que tener en cuenta que estos cambios no siempre son muy significativos, aun existiendo interacción ADN-ligando. Por ello, se utiliza el DC en muchas ocasiones para obtener una información cualitativa inicial y como técnica complementaria a otros ensayos de naturaleza más cuantitativa.

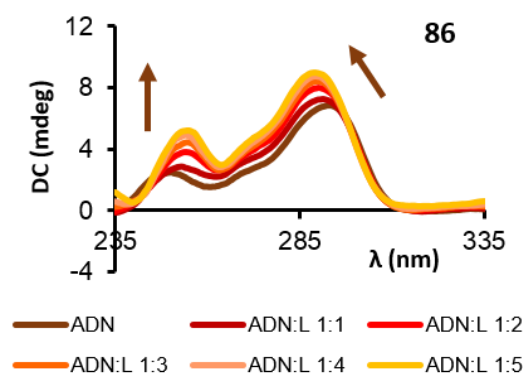
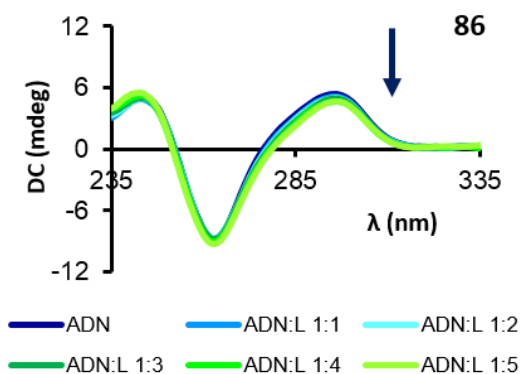
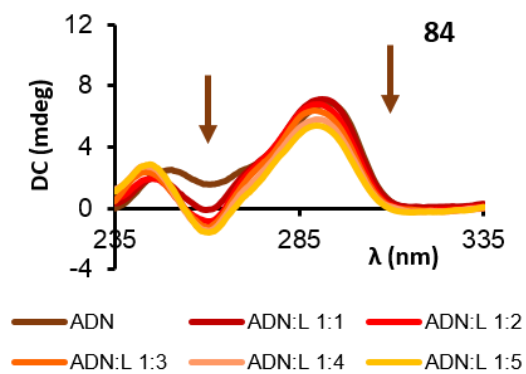
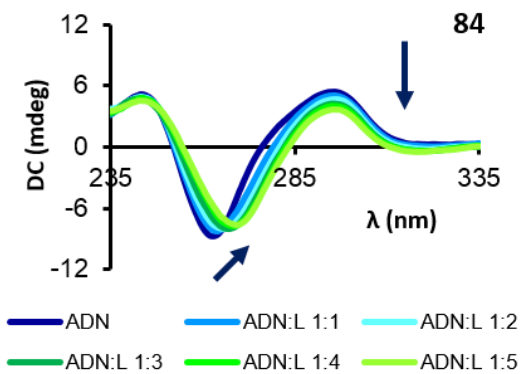
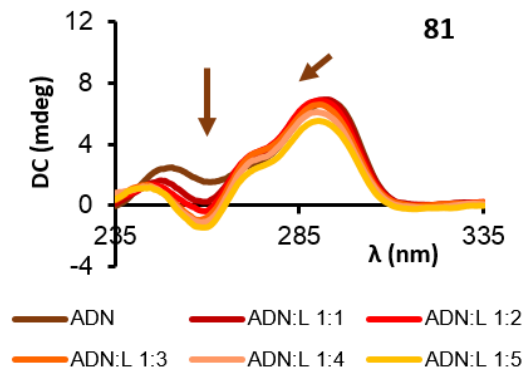
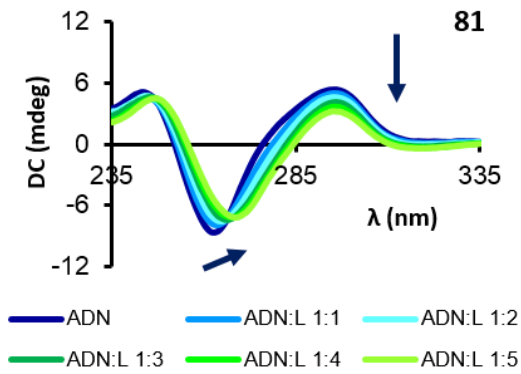
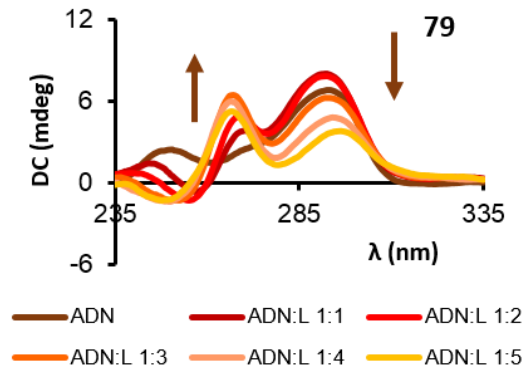
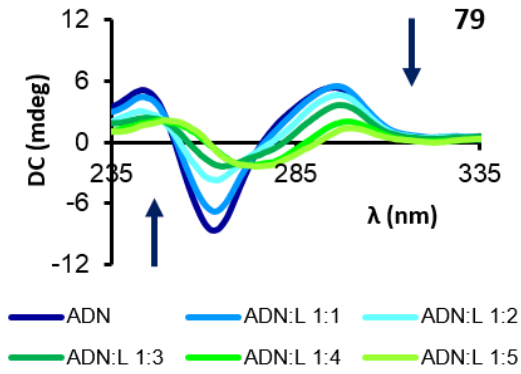
A continuación se muestra una selección de los espectros de DC obtenidos con algunos de los productos sintetizados y con el compuesto de referencia **360A**. Las gráficas azul-verde representan las condiciones iónicas en sodio, mientras las gráficas rojo-naranjas representan la interacción entre el ADN cuádruple-G y

²¹⁸ A. Randazzo, G. P. Spada, M. W. da Silva, *Top. Curr. Chem.*, **2013**, *330*, 67-86

ligando en **condiciones iónicas de potasio**. Algunos compuestos no producen ningún cambio en el espectro de DC (**73**, Anexo II) o solo muy ligeras modificaciones en el espectro de los oligonucleótidos (**6**, **75**, **83**, **89**, **A**, **B**, **E**, Anexo II).

Por otra parte, existen una serie de compuestos que producen cambios significativos en el espectro de DC característico del ADN cuádruple-G, como es el caso del compuesto de referencia **360A**, y de los compuestos sintetizados **74**, **76**, **79**, **81**, **84**, **86**, **C** y **D**, tal y como se muestra en la figura 83.





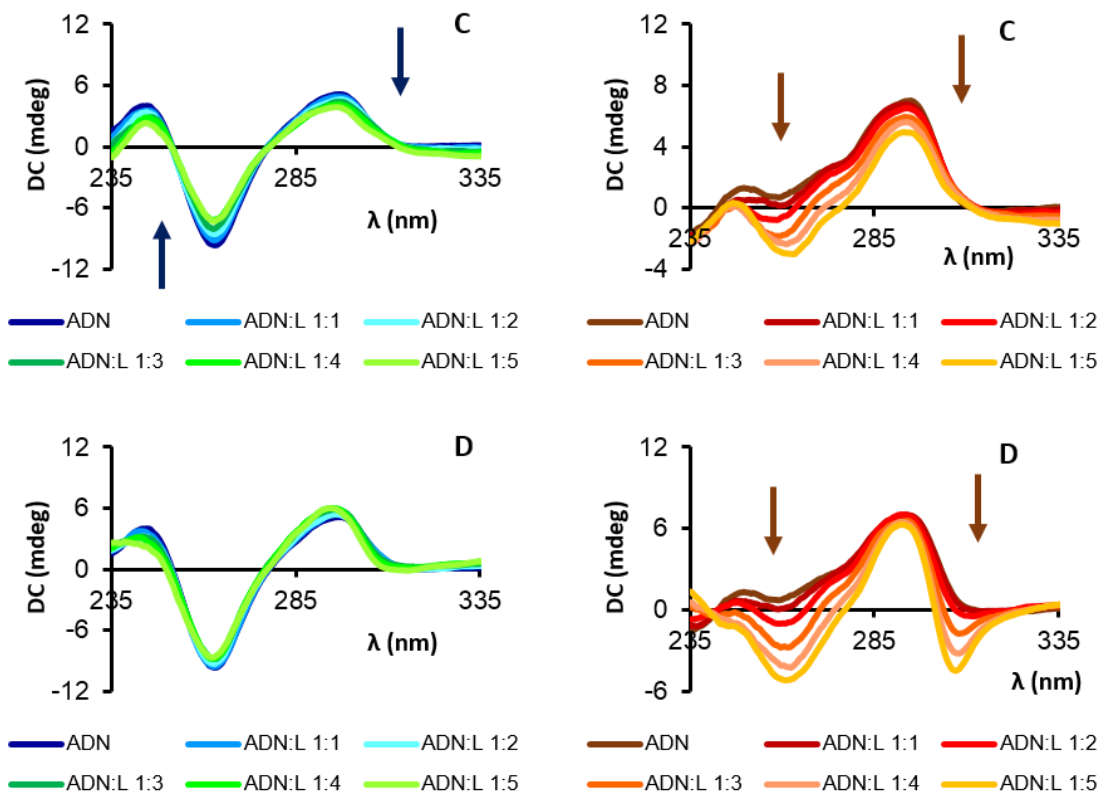


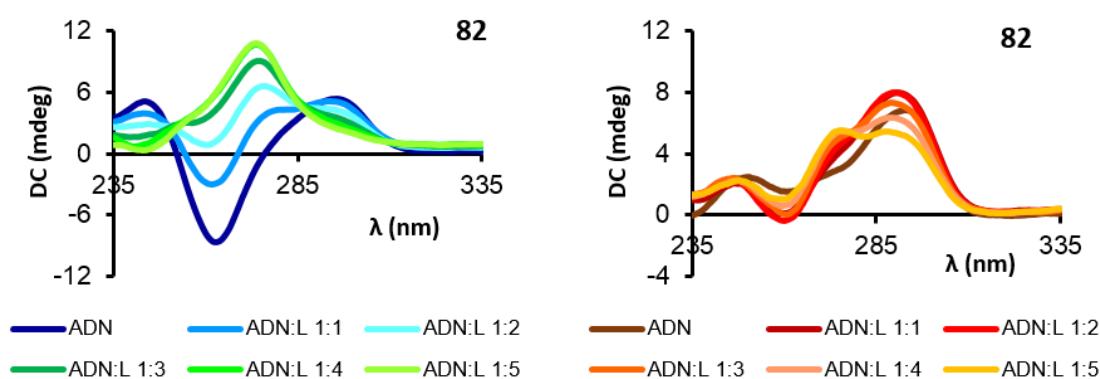
Figura 83. Espectros de DC del ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de sodio (izquierda) o potasio (derecha) con cambios destacados en los espectros (360A, 74, 76, 79, 81, 84, 86, C y D)

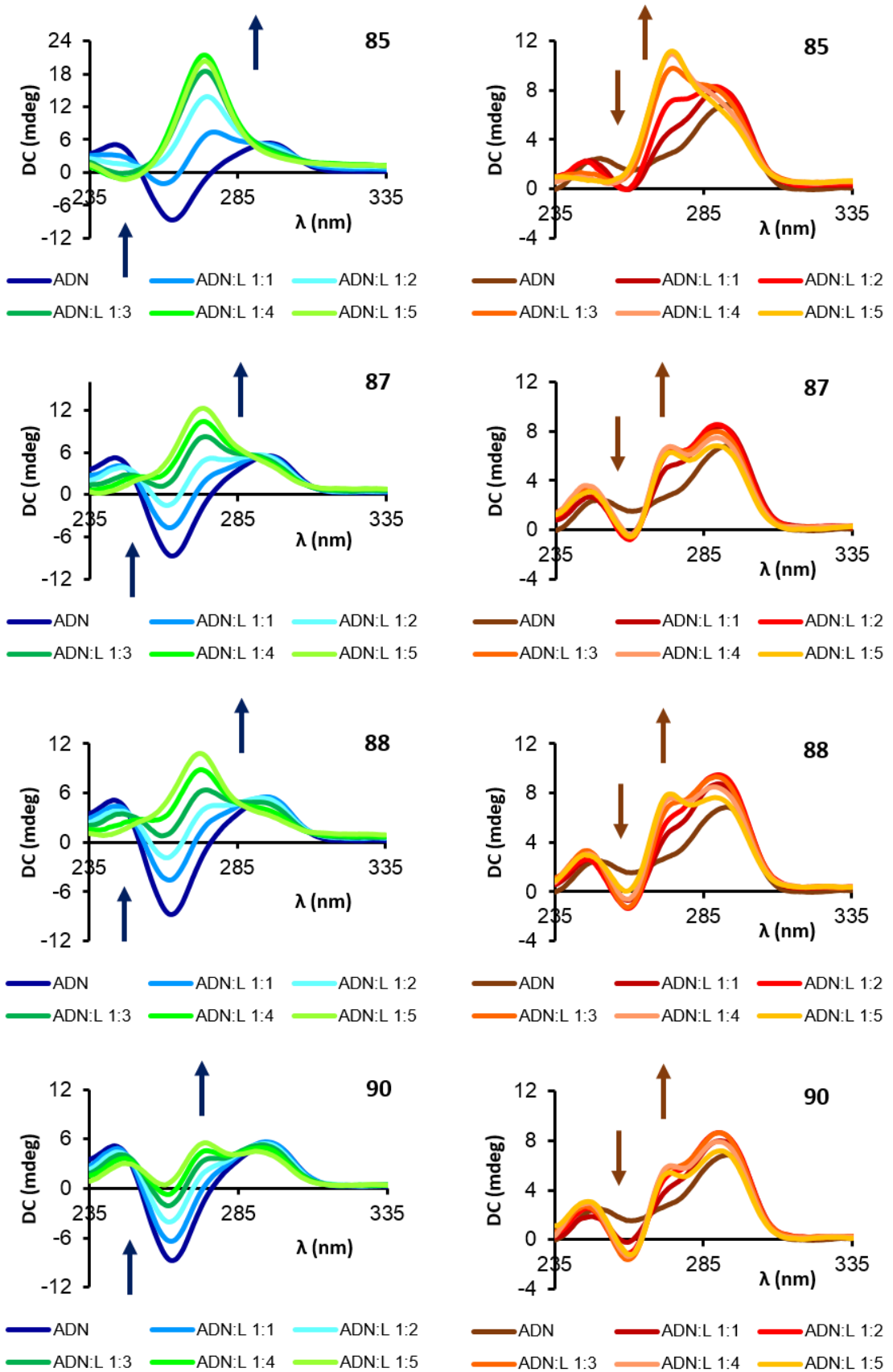
Como cabía esperar, el compuesto de referencia **360A** produce cambios en los espectros de DC del ADN cuádruple-G muy significativos, tanto en condiciones iónicas de sodio como en condiciones iónicas de potasio. Además, las modificaciones observadas corresponden al comportamiento estándar de los ligandos estabilizadores de cuádruple-G: la estabilización se manifiesta, cualitativamente, por un incremento en la intensidad (elipticidad) de los máximos y mínimos del espectro de DC característicos para estas estructuras secundarias.

Para el resto de compuestos, las variaciones observadas en el espectro de DC son más importantes cuando se analizan los efectos sobre el ADN plegado en condiciones iónicas de potasio que en condiciones de iónicas de sodio. En general, se aprecia una cierta concordancia con los resultados obtenidos por desnaturalización térmica previamente descritos. Algunos de los compuestos que

demonstraron unos valores nulos o relativamente bajos de $\Delta T_{1/2}$, como por ejemplo **74**, **76**, **81** y **84**, originan espectros de DC en los que se aprecia un ligero descenso de la elipticidad de las señales características, mientras que el complejo **79**, que se clasificó como ligando de cuádruple fuerte en los ensayos FRET, origina variaciones en el espectro que parecen indicar un cambio en la conformación del ADN que produce una estabilización de una topología de tipo “paralela”. Además, en este caso y en el de varios de los compuestos de esta serie se aprecia, aparentemente, una ligera desestabilización de la estructura en condiciones iónicas de sodio, lo que no parece estar en concordancia con los ensayos de desnaturalización. Es importante destacar, no obstante, que la secuencia de los oligonucleótidos en los dos tipos de ensayos viene impuesta por el tipo de experimento y que la diferencia en una base y/o la presencia o no de las moléculas de fluoróforo pueden tener un efecto importante en la interacción observada entre estos compuestos y el ADN cúadruple-G, como parece ser el caso para la estructura QNa.

Otro grupo de compuestos está constituido por aquellos que manifiestan un cambio relevante en los espectros de DC y, además, inducen un cambio característico y común en el espectro de ADN cúadruple, tanto en condiciones iónicas de sodio como de potasio. Concretamente, y para las condiciones iónicas de sodio, se trata de la desaparición de la señal negativa a 260 nm y de la aparición de una señal positiva a 274 nm. Por otra parte, en las condiciones iónicas de potasio, se observa una disminución de la señal a 290 nm y un aumento de la señal a 275 nm. Estos cambios ocurren en los espectros de los productos **82**, **85**, **87**, **88**, **90**, **91**, **92**, todos ellos pertenecientes a la misma familia, desde un punto de vista estructural (figura 84).





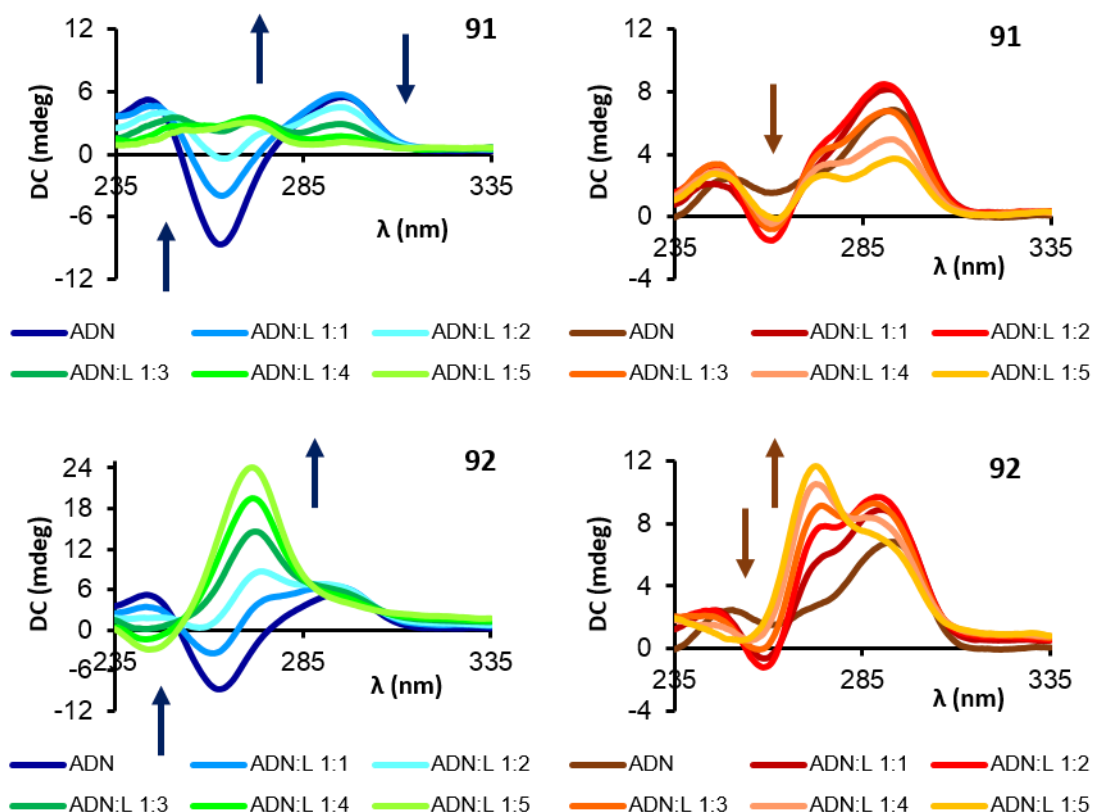


Figura 84. Cambios en los espectros de DC del ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de sodio (izquierda) o potasio (derecha) con los productos **82**, **85**, **87**, **88**, **90**, **91** y **92**

Aun admitiendo el posible error que puede suponer el realizar una interpretación de tipo cualitativo, los espectros de DC de los compuestos de este grupo sugieren que estos producen efectos importantes en la estructura del ADN cuádruple-G, en las dos condiciones iónicas estudiadas. En condiciones iónicas de potasio, parece producirse un efecto estabilizador claro hacia una topología con un mayor carácter paralelo, hecho muy evidente para el caso de los compuestos **85** y **92** y, en menor grado, para el compuesto **88**. En el caso de las condiciones iónicas de sodio, el efecto sobre la conformación del ADN es muy importante, produciéndose una alteración estructural muy significativa, de nuevo, con los compuestos **85** y **92**. Para este tipo de cambios drásticos no se puede descartar que se esté produciendo un fenómeno de dicroísmo circular inducido. Por otra parte, hay que destacar que todos los compuestos de la familia de derivados que contienen heterociclos alifáticos y $n=2$ (espaciador de 3 átomos de carbono), que presentaban una mayor estabilización del cuádruple-G (un valor

más elevado de $\Delta T_{1/2}$), se encuentran agrupados dentro de esta categoría de espectros de DC.

El último grupo de espectros corresponde al de los productos **77** y **80** (figura 85). En los espectros registrados se observó un fenómeno anómalo. Independientemente de la topología del cuádruple de partida parece que, al añadir alícuotas del ligando **77** o del ligando **80** ocurren unos cambios drásticos en el espectro, de manera que en los últimos puntos de la valoración prácticamente no se observan diferencias entre los espectros en condiciones iónicas de sodio o de potasio, a la misma concentración y proporción ADN/ligando. A concentraciones elevadas, aparentemente, se produce una distorsión estructural que parece sugerir que el oligonucleótido pierde completamente la forma plegada en cuádruple-G. A concentraciones intermedias, los cambios espectrales coinciden con los observados en la categoría anterior, observándose un efecto muy importante para el compuesto **80** a relación ADN-ligando de 1:3. Tampoco es descartable en estos casos que nos encontremos ante un caso de dicroísmo inducido.

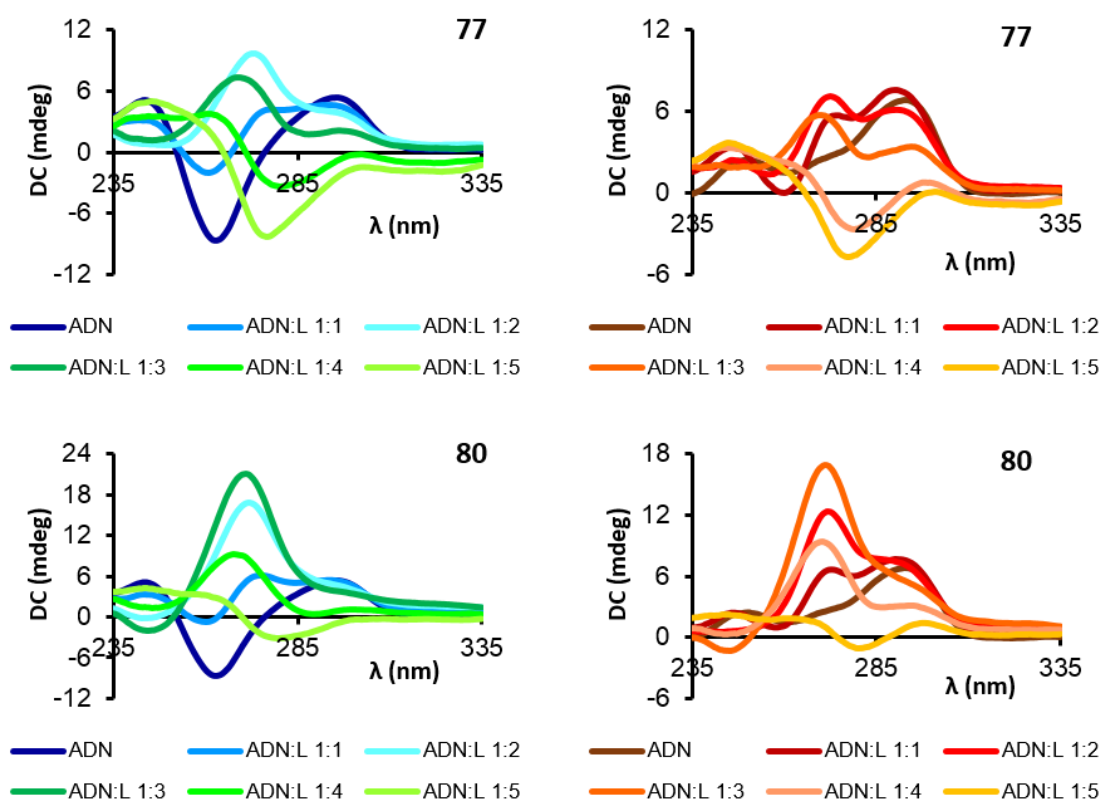


Figura 85. Cambios anómalos observados en los espectros de DC del ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de sodio (izquierda) o potasio (derecha) con los productos **77** y **80**

En resumen, varios de los compuestos estudiados muestran variaciones significativas en los espectros de dicroísmo circular del ADN cuádruple, en ambas condiciones iónicas. Conviene resaltar que estos experimentos normalmente se realizan en condiciones cinéticas, lo que suele requerir una confirmación adicional por realización de otras medidas en condiciones de equilibrio. Pero aun asumiendo las limitaciones de la técnica, los resultados obtenidos sí evidencian la existencia de interacción entre los ligandos preparados y el ADN cuádruple-G, así como distintos efectos de los mismos en la estructura global de la biomolécula.

3.2.2.1.2.2 Ensayo de desplazamiento de ligandos fluorescentes (G4-FID)

Otra técnica comúnmente empleada para evaluar la interacción entre el ADN cuádruple-G y ligandos es el ensayo de desplazamiento de ligandos fluorescentes (G4-FID).^[163] En este experimento se emplea el naranja de tiazol (*TO*, del inglés, *thiazole orange*), un compuesto que es fluorescente sólo si se encuentra unido al ADN, tanto de tipo cuádruple-G como dúplex. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizadas en este experimento fueron la secuencia Tel-22 (5'-AGG GTT AGG GTT AGG GTT AGG G-3') para los cuádruples y ds17 (5'-CCA GTT CGT AGT AAC CC-3' y hebra complementaria 5'- GGG TTA CTA CGA ACT GG-3') para el ADN dúplex.

En este ensayo se registra en primer lugar el espectro de emisión de una disolución de naranja de tiazol unido al ADN. Esta fluorescencia se registra en el intervalo 510 – 750 nm y, posteriormente, se mide el área debajo de la curva de emisión obtenida experimentalmente. A continuación, se añaden pequeñas alícuotas del ligando de interés y se vuelve a registrar el espectro de emisión de TO unido al ADN después de cada alícuota añadida. Si el ligando se une al ADN del mismo modo que el TO, se observa una reducción de la fluorescencia emitida por el TO (figura 86, **a** y **b**) con lo que simultáneamente disminuye el área debajo de la curva de emisión de fluorescencia. Por otro lado, si el ligando no desplaza al TO de su unión con el ADN, no se observa un cambio apreciable en el espectro de emisión (figura 86, **c**).^[163c]

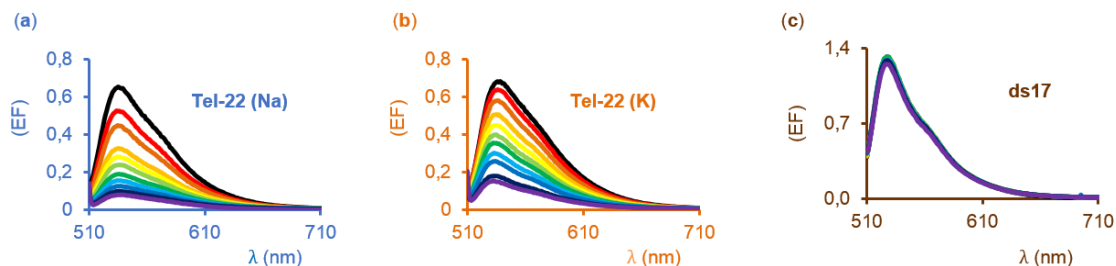


Figura 86. Curvas de emisión de fluorescencia del complejo TO – ADN; **a,b** - Disminución de la emisión de fluorescencia al añadir el ligando **360A** a la disolución de Tel-22; **c** - emisión de fluorescencia sin cambio al añadir el ligando **360A** a la disolución de ds17; la concentración de ligando aumenta con las líneas representadas de rojo ($0,125 \mu\text{M}$ **360A**) a morado ($2,5 \mu\text{M}$ **360A**)

A efectos de cuantificación, en primer lugar se registra el valor máximo de fluorescencia, correspondiente a la situación en la que el 100% del TO se encuentra unido al ADN, determinando el área debajo de la curva (ADC_0 , figura 86, curva de color negro). Tras las sucesivas adiciones de ligando se puede observar (o no) una disminución del porcentaje de TO unido al ADN. El nuevo porcentaje del TO unido al ADN ($\% \text{TOU}_x$) se recalcula a partir del área debajo de la curva ADC_x , registrada a concentración x del ligando presente en el medio, según la fórmula 2:

$$\% \text{TOU}_x = (100 \cdot \text{ADC}_x) / \text{ADC}_0 \text{ (fórmula 2)}$$

El porcentaje del TO desplazado de la unión al ADN ($\% \text{DTO}$) se recalcula sencillamente según la fórmula 3:

$$\% \text{DTO} = 100 - \% \text{TOU}_x \text{ (fórmula 3)}$$

Finalmente, los valores del porcentaje del TO desplazado del ADN ($\% \text{DTO}$) por el ligando de interés se representan en una gráfica frente la concentración del ligando utilizado. Generalmente se evalúan tres estructuras de ADN diferentes: ADN **cuádruple-G en condiciones iónicas de potasio (Tel-22 (K))**, ADN **cuádruple-G en condiciones iónicas de sodio (Tel-22 (Na))** y el **ADN dúplex**

(ds17), tal y como se representa en la figura 87, para el compuesto de referencia **360A**.

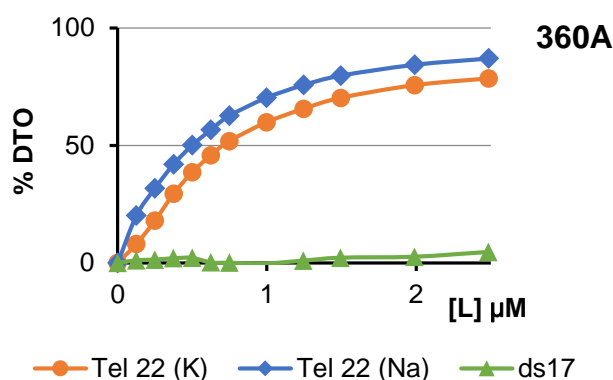


Figura 87. Gráfica que representa el porcentaje de desplazamiento del naranja de tiazol (%DTO) frente a la concentración del ligando de referencia **360A** para el ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de potasio Tel-22 (K), sodio Tel-22 (Na) y el ADN dúplex (ds17)

La magnitud que se utiliza para comparar la capacidad de los ligandos examinados de desplazar el ligando fluorescente TO de las distintas estructuras de ADN se denomina 5°DC . 5°DC representa la concentración del ligando a que se desplaza el 50% del naranja de tiazol de su unión con el ADN.

Posteriormente, se puede determinar el valor de la selectividad de unión del ligando (**S**) a las dos estructuras del ADN cuádruple-G en relación al ADN dúplex, utilizando los valores de 5°DC obtenidos para cada estructura (fórmula 4).^[163]

$$\mathbf{S} = 5^{\circ}\text{DC}_{(\text{ADN dúplex})} / 5^{\circ}\text{DC}_{(\text{ADN cuádruple-G})} \text{ (fórmula 4)}$$

En el caso de que el ligando no llegue a desplazar el 50% del TO de su unión con alguno de los ADNs estudiados, no se puede calcular la selectividad **S** según la fórmula 4, pero se puede obtener una selectividad estimada (**Est. S**), como ha sido necesario en el caso del compuesto referencia **360A**. Esta se determina comparando el porcentaje de desplazamiento de TO en el dúplex ds17, a la máxima concentración experimentada: $c_{\text{max}} = 2,5 \mu\text{M}$ (%DTO = 4,6%) con la

concentración del ligando (^xDC) que produce el mismo %DTO equivalente al 4,6% (fórmula 5). Este valor del porcentaje de desplazamiento corresponde a valores de concentración de $^x\text{DC} = 73,7 \text{ nM}$ para un desplazamiento del 4,6% con el ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de potasio y de $^x\text{DC} = 27,5 \text{ nM}$ para el ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de sodio. Los valores de la selectividad estimada obtenidos son 34 y 90, respectivamente, para el ADN cuádruple-G en potasio o sodio.^[163c]

$$\text{Est. S} = c_{\text{max}} / ^x\text{DC} \text{ (fórmula 5)}$$

A continuación, se muestran las gráficas obtenidas en el experimento G4-FID para algunos compuestos seleccionados. En el caso de los compuestos 75, 77 y 79 se empleó el rango de concentraciones de ligando 0 - 2,5 μM (figura 88).

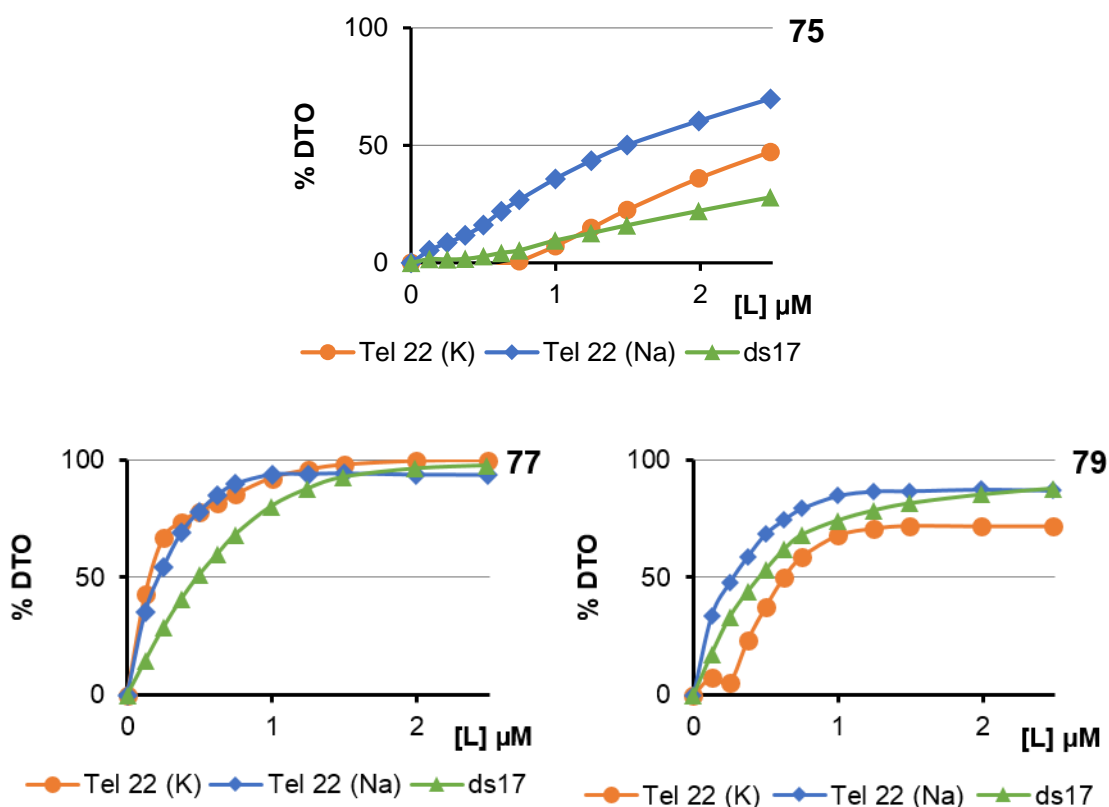


Figura 88. Desplazamiento del naranja de tiazol (%DTO) frente a la concentración de los ligandos (75, 77 y 79) para el ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de potasio Tel-22 (K), sodio Tel-22 (Na) y el ADN dúplex (ds17)

En el caso de los compuestos **6** y **A – E** se empleó un rango de concentraciones de ligando 0 - 10 μM (figura 88).

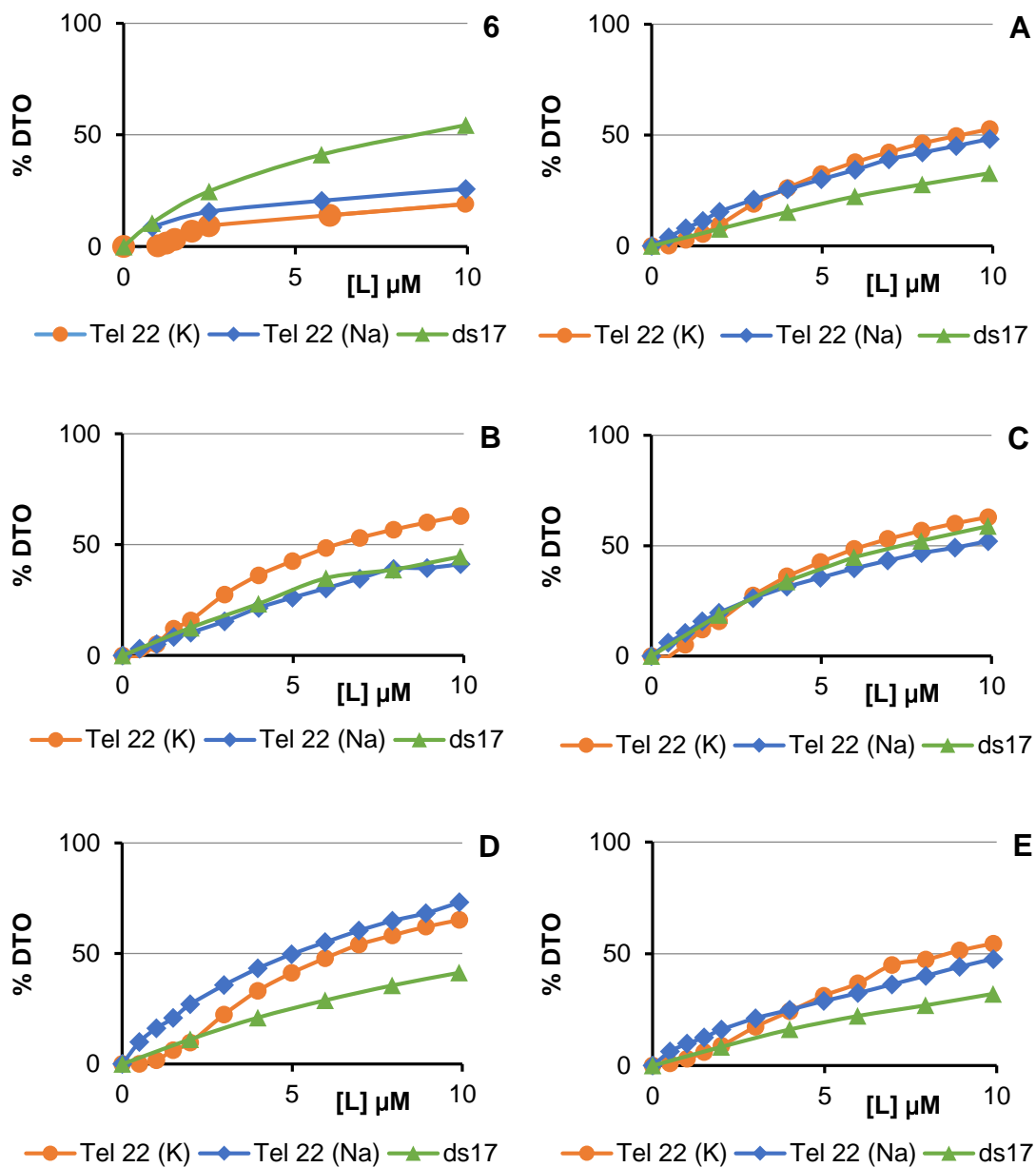


Figura 89. Desplazamiento del naranja de tiazol (%DTO) frente a la concentración de los ligandos (**6**, **75**, **77**, **79**, **A – E**) para el ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de potasio Tel-22 (K), sodio Tel-22 (Na) y el ADN dúplex (ds17)

A partir de las gráficas obtenidas se han podido calcular los valores de ^{50}DC y las selectividades (tabla 8 y 10). Por otro lado, a partir de los valores de concentración (xDC) se pudo obtener el porcentaje de desplazamiento de TO a concentración máxima y las selectividades estimadas (tablas 9 y 11). Los resultados se recogen en las **tablas 8 y 9, para el Tel-22 en condiciones iónicas de potasio** frente al ADN dúplex y en las **tablas 10 y 11 para el Tel-22 en condiciones iónicas de sodio** frente al ADN dúplex.

Antes de analizar los resultados obtenidos conviene resaltar que estos valores de selectividad no tienen correspondencia con la escala de selectividad (máximo 1) que se ha descrito anteriormente para el caso de los ensayos de desnaturalización térmica competitiva.

Producto	^{50}DC Tel-22 (K) (μM)	^{50}DC ds17 (μM)	Selectividad
77	0,2	0,5	~ 3
79	0,6	0,5	~ 1
C	8,3	7,2	~ 1

Tabla 8. Valores de ^{50}DC y selectividades de los compuestos para Tel-22 en condiciones iónicas de potasio

Producto	Tel-22(K) xDC (%DTO) (μM)	ds17 xDC (%DTO) (μM)	Selectividad estimada
360A	0,07 (4,6%)	2,5 (4,6%)	~ 34
6	10,0 (19,0%)	1,7 (19,0%)	~ 0,2
75	1,7 (27,9%)	2,5 (27,9%)	~ 1
A	5,3 (32,8%)	10,0 (32,8%)	~ 2
B	5,3 (44,7%)	10,0 (44,7%)	~ 2
D	5,0 (41,4%)	10,0 (41,4%)	~ 2
E	5,1 (32,1%)	10,0 (32,1%)	~ 2

Tabla 9. Valores de xDC y selectividades estimadas de los compuestos para Tel-22 en condiciones iónicas de potasio

Producto	⁵⁰ DC Tel-22 (Na) (μM)	⁵⁰ DC ds17 (μM)	Selectividad
77	0,22	0,45	~ 2
79	0,28	0,46	~ 2
C	9,20	7,2	~ 1

Tabla 10. Valores de ⁵⁰DC y selectividades de los compuestos para Tel-22 en condiciones iónicas de sodio

Producto	Tel-22(K) ^x DC (%DTO) (μM)	ds17 ^x DC (%DTO) (μM)	Selectividad estimada
360A	0,03 (4,6%)	2,5 (4,6%)	~ 90
6	10,0 (25,9%)	2,7 (25,9%)	~ 0,3
75	0,8 (27,9%)	2,5 (27,9%)	~ 3
A	5,0 (32,8%)	10,0 (32,8%)	~ 2
B	10,0(44,7%)	10,0 (44,7%)	~ 1
D	3,7(41,4%)	10,0 (41,4%)	~ 3
E	5,9(32,1%)	10,0 (32,1%)	~ 2

Tabla 11. Valores de ^xDC y selectividades estimadas de los compuestos para Tel-22 en condiciones iónicas de sodio vs ADN dúplex

El compuesto con mayor selectividad obtenida experimentalmente en este ensayo fue el 77 (selectividad 3 y 2 para el ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de potasio y sodio, respectivamente). Por otra parte, los compuestos 75 y 79 demuestran una selectividad de 3 y 2 (respectivamente) pero solo en condiciones iónicas de sodio.

Sorprendentemente el compuesto 6 no muestra ningún tipo de selectividad hacia el ADN cuádruple-G – al contrario, la concentración ⁵⁰DC para la estructura del dúplex es 8,5 μM mientras en los casos de las estructuras de los cuádruples, el compuesto 6 no consigue desplazar el 50% del TO de su unión ni a concentración de 10 μM . Este resultado se podría deber a la existencia de un

modo de unión diferente del compuesto **6** con las estructuras del ADN cuádruple al que muestra el naranja de tiazol y su consecuente falta de capacidad de desplazar el TO de su unión con el ADN cuádruple.

Por último, los complejos metálicos **A – E** en condiciones iónicas de potasio y sodio son capaces de desplazar el 50% del TO unido al ADN cuádruple únicamente a concentraciones de compuesto muy elevadas. En condiciones iónicas de potasio se consigue desplazar el 50% del TO unido al ADN cuádruple-G en el rango de concentraciones $6 - 9 \mu\text{M}$, mientras que en las condiciones iónicas de sodio el rango es más amplio ($5 - 13 \mu\text{M}$). Para los cálculos de selectividad, el único compuesto que consiguió desplazar el 50% del TO de su unión al ADN fue el complejo **C**. Sin embargo, este complejo no mostró selectividad en ninguna de las condiciones iónicas empleadas en este ensayo. Para el resto de complejos **A, B, D** y **E** se realizó el cálculo de selectividad estimada. Esta, para todos los complejos en condiciones iónicas de potasio es de 2, mientras en las condiciones de tampón sodio varía entre 1 – 3.

A la vista de los resultados obtenidos, podemos clasificar los compuestos ensayados con esta técnica en compuestos que compiten con el naranja de tiazol (TO) en su unión con el ADN cuádruple-G y compuestos que probablemente se unen al cuádruple de un modo distinto a como lo hace TO. Entre los primeros, que podrían clasificarse como excelentes ligandos de ADN cuádruple, se encontrarían los complejos **77** y **79**, si bien en este tipo de ensayo indirecto no muestran una selectividad apreciable en su unión al cuádruple frente al ADN de doble hebra. Por otra parte, el resto de compuestos ensayados (compuestos **6** y **75** y los complejos de Cu(II) y piranosilamina, **A - E**), pertenecerían a la segunda categoría, lo que significaría que estos compuestos muestran un modo de unión que supone, principalmente, el reconocimiento de los surcos y/o los bucles del cuádruple, en lugar de una unión en las tétradas terminales de la estructura.

3.2.2.1.3 Estudios termodinámicos entre el ligando y el ADN cuádruple-G

Diálisis de Equilibrio Competitiva

La diálisis de equilibrio competitiva, como ya se describió en el capítulo de antecedentes, se basa en la distribución diferencial de un ligando entre distintos compartimentos, en función de la afinidad de ese ligando hacia cada ácido nucleico presente en dichos compartimentos. Al alcanzarse el equilibrio, si el ligando se une a un tipo de ADN concreto, la concentración del mismo en el compartimento que lo contiene aumenta. La cuantificación de la concentración total y la determinación de la concentración de ligando unido, si ese es el caso, a las moléculas de ADN, se determina por espectroscopia de UV-visible, empleando para ello los coeficientes de extinción determinados para cada compuesto. La concentración obtenida en cada compartimento permite así la determinación de constantes de asociación aparentes (K_a). Si además la distribución se realiza en distintos compartimentos que contienen ADNs de distintas secuencias y estructuras secundarias, esta metodología permite realizar un cálculo para establecer la selectividad estructural del compuesto en su unión con las distintas macromoléculas objeto de estudio.^[107,176,219,220]

El protocolo que se empleó para realizar el experimento es el descrito por Chaires y colaboradores (tampón de diálisis en condiciones iónicas de sodio y potasio, pH = 7,2, 24 horas de equilibrado, 1 – 2 μ M de compuesto estudiado y el ADN cuádruple (Tel-22) o el ADN dúplex (ds17) a concentración de 75 μ M en unidades monoméricas (tétradas o pares de bases)).^[176]

Con estos dos tipos de ADN se determinaron las constantes de asociación para cada compuesto según la fórmulas 6 y 7, y posteriormente se determinó la selectividad (**S**) hacia el ADN cuádruple-G, a partir de las constantes de asociación obtenidas previamente (fórmula 8).^[176]

$$c_u = c_b - c_l \text{ (fórmula 6)}$$

²¹⁹ J. B. Chaires, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, **2002**, 831-838, Editorial John Wiley & Sons, Inc.

²²⁰ J. B. Chaires, *Top. Curr. Chem.*, **2005**, 253: 33-53

$$K_a = \frac{c_u}{c_l \cdot \{(c_{ADN}) - c_u\}} \text{ (fórmula 7)}$$

$$S = K_a \text{ (ADN cuádruple-G)} / K_a \text{ (ADN dúplex)} \text{ (fórmula 8)}$$

Fórmulas 6 - 8. K_a - constante de asociación (M^{-1}); c_b - concentración de ligando en la bolsa de diálisis; c_l - concentración del ligando libre; c_u - concentración del ligando unido al ADN; c_{ADN} - concentración del ADN en unidades monoméricas

Todas las experiencias se realizaron, como mínimo, por duplicado. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas que se recogen a continuación – tabla 12 para las condiciones iónicas de sodio, y tabla 13 para las condiciones iónicas de potasio.

	ADN cuádruple-G $K_a \cdot 10^4 (M^{-1})$	ADN dúplex $K_a \cdot 10^4 (M^{-1})$	Selectividad
360A	146,0 ± 0,3	2,9 ± 0,1	~ 50
6	13,0 ± 0,1	4,1 ± 0,1	~ 3
77	56,4 ± 5,8	13,7 ± 2,9	~ 4
79	35,2 ± 1,8	8,6 ± 2,2	~ 4
80	103,6 ± 22,7	21,6 ± 1,1	~ 5
91	59,5 ± 3,1	8,0 ± 0,0	~ 7
92	54,6 ± 2,1	18,9 ± 3,9	~ 3
A	1,3 ± 0,2	0,6 ± 0,0	~ 2
B	1,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1	~ 2
C	2,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0	~ 2
D	1,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	~ 2
E	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,0	~ 3

Tabla 12. Constantes de asociación obtenidas para el ADN cuádruple-G (Tel-22), ADN dúplex (ds17) y los valores de selectividad para algunos productos en condiciones iónicas de tampón sodio

En el caso de los ligandos **73** - **75** ha sido imposible realizar los experimentos de diálisis porque su espectro de absorción UV-visible solapa con el espectro del ADN.

Los complejos con más afinidad y selectividad hacia el ADN cuádruple-G en las condiciones iónicas de sodio fueron los compuestos **77**, **79**, **80**, **91** y **92**. De esta serie, el complejo metálico más débil de todos es el complejo de níquel, el producto **79**, con constantes de asociación $35,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ADN cuádruple y $8,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ADN dúplex y con un valor de la selectividad de 4. El resto de complejos metálicos presentaron una buena afinidad, a juzgar por los valores de constantes de asociación determinados, y comprendidos entre $54,6$ y $103,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ADN cuádruple entre $8,0$ y $21,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ADN dúplex. La selectividad hacia el ADN cuádruple frente al ADN dúplex varía entre 3 y 7.

El compuesto **6**, el único compuesto que no es un complejo metálico, se podría clasificar como el siguiente ligando en orden de afinidad, con constantes de asociación $13,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ADN cuádruple y $4,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ADN dúplex y con un valor de selectividad de 3.

De entre todos los ligandos estudiados, se pueden clasificar como los más débiles, en función de su afinidad, los productos **A** - **E**, para los cuales se determinaron constantes de asociación entre $0,6$ y $2,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ADN cuádruple entre $0,2$ y $1,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ADN dúplex. La selectividad hacia el ADN cuádruple frente al ADN dúplex es muy similar en todos casos (~ 2), menos el compuesto **E**, que mostró una selectividad de ~ 3 .

	ADN cuádruple $K_a \cdot 10^4 (M^{-1})$	ADN dúplex $K_a \cdot 10^4 (M^{-1})$	Selectividad
360A	39,4 ± 1,6	2,9 ± 0,1	~ 14
6	18,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	~ 8
77	278,5 ± 0,00	117,9 ± 18,6	~ 2
79	27,3 ± 4,0	6,8 ± 0,2	~ 4
80	59,4 ± 9,5	15,9 ± 0,1	~ 4
91	52,6 ± 3,2	6,5 ± 0,4	~ 8
92	118,4 ± 0,8	16,7 ± 0,0	~ 7
A	7,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	~ 11
B	6,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	~ 8
C	10,3 ± 0,9	1,0 ± 0,1	~ 10
D	10,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	~ 9
E	1,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1	~ 8

Tabla 13. Constantes de asociación obtenidas para el ADN cuádruple-G (Tel-22), ADN dúplex (ds17) y los valores de selectividad para algunos productos en condiciones iónicas de tampón potasio

Se puede destacar que cuando los experimentos se llevaron a cabo empleando condiciones iónicas de potasio, las constantes de asociación aumentaron en la mayoría de los casos, especialmente para el ADN cuádruple. Para el compuesto **6** se obtuvieron valores de constante de asociación de $18,5 \cdot 10^4 M^{-1}$ para el ADN cuádruple y de $2,4 \cdot 10^4 M^{-1}$ para el ADN dúplex y un valor de selectividad relativamente elevado, ~ 8.

Al igual que ocurría en condiciones iónicas de sodio, los complejos metálicos con mayor afinidad hacia el ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de potasio fueron los compuestos **77**, **79**, **80**, **91** y **92**. En esta serie el complejo más débil es el complejo de níquel (**79**), con constantes de asociación de $27,3 \cdot 10^4 M^{-1}$ para el ADN cuádruple y de $6,8 \cdot 10^4 M^{-1}$ para el ADN dúplex y con un valor de selectividad de 4. Para los compuestos **80**, **91** y **92** se determinaron constantes de asociación con un valor entre 52,6 y $118,4 \cdot 10^4 M^{-1}$ para el ADN cuádruple entre 6,5 y $16,7 \cdot 10^4 M^{-1}$ para el ADN dúplex. La selectividad hacia el ADN cuádruple

frente al ADN dúplex alcanza valores comprendidos entre 4 y 8. Por último, se detectó un comportamiento anómalo en el caso del compuesto **77**, cuyos valores de constantes de asociación determinados fueron muy elevados: $278,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ADN cuádruple y $117,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ADN dúplex, con una selectividad de ~ 2 .

En estas condiciones, los ligandos más débiles continúan siendo los productos **A – E**, con constantes de asociación comprendidas entre $1,6 - 10,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ADN cuádruple entre $0,2$ y $1,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para el ADN dúplex. Sin embargo, la selectividad hacia el ADN cuádruple frente al ADN dúplex ha aumentado considerablemente en todos los casos, con valores comprendidos entre 8 y 11.

En general, los compuestos estudiados por diálisis de equilibrio competitiva en esta tesis doctoral tienen la capacidad de reconocer la estructura del ADN cuádruple-G con muy buena afinidad y con cierta selectividad. Estos valores de selectividad resultan ser más representativos que los resultados obtenidos por otras técnicas descritas con anterioridad, en las que se emplea exceso de oligonucleótido competidor o se evalúa indirectamente el modo de interacción con el ADN cuádruple-G. Sin embargo, en relación a compuestos de referencia descritos previamente en la bibliografía estos resultados son claramente mejorables.

3.2.2.1.4 Viscosimetría

La viscosimetría es una técnica que se puede emplear para determinar el modo de unión entre un ligando y el ADN dúplex.^[221] La unión no covalente del ligando a la doble hélice se puede producir mediante un mecanismo de intercalación, mediante su unión a los surcos o, en determinadas ocasiones, mediante una combinación de ambos modos de unión. Una manera de diferenciar entre ligandos intercalantes de aquellos que se unen al surco es analizar la variación de la viscosidad de una disolución de ADN con la adición de alícuotas sucesivas de ligando.^[180] Los valores de la viscosidad de la disolución de ADN con ligando a concentración x , después de cada adición, se representan

²²¹ D. Suh, J. B. Chaires, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 723–728

como $(\mu_x/\mu_0)^{1/3}$ frente a la relación de concentraciones $[\text{Ligando}]/[\text{ADN (nt)}]$, y posteriormente se realiza un ajuste lineal de los datos obtenidos. De este modo, aquellos compuestos que se comportan como monointercalantes clásicos dan lugar a correlaciones lineales con un valor de pendiente próximo a 1, mientras que aquellos compuestos que se unen a los surcos originan un ajuste lineal caracterizado por una pendiente de la recta prácticamente igual a cero. Experimentalmente se ha demostrado que el rango del valor de la pendiente puede variar, encontrándose para los monointercalantes clásicos un rango de valores de pendientes comprendido entre 0,80 y 1,50, mientras que para los ligandos con capacidad de unirse a los surcos de la molécula de ADN se han observado rangos entre -0,3 y 0,2.^[181,182,222]

Para optimizar las condiciones experimentales en nuestro laboratorio se realizó primero el experimento con ADN dúplex del timo de ternera, tampón fosfato 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, empleando un monointercalante clásico como compuesto de referencia, el bromuro de etidio. El valor de la pendiente obtenido fue 1,11 (figura 90), de acuerdo con lo esperado.

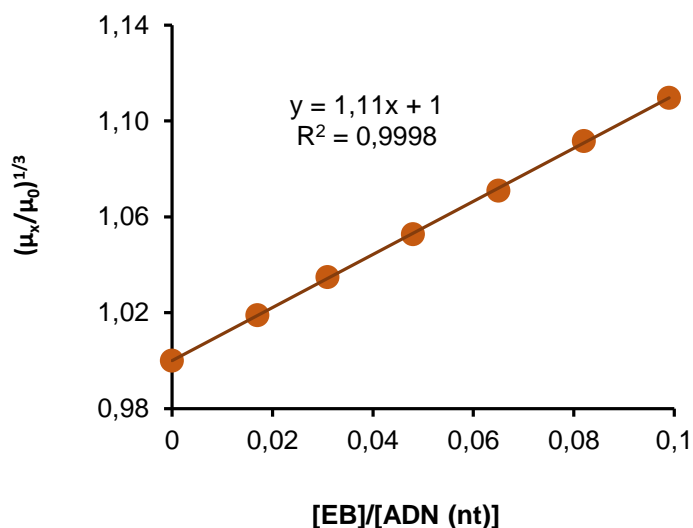


Figura 90. Viscosidad relativa $(\mu_x/\mu_0)^{1/3}$ de la disolución de bromuro de etidio (EB) frente a la relación $[\text{EB}]/[\text{ADN (nt)}]$, μ_x - viscosidad absoluta de la disolución ADN-ligando; μ_0 - viscosidad absoluta de la disolución de ADN en ausencia de compuesto, cuya concentración se expresa en nucleótidos (nt)

Los valores de las pendientes obtenidos experimentalmente y la clasificación del modo de la unión de algunos productos descritos se recogen en la tabla 14.

Producto	Valor pendiente	Clasificación
EB	$1,03 \pm 0,02$	Monointercalante clásico
6	$0,99 \pm 0,13^a$	Unión mixta, dependiente de la concentración
	$0,39 \pm 0,09^b$	
74	$0,34 \pm 0,02$	Intercalante parcial
77	$1,00 \pm 0,09^a$	Unión mixta, dependiente de concentración
	$-0,07 \pm 0,00^b$	
79	$-1,23 \pm 0,16$	Efecto compactante
A	0,30	Unión al surco/Intercalante parcial
B	0,19	Unión al surco
C	0,36	Unión al surco/Intercalante parcial
D	0,33	Unión al surco/Intercalante parcial
E	0,35	Unión al surco/Intercalante parcial
F	$0,31 \pm 0,04$	Unión al surco/Intercalante parcial
G	$0,84 \pm 0,03$	Monointercalante
H	$0,65 \pm 0,02$	Intercalante parcial
I	$0,88 \pm 0,06$	Intercalante
J	$1,85 \pm 0,11$	Bis-intercalante
K	$1,59 \pm 0,02$	Bis-intercalante

Tabla 14. *a, b* - ajuste especial - se ajustan dos pendientes:

a - [Ligando]/[ADN (nt)]: 0,00 – 0,04 y *b* - [Ligando]/[ADN (nt)]: 0,04 – 0,10

En todos los casos se obtuvieron gráficas con ajustes de regresión lineal, a excepción de los productos **6** y **77**, que manifestaron un comportamiento dependiente de la concentración (figura 91) – a concentraciones bajas, muestran una tendencia a intercalar, mientras que a concentraciones más altas cambian el comportamiento y prefieren unirse a los surcos.

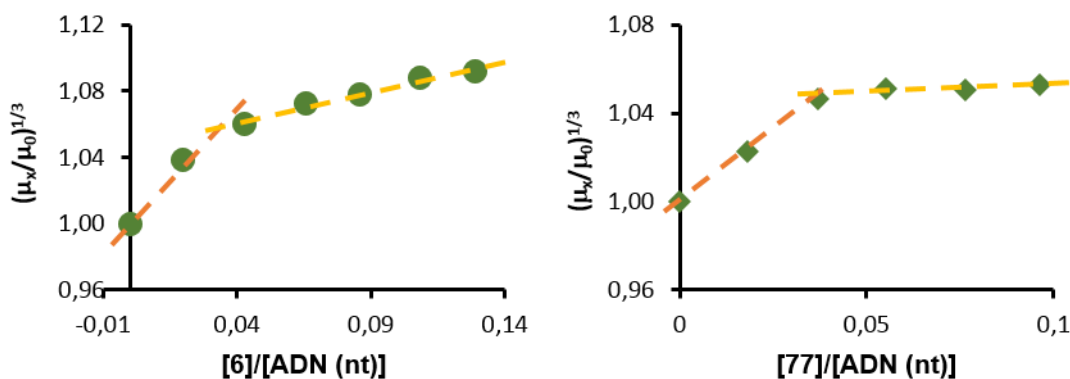


Figura 91. Viscosidad relativa $(\mu_x/\mu_0)^{1/3}$ de la disolución del compuesto **6** o **77** frente a la relación $[L]/[ADN (nt)]$, μ_x - viscosidad absoluta de la disolución ADN-ligando; μ_0 - viscosidad absoluta de la disolución de ADN en ausencia de compuesto

Un resultado inesperado es el que se obtuvo en el caso del complejo de níquel **79**. Para este compuesto se obtuvo un valor negativo de la pendiente (-1,23), lo que se atribuye a un efecto de compactación del ADN.

En el caso de los complejos de *N*-glicosilaminas de la 1,10-fenantrolina (**A** - **E**), por su parte, se observó un comportamiento preferencial de unión al surco, con una posible intercalación parcial de las estructuras en la doble hélice del ADN, con excepción del derivado de la fucopiranosilamina (**B**) donde se observó exclusivamente la unión al surco.

Por último, se estudiaron asimismo los ligandos de 1,2-etilen-4,4'-bipiridina con naftaleno (**F**), antraceno (**G**) y fenazina (**H**) y sus complejos de platino(II) **I** - **K**. Estos compuestos inicialmente fueron diseñados como ligandos intercalantes del ADN dúplex, de los cuales los ligandos (**F** - **H**) fueron diseñados como monointercalantes, mientras que de los complejos de platino(II) se esperaba una bis-intercalación. Los resultados obtenidos confirmaron los modos de unión de los ligandos como monointercalantes y de bis-intercalantes para los complejos metálicos de antraceno y fenazina. Los compuestos que contienen naftaleno en su estructura se comportaron como intercalantes parciales.^[223]

3.2.2.1.5 Ensayo directo de inhibición de la telomerasa

Un ensayo muy utilizado tradicionalmente para llevar a cabo la determinación de la actividad de la telomerasa *in vitro* es el protocolo de amplificación de repeticiones de la secuencia telomérica, TRAP (del inglés, *Telomere Repeat Amplification Protocol*).^[6] El ensayo TRAP consiste en dos etapas: una primera en la que la enzima presente en el extracto celular ejerce su función catalítica, adicionando la secuencia TTAGGG a un oligonucleótido que ejerce la función de ser un pseudo-sustrato telomérico; y una segunda etapa en la que se produce la amplificación de los productos de ADN obtenidos en la etapa anterior por medio de una enzima Taq polimerasa, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, PCR. Finalmente, los fragmentos de ADN amplificados son resueltos por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida y se cuantifica la actividad de la enzima telomerasa en función de la cantidad de ADN extendido en el ensayo.^[6]

El protocolo empleado para realizar el ensayo de la inhibición de la enzima telomerasa por varios ligandos fue el TRAP-LIG, una modificación del ensayo TRAP tradicional diseñada por primera vez en el grupo de investigación de Prof. Stephen Neidle. Esta variante evita que los compuestos estabilizadores de ADN cuádruple-G interfieran con la etapa de PCR, reaccionando con los cebadores o con el ADN extendido tras la última etapa de la misma,^[183,184] lo que conduciría a una aparente inhibición de la telomerasa y una sobreestimación del poder inhibitorio de los compuestos estudiados. El ensayo TRAP-LIG incorpora una etapa adicional al procedimiento estándar TRAP: la eliminación del ligando después de la actuación catalítica de la enzima, con lo que el ensayo modificado consta de tres etapas.

Durante una estancia predoctoral en UCL (University College London, School of Pharmacy) en el grupo de investigación de Prof. Stephen Neidle se llevaron a cabo experimentos de tipo TRAP-LIG con una selección de productos, los compuestos **6**, **55**, **77**, **79**, **A**, **D** y **E** y la telomerasa humana extraída de las células MIA-Pa-Ca-2.

Los resultados obtenidos por utilización de esta técnica se presentan determinando los valores de concentración de inhibición del 50% de la actividad de la enzima, con el parámetro denominado $^{tel}IC_{50}$. Cada $^{tel}IC_{50}$ representa la

concentración de ligando necesaria para producir una inhibición del 50% de la telomerasa, y se corresponde con una disminución del 50% de la densidad, obtenida por integración, de las bandas de ADN obtenidas en el ensayo, en relación al control positivo en ausencia de ligando.^[183,184]

Los geles más significativos se muestran a continuación en la figura 92 y los valores preliminares obtenidos de $^{tel}IC_{50}$ de los productos, siguiendo el protocolo descrito, se recogen en la tabla 15.

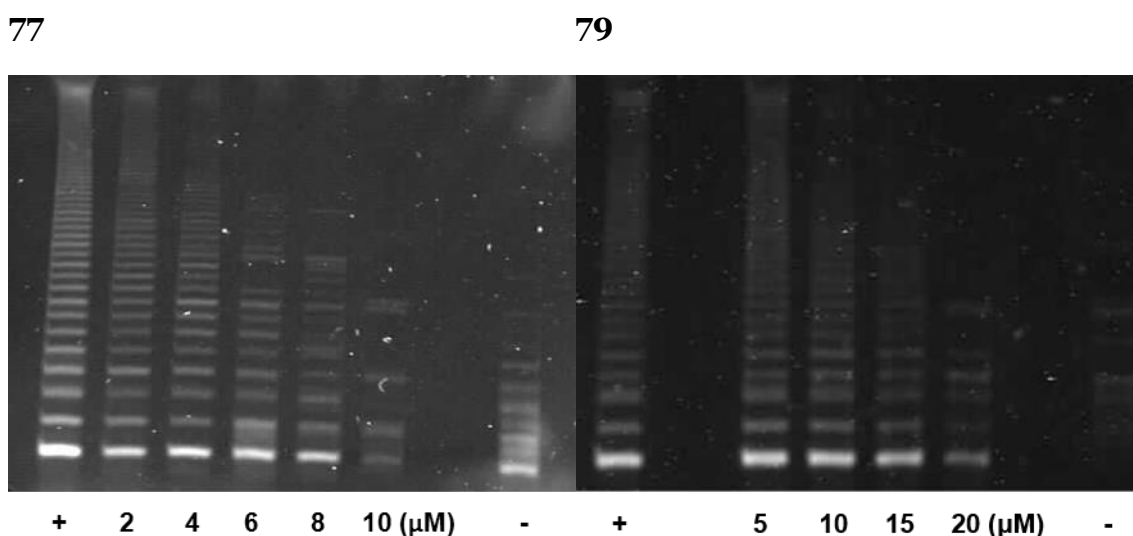


Figura 92. Geles obtenidos en el experimento TRAP-LIG con los productos 77 y 79

Producto	$^{tel}IC_{50}$ (μM)
6	6,6
55	>100
77	7,2
79	27,0
A	>100
D	>100
E	>100

Tabla 15. Valores $^{tel}IC_{50}$ preliminares determinados en el ensayo TRAP-LIG

De los compuestos empleados en este ensayo mostraron una actividad inhibidora de la telomerasa humana con valores de $^{tel}IC_{50}$ de 6,6 y 7,2 μM los compuestos **6** y **77** respectivamente, mientras el complejo de níquel **79** presentó un valor $^{tel}IC_{50}$ más elevado: 27,0 μM . Por otra parte, ni el ligando **55**, ni los complejos de Cu(II) **A**, **D** ni **E** presentaron actividad inhibidora en el rango de concentraciones examinado.

3.2.2.1.6 Ensayos con células en cultivo

Adicionalmente, durante la estancia en la University College London, en el grupo de investigación de Prof. Stephen Neidle, se realizaron ensayos con células en cultivo con una selección de productos estabilizadores de las estructuras de ADN cuádruple-G. Una de las pruebas de determinación de la actividad biológica *in vitro* más comunes es el estudio de la toxicidad celular o citotoxicidad. En nuestro caso se llevaron a cabo ensayos de la citotoxicidad celular mediante el test SRB, o ensayo de citotoxicidad con sulforodamina B.^[186,224]

El ensayo de citotoxicidad con sulforodamina B (SRB) se emplea para determinar la cantidad de células supervivientes tras su incubación con un compuesto determinado. Esta técnica es un ensayo colorimétrico, y se basa en la cuantificación de un colorante que se encuentra ligado a las proteínas de las células que se mantienen vivas durante el transcurso del experimento.

El método fue optimizado para realizar el cribado de citotoxicidad de los compuestos frente a células adherentes en un formato de placa multipocillo. Transcurrido el período de incubación con el compuesto objeto de estudio, se fijan las células con ácido tricloroacético al 10% (w/v), y se tiñen durante media hora con sulforodamina B. Después de 30 minutos se elimina el exceso del colorante, lavando varias veces con ácido acético al 1% (v/v). La sulforodamina B unida a proteínas se disuelve en disolución de 10 mM Tris para la determinación la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas. La absorbancia normalizada se representa en una gráfica frente a la concentración del compuesto estudiado, y

²²⁴ P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd, *JNCI*, **1990**, *82*, 1107-1112

posteriormente se determina el valor de concentración de inhibición del crecimiento de las células, IC_{50} . IC_{50} representa una concentración del compuesto a la que se alcanza intensidad de absorbancia normalizada igual al 50% de la muestra de control (control positivo). La muestra de control positivo se corresponde con la ausencia del compuesto de prueba.^[186]

El experimento se realizó con cinco líneas celulares tumorales (RCC4 – de carcinoma renal, A549 – de carcinoma de pulmón, MCF7 – de carcinoma de pecho, PANC y MIA-Pa-Ca-2 – de carcinoma de páncreas) y una línea de fibroblastos no cancerígenos (WI38), como control de toxicidad frente células sanas.^[93] A continuación, en la figura 93, se muestra una selección de placas en formato multipocillo obtenidas durante el experimento y los valores de IC_{50} de los productos ensayados, se recogen en la tabla 16.

IC_{50} (μ M)	RCC4	A549	MIA-Pa-Ca-2	PANC	MCF7	WI38
6	>50	>50	>50	>50	>50	>50
77	12,0	4,5	10,3	7,0	31,0	4,6
79	6,1	22,5	25,3	35,2	17,5	6,9

Tabla 16. IC_{50} – concentración de producto para conseguir una inhibición del 50% del crecimiento de las células: RCC4 – línea celular de carcinoma renal, A549 – línea celular de carcinoma de pulmón, MCF7 – línea celular de carcinoma de pecho, PANC y MIA-Pa-Ca-2 – línea celular de carcinoma de páncreas, WI38 - línea celular de fibroblastos sanos

En el rango de concentraciones examinado no se observó ninguna citotoxicidad del compuesto **6** frente a las células cancerosas, ni frente a la línea de fibroblastos sanos, los valores de IC_{50} son superiores a 50 μ M en todos los casos. Este resultado se podría deber a la baja capacidad del compuesto **6** de penetrar en las células o simplemente a una falta de citotoxicidad significativa de este compuesto.

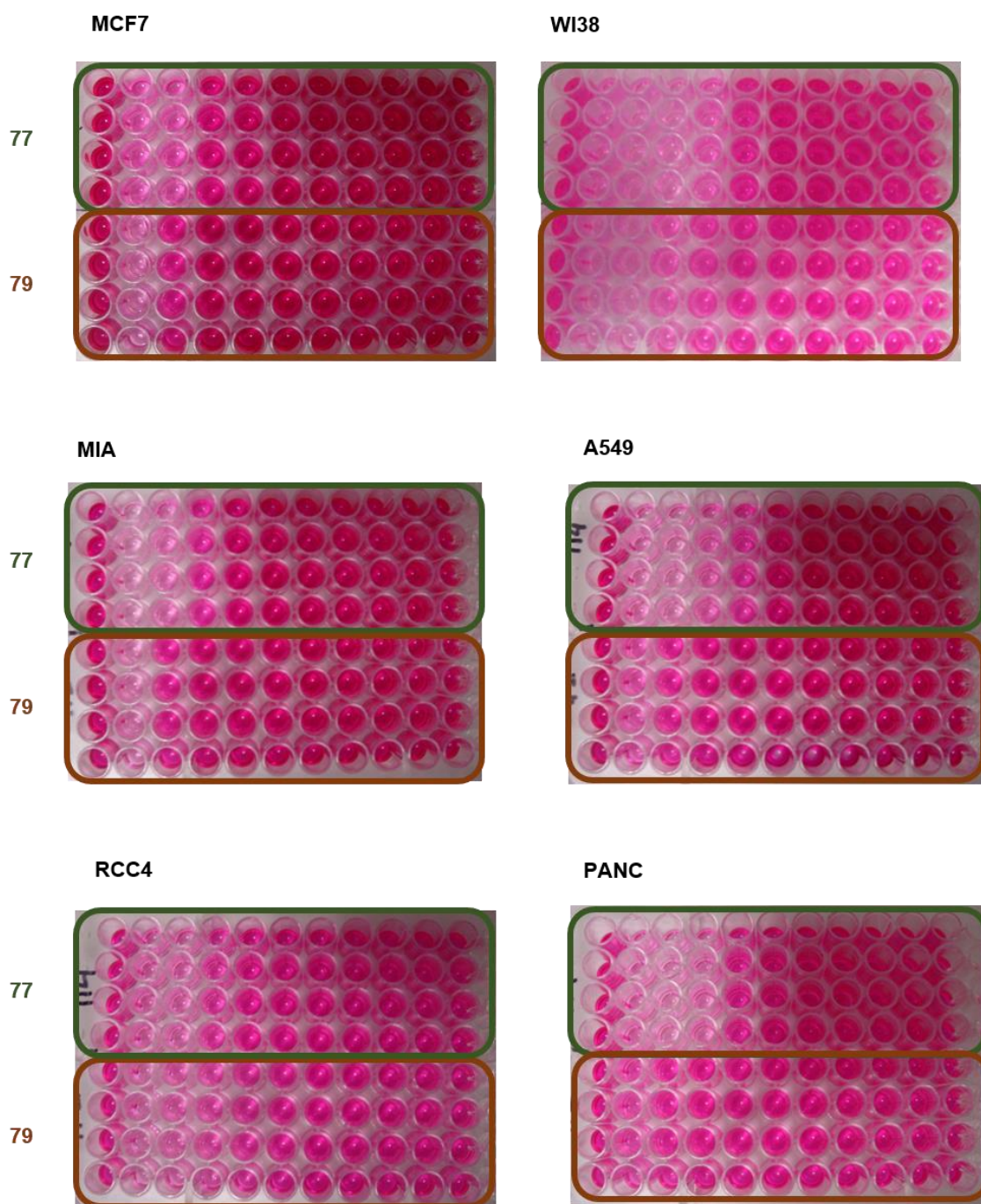


Figura 93. Selección de placas del test SRB – concentraciones de compuesto, de izquierda a derecha: $0 \mu\text{M}$ (control positivo), 50 , 25 , $12,3$, $6,3$, $3,1$, $1,6$, $0,8$, $0,4$, $0,2$ y $0,1 \mu\text{M}$

Por otra parte, los complejos **77** y **79** mostraron un efecto citotóxico importante en las distintas células examinadas. Los rangos de concentraciones de IC_{50} fueron de $4,6 - 31,0 \mu\text{M}$ para el complejo de Cu(II) **77** y de $6,1 - 35,2 \mu\text{M}$ para el complejo de Ni(II) **79**. Desafortunadamente, se observó también

citotoxicidad de ambos complejos en fibroblastos sanos WI38. Estos resultados preliminares han de ser confirmados mediante la realización de experimentos adicionales, incluyendo la determinación de la actividad biológica del resto de compuestos sintetizados durante el desarrollo de este trabajo.

4. Parte experimental

4.1 Síntesis

4.1.1 Materiales y métodos

Las reacciones que exigieron condiciones anhidras se llevaron a cabo bajo atmósfera de argón. Los disolventes utilizados, con un grado de pureza adecuado para síntesis, se secaron mediante el empleo de un equipo MBraun SPS-800. Los reactivos comerciales utilizados han sido adquiridos principalmente a Sigma Aldrich, Fluka y Acros, y se emplearon sin ningún tipo de manipulación.

Las reacciones y los procesos de purificación se siguieron por cromatografía en capa fina, empleando placas de gel de sílice 60 G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel 0,20 mm) detectándose los distintos productos por UV (254 y 366 nm), o bien utilizando como métodos de revelado una disolución acuosa de KMnO₄ (1%) o una disolución etanólica de CoCl₂. Para las cromatografías en columna flash se utilizó gel de sílice 60 (Merck) de 40 – 63 µm.

Tras los procesos de purificación correspondientes, los productos se secaron convenientemente a vacío, en presencia de un agente desecante adecuado.^[225]

Los productos obtenidos se analizaron por y distintas técnicas espectroscópicas, con objeto de comprobar su pureza y asignar su estructura. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Electrothermal 9100 y se dan sin corregir.
- Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR 1725X en pastillas de KBr o utilizando ventanas de NaCl.
- Los espectros de masas de baja resolución se realizaron en un espectrómetro Hewlett-Packard 5988A (70 eV). Los espectros de masa de alta resolución se registraron en un equipo Agilent 1100 Serie LC/MS-TOF. Los espectros FAB se realizaron en matriz de alcohol 3-nitrobencílico en un instrumento VG AutoSpec Waters. Los datos se expresan en unidades de masa-carga (m/z).

²²⁵ M. A. Martínez Grau, A. G. Csáky, *Técnicas experimentales en síntesis orgánica, 1ª edición, 1998*, ISBN 978 8477386056, Editorial Síntesis

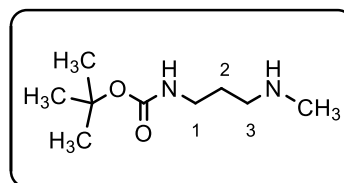
- Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C han sido registrados en los siguientes aparatos: Varian UNITY 300, Varian-Mercury-VX-300 y Varian UNITY^{Plus}-500. Los diferentes espectros y experimentos de RMN unidimensionales (1D) y bidimensionales (2D) se llevaron a cabo empleando disoluciones de concentración 0,10 – 0,25 M en disolventes deuterados suministrados por la casa comercial SDS. Los valores de los desplazamientos químicos se expresan en unidades δ (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hz.^[226,227]

En la descripción de la asignación de cada protón (^1H) o carbono (^{13}C), para la mayoría de los compuestos sintetizados, se ha utilizado el criterio de numerar la unidad heterocíclica principal, asignando a las cadenas laterales las letras *a* – *i*, según su proximidad al sistema cíclico.

4.1.2 Procedimientos de síntesis

Carbamato de *tert*-butil-[3-(metilamino)prop-1-ilo] (1)^[187]

A una disolución de 724 μL (6,86 mmol) de *N*-metilpropano-1,3-diamina en 35 mL de diclorometano seco, se adicionó lentamente, bajo atmósfera de argón y a $-45\text{ }^\circ\text{C}$, una disolución de



1,46 g (6,65 mmol) de 1-[(*tert*-butoxicarbonil)oxi]pirrolidin-2,5-diona en diclorometano, enfriada previamente a $-45\text{ }^\circ\text{C}$. Después de la adición se dejó evolucionar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y después de 22 horas con agitación, la mezcla de reacción se concentró a sequedad. El sólido obtenido se trató con 50 mL de éter etílico y con 3 x 30 mL de NaH_2PO_4 (100 mM, pH = 5). El pH de la fase acuosa resultante se ajustó con una disolución de hidróxido de sodio (1M) a pH = 11 y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL). La fase orgánica se secó con Na_2CO_3 y se concentró a sequedad. De esta manera, se obtuvieron 478 mg de un aceite incoloro.

²²⁶ G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, K. I. Goldberg, *Organometallics*, **2010**, 29, 2176 – 2179

²²⁷ E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter, A. Herrera, R. Martínez, *Determinación estructural de compuestos orgánicos*, (traducción de la edición en inglés), **2001**, ISBN 84 07 00526 6, Editorial Springer-Verlag Ibérica

Rdto.: 38%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3361, 2975, 2931, 1694, 1577, 1482, 1394, 1366, 1307, 1252, 1163, 1050, 878.

MS (ESI, m/z) para C₉H₂₁N₂O₂ [M + H]⁺

Calculado: 189,16

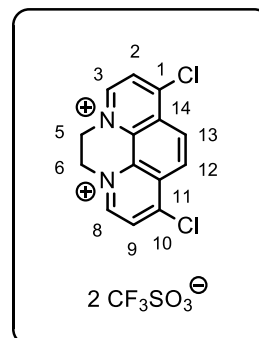
Encontrado: 189,20

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,27 (s ap. ancho, 2H, H-1), 2,81 (s, 3H, NCH₃), 2,66 (t, J = 6,8 Hz, 2H, H-3), 1,62 (q ap., J = 6,8 Hz, 2H, H-2), 1,46 (s, 9H, (CH₃)₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 79,3, 49,4, 36,0, 33,9, 29,4, 28,4.

Bistriflato del 1,10-dicloro-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-l,m,n] [1,10]fenantrolinio (2)

A una suspensión de 245 mg (0,95 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina en 20 mL de diclorometano, bajo atmósfera inerte, se adicionó una disolución de 332 mg (1,02 mmol) de bis(trifluorometanosulfonato) de etano-1,2-diilo en 10 mL de diclorometano. La disolución amarilla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente. Después de 23 horas se enfrió la mezcla a 4 °C durante 30 minutos y el precipitado formado se filtró y se lavó con diclorometano frío (2 x 10 mL). De este modo se obtuvieron 483 mg de bistriflato de la 1,10-dicloro-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-l,m,n] [1,10]fenantrolinio como un sólido amarillo claro.



Rdto.: 88%

P.f. = 229 - 230 °C (descompone)

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3107, 3052, 2978, 2935, 1584, 1470, 1275, 1142, 1031, 876, 850, 834, 825, 754, 731, 707.

MS (ESI, m/z) para C₁₄H₁₁Cl₂N₂ [M - 2 CF₃SO₃]⁺

Calculado: 277,03

Encontrado: 276,02

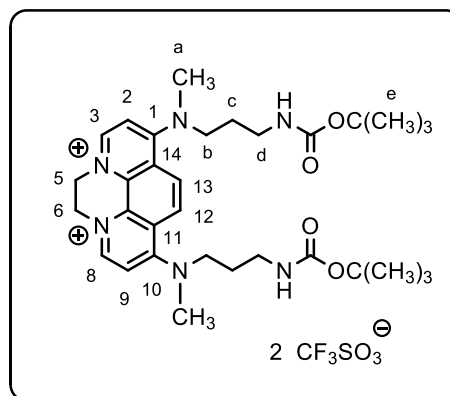
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): 9,94 (d, $J = 6,3$ Hz, 2H, H-3,8), 9,12 (s, 2H, H-12,13), 9,04 (d, $J = 6,3$ Hz, 2H, H-2,9), 5,98 (s, 4H, H-5,6).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): 206,1, 155,3, 150,7, 131,8, 131,3, 129,3, 127,8, 53,8.

$^{19}\text{F-RMN}$ (282 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): - 79,1.

Bistriflato del 1,10-bis (*N*-metil,*N*-*terc*-butoxicarbonilaminoprop-3-il)amino-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-*l,m,n*] [1,10]fenantrolinio (3)

A una disolución de color amarillo de 214 mg (0,37 mmol) de bistriflato de 1,10-dicloro-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-*l,m,n*] [1,10]fenantrolinio en 20 mL de acetonitrilo anhidro se adicionó, bajo atmósfera de argón, una disolución de 246 mg (1,31 mmol) de carbamato de *terc*-butil-[3-(metilamino)prop-1-ilo] en 10 mL de



acetonitrilo. El color de la disolución cambió inmediatamente a rojo oscuro, que se aclaró con el tiempo, dando lugar a una tonalidad anaranjada. Posteriormente, se añadieron a la disolución 188 mg (1,36 mmol) de K_2CO_3 y la mezcla se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró hasta obtener un aceite de color naranja. El aceite se disolvió en la mínima cantidad de acetato de etilo y se añadió éter etílico frío precipitando así un sólido amarillo. La suspensión se dejó a -20 °C durante 1 hora y luego el sólido se filtró obteniéndose 328 mg de un sólido amarillo.

Rdto.: 100%

P.f. = 90 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3504, 3295, 3097, 2978, 2935, 1679, 1635, 1606, 1585, 1227, 1163, 1029, 867, 815, 773, 758, 719.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{33}\text{H}_{48}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_7\text{S}$ [$\text{M} - \text{CF}_3\text{SO}_3$] $^+$

Calculado: 729,33

Encontrado: 729,11

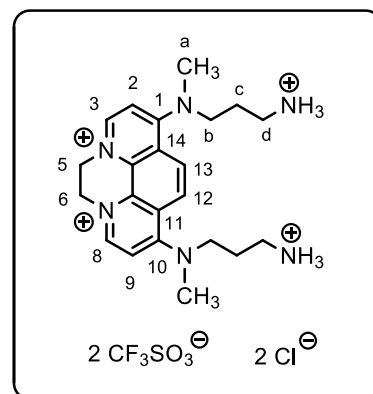
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 8,39 (s, 2H, H-12,13), 8,14-7,80 (m ap., 2H, H-3,8), 6,82 (m ap., 2H, H-2,9), 4,87 (s, 4H, H-5,6), 3,53 (s ap., 4H, H-d), 3,41 (t, $J = 6,9$ Hz, 4H, H-b), 2,90 (s, 6H, H-a), 2,00 (q ap., $J = 6,9$ Hz, 4H, H-c), 1,44 (s, 18H, (C-e).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 156,5, 143,9, 130,0, 120,5, 118,0, 102,2, 81,2, 48,5, 47,2, 45,2, 34,8, 28,7.

$^{19}\text{F-RMN}$ (282 MHz, CD_3OD), δ (ppm): - 76,2.

Bistriflato, dicloruro del 1,10-bis [*N*-(1-amonioprop-3-il)-*N*-metil]amino-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-*l,m,n*] [1,10]fenantrolinio (4)

A una disolución de color amarillo de 450 mg (0,51 mmol) de bistriflato de 1,10-bis(*N*-metil,*N*-*terc*-butoxicarbonilaminoprop-3-il)-5,6-dihidropirazino [1,2,3,4-*l,m,n*] [1,10]fenantrolinio en 10 mL de THF anhidro se añadieron, gota a gota, 3 mL (36,10 mmol) de ácido clorhídrico concentrado y se mantuvo a temperatura ambiente durante 24 horas. La disolución naranja cambió su coloración inmediatamente a amarillo claro. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el sólido obtenido se lavó con diclorometano frío obteniéndose 383 mg de un sólido amarillo.



Rdto.: 100%

P.f. = 179 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ cm^{-1}): 3410, 3205, 3076, 2935, 1628, 1598, 1471, 1278, 1160, 1034, 917, 833, 759, 726, 642.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{Cl}_2\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_6\text{S}_2$ [$\text{M} - \text{H}$] $^-$

Calculado: 749,12

Encontrado: 749,05

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 8,74 (s, 2H, H-12,13), 8,66 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H, H-3,8), 7,32 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H, H-2,9), 4,88 (s, 4H, H-5,6), 3,83 (t, *J* = 7,3 Hz, 4H, H-d), 3,22 (t, *J* = 7,3 Hz, 4H, H-b), 2,75 (s, 6H, H-a), 2,24 (q ap., *J* = 7,3 Hz, 4H, H-c).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 157,0, 147,1, 130,6, 121,8, 120,7, 103,2, 50,8, 47,8, 42,1, 33,7, 25,8.

¹⁹F-RMN (282 MHz, CD₃OD), δ (ppm): - 85,3.

Bistriflato del 1,10-bis *N*-metil,*N*-[1-(bis-*tert*-butoxicarbonil)-guanidino-prop-3-il]amino-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4 – 1,m,n] [1,10]fenantrolinio (5)

A una suspensión de color amarillo de 321 mg (0,43 mmol) de bistriflato, dicloruro del 1,10-bis [*N*-(1-amonioprop-3-il)-*N*-metilamino]

5,6-

dihidropirazino[1,2,3,4-1,m,n]

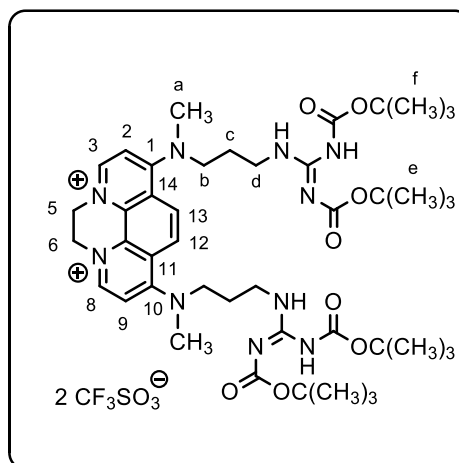
[1,10]fenantrolinio en 30 mL de DMF anhidra se adicionaron, bajo atmósfera de

argón, 280 μL (1,99 mmol) de trietilamina, 273 mg (0,92 mmol) de *N,N'*-

bis(*tert*-butoxicarbonil)-*S*-metilisotiourea y 265 mg (0,98 mmol) de HgCl₂. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 49 horas. Posteriormente la mezcla de reacción se disolvió en metanol para precipitar las sales inorgánicas de HgCl₂, se centrifugó la suspensión obtenida y se lavó dos veces más con metanol. El líquido resultante se concentró hasta un pequeño volumen de metanol y se añadió abundante éter etílico frío precipitando así un sólido amarillo. La suspensión se dejó a - 20 °C durante 1 hora y al filtrar se obtuvieron 312 mg de un sólido amarillo claro.

Rdto.: 63%

P.f. = 63 – 64 °C



IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3498, 3216, 3080, 2978, 2932, 2360, 1741, 1629, 1603, 1458, 1393, 1250, 1144, 1030, 812, 639.

MS (ESI, m/z) para C₄₆H₆₉F₆N₁₀O₁₄S₂ [M + H]⁺

Calculado: 1163,43

Encontrado: 1164,20

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 8,64 (s, 2H, H-12,13), 8,59 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, H-3,8), 7,28 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, H-2,9), 4,92 (s, 4H, H-5,6), 3,76 (t, $J = 6,6$ Hz, 4H, H-d), 3,63 (t, $J = 6,6$ Hz, 4H, H-b), 3,06 (s, 6H, H-a), 2,12 (q ap., $J = 6,6$ Hz, 4H, H-c), 1,45 (s, 36H, H-e,f).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 167,8, 156,9, 156,7, 146,9, 130,6, 121,7, 120,6, 103,1, 84,0, 55,7, 50,8, 42,3, 33,9, 28,6, 28,5, 26,3.

¹⁹F-RMN (282 MHz, CD₃OD), δ (ppm): - 80,2.

Bistriflato, bistrifluoracetato del 1,10-bis N-metil-(N-1-guanidinioprop-3-il)amino-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-l,m,n] [1,10]fenantrolinio (6)

A una suspensión de **5** (160 mg, 0,14 mmol) en diclorometano anhidro (20 mL) y bajo atmósfera de argón se adicionaron 560 μ L (7,54 mmol) de ácido trifluoroacético. Transcurridas 25 horas con agitación a temperatura ambiente se evaporó el disolvente y el residuo obtenido se disolvió en la mínima cantidad de metanol y al añadir éter etílico frío

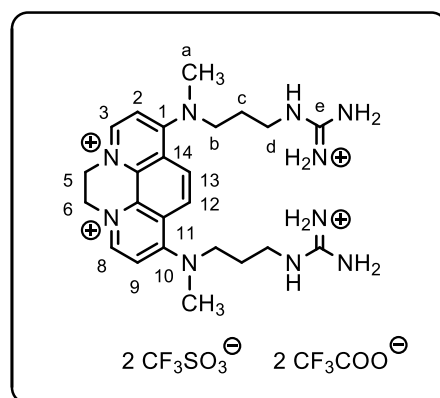
precipitó un sólido amarillo. La suspensión se dejó a - 20 °C durante 16 horas y se filtró obteniéndose de este modo 132 mg de un sólido amarillo claro.

Rdto.: 97%

P.f. = 180 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3354, 3190, 1667, 1602, 1459, 1431, 1253, 1203, 1079.

MS (ESI, m/z) para C₃₀H₃₉F₁₂N₁₀O₁₀S₂ [M + H]⁺



Calculado: 991,21

Encontrado: 992,73

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 8,63 (s, 2H, H-12,13), 8,62 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, H-3,8), 7,25 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H, H-2,9), 4,92 (s, 4H, H-5,6), 3,73 (t, $J = 7,2$ Hz, 4H, H-d), 3,55 (t, $J = 7,2$ Hz, 4H, H-b), 3,10 (s, 6H, H-a), 2,17 (q ap., $J = 7,2$ Hz, 4H, H-c).

¹³C-RMN (125 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 158,3 y 157,0 (C-e, C-1,10), 146,9 (C-3,8), 130,6 (C-4b,7b), 121,6 (C-12,13), 120,6 (C-11,14), 103,0 (C-2,9), 50,7 (C-5,6), 49,1 (C-b), 42,5 (C-d), 36,6 (C-a), 26,4 (C-c).

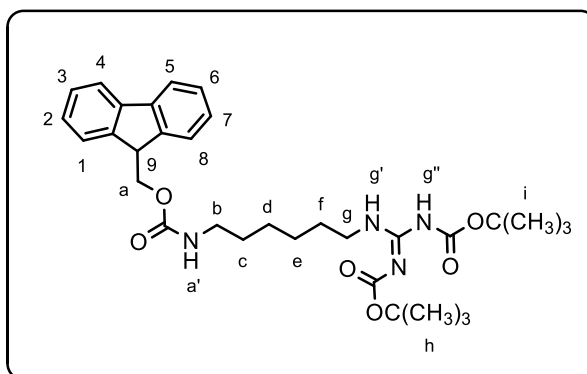
¹⁹F-RMN (282 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): - 76,8, - 80,1.

UV-vis: λ_{\max} (nm) = 366, 349, 260

$\epsilon_{(366 \text{ nm})} = 26532 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

6-Fluorenilmetoxicarbonilaminohex-1-il-bis(*terc*-butoxicarbonil)guanidina (7)

A una disolución de 69 mg (0,23 mmol) de *N,N'*-bis(*terc*-butoxicarbonil)-*S*-metilisotiurea en 5 mL de acetonitrilo anhidro y bajo atmósfera de argón, se añadieron 98 mg (0,23 mmol) de hidrobromuro de *N*-fluorenilmetoxicarbonil-hexan-1,6-



diamina, 65 mg (0,24 mmol) de HgCl₂ y 200 μ L (1,15 mmol) de *N,N*-diisopropil(*N*-etil)amina. La mezcla se dejó agitando a temperatura ambiente durante 24 horas después de las cuales la suspensión resultante se filtró. El filtrado se concentró a sequedad y la mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columna flash (\varnothing 30 mm, h = 17,5 cm, hexano/acetato de etilo 8:2, $R_f = 0,14$) con lo que se obtuvieron 118 mg del producto deseado como un aceite incoloro.

Rdto.: 87%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3334, 3067, 2978, 2933, 1720, 1639, 1134, 1054, 759, 741.

MS (ESI, m/z) para C₃₂H₄₅N₄O₆ [M + H]⁺

Calculado: 581,33

Encontrado: 581,35

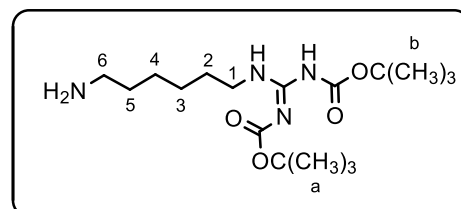
¹H-RMN (300 MHz, CD₃COCD₃), δ (ppm): 11,66 (s, 1H, NH-g''), 8,29 (s, 1H, NH-a'), 7,84 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H, H-4,5), 7,67 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, H-1,8), 7,39 (t, $J = 7,3$, 2H, H-3,6), 7,30 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, H-2,7), 6,46 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H, NH-g'), 4,32 (d, $J = 7,0$ Hz, 2H, H-a), 4,20 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H, H-9), 3,39 (c ap., $J = 3,4$ Hz, 2H, H-b), 3,15 (c ap., $J = 6,7$ Hz, 2H, H-g), 1,60-1,52 (m, 4H, H-c,f), 1,50 (s, 9H, H-i), 1,43 (s, 9H, H-h), 1,40-1,30 (m, 4H, H-d,e).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 163,4, 156,4, 156,1, 153,3, 144,0, 141,3, 127,6, 127,0, 125,1, 119,9, 83,2, 79,5, 66,5, 47,3, 41,0, 40,9, 29,8, 28,9, 28,3, 28,1, 26,5, 26,3.

6-Aminohex-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina (**8**)

Método A

69 mg (0,12 mmol) de 6-fluorenilmetoxicarbonilaminohex-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina (**7**) se disolvieron en 10 mL de morfolina y la disolución se dejó con agitación a temperatura ambiente. Después de 24 horas



la mezcla de reacción se concentró a sequedad y el producto bruto obtenido se purificó por cromatografía en columna flash (\varnothing 20 mm, h = 15,0 cm, acetato de etilo/metanol 8:2, $R_f = 0,12$) con lo que se obtuvieron 17 mg de 6-aminohex-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina.

Método B

597 mg (1,03 mmol) de 6-fluorenilmetoxicarbonilaminohex-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina (**7**) se disolvieron en 10 mL de morfolina y se dejó con agitación, bajo atmósfera de argón, durante 24 horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el sólido obtenido se lavó con metanol frío. Al concentrar

la disolución metanólica se obtuvo una mezcla de productos, que contenía 364 mg del producto deseado.

Método C

A una disolución de 186 mg (0,32 mmol) de 6-fluorenilmetoxicarbonilaminohehex-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina (7) en 20 mL de THF se adicionaron 576 μ L de octanotiol y 10 μ L (0,06 mmol) de 1,5-diazabicyclo[5.4.0]undec-5-eno. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas, se concentró a sequedad y posteriormente se purificó por cromatografía en columna flash (\varnothing 30 mm, h = 15,5 cm, acetato de etilo/metanol 8:2, R_f = 0,12) con lo que se obtuvieron 115 mg del producto deseado como un aceite incoloro.

Rdto.: Método A 40%

Método B 99%

Método C 100%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3335, 2978, 2934, 2861, 1720, 1642, 1576, 1416, 1368, 1332, 1156, 1134.

HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₁₇H₃₅N₄O₄ [M + H]⁺

Calculado: 359,2658

Encontrado: 359,2668

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,36 (t, *J* = 6,7 Hz, 2H, H-1), 3,13 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H, H-6), 1,62-1,54 (m, 4H, H-2,5), 1,50 (s, 9H, H-b), 1,42 (s, 9H, H-a), 1,40-1,32 (m, 4H, H-3,4).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃COCD₃), δ (ppm): 164,4, 156,3, 153,5, 83,4, 78,5, 51,5, 41,0, 31,4, 29,6, 28,3, 27,9, 27,7, 27,2.

4-((9*H*-Fluoren-9-il)metil)morfolina (**8a**)

El producto **8a** es un sólido blanco, aislado como producto secundario de la mezcla de reacción obtenida por el método B.

P.f. = 172 – 173 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3060, 2969, 2943, 2801, 1113.

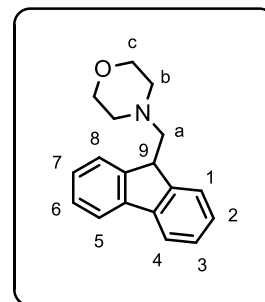
MS (ESI, m/z) para C₁₈H₂₀NO [M + H]⁺

Calculado: 266,15

Encontrado: 266,15

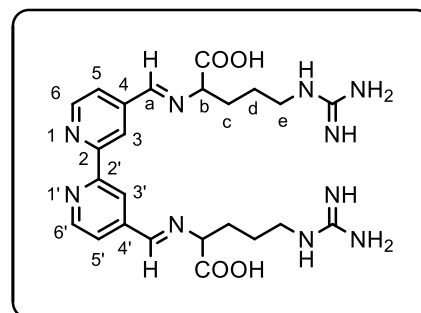
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7,75 (d, 2H, J = 7,5 Hz, H-4,5), 7,68 (d, 2H, J = 7,5 Hz, H-1,8), 7,37 (t ap., 2H, J = 7,5 Hz, H-3,6), 7,29 (t ap., J = 7,5 Hz, H-2,7), 4,03 (t, 1H J = 8,1 Hz, H-9), 3,82 (t, 4H, J = 4,7 Hz, H-c), 2,65 – 2,61 (m, 6H, H-a,b).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃COCD₃), δ (ppm): 144,0, 141,3, 127,1, 126,7, 125,3, 119,7, 67,2, 62,7, 54,0, 44,2.



4,4'-Bis-*N,N'*-(4-carboxi-1-guanidinobutan-4-il)iminometil-2,2'-bipiridina (**9**)

A una suspensión de 358 mg (2,02 mmol) de L-arginina en 15 mL de etanol, bajo atmósfera de argón, se añadieron 4 mL de una suspensión de 194 mg (0,87 mmol) de 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxaldehído en etanol. La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 22 horas. El precipitado resultante se filtró y se lavó con etanol, obteniéndose 441 mg de un sólido amarillo.

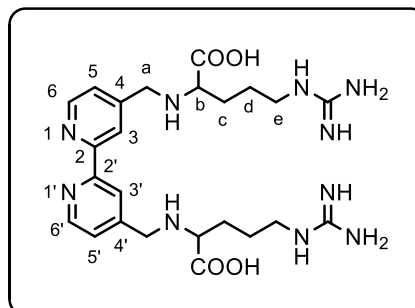


Rdto.: 97%

¹H-RMN (300 MHz, D₂O), δ (ppm): 8,56 (d, J = 4,9 Hz, 2H, H-6,6'), 8,25 (s, 2H, H-3,3'), 8,15 (s, 2H, H-a), 7,63 (d, J = 4,9 Hz, 2H, H-5,5'), 3,84 (t, J = 6,8 Hz, 2H, H-b), 3,10 (t, J = 5,9 Hz, 4H, H-e), 3,08 – 2,99 (m, 8H, H-c,d).

4,4'-Bis-*N,N'*-(4-carboxi-1-guanidinobutan-4-il)aminometil-2,2'-bipiridina (10)

A una suspensión de 391 mg (0,75 mmol) del compuesto **9** en 30 mL de metanol, se añadieron 56 mg (1,76 mmol) de borohidruro de sodio. La mezcla de reacción se dejó evolucionar hasta temperatura ambiente y se mantuvo con agitación durante 24 horas al cabo de las cuales se observó la presencia de un aceite amarillo en el medio de reacción. La disolución se decantó y se concentró a sequedad. El sólido obtenido se trató con 20 mL de 2-propanol y se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. El sólido obtenido se filtró obteniéndose 340 mg del producto deseado.



Rdto.: 91%

P.f. > 300 °C

MS (ESI, m/z) para $C_{24}H_{37}N_{10}O_4$ [M + H]⁺

Calculado: 529,30

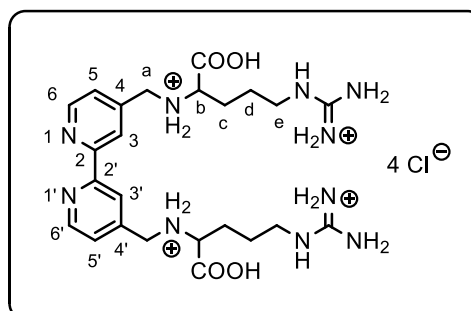
Encontrado: 529,29

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 8,95-8,93 (m, 4H, H-3,3',6,6'), 8,00 (d, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-5,5'), 4,63 (s, 4H, H-a), 4,31 (t, *J* = 5,0 Hz, 2H, H-b), 2,25 – 2,15 (m, 4H, H-e), 2,04 – 1,65 (m, 8H, H-c,d).

¹³C-RMN (75 MHz, D₂O), δ (ppm): 181,5, 156,6, 155,2, 150,3, 149,1, 124,0, 121,9, 62,5, 50,1, 40,8, 31,0, 23,6.

Tetrahidrocloruro de 4,4'-bis-*N,N'*-(4-carboxi-1-guanidiniobutan-4-il)amoniometil-2,2'-bipiridina (11)

A una suspensión de 224 mg (0,42 mmol) de 4,4'-bis-*N,N'*-(4-carboxi-1-guanidinobutan-4-il)aminometil-2,2'-bipiridina (**10**) en 20 mL de metanol se añadieron 10 gotas de agua y la disolución



así obtenida se filtró con filtro de pliegues para obtener una disolución clara. El filtrado se trató con 3 mL de una disolución saturada de cloruro de hidrógeno en éter etílico y la mezcla de reacción se dejó durante 72 horas con agitación a temperatura ambiente y a continuación se concentró a sequedad y se secó a vacío. El residuo obtenido se trató con acetato de etilo, se filtró y se obtuvieron así 186 mg del producto deseado.

Rdto.: 65%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3356, 3181, 2944, 2863, 2472, 1655, 1591, 1458, 1382.

MS (ESI, m/z) para C₂₄H₄₀Cl₃N₁₀O₄ [M - Cl]⁺

Calculado: 637,23

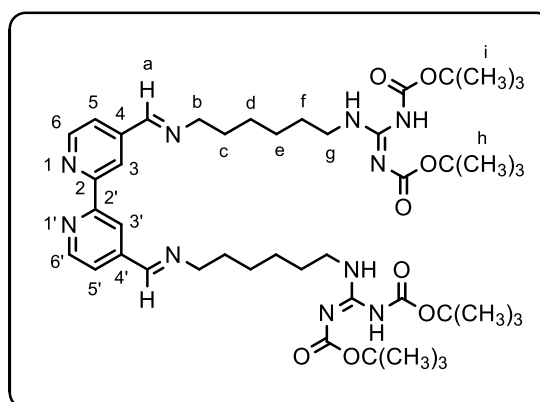
Encontrado: 637,25

¹H-RMN (300 MHz, D₂O), δ (ppm): 8,38 (d, J = 4,9 Hz, 2H, H-6,6'), 7,79 (s, 2H, H-3,3'), 7,27 (d, J = 4,9, 2H, H-5,5'), 3,78 (d, J = 14,1 Hz, 2H, H-a), 3,57 (d, J = 14,1 Hz, 2H, H-a), 3,10-2,90 (m, 6H, H-b,e), 1,50-1,30 (m, 4H, H-c,d).

¹³C-RMN (75 MHz, D₂O), δ (ppm): 170,7, 158,7, 151,5, 149,1, 147,1, 128,4, 125,4, 61,2, 48,4, 41,7, 28,7, 25,8.

4,4'-Bis-*N,N'*-[1-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidino]hexan-6-il)iminometil-2,2'-bipiridina (12)

Se disolvieron 168 mg (0,47 mmol) de 6-aminohex-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina y 36 mg (0,16 mmol) de 2,2'-bipiridina-4,4'-dicarboxaldehído en 20 mL de 2-metilpropan-2-ol anhidro manteniendo la mezcla de reacción en atmósfera de argón. La mezcla



de reacción se dejó con agitación, a reflujo, durante 49 horas. Al evaporar el

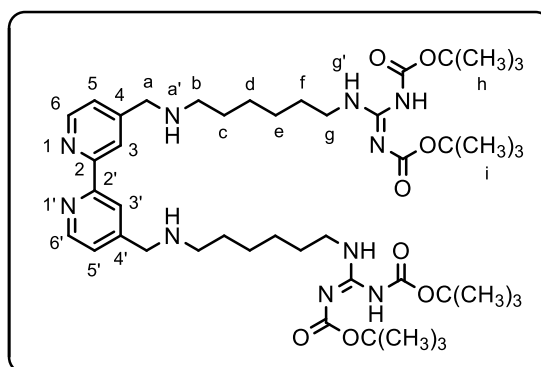
disolvente se obtuvo un crudo de reacción, que se utilizó directamente en la siguiente reacción.

Rdto.: 98%

¹H-RMN (300 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): 8,82 (s, 2H, H-a), 8,77 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H, H-6,6'), 8,51 (s, 2H, H-3,3'), 7,74 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H, H-5,5'), 3,74 (t, *J* = 4,7 Hz, 4H, H-b), 3,39 (m, 4H, H-g), 2,89 (m, 4H, H-c), 1,78 – 1,70 (m, 4H, H-f), 1,64 – 1,56 (m, 8H, H-d,e), 1,50 (s, 18H, H-i), 1,42 (s, 18H, H-h).

4,4'-Bis-*N,N'*-[1-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidinohexan-6-il]aminometil-2,2'-bipiridina (**13**)

138 mg de crudo de la reacción anterior (**12**) se disolvieron en 30 mL de metanol y la mezcla se enfrió a 0 °C. Posteriormente, se adicionaron 27 mg (0,72 mmol) de NaBH₄ y, después de alcanzar la temperatura ambiente, la mezcla se dejó con agitación durante 24 horas. Al



evaporar el disolvente se obtuvo un crudo de reacción al que se le añadieron 8 mL de agua y la suspensión obtenida se filtró. Con el sólido resultante se llevó a cabo siguiente reacción.

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3338, 3055, 2974, 2932, 2856, 1719, 1637, 1591, 1417, 1154.

MS (ESI, *m/z*) para C₄₆H₇₇N₁₀O₈ [M + H]⁺

Calculado: 897,59

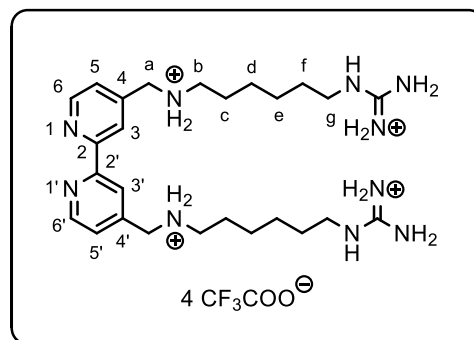
Encontrado: 897,56

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 8,63 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H, H-6,6'), 8,32 (s, 2H, H-3,3'), 7,48 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H, H-5,5'), 3,93 (s, 4H, H-a), 3,82 (t, *J* = 5,6 Hz, 2H, NH-g'), 3,38 – 3,30 (m, 4H, H-g), 2,66 (t, *J* = 7,2 Hz, 4H, H-b), 2,16 (q ap., *J* = 2,1 Hz, NH-a'), 1,60 – 1,55 (m, 8H, H-c,f), 1,55 (s, 18H, H-i), 1,49 (s, 18H, H-h), 1,43 – 1,36 (m, 8H, H-d,e).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 164,6, 157,6, 157,3, 154,2, 150,3, 124,8, 122,3, 84,4, 80,3, 53,4, 50,0, 41,7, 30,4, 30,0, 28,8, 28,2, 28,0, 27,7.

Tetrakis-trifluoracetato de 4,4'-bis-*N,N'*-[1-guanidiniohexan-6-il)amoniometil-2,2'-bipiridina (14)

A 35 mg del sólido de la reacción anterior se adicionaron 2 mL de ácido trifluoroacético. La reacción se dejó con agitación y se siguió su transcurso por resonancia magnética nuclear de protón, hasta detectar la desprotección completa de los grupos guanidino. El crudo de



reacción se extrajo con éter etílico (3 x 10 mL) y al concentrar la fase acuosa se obtuvo el producto deseado, como un aceite de coloración rojiza.

Rdto.: 62%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3370, 2928, 2856, 2092, 1638, 1456, 1251.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{F}_9\text{N}_{10}\text{O}_6$ $[\text{M} - \text{CF}_3\text{COO}]^+$

Calculado: 839,36

Encontrado: 838,76

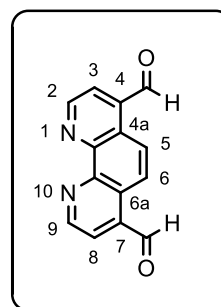
^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 8,80 (d, $J = 5,0$ Hz, 2H, H-6,6'), 8,61 (s, 2H, H-3,3'), 7,62 (d, $J = 5,0$ Hz, 2H, H-5,5'), 4,41 (s, 4H, H-a), 3,83 (s ap., 4H, H-b), 3,22 – 3,16 (m, 8H, H-c,h), 1,84 – 1,80 (m, 4H, H-g), 1,67 – 1,62 (m, 8H, H-d,f), 1,43 – 1,39 (m, 4H, H-e).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 158,6, 153,5, 149,9, 146,0, 127,4, 124,3, 50,9, 50,7, 42,7, 29,7, 29,5, 28,6, 27,1.

^{19}F -RMN (282 MHz, CD_3OD), δ (ppm): - 78,7.

1,10-Fenantrolina-4,7-dicarboxaldehido (15)

A una disolución de 1,00 g (4,71 mmol) de 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en 68 mL de una mezcla dioxano/agua (96:4) se adicionaron 2,51 g (22,43 mmol) de dióxido de selenio. La mezcla de reacción se dejó con agitación a reflujo durante 30 minutos, tras las cuales se filtró sobre celita la suspensión en caliente. El filtrado se enfrió a 4 °C y el precipitado resultante se filtró obteniéndose 979 mg de 1,10-fenantrolina-4,7-dicarboxaldehido en forma de agujas.



Rdto.: 88%

P.f. = 160 °C (descompone)

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3059, 2859, 2356, 1698, 1504, 1383.

MS (ESI, m/z) para C₁₄H₉N₂O₂ [M + H]⁺

Calculado: 237,07

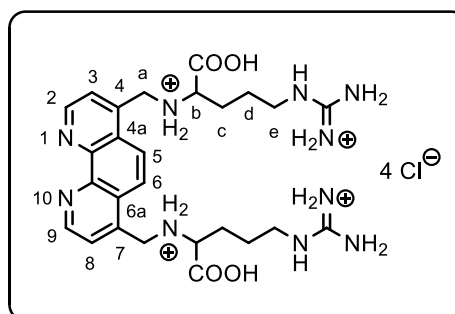
Encontrado: 237,10

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 10,62 (s, 2H, -CHO), 9,52 (d, J = 4,7 Hz, 2H, H-2,9), 9,21 (s, 2H, H-5,6), 8,08 (d, J = 4,7 Hz, 2H, H-3,8).

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO), δ (ppm): 193,7, 150,7, 145,6, 136,3, 125,7, 124,0, 123,9.

Tetrahidrocloruro de 4,7-bis-*N,N'*-(4-carboxi-1-guanidiniobutan-4-il)amonioetil-1,10-fenantrolina (16)

A una suspensión de 130 mg (0,74 mmol) de L-arginina en 6 mL de etanol, bajo atmósfera de argón, se añadieron 4 mL de una suspensión de 82 mg (0,35 mmol) de 1,10-fenantrolina-4,7-dicarboxaldehido en etanol. La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 30 horas. El precipitado resultante se filtró y se lavó con etanol, obteniéndose 185 mg de un sólido anaranjado.



A una suspensión a 0 °C de 119 mg (0,22 mmol) del producto obtenido en el paso anterior, en 10 mL de metanol se añadieron 21 mg (0,55 mmol) de borohidruro de sodio. La mezcla de reacción se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se mantuvo con agitación durante 22 horas y a continuación la suspensión se filtró y el filtrado se concentró a sequedad. El sólido obtenido se lavó con 20 mL de acetato de etilo y por filtración se obtuvieron 100 mg de un sólido amarillo.

El sólido obtenido se disolvió en 15 mL de metanol y se añadieron 2 mL de una disolución saturada de cloruro de hidrógeno en éter etílico. La mezcla de reacción se dejó durante 16 horas a 4 °C y la suspensión resultante se filtró obteniéndose 39 mg del producto deseado, impuro.

P.f. > 300 °C

MS (ESI, m/z) para $C_{26}H_{40}Cl_2N_{10}O_4$ $[M - 2Cl]^+$

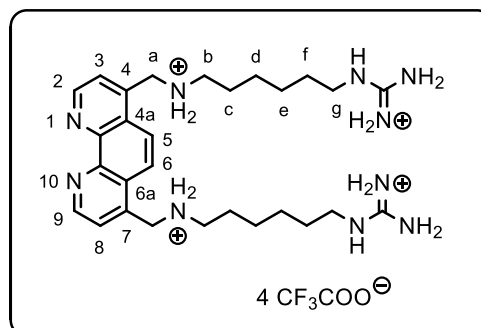
Calculado: 626,26

Encontrado: 626,71

1H -RMN (300 MHz, D_2O), δ (ppm): 9,07 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H, H-2,9), 8,29 (s, 2H, H-5,6), 7,97 (d, $J = 5,5$ Hz, 2H, H-3,8), 3,78 (d, $J = 14,1$ Hz, 2H, H-a), 3,57 (d, $J = 14,1$ Hz, 2H, H-a), 3,10-2,90 (m, 6H, H-b,e), 1,50-1,30 (m, 4H, H-c,d).

4,7-Bis- N,N' [1-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidinohexan-6-il)amoniometil-1,10-fenantrolina (17)

Bajo atmósfera de argón se disolvieron 115 mg (0,30 mmol) de 6-aminohex-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina y 34 mg (0,14 mmol) de 1,10-fenantrolina-4,7-dicarboxaldehído en 17 mL de 2-metilpropan-2-ol anhidro. La mezcla de reacción se dejó con



agitación a reflujo durante 48 horas y después se concentró hasta sequedad para obtener así un aceite de color marrón oscuro que se utilizó directamente en el siguiente paso de reacción.

132 mg del producto obtenido en el paso anterior se disolvieron en 20 mL de metanol. A continuación, se adicionaron, a 0 °C, 23 mg (0,60 mmol) de NaBH₄. La mezcla se dejó con agitación durante 24 horas a temperatura ambiente y tras la evaporación del disolvente, el residuo se trató con 5 mL de agua. El sólido obtenido por filtración se usó en la siguiente etapa.

132 mg del producto obtenido en el paso anterior se disolvieron en 5 mL de ácido trifluoroacético. La reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente y se monitorizó por resonancia magnética nuclear de protón, hasta observar la completa desprotección de todos los grupos guanidino. Después de evaporar el ácido trifluoroacético el residuo se disolvió en 15 mL de agua y se extrajo con éter etílico (3 x 10 mL). Al concentrar la fase acuosa se obtuvo el producto deseado.

MS (ESI, m/z) para C₃₄H₄₈F₉N₁₀O₆ [M – CF₃COO]⁺

Calculado: 863,36

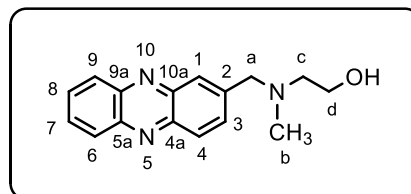
Encontrado: 863,42

¹H-RMN (500 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 9,27 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H, H-2,9), 8,49 (s, 2H, H-5,6), 8,17 (d, *J* = 5,0 Hz, 2H, H-3,8), 4,35 – 4,26 (m, 12H, H-a,b,g), 3,53 – 3,49 (m, 4H, H-f), 1,91 – 1,89 (m, 4H, H-c), 1,70 – 1,60 (m, 8H, H-d,e).

¹⁹F-RMN (282 MHz, CD₃OD), δ (ppm): - 78,9.

2-[Fenazin-2-ilmetil(*N*-metil)amino]etan-1-ol (18)

A una disolución de 28 mg (0,10 mmol) de 2-(bromometil)fenazina en 12 mL de acetonitrilo anhidro se adicionaron, bajo atmósfera de argón, 24 μL (0,30 mmol) de 2-



(metilamino)etan-1-ol. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación se eliminó el disolvente a presión reducida y sobre el residuo obtenido se añadieron 10 mL de una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃. La disolución resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 5 mL) y los extractos orgánicos reunidos se secaron con MgSO₄, se concentraron a sequedad y el producto obtenido se secó a vacío. De esta manera

se obtuvieron 25 mg de 2-[metil(fenazín-2-ilmetil)amino]etan-1-ol como un aceite amarillo.

Rdto.: 97%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3382, 3059, 2915, 2850, 1436.

MS (ESI, m/z) para C₁₆H₁₈N₃O [M + H]⁺

Calculado: 268,14

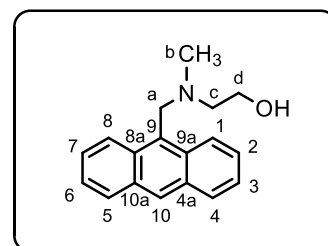
Encontrado: 268,05

¹H-RMN (300 MHz), (CDCl₃), δ (ppm): 8,22 – 8,18 (m, 3H, H-4,6,9), 8,10 (s, 1H, H-1), 7,88 – 7,80 (m, 3H, H-3,7,8), 3,86 (s, 2H, H-a), 3,69 (t, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-d), 2,75 (t, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-c), 2,33 (s, 3H, H-b).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 143,5, 143,3, 143,0, 141,4, 131,9, 130,5, 130,3, 129,7, 129,6, 129,5, 128,5, 62,2, 58,8, 58,5, 41,7.

2-[Antracén-9-ilmetil(metil)amino]etan-1-ol (19)^[196]

A una disolución de 66 mg (0,24 mmol) de 9-(bromometil)antraceno en 15 mL de acetonitrilo anhidro se adicionaron, bajo atmósfera de argón, 59 μ L (0,74 mmol) de 2-(metilamino)etan-1-ol. La mezcla resultante se mantuvo con agitación a



temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación se eliminó el disolvente a presión reducida y sobre el residuo obtenido se añadieron 20 mL de una disolución acuosa saturada de Na₂CO₃. La disolución resultante se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL) y los extractos orgánicos reunidos se secaron con MgSO₄, se concentraron a sequedad y el producto obtenido se secó a vacío. De esta manera se obtuvieron 65 mg de 2-[antraceno-9-ilmetil(metil)amino]etan-1-ol, como un sólido amarillo.

Rdto.: 99%

P.f. = 80 – 81 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3369, 3064, 2854, 1599, 1459.

MS (ESI, m/z) para C₁₈H₂₀NO [M + H]⁺

Calculado: 266,15

Encontrado: 266,06

¹H-RMN (300 MHz), (CDCl₃), δ (ppm): 8,42 – 8,37 (m, 3H, H-1,8,10), 8,00 (d, $J = 7,9$ Hz, 2H, H-4,5), 7,54 – 7,43 (m, 4H, H-2,3,6,7), 4,56 (s, 2H, H-a), 3,55 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H, H-d), 2,73 (t, $J = 5,0$ Hz, 2H, H-c), 2,34 (s, 3H, H-b).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 131,4, 131,2, 129,2, 128,8, 128,0, 126,1, 124,9, 124,4, 58,2, 58,0, 53,8, 41,2.

Procedimiento general A

A una disolución de 2,0 equivalentes del correspondiente aminoalcan-1-ol en 8 mL de acetonitrilo se adicionaron, en atmósfera de argón, 1,2 equivalentes de K₂CO₃ y 1,0 equivalente de 1,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)-2-metilisotiurea. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 25 horas y posteriormente se concentró a sequedad. El residuo se disolvió en 15 mL de acetato de etilo y se lavó con agua (3 x 10 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se concentró a sequedad y el crudo resultante se purificó por cromatografía en columna flash (Ø 25 mm, h = 19,0 cm, hexano/acetato de etilo 2:1), con lo que se obtuvieron los productos deseados.

2-Hidroxiet-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina (**20**)

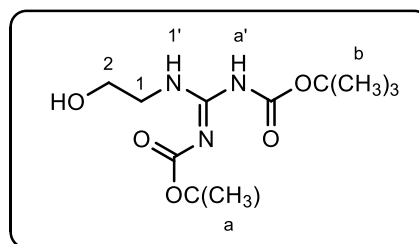
Siguiendo el procedimiento general A se preparó el producto **20** a partir de 131 µL (2,10 mmol) de 2-aminoetan-1-ol, 180 mg (1,30 mmol) de K₂CO₃ y 318 mg (1,10 mmol) de 1,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)-2-metilisotiurea.

De esta manera se obtuvieron 220 mg de 2-hidroxiet-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina, como un sólido blanco.

R_f (hexano/acetato de etilo 2:1): 0,18

Rdto.: 66%

P.f. = 116 – 118 °C



IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3450, 3331, 2980, 2930, 1739, 1647, 1413, 1365, 1146, 1055.

MS (ESI, m/z) para C₁₃H₂₆N₃O₅ [M + H]⁺

Calculado: 304,19

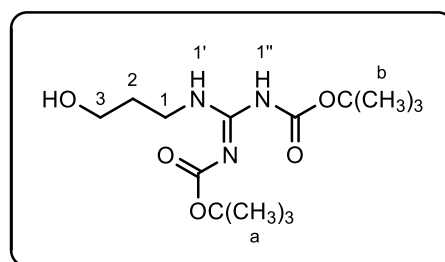
Encontrado: 303,99

¹H-RMN (300 MHz), (CDCl₃), δ (ppm): 11,43 (s, 1H, NH-a'), 8,67 (s, 1H, NH-1'), 4,53 (s, 1H, OH), 3,75 (t, 2H, $J = 4,1$ Hz, H-2), 3,57 – 3,52 (m, 2H, H-1), 1,48 (s, 9H, H-b), 1,46 (s, 9H, H-a).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 174,0, 157,4, 149,7, 83,5, 79,5, 63,2, 46,4, 28,2, 28,0.

3-Hidroxi-prop-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina (**21**)

Seguendo el procedimiento general A se preparó el producto **21** a partir de 205 μ L (2,68 mmol) de 3-aminopropan-1-ol, 206 mg (1,49 mmol) de K₂CO₃ y 388 mg (1,34 mmol) de 1,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)-2-metilisotio-urea. De esta manera se obtuvieron 370 mg de 3-hidroxi-prop-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina, como un sólido blanco.



R_f (hexano/acetato de etilo **2:1**): 0,25

Rdto.: 87%

P.f. = 117 – 118 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3281, 2973, 2944, 2909, 2864, 1734, 1642, 1159, 1132.

MS (ESI, m/z) para C₁₄H₂₈N₃O₅ [M + H]⁺

Calculado: 318,20

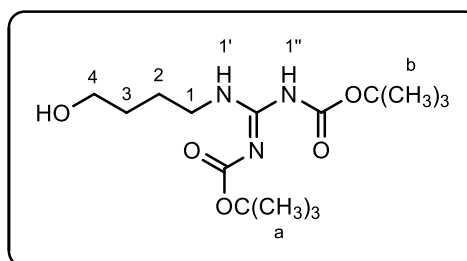
Encontrado: 318,00

¹H-RMN (300 MHz), (CDCl₃), δ (ppm): 11,44 (s, 1H, NH-1''), 8,45 (s, 1H, NH-1'), 4,74 (t, 1H, $J = 7,0$ Hz, OH), 3,61 – 3,53 (m, 4H, H-1,3), 1,68 (m, 2H, H-2), 1,50 (s, 9H, H-b), 1,47 (s, 9H, H-a).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 162,8, 157,1, 153,1, 83,4, 79,4, 57,6, 36,7, 32,8, 28,1, 28,0.

4-Hidroxibut-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina (**22**)

Siguiendo el procedimiento general A se preparó el producto **22** a partir de 165 μL (1,79 mmol) del 4-aminobutan-1-ol, 142 mg (1,02 mmol) de K_2CO_3 y 247 mg (0,85 mmol) de 1,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)-2-metilisotio-urea. De esta manera se obtuvieron 168 mg de 4-hidroxibut-1-il-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidina, como un sólido blanco.



R_f (hexano/acetato de etilo 2:1): 0,27

Rdto.: 60%

P.f. = 118 – 119 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3547, 3325, 2981, 2938, 1723, 1647, 1410, 1365, 1140, 1055.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M} + \text{H}]^+$

Calculado: 332,22

Encontrado: 332,97

¹H-RMN (300 MHz), (CDCl_3), δ (ppm): 11,44 (s, 1H, NH-1''), 8,34 (s ap., 1H, NH-1'), 3,64 (t, 1H, $J = 6,2$ Hz, H-4), 3,42 (m, 2H, H-1), 1,65 – 1,55 (m, 4H, H-2,3), 1,45 (s, 18H, H-a,b).

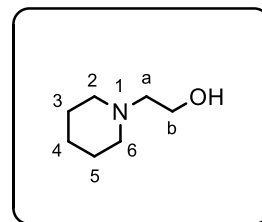
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 162,9, 157,3, 153,0, 83,4, 79,4, 57,9, 36,8, 30,8, 28,1, 28,0, 23,8.

Procedimiento general B

A una disolución de 1,0 equivalente del correspondiente n-bromoalcan-1-ol en diclorometano, bajo atmósfera de argón, se adicionó, gota a gota, una disolución de 2,5 equivalentes de piperidina en diclorometano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, tras las cuales se evaporó el disolvente hasta sequedad. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna flash (\varnothing 55 mm, h = 18,5 cm, 1% - 5% 7N NH_3 en metanol/diclorometano) con lo que se obtuvieron los productos deseados.^[197]

2-(Piperidin-1-il)etan-1-ol (23)

Siguiendo el procedimiento general B se preparó el producto **23** a partir de 598 μL (8,01 mmol) del 2-bromoetan-1-ol y 2,0 mL (20,02 mmol) de piperidina. De esta manera se obtuvieron 364 mg de 2-(piperidin-1-il)etan-1-ol como un aceite incoloro.



Rdto.: 35%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3344, 2946, 2841, 2806, 2737, 1585, 1460, 1427, 1093.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{NO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$

Calculado: 130,12

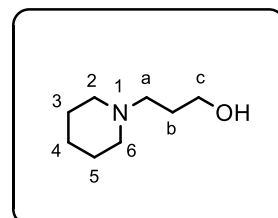
Encontrado: 130,21

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 4,01 (s, 1H, OH), 4,00 (t, 2H, $J = 4,9$ Hz, H-b), 3,21 – 3,15 (m, 6H, H-2,6, H-a), 1,95 – 1,85 (m, 4H, H-3,5), 1,66 (q, $J = 4,9$ Hz, 2H, H-4).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 60,5, 55,9, 54,7, 22,5, 21,8.

3-(Piperidin-1-il)propan-1-ol (24)

Siguiendo el procedimiento general B se preparó el producto **24** a partir de 373 μL (4,00 mmol) del 3-bromopropan-1-ol y 1,0 mL (10,01 mmol) de piperidina. De esta manera se obtuvieron 329 mg de 3-(piperidin-1-il)propan-1-ol como un sólido blanco.



Rdto.: 58%

P.f. = 141 - 142 $^{\circ}\text{C}$

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3391, 2934, 2705, 2552, 2577, 1465, 1445, 1089, 1055.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{NO}$ $[\text{M} + \text{H}]^+$

Calculado: 144,14

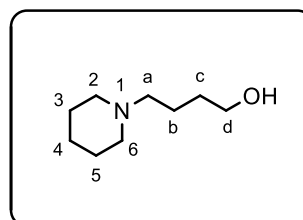
Encontrado: 144,20

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 4,82 (s, 1H, OH), 3,80 (t, 2H, $J = 5,3$ Hz, H-c), 2,86 – 2,77 (m, 6H, H-2,6, H-a), 1,89-1,75 (m, 6H, H-3,5, H-b), 1,55 (q, $J = 4,9$ Hz 2H, H-4).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 60,2, 56,5, 53,8, 26,4, 23,4, 22,4.

4-(Piperidin-1-il)butan-1-ol (**25**)

Seguendo el procedimiento general B se preparó el producto **25** a partir de 350 μL (3,27 mmol) de 4-bromobutan-1-ol y 1,0 mL (10,01 mmol) de piperidina. De esta manera se obtuvieron 206 mg de 4-(piperidin-1-il)butan-1-ol como un aceite transparente incoloro.



Rdto.: 40%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3397, 2936, 2862, 2810, 2745, 1454, 1057.

MS (ESI, m/z) para C₉H₂₀NO [M + H]⁺

Calculado: 158,15

Encontrado: 158,20

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6,20 (s, 1H, OH), 3,54 (t, 2H, $J = 5,3$ Hz, H-d), 2,57 (t, $J = 4,8$ Hz, 4H, H-2,6), 2,47 (t, $J = 6,2$ Hz, 2H, H-a), 1,75-1,60 (m, 8H, H-3,4,5, H-c), 1,42 (m, 2H, H-b).

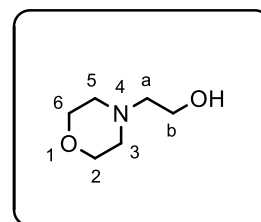
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 62,2, 58,6, 54,0, 32,0, 24,8, 23,6.

Procedimiento general C

A una disolución de 1 equivalente del correspondiente n-bromoalcan-1-ol en tolueno se adicionaron, gota a gota, 2 equivalentes de morfolina disuelta en tolueno. La mezcla de reacción se agitó y calentó a 80 °C durante 4 horas y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. La suspensión resultante se filtró y el filtrado obtenido se concentró hasta obtener un aceite que se purificó mediante destilación a presión reducida o por cromatografía flash de columna, según el caso.^[198]

2-(Morfolin-4-il)etan-1-ol (26)

Siguiendo el procedimiento general C se preparó el producto **26** a partir de 4,2 mL (56,29 mmol) de 2-bromoetan-1-ol y 10,0 mL (114,33 mmol) de morfolina. Tras la filtración se obtuvo un aceite que se purificó mediante destilación obteniendo 4,30 g de 2-(morfolin-4-il)etan-1-ol, como un aceite incoloro.



Rdto.: 58%

P.eb. (1 Torr): 62 °C

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3400, 2953, 2859, 2816, 1456, 1116.

MS (ESI, m/z) para C₆H₁₄NO₂ [M + H]⁺

Calculado: 132,10

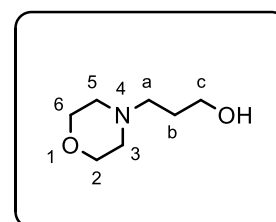
Encontrado: 132,22

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,69 (t, 4H, $J = 4,7$ Hz, H-2,6), 3,60 (t, 2H, $J = 5,2$ Hz, H-b), 2,52 (t, H, $J = 5,2$ Hz, H-a), 2,48 (t, 4H, $J = 4,7$ Hz, H-3,5).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 67,0, 59,8, 57,5, 53,3.

3-(Morfolin-4-il)propan-1-ol (27)

Siguiendo el procedimiento general C se preparó el producto **27** a partir de 1,5 mL (16,59 mmol) de 3-bromopropan-1-ol y 2,94 mL (33,59 mmol) de morfolina. El aceite obtenido en el proceso de elaboración se purificó mediante destilación obteniendo 602 mg de 3-(morfolin-4-il)propan-1-ol, como un aceite incoloro.



Rdto.: 25%

P.eb. (1 Torr): 74 °C

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3383, 2917, 2849, 2813.

MS (ESI, m/z) para C₇H₁₆NO₂ [M + H]⁺

Calculado: 146,12

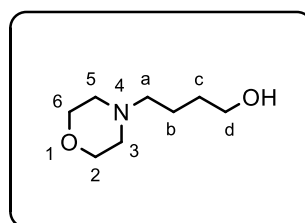
Encontrado: 146,19

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 4,92 (s, 1H, OH), 3,75 (t, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-c), 3,65 (t, 4H, *J* = 4,6 Hz, H-2,6), 2,56 (t, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-a), 2,47 (s ap. ancho, 4H, H-3,5), 1,66 (q ap., 2H, *J* = 5,3 Hz, H-b).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 66,7, 63,9, 58,7, 53,5, 26,8.

4-(Morfolin-4-il)butan-1-ol (**28**)

Siguiendo el procedimiento general C se preparó el producto **28** a partir de 350 μL (3,27 mmol) de 4-bromobutan-1-ol y 700 μL (8,00 mmol) de morfolina. El aceite obtenido en el proceso de elaboración se purificó por cromatografía flash de columna (Ø 25 mm, h = 17,0 cm, 1% - 5% 7N NH₃ en metanol/diclorometano) obteniendo 146 mg del 4-(morfolin-4-il)butan-1-ol, como un aceite incoloro.



Rdto.: 28%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3391, 2936, 2860, 2815, 1457, 1117.

MS (ESI, m/z) para C₈H₁₈NO₂ [M + H]⁺

Calculado: 160,13

Encontrado: 160,17

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5,22 (s, 1H, OH), 3,64 (t, 4H, *J* = 4,7 Hz, H-2,6), 3,48 (t, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-d), 2,43 (t, 4H, *J* = 4,7 Hz, H-3,5), 2,33 (t, *J* = 4,6 Hz, 2H, H-a), 1,66 (m, 4H, H-b, H-c).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 66,3, 62,4, 58,8, 53,3, 32,1, 24,4.

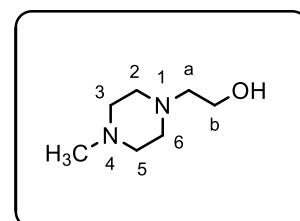
Procedimiento general D

Se disolvió 1,0 equivalente del correspondiente n-bromoalcano-1-ol en 5 mL de tolueno, bajo atmósfera de argón. Posteriormente, se añadieron, gota a gota, 1,3 equivalentes de *N*-metilpiperazina en 10 mL de tolueno. La mezcla de reacción se dejó con agitación a temperatura ambiente y después de 16 horas se

filtró y se concentró a sequedad. El producto se purificó por cromatografía flash de columna (\varnothing 20 mm, h = 17,0 cm, 1% - 5% 7N NH₃ en metanol/diclorometano) con lo que se obtuvieron los productos deseados como aceites incoloros.

2-(4-Metilpiperazin-1-il)etan-1-ol (29)

Siguiendo el procedimiento general D se preparó el producto **29** a partir de 600 μ L (8,04 mmol) de 2-bromoetan-1-ol y 1,2 mL (10,72 mmol) de *N*-metilpiperazina. De esta manera se obtuvieron 336 mg de 2-(4-metilpiperazin-1-il)etan-1-ol, como un aceite transparente incoloro.^[198]



Rdto.: 29%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3392, 2945, 2814, 1654, 1460, 1286, 1149, 1055, 929, 826, 798.

MS (ESI, m/z) para C₇H₁₇N₂O [M + H]⁺

Calculado: 145,13

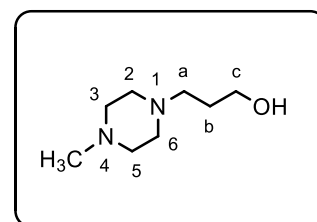
Encontrado: 145,20

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,60 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H, H-b), 2,54-2,40 (m, 10H, H-2,3,5,6, H-a), 2,29 (s, 3H, NCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 59,1, 57,6, 55,1, 52,7, 45,9.

3-(4-Metilpiperazin-1-il)propan-1-ol (30)

Siguiendo el procedimiento general D se preparó el producto **30** a partir de 1,5 mL (16,59 mmol) de 3-bromopropan-1-ol y 2,5 mL (22,31 mmol) de *N*-metilpiperazina. De esta manera se obtuvieron 2,46 g de 3-(4-metilpiperazin-1-il)propan-1-ol, como un aceite transparente incoloro.



Rdto.: 94%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3391, 2947, 2818, 2361, 1652, 1463, 1286, 1149, 1059, 927, 817.

MS (ESI, m/z) para C₈H₁₉N₂O [M + H]⁺

Calculado: 159,15

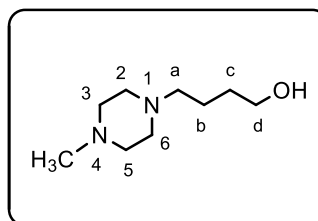
Encontrado: 159,20

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3,78 (t, $J = 4,6$ Hz, 2H, H-c), 2,60-2,26 (m, 13H, H-2,3,5,6, H-a, NCH_3), 1,69 (q ap., $J = 4,6$ Hz, 2H, H-b).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 64,7, 58,8, 55,0, 53,2, 45,9, 26,9.

4-(4-Metilpiperazin-1-il)butan-1-ol (**31**)

Siguiendo el procedimiento general D se preparó el producto **31** a partir de 350 μL (3,27 mmol) de 4-bromobutan-1-ol y 487 μL (4,35 mmol) de *N*-metilpiperazina. De esta manera se obtuvieron 512 mg de 3-(4-metilpiperazin-1-il)propan-1-ol, como un aceite transparente incoloro.



Rdto.: 91%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3390, 2942, 2813, 2361, 1652, 1461, 1286, 1150, 1057, 1009.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$

Calculado: 173,16

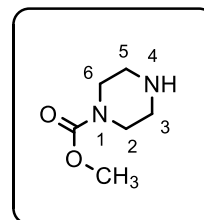
Encontrado: 173,20

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3,54 (t, $J = 4,6$ Hz, 2H, H-d), 2,50 (m, 10H, H-2,3,5,6, H-a), 2,28 (s, 3H, NCH_3), 1,66 (m, 4H, H-b, H-c).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 62,6, 58,4, 54,4, 52,7, 45,7, 32,6, 25,3.

Metil éster del ácido piperazina-1-carboxílico (**32**)^[199]

A una disolución de 4,9 g (56,88 mmol) de piperazina en 70 mL de ácido clorhídrico (1 M) se añadió, gota a gota, una disolución de 1,43 mL (18,13 mmol) de cloroformiato de metilo en 25 mL de acetonitrilo. La mezcla se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente, después de los cuales se lavó dos veces la mezcla de reacción con 40 mL de acetato de etilo. El pH de la fase acuosa se ajustó a 11 con una disolución de NaOH (1 M) y se lavó tres veces con 50 mL de diclorometano. Los extractos orgánicos reunidos se secaron con



MgSO₄ y se concentraron a sequedad, obteniéndose 1,19 g del producto deseado, como un aceite amarillo.

Rdto.: 46%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3315, 2997, 2954, 2917, 2860, 1696.

MS (ESI, m/z) para C₆H₁₃N₂O₂ [M + H]⁺

Calculado: 145,10

Encontrado: 145,17

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,61 (s, 3H, OCH₃), 3,35 (t, 4H, *J* = 5,0 Hz, H-2,6), 2,73 (t, 4H, *J* = 5,0 Hz, H-3,5).

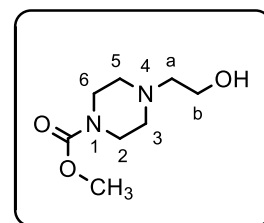
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 155,8, 52,4, 45,7, 44,7.

Procedimiento general E

A una disolución de 1,0 equivalente del correspondiente n-bromoalcan-1-ol en 10 mL de acetonitrilo se adicionaron 1,1 equivalente de K₂CO₃ y posteriormente, gota a gota, una disolución de 1,0 equivalente del metil éster del ácido piperazina-1-carboxílico (**32**) en 10 mL de acetonitrilo. La mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 72 horas. El producto se purificó por cromatografía flash de columna (\varnothing 30 mm, h = 20,0 cm, diclorometano/metanol 9:1, R_f ~ 0,2) con lo que se obtuvieron los productos deseados como aceites incoloros.

Metil éster del ácido 4-(2-hidroxiet-1-il)piperazina-1-carboxílico (**33**)

Siguiendo el procedimiento general E se preparó el producto **33** a partir de 186 μ L (2,49 mmol) de 2-bromoetan-1-ol, 365 mg (2,64 mmol) de K₂CO₃ y 359 mg (2,49 mmol) del compuesto **32**. De esta manera se obtuvieron 75 mg de metil éster del ácido 4-(2-hidroxiet-1-il)piperazina-1-carboxílico, como un aceite transparente incoloro.



Rdto.: 16%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3436, 2948, 2868, 2815, 1703, 1472, 1447, 1246, 1130.

MS (ESI, m/z) para $C_8H_{17}N_2O_3$ $[M + H]^+$

Calculado: 189,12

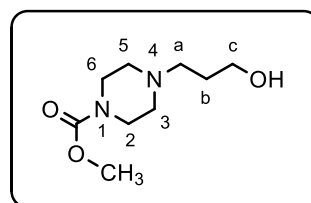
Encontrado: 189,16

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 3,65 (s, 3H, OCH_3), 3,59 (t, 2H, $J = 4,9$ Hz, H-b), 3,45 (t, 4H, $J = 4,4$ Hz, H-2,6), 2,84 (s, 1H, OH), 2,51 (t, 2H, $J = 4,9$ Hz, H-a), 2,43 (t, 4H, $J = 4,9$ Hz, H-3,5).

^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 156,2, 60,3, 59,4, 57,7, 52,5, 43,7.

Metil éster del ácido 4-(3-hidroxi-prop-1-il)piperazina-1-carboxílico (34)

Siguiendo el procedimiento general E se preparó el producto **34** a partir de 190 μ L (2,04 mmol) de 3-bromopropan-1-ol, 298 mg (2,16 mmol) de K_2CO_3 y 294 mg (2,04 mmol) del compuesto **32**. De esta manera se obtuvieron 305 mg de metil éster del ácido 4-(3-hidroxi-prop-1-il)piperazina-1-carboxílico como un aceite transparente incoloro.



Rdto.: 74%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3399, 2952, 2823, 1697, 1474, 1449, 1252, 1132.

MS (ESI, m/z) para $C_9H_{19}N_2O_3$ $[M + H]^+$

Calculado: 203,14

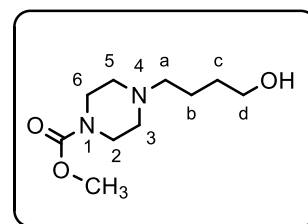
Encontrado: 203,14

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 3,72 (t, 2H, $J = 5,4$ Hz, H-c), 3,62 (s, 3H, OCH_3), 3,42 (t, 4H, $J = 4,9$ Hz, H-2,6), 3,38 (s, 1H, OH), 2,54 (t, 2H, $J = 5,9$ Hz, H-a), 2,42 (t, 4H, $J = 4,9$ Hz, H-3,5), 1,67 (q ap., 2H, $J = 5,4$ Hz, H-b).

^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 155,6, 64,0, 58,4, 52,8, 52,5, 43,5, 27,1.

Metil éster del ácido 4-(4-hidroxibut-1-il)piperazina-1-carboxílico (35)

Siguiendo el procedimiento general E se preparó el producto **35** a partir de 126 μL (1,18 mmol) de 4-bromobutan-1-ol, 173 mg (1,25 mmol) de K_2CO_3 y 170 mg (1,18 mmol) del compuesto **32**. De esta manera se obtuvieron 174 mg de metil éster del ácido 4-(4-hidroxibut-1-il)piperazina-1-carboxílico como un aceite transparente incoloro.



Rdto.: 69%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3404, 2941, 2866, 2816, 1704, 1472, 1447, 1412, 1288, 1251.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}$]⁺

Calculado: 217,15

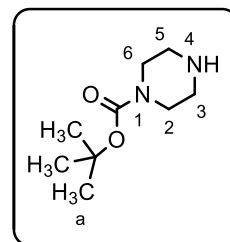
Encontrado: 217,15

¹H-RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 5,54 (s, 1H, OH), 3,66 (s, 3H, OCH_3), 3,55 (t, 2H, $J = 5,0$ Hz, H-d), 3,48 (t, 4H, $J = 5,0$ Hz, H-2,6), 2,43 (t, 4H, $J = 5,0$ Hz, H-3,5), 2,38 (t, 2H, $J = 5,5$ Hz, H-a), 1,65-1,61 (m, 4H, H-b, H-c).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 155,7, 62,7, 58,6, 52,7, 52,6, 43,3, 32,3, 25,0.

Terc-butil éster del ácido piperazina-1-carboxílico (36)

A una disolución de 5,0 g (58,05 mmol) de piperazina en 100 mL de diclorometano a 0 °C se añadió, gota a gota, una disolución de 6,3 g (28,87 mmol) de 1-[(*terc*-butoxicarbonil)oxi]pirrolidin-2,5-diona en 50 mL de diclorometano. La mezcla se agitó durante 1 hora, se filtró y el



filtrado se concentró hasta obtener un aceite. El aceite se disolvió en 10 mL de agua y se volvió a filtrar. La disolución obtenida se saturó con K_2CO_3 y a continuación se extrajo con éter etílico. Los extractos orgánicos reunidos se secaron con MgSO_4 y se concentraron a sequedad. Se obtuvieron 3,39 g de *terc*-butil éster del ácido piperazina-1-carboxílico.

Rdto.: 63%

P.f. = 70 – 71 °C

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3320, 2976, 2928, 2859, 1686.

MS (ESI, m/z) para C₉H₁₉N₂O₂ [M + H]⁺

Calculado: 187,18

Encontrado: 187,14

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,22 (t, 4H, J = 5,0 Hz, H-2,6), 2,64 (t, 4H, J = 5,0 Hz, H-3,5), 1,96 (s, 1H, NH), 1,30 (s, 9H, H-a).

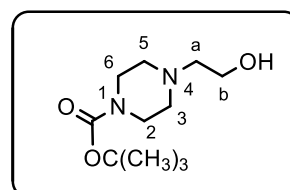
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 154,5, 79,2, 45,5, 44,4, 28,1.

Procedimiento general F

Una disolución de 1,0 equivalente de *tert*-butil éster del ácido piperazina-1-carboxílico (**37**), 1,5 equivalentes del correspondiente *n*-bromoalcan-1-ol y 3,0 equivalentes de K₂CO₃ en 15 mL de acetonitrilo se agitó a reflujo durante 15 horas. Posteriormente, la mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columna flash (\varnothing 40 mm, h = 17,0 cm, diclorometano/metanol 20:1, R_f ~ 0,19) con lo que se obtuvieron los productos deseados como aceites incoloros.^[202]

Tert-butil éster del ácido 4-(2-hidroxiet-1-il)piperazina-1-carboxílico (**37**)

Siguiendo el procedimiento general F se preparó el producto **37** a partir de 510 mg (2,74 mmol) del compuesto **36**, 277 μ L (4,11 mmol) de 2-bromoetan-1-ol, 1,14 g (8,22 mmol) de K₂CO₃. De esta manera se obtuvieron 365 mg de *tert*-butil éster del ácido 4-(2-hidroxiet-1-il)piperazina-1-carboxílico, como un aceite transparente incoloro.



Rdto.: 58%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3393, 2967, 2926, 2803, 1676.

MS (ESI, m/z) para C₁₁H₂₂N₂O₃ [M + H]⁺

Calculado: 231,17

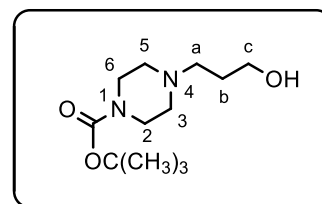
Encontrado: 231,19

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3,60 (t, 2H, $J = 5,4$ Hz, H-b), 3,41 (t, 4H, $J = 5,1$ Hz, H-2,6), 2,53 (t, 2H, $J = 5,4$ Hz, H-a), 2,43 (t, 4H, $J = 5,1$ Hz, H-3,5), 1,22 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 154,5, 79,7, 63,6, 59,3, 52,6, 46,4, 28,4.

***Terc*-butil éster del ácido 4-(3-hidroxi-prop-1-il)piperazina-1-carboxílico (38)**

Siguiendo el procedimiento general F se preparó el producto **38** a partir de 455 mg (2,44 mmol) del compuesto **36**, 328 μL (3,66 mmol) de 3-bromopropan-1-ol y 1,01 g (7,32 mmol) de K_2CO_3 . De esta manera se obtuvieron 383 mg de *terc*-butil éster del ácido 3-(2-hidroxi-prop-1-il)piperazina-1-carboxílico, como un aceite transparente incoloro.



Rdto.: 64%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3399, 2931, 2856, 2810, 1697.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$

Calculado: 245,19

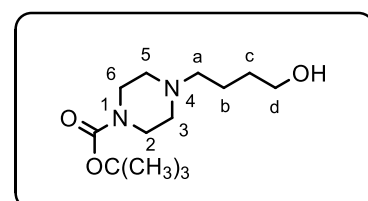
Encontrado: 245,18

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3,76 (t, 2H, $J = 5,4$ Hz, H-c), 3,39 (t, 4H, $J = 5,1$ Hz, H-2,6), 2,58 (t, 2H, $J = 5,4$ Hz, H-a), 2,43 (t, 4H, $J = 5,1$ Hz, H-3,5), 1,70 (q ap., 2H, $J = 5,6$ Hz, H-b), 1,22 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 154,5, 79,7, 64,4, 58,7, 53,1, 44,0, 28,3, 27,0.

***Terc*-butil éster del ácido 4-(4-hidroxibut-1-il)piperazina-1-carboxílico (39)**

Siguiendo el procedimiento general F se preparó el producto **39** a partir de 647,0 mg (3,47 mmol) del compuesto **36**, 560 μL (5,23 mmol) de 4-bromobutan-1-ol y 1,45 g (10,45 mmol) de



K₂CO₃. De esta manera se obtuvieron 453 mg de *tert*-butil éster del ácido 4-(4-hidroxi-but-1-il)piperazina-1-carboxílico, como un aceite transparente incoloro.

Rdto.: 51%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3410, 2934, 2863, 2810, 1695, 1423, 1366, 1249, 1172, 1130.

MS (ESI, m/z) para C₁₃H₂₇N₂O₃ [M + H]⁺

Calculado: 259,20

Encontrado: 259,17

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,53 (t, 2H, *J* = 5,4 Hz, H-d), 3,42 (t, 4H, *J* = 4,9 Hz, H-2,6), 2,42-2,36 (m, 6H, H-3,5, H-a), 1,74-1,62 (m, 4H, H-b,c), 1,40 (s, 9H, (CH₃)₃).

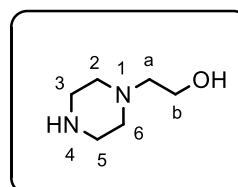
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 154,6, 79,7, 62,6, 58,5, 52,7, 42,8, 32,3, 28,3, 27,0.

Procedimiento general G

A una disolución de 1 equivalente de los compuestos **37** - **39** en diclorometano se añadieron 10 equivalentes de ácido trifluoroacético y se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad, al residuo se le añadieron 5 mL de NaOH (1 M) y se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente la mezcla se concentró a sequedad y el residuo se trató con diclorometano y se filtró. Al concentrar el filtrado se obtuvieron los productos deseados como aceites incoloros.^[189]

2-(Piperazin-1-il)etan-1-ol (**40**)

Siguiendo el procedimiento general G se preparó el compuesto **40** a partir de 340 mg (1,48 mmol) del compuesto **37** y 1,15 mL (14,86 mmol) de ácido trifluoroacético. De esta manera se obtuvieron 56 mg de 2-(piperazin-1-il)etan-1-ol como un aceite transparente incoloro.



Rdto.: 29%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3386, 3295, 2945, 2826.

MS (ESI, m/z) para C₆H₁₅N₂O [M + H]⁺

Calculado: 131,12

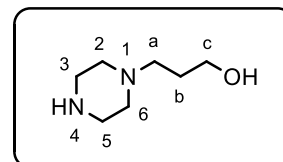
Encontrado: 131,20

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,57 (t, 2H, *J* = 5,4 Hz, H-b), 2,86 (t, 4H, *J* = 4,9 Hz, H-3,5), 2,50 (t, 2H, *J* = 5,4 Hz, H-a), 2,48 (s ap., 4H, H-2,6).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 59,8, 57,3, 54,2, 46,2.

3-(Piperazin-1-il)propan-1-ol (**41**)

Siguiendo el procedimiento general G se preparó el producto **41** a partir de 350 mg (1,43 mmol) del compuesto **38** y 1,11 mL (14,33 mmol) de ácido trifluoroacético. De esta manera se obtuvieron 191 mg de 3-(piperazin-1-il)propan-1-ol como un aceite transparente incoloro.



Rdto.: 93%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3359, 3293, 2946, 2824.

MS (ESI, m/z) para C₇H₁₇N₂O [M + H]⁺

Calculado: 145,13

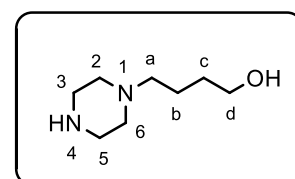
Encontrado: 145,22

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,77 (t, 2H, *J* = 5,4 Hz, H-c), 2,85 (t, 4H, *J* = 4,9 Hz, H-3,5), 2,57 (t, 2H, *J* = 5,4 Hz, H-a), 2,47 (s ap., 4H, H-2,6), 1,68 (q ap., 2H, *J* = 5,4 Hz, H-b).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 64,7, 59,5, 54,6, 46,1, 26,7.

4-(Piperazin-1-il)butan-1-ol (**42**)

Siguiendo el procedimiento general G se preparó el producto **42** a partir de 410 mg (1,59 mmol) del compuesto **39** y 1,23 mL (15,88 mmol) de ácido



trifluoroacético. De esta manera se obtuvieron 89 mg de 4-(piperazin-1-il)butan-1-ol como un aceite transparente incoloro.

Rdto.: 56%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3282, 2939, 2804, 1447, 1368, 1322, 1134, 1058.

MS (ESI, m/z) para C₈H₁₉N₂O [M + H]⁺

Calculado: 159,15

Encontrado: 159,19

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,52 (t, 2H, $J = 3,7$ Hz, H-d), 2,86 (t, 4H, $J = 5,0$ Hz, H-3,5), 2,43 - 2,31 (m, 6H, H-2,6, H-a), 1,68 - 1,61 (m, 4H, H-b,c).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 62,6, 59,1, 54,1, 45,6, 32,6, 25,1.

Antraceno-9-carboxaldehido (43)

P.f. = 238 – 240 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3050, 1669.

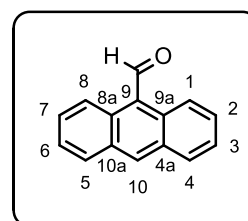
MS (ESI, m/z) para C₁₅H₁₁NO [M + H]⁺

Calculado: 207,08

Encontrado: 207,12

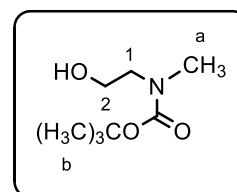
¹H-RMN (300 MHz), (CDCl₃), δ (ppm): 11,53 (s, 1H, CHO), 8,99 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz, H-1,8), 8,71 (s, 1H, H-10), 8,07 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-4,5), 7,68 (t ap., $J = 6,9$ Hz, 2H, H-2,7), 7,55 (t ap., $J = 6,9$ Hz, 2H, H-3,6).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 193,4, 135,3, 132,6, 132,1, 131,1, 129,3, 129,1, 125,7, 123,5.



N-2-hidroxietil-(N-metil)carbamato de *terc*-butilo (44)

A una disolución de 200 μ L (2,49 mmol) del 2-(*N*-metil)aminoetan-1-ol en 1 mL de THF se añadió gota a gota una disolución de 605 mg (2,69 mmol) de carbonato de *terc*-butilo en 2 mL de THF. Después de 19 horas se evaporó el disolvente y el producto se purificó por cromatografía de columna flash (\emptyset



25 mm, h = 19,5 cm, hexano/acetato de etilo 1:1). De esta forma se obtuvieron 431 mg de *N*-2-hidroxietyl-(*N*-metil)carbamato de *terc*-butilo como un aceite incoloro.

Rdto.: 99%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3439, 2976, 2934, 2880, 1694, 1674, 1483, 1252, 1156.

MS (ESI, m/z) para C₈H₁₈NO₃ [M + H]⁺

Calculado: 176,13

Encontrado: 176,16

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,72 (t, 2H, *J* = 5,2 Hz, H-2), 3,34 (t, 2H, *J* = 5,2 Hz, H-1), 2,89 (s, 3H, H-a), 1,43 (s, 9H, H-b).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 157,6, 80,0, 61,7, 51,5, 35,5, 28,4.

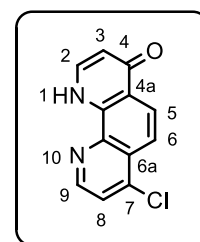
7-cloro-1,10-fenantrolin-4-ona (45)

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3343, 3082, 1575.

MS (ESI, m/z) para C₁₂H₈ClN₂O [M + H]⁺

Calculado: 231,03

Encontrado: 231,08



¹H-RMN (300 MHz), (CD₃OD), δ (ppm): 8,93 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz, H-2), 8,37 (d, 1H, *J* = 9,2 Hz, H-5), 8,15 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz, H-8), 8,10 (d, 1H, *J* = 9,2 Hz, H-6), 7,90 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz, H-3), 6,62 (d, 1H, *J* = 7,2 Hz, H-9).

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 180,0, 150,7, 144,0, 141,7, 140,7, 138,9, 128,5, 125,5, 124,5, 119,5, 116,2, 113,3.

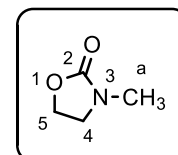
3-Metiloxazolidin-2-ona (46)

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 2983, 2918, 1750, 1499, 1421, 1267, 1048.

MS (ESI, m/z) para C₄H₈NO₂ [M + H]⁺

Calculado: 102,06

Encontrado: 102,17

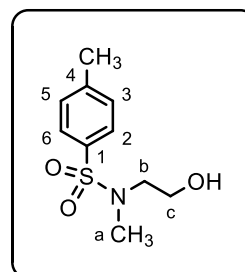


¹H-RMN (300 MHz), (CDCl₃), δ (ppm): 4,42 (t, 2H, *J* = 5,2 Hz, H-5), 3,55 (t, 2H, *J* = 5,2 Hz, H-4), 2,75 (s, 3H, H-a).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 159,0, 61,7, 46,9, 31,0.

***N*-(2-hidroxietil)-*N*-metil-4-metilbencenosulfonamida (47)**

A una disolución de 1,27 g (6,52 mmol) de cloruro de 4-toluenosulfonilo en 6 mL de piridina anhidra a 60 °C se adicionó, gota a gota, una disolución de 494 μL (6,09 mmol) de 2-(metilamino)etan-1-ol en 4 mL de piridina anhidra. La mezcla de reacción se dejó con agitación a 60 °C durante 6 horas, tras las cuales se vertió sobre 6 mL de agua y se mantuvo a 4 °C durante 20 horas. Tras la evaporación del disolvente, la mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columna flash (Ø 25 mm, h = 17,0 cm, hexano/acetato de etilo 1:1, *R_f* (*N*-(2-cloroetil) derivado) = 0,82, *R_f* (*N*-(2-hidroxietil) derivado) = 0,25) con lo que se obtuvieron 855 mg del *N*-(2-cloroetil)-*N*-metil-4-metilbencenosulfonamida y 202 mg del *N*-(2-hidroxietil)-*N*-metil-4-metilbencenosulfonamida (**47**).



Rdto.: 15%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3522, 3065, 3031, 2925, 2886, 1598, 1336, 1160.

MS (ESI, m/z) para C₁₀H₁₆NO₃S [M + H]⁺

Calculado: 230,09

Encontrado: 230,05

¹H-RMN (300 MHz), (CDCl₃), δ (ppm): 7,72 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, H-2,6), 7,37 (d, 2H, *J* = 8,6 Hz, H-3,5), 3,80 (t, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-c), 3,18 (t, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-b), 2,86 (s, 3H, H-a), 2,47 (s, 3H, Ph-CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 143,6, 134,0, 129,7, 127,4, 60,2, 52,5, 36,1, 21,5.

***N*-(2-cloroetil)-*N*-metil-4-metilbenzensulfonamida (47a)**

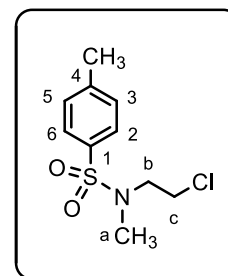
IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3030, 2961, 2924, 1597, 1456, 1340, 1159.

MS (ESI, m/z) para C₁₀H₁₅ClNO₂S [M + H]⁺

Calculado: 248,05

Encontrado: 247,99

¹H-RMN (300 MHz), (CDCl₃), δ (ppm): 7,66 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-2,6), 7,31 (d, 2H, $J = 8,2$ Hz, H-3,5), 3,62 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz, H-c), 3,31 (t, 2H, $J = 6,9$ Hz, H-b), 2,82 (s, 3H, H-a), 2,42 (s, 3H, CH₃-Ph).



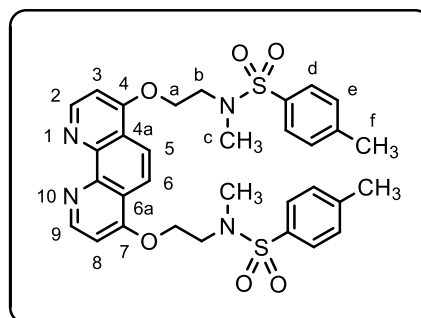
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 143,7, 134,5, 129,8, 127,3, 51,8, 41,7, 36,3, 21,5.

Procedimiento general H

A una disolución de 2,0 equivalentes de alcohol correspondiente (**18** – **22**) en 8 mL de DMF anhidra se adicionaron, bajo atmósfera de argón, 5,6 equivalentes de hidruro de sodio del 60% y se mantuvo la agitación durante 45 minutos. Posteriormente, se añadió 1,0 equivalente de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 2,8 equivalentes de éter 15-corona-5. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 120 horas y a continuación el crudo de reacción se vertió sobre agua-hielo y se mantuvo a una temperatura de 4 °C durante 20 horas. La suspensión resultante se filtró y el sólido resultante se lavó dos veces con agua fría y se secó con vacío, con lo que se obtuvo el producto deseado.

***N,N'*-bis(1,10-fenantrolina-4,7-diil-bis-oxietil)bis-[*N,N'*-dimetil-*N,N'*-bis(4-metilbencenosulfonamida)] (48)**

Siguiendo el procedimiento general H se preparó el producto **48** a partir de 110 mg (0,48 mmol) de *N*-(2-hidroxietil)-*N*-metil-4-metilbencenosulfonamida, 54 mg (1,34 mmol) de hidruro de sodio, 62 mg (0,24 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 134 μ L (0,67 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 68 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 16%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3066, 2924, 2854, 1591, 1336, 1160.

MS (ESI, m/z) para C₃₂H₃₅N₄O₆S₂ [M + H]⁺

Calculado: 635,20

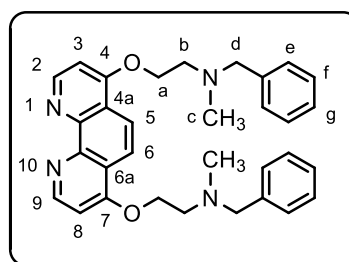
Encontrado: 635,19

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8,92 (d, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-2,9), 8,19 (s, 2H, H-5,6), 7,76 (d, 4H, *J* = 7,9 Hz, H-d), 7,38 (d, 4H, *J* = 7,9 Hz, H-e), 7,25 (d, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-3,8), 4,51 (t, 4H, *J* = 4,9 Hz, H-a), 3,63 (t, 4H, *J* = 4,9 Hz, H-b), 3,00 (s, 6H, H-c), 2,39 (s, 6H, H-f).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 161,2, 151,1, 150,0, 136,9, 133,5, 129,9, 127,2, 122,0, 119,0, 103,6, 67,3, 49,2, 31,9, 22,6.

***N,N'*-bis(1,10-fenantrolina-4,7-diil-bis-oxietil)bis(*N,N'*-bencil-*N,N'*-metilamina) (49)**

Siguiendo el procedimiento general H se preparó el producto **49** a partir de 361 μ L (2,0 mmol) de 2-[*N*-bencil(*N*-metil)amino]etan-1-ol, 218 mg (5,6 mmol) de hidruro de sodio, 257 mg (1,0 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 556 μ L (2,8 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 494 mg del producto deseado, como un aceite marrón.



Rdto.: 98%

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3059, 3026, 2941, 2843, 2784, 1587, 1513, 1451, 1289.

MS (ESI, m/z) para C₃₂H₃₅N₄O₂ [M + H]⁺

Calculado: 507,28

Encontrado: 507,19

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8,92 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz, H-2,9), 8,10 (s, 2H, H-5,6), 7,36 – 7,23 (m, 10H, H-e,f,g), 6,89 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz, H-3,8), 4,30 (t, 4H, $J = 5,6$ Hz, H-a), 3,65 (s, 4H, H-d), 2,97 (t, 4H, $J = 5,6$ Hz, H-b), 2,41 (s, 6H, H-c).

¹³C-RMN (75 MHz), (CDCl₃), δ (ppm): 161,3, 150,9, 146,6, 138,5, 128,9, 128,2, 127,1, 120,8, 118,9, 103,3, 67,0, 62,7, 55,1, 43,0.

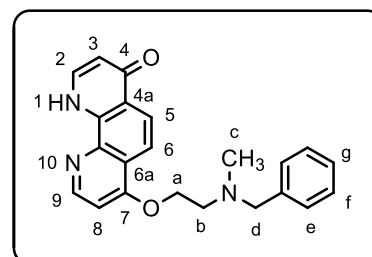
7-(2-*N*-bencil(*N*-metil)aminoetoxi)-1,10-fenantrolin-4-ona (50)

IR (NaCl), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3343, 3082, 3026, 2941, 1575, 1513, 1451, 1289.

MS (ESI, m/z) para C₂₂H₂₂N₃O₂ [M + H]⁺

Calculado: 360,17

Encontrado: 360,13



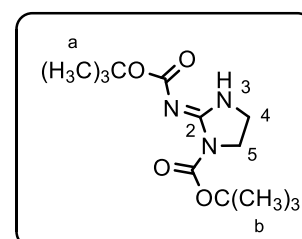
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 10,40 (s, 1H, NH), 8,67 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, H-9), 8,30 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, H-6), 7,93 (d, $J = 9,1$ Hz, 1H, H-5), 7,41 – 7,24 (m, 6H, H-3, H-e,f,g), 6,86 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H, H-8), 6,51 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H, H-2), 4,30 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, H-a), 3,66 (s, 2H, H-d), 2,98 (t, $J = 5,7$ Hz, 2H, H-b), 2,43 (s, 3H, H-c).

Terc-butil éster del ácido 2-((*terc*-butoxicarbonil)imino)imidazolidina-1-carboxílico (51)

P.f. = 81 – 82 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3391, 2985, 2922, 1746, 1652, 1593, 1485, 1441, 1365, 1320, 1251, 1140, 1119.

MS (ESI, m/z) para C₁₃H₂₄N₃O₄ [M + H]⁺



Calculado: 286,18

Encontrado: 285,99

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz), (CDCl_3), δ (ppm): 8,66 (s, NH), 3,78 (s ap. ancho, 2H, H-5), 3,67 (s ap. ancho, 2H, H-4), 1,46 (s, 9H, H-b), 1,43 (s, 9H, H-a).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 160,2, 149,9, 147,0, 82,8, 77,2, 45,1, 39,4, 28,0, 27,9.

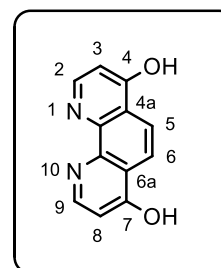
1,10-Fenantrolina-4,7-diol (**52**)

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3432, 3070, 1622, 1363, 774.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$

Calculado: 213,07

Encontrado: 213,09

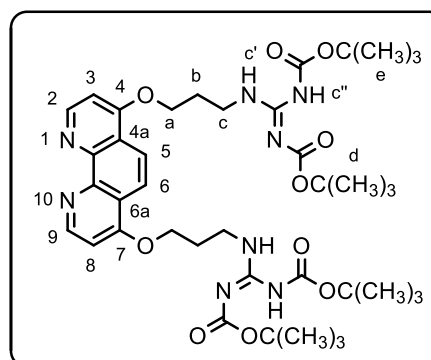


$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz), (CDCl_3), δ (ppm): 8,24 (d, 2H, $J = 6,4$ Hz, H-2,9), 8,07 (s, 2H, H-5,6), 6,60 (d, 2H, $J = 6,4$ Hz, H-3,8).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 193,8, 171,0, 164,9, 144,8, 117,8, 111,0.

[(1,10-Fenantrolina-4,7-diil)oxiprop-1,1'-diil]tetrakis(*terc*-butoxicarbonil)bisguanidina (**53**)

Siguiendo el procedimiento general H se preparó el producto **53** a partir de 162 mg (0,51 mmol) de 3-hidroxiprop-1-il-bis(*terc*-butoxicarbonil)guanidina (**21**), 51 mg (1,27 mmol) de hidruro de sodio, 61 mg (0,24 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 134 μL (0,67 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 191 mg del producto deseado como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 97%

P.f. = 98 – 101 $^{\circ}\text{C}$

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3337, 3122, 2978, 2930, 1722, 1642, 1617, 1588, 1331, 1135.

MS (ESI, m/z) para C₄₀H₅₉N₈O₁₀ [M + H]⁺

Calculado: 811,44

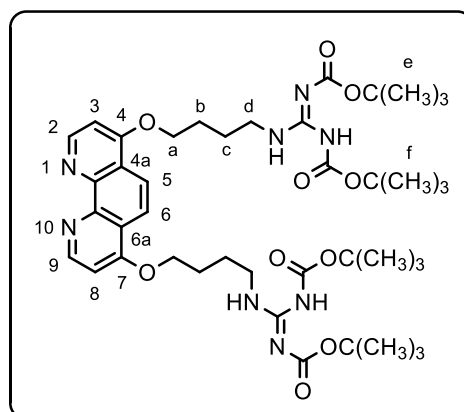
Encontrado: 811,41

¹H-RMN (300 MHz), (CDCl₃), δ (ppm): 11,51 (s, 2H, NH-c''), 8,98 (d, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-2,9), 8,54 (t, 2H, *J* = 4,9 Hz, NH-c'), 8,18 (s, 2H, H-5,6), 6,98 (d, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-3,8), 4,34 (t, 4H, *J* = 5,6 Hz, H-a), 3,75 (c ap., 4H, *J* = 5,6 Hz, H-c), 2,29 (q ap., 4H, *J* = 5,6 Hz, H-b), 1,49 (s, 18H, H-e), 1,47 (s, 18H, H-d).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 163,5, 161,3, 156,3, 153,3, 151,1, 146,9, 120,9, 119,0, 103,3, 83,2, 79,3, 66,3, 38,0, 28,7, 28,3, 28,0.

[(1,10-Fenantrolina-4,7-diil)-oxibut-1,1'-diil]tetrakis(*terc*-butoxicarbonil)bisguanidina (54)

Siguiendo el procedimiento general H se preparó el producto **54** a partir de 160 mg (0,48 mmol) de 4-hidroxibut-1-il-bis(*terc*-butoxicarbonil)guanidina (**22**), 51 mg (1,27 mmol) de hidruro de sodio, 60 mg (0,23 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 134 μL (0,67 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 174 mg del producto deseado como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 89%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3333, 3046, 2925, 2856, 1719, 1674, 1638, 1586, 1453, 1365, 1129, 1048.

MS (ESI, m/z) para C₄₂H₆₃N₈O₁₀ [M + H]⁺

Calculado: 839,47

Encontrado: 839,19

¹H-RMN (300 MHz), (CDCl₃), δ (ppm): 8,95 (d, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-2,9), 8,16 (s, 2H, H-5,6), 6,95 (d, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-3,8), 4,26 (t, 4H, *J* = 6,2 Hz, H-a),

3,55 (t, 4H, $J = 6,9$ Hz, H-d), 2,05 – 1,95 (m, 4H, H-b), 1,95 – 1,80 (m, 4H, H-c), 1,48 (s, 18H, H-f), 1,46 (s, 18H, H-e).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 163,5, 161,4, 156,0, 153,2, 151,1, 146,9, 120,9, 118,9, 103,3, 83,2, 79,3, 67,9, 40,2, 29,7, 29,4, 28,3, 28,0.

Procedimiento general I

A una disolución de 1 equivalente de compuesto protegido (**53**, **54**) en 10 mL de diclorometano anhidro se adicionaron 50 equivalentes de ácido trifluoroacético. La reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 24 horas tras las cuales se evaporó el disolvente. El residuo obtenido se disolvió en la mínima cantidad de metanol y, después de la adición de éter etílico frío, precipitó un sólido amarillo. La mezcla se enfrió a -20 °C durante 20 horas y posteriormente se filtró la suspensión resultante lavando varias veces el sólido obtenido con éter etílico frío. De esta manera se obtuvieron los productos (**55** y **56**).

Bistrifluoracetato del [(1,10-fenantrolina-4,7-diil)bis-(oxiprop-1,1'-diil)]bisguanidinio (**55**)

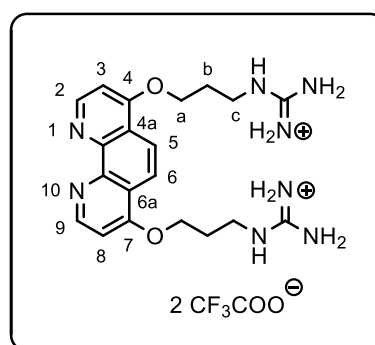
Siguiendo el procedimiento general I se preparó el producto **55** a partir de 93 mg (0,12 mmol) del compuesto **53** y 0,5 mL (6,7 mmol) de ácido trifluoroacético. De esta manera se obtuvieron 66 mg del bistrifluoracetato del [(1,10-fenantrolina-4,7-diil)bis-(oxiprop-1,1'-diil)]bisguanidinio como un sólido ligeramente amarillo.

Rdto.: 91%

P.f. = 137 – 138 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3356, 3178, 2856, 1693, 1590, 1201, 1129.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{F}_3\text{N}_8\text{O}_4$ $[\text{M} - \text{CF}_3\text{COO}]^+$



Calculado: 525,22

Encontrado: 525,26

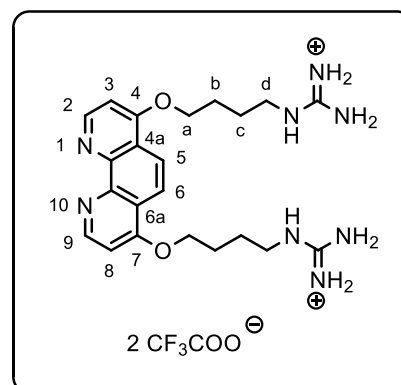
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz), (CD_3OD), δ (ppm): 9,00 (d, 2H, $J = 5,9$ Hz, H-2,9), 8,34 (s, 2H, H-5,6), 7,55 (d, 2H, $J = 5,9$ Hz, H-3,8), 4,61 (t, 4H, $J = 5,6$ Hz, H-a), 3,59 (t, 4H, $J = 6,6$ Hz, H-c), 2,36 (m, 4H, H-b).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 164,6, 157,4, 149,0, 139,9, 121,4, 119,8, 105,3, 67,4, 37,0, 27,8.

$^{19}\text{F-RMN}$ (282 MHz, CD_3OD), δ (ppm): - 76,9.

Bistrifluoracetato del [(1,10-fenantrolina-4,7-diil)bis-(oxibut-1,1'-diil)]bisguanidinio (56)

Siguiendo el procedimiento general I se preparó el producto **56** a partir de 101 mg (0,12 mmol) del compuesto **53** y 0,5 mL (6,7 mmol) de ácido trifluoroacético. De esta manera se obtuvieron 71 mg del bistrifluoracetato del [(1,10-fenantrolina-4,7-diil)bis-(oxibut-1,1'-diil)]bisguanidinio como un aceite de color marrón.



Rdto.: 89%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3371, 3181, 2944, 1679, 1591, 1203, 1134.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{O}_2$ [$\text{M} - 2 \text{CF}_3\text{COO}$] $^+$

Calculado: 440,26

Encontrado: 439,03

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz), (CD_3OD), δ (ppm): 9,05 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-2,9), 8,42 (s, 2H, H-5,6), 7,62 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-3,8), 4,59 (t, 4H, $J = 6,2$ Hz, H-a), 3,38 (t, 4H, $J = 6,2$ Hz, H-d), 2,22 – 2,15 (m, 4H, H-b), 2,02 – 1,93 (m, 4H, H-c).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 166,7, 158,7, 149,9, 139,9, 122,8, 121,3, 106,9, 70,6, 42,1, 27,0, 26,5.

^{19}F -RMN (282 MHz, CD_3OD), δ (ppm): - 76,9.

Procedimiento general J

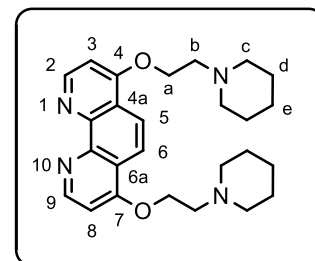
A una disolución de 2,0 equivalentes del correspondiente alcohol (**23** - **31**, **33** - **35**, **40** - **42**) en 8 mL de DMF anhidra se adicionaron, bajo atmósfera de argón, 5,6 equivalentes de hidruro de sodio del 60% y la mezcla se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 45 minutos. Posteriormente se añadieron 1,0 equivalente de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 2,8 equivalentes de éter 15-corona-5. La mezcla de reacción se mantuvo agitando a temperatura ambiente durante 120 horas y a continuación se eliminó el disolvente a presión reducida. Al residuo obtenido se añadieron 30 mL de agua y la disolución resultante se extrajo con diclorometano (3 x 25 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con MgSO_4 y se concentraron a sequedad. A continuación, la mezcla con el producto deseado y el éter 15-corona-5 se disolvió en la mínima cantidad de metanol y se trató 3 veces con una cantidad abundante de hexano frío. Al concentrar la fracción metanólica se obtuvieron los productos deseados.

Procedimiento general K

A una disolución de 2,0 equivalentes del correspondiente alcohol en 8 mL de DMF anhidra se adicionaron, bajo atmósfera de argón, 5,6 equivalentes de hidruro de sodio del 60% y la mezcla se dejó con agitación durante 45 minutos. Posteriormente, se añadió 1,0 equivalente de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y la mezcla de reacción se mantuvo agitando a temperatura ambiente durante 120 horas. A continuación se eliminó el disolvente a presión reducida y sobre el residuo obtenido se añadieron 30 mL de una disolución de NaOH 1M y la disolución resultante se extrajo con diclorometano (3 x 25 mL). Los extractos orgánicos reunidos se secaron con MgSO_4 y se concentraron a sequedad.

4,7-Bis[2-(piperidin-1-il)etoxi]1,10-fenantrolina (**57**)

Siguiendo el procedimiento general J se preparó el producto **57** a partir de 38 mg (0,30 mmol) de 2-(piperidin-1-il)etan-1-ol (**23**), 34 mg (0,84 mmol) de hidruro de sodio, 38 mg (0,15 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 84 μ L (0,42 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 44 mg del producto deseado como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 68 %

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3092, 2937, 2856, 1432, 1127.

MS (ESI, m/z) para C₂₆H₃₅N₄O₂ [M + H]⁺

Calculado: 435,28

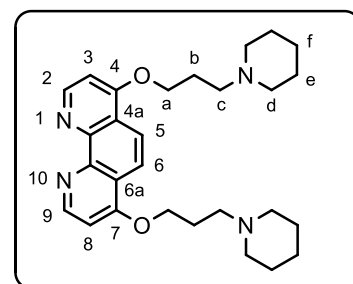
Encontrado: 435,09

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8,97 (d, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-2,9), 8,15 (s, 2H, H-5,6), 6,96 (d, 2H, *J* = 5,3 Hz, H-3,8), 4,36 (t, 4H, *J* = 5,9 Hz, H-a), 2,96 (t, 4H, *J* = 5,9 Hz, H-b), 2,59 (t, 8H, *J* = 5,0 Hz, H-c), 1,62 (q ap., 8H, *J* = 5,0 Hz, H-d), 1,58 (q, 4H, *J* = 5,0 Hz, H-e).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 161,4, 151,2, 146,9, 121,0, 119,0, 103,4, 67,0, 57,6, 55,1, 26,0, 24,1.

4,7-Bis[3-(piperidin-1-il)propoxi]1,10-fenantrolina (**58**)

Siguiendo el procedimiento general J se preparó el producto **58** a partir de 43 mg (0,30 mmol) de 3-(piperidin-1-il)propan-1-ol (**24**), 34 mg (0,84 mmol) de hidruro de sodio, 38 mg (0,15 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 84 μ L (0,42 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 52 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 76%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3062, 2932, 2856, 1584, 1429, 1307, 1125, 1049.

MS (ESI, m/z) para $C_{28}H_{39}N_4O_2$ $[M + H]^+$

Calculado: 463,31

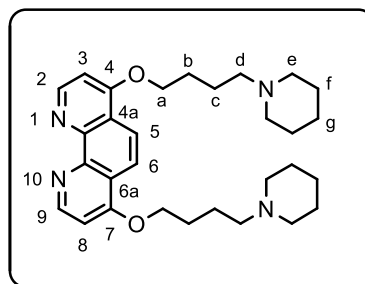
Encontrado: 463,10

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8,94 (d, 2H, $J = 5,0$ Hz, H-2,9), 8,14 (s, 2H, H-5,6), 6,96 (d, 2H, $J = 5,0$ Hz, H-3,8), 4,27 (t, 4H, $J = 6,2$ Hz, H-a), 2,56 (t, 4H, $J = 6,9$ Hz, H-c), 2,42 (s ap., 8H, H-d), 2,14 – 2,04 (m, 4H, H-b), 1,59 (q ap., 8H, $J = 5,0$ Hz, H-e), 1,44 (q, 4H, $J = 5,0$ Hz, H-f).

^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 161,4, 151,1, 147,0, 120,9, 118,9, 103,4, 67,2, 55,9, 54,7, 26,6, 26,0, 24,1.

4,7-Bis[4-(piperidin-1-il)butoxi]1,10-fenantrolina (**59**)

Siguiendo el procedimiento general J se preparó el producto **59** a partir de 36 mg (0,22 mmol) de 4-(piperidin-1-il)butan-1-ol (**25**), 25 mg (0,62 mmol) de hidruro de sodio, 29 mg (0,11 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 62 μ L (0,31 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 44 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 80%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3063, 2930, 2871, 1431, 1124.

MS (ESI, m/z) para $C_{30}H_{43}N_4O_2$ $[M + H]^+$

Calculado: 491,34

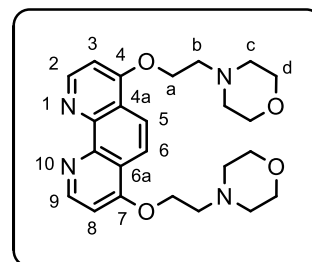
Encontrado: 491,10

1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8,95 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H-2,9), 8,15 (s, 2H, H-5,6), 6,94 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H-3,8), 4,24 (t, 4H, $J = 6,4$ Hz, H-a), 2,61 – 2,49 (m, 12H, H-d,e), 1,98 (q, 4H, $J = 6,4$ Hz, H-b), 1,62 (q, 4H, $J = 6,4$ Hz, H-c), 1,60 (q ap., 8H, $J = 5,4$ Hz, H-f), 1,44 (q, 4H, $J = 5,4$ Hz, H-g).

^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 161,5, 151,1, 146,9, 121,0, 118,9, 103,3, 68,4, 58,8, 54,4, 29,2, 27,1, 25,6, 24,2.

4,7-Bis[2-(morfolin-4-il)etoxi]1,10-fenantrolina (**60**)

Seguendo el procedimiento general J se preparó el producto **60** a partir de 97 mg (0,74 mmol) de 2-(morfolin-4-il)etan-1-ol (**26**), 83 mg (2,07 mmol) de hidruro de sodio, 95 mg (0,37 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 206 μ L (1,04 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 130 mg del producto deseado como un sólido ligeramente amarillo.



Seguendo el procedimiento general K se preparó el producto **60** a partir de 133 mg (1,02 mmol) de 2-(morfolin-4-il)etan-1-ol (**26**), 108 mg (2,71 mmol) de hidruro de sodio y 127 mg (0,50 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina. De esta manera se obtuvieron 126 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.

Rdto.: Procedimiento general J 80%

Procedimiento general K 58%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3019, 2953, 2855, 1587, 1313, 1116.

MS (ESI, m/z) para C₂₄H₃₁N₄O₄ [M + H]⁺

Calculado: 439,23

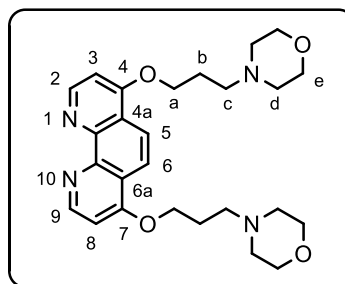
Encontrado: 439,19

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8,96 (d, 2H, $J = 5,4$ Hz, H-2,9), 8,13 (s, 2H, H-5,6), 6,95 (d, 2H, $J = 5,4$ Hz, H-3,8), 4,36 (t, 4H, $J = 5,6$ Hz, H-a), 3,72 (t, 8H, $J = 4,6$ Hz, H-d), 2,97 (t, 4H, $J = 5,6$ Hz, H-b), 2,64 (t, 8H, $J = 4,6$ Hz, H-c).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 161,2, 151,1, 146,9, 120,9, 119,0, 103,4, 66,9, 66,8, 57,2, 54,1.

4,7-Bis[3-(morfolin-4-il)propoxi]1,10-fenantrolina (61)

Siguiendo el procedimiento general J se preparó el producto **61** a partir de 100 mg (0,68 mmol) de 3-(morfolin-4-il)propan-1-ol (**27**), 77 mg (1,92 mmol) de hidruro de sodio, 88 mg (0,34 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 189 μ L (0,95 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 121 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 76%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3092, 2927, 2856, 2804, 1586, 1116.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M} + \text{H}]^+$

Calculado: 467,27

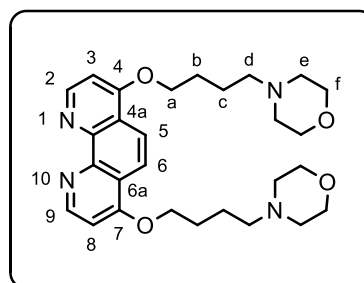
Encontrado: 467,07

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8,96 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H-2,9), 8,11 (s, 2H, H-5,6), 6,97 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H-3,8), 4,29 (t, 4H, $J = 6,7$ Hz, H-a), 3,71 (t, 8H, $J = 4,6$ Hz, H-e), 2,61 (t, 4H, $J = 6,7$ Hz, H-c), 2,48 (t, 8H, $J = 4,6$ Hz, H-d), 2,14 (q, 4H, $J = 6,7$ Hz, H-b).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 161,5, 151,2, 146,9, 120,9, 118,9, 103,4, 67,0, 66,7, 57,3, 55,4, 26,2.

4,7-Bis[4-(morfolin-4-il)butoxi]1,10-fenantrolina (62)

Siguiendo el procedimiento general J se preparó el producto **62** a partir de 32 mg (0,20 mmol) de 4-(morfolin-4-il)butan-1-ol (**28**), 22 mg (0,56 mmol) de hidruro de sodio, 26 mg (0,10 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 56 μ L (0,28 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 34 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 68%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3077, 2923, 2849, 1429, 1116.

MS (ESI, m/z) para C₂₈H₃₉N₄O₄ [M + H]⁺

Calculado: 495,30

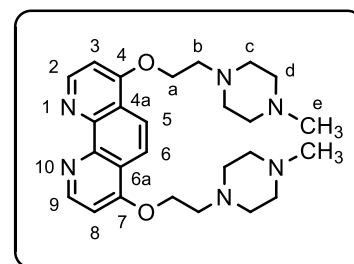
Encontrado: 495,07

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8,95 (d, 2H, $J = 5,4$ Hz, H-2,9), 8,13 (s, 2H, H-5,6), 6,94 (d, 2H, $J = 5,4$ Hz, H-3,8), 4,24 (t, 4H, $J = 6,4$ Hz, H-a), 3,71 (t, 8H, $J = 4,4$ Hz, H-f), 2,47 – 2,32 (m, 12H, H-d,e), 2,00 – 1,92 (m, 4H, H-b), 1,77 – 1,68 (m, 4H, H-c).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 161,3, 150,9, 146,6, 120,7, 118,7, 103,1, 68,2, 66,7, 58,3, 53,5, 26,6, 22,9.

4,7-Bis{2-[(4-metil)piperazin-1-il]etoxi}1,10-fenantrolina (63)

Seguendo el procedimiento general J se preparó el producto **63** a partir de 24 mg (0,17 mmol) de 2-(4-metilpiperazin-1-il)etan-1-ol (**29**), 19 mg (0,47 mmol) de hidruro de sodio, 21 mg (0,08 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 46 μ L (0,23 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 28 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 77%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3033, 2935, 2794, 1587, 1514, 1290, 1167, 1042.

MS (ESI, m/z) para C₂₆H₃₇N₆O₂ [M + H]⁺

Calculado: 465,30

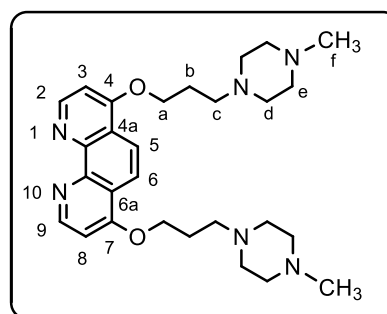
Encontrado: 465,18

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8,94 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz, H-2,9), 8,11 (s, 2H, H-5,6), 6,93 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz, H-3,8), 4,34 (t, 4H, $J = 5,6$ Hz, H-a), 2,98 (t, 4H, $J = 5,6$ Hz, H-b), 2,67 (s ap., 8H, H-c), 2,45 (s ap., 8H, H-d), 2,26 (s, 6H, H-e).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 161,3, 151,2, 146,9, 120,9, 119,0, 103,4, 67,0, 56,8, 55,1, 53,7, 46,0.

4,7-Bis{3-[(4-metil)piperazin-1-il]propoxi}1,10-fenantrolina (64)

Seguendo el procedimiento general J se preparó el producto **64** a partir de 32 mg (0,20 mmol) de 3-(4-metilpiperazin-1-il)propan-1-ol (**30**), 22 mg (0,56 mmol) de hidruro de sodio, 26 mg (0,10 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 56 μ L (0,28 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 37 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 76%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3078, 2928, 2876, 2843, 2795, 1586, 1450, 1230, 1165, 1045.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_2$ [M + H]⁺

Calculado: 493,33

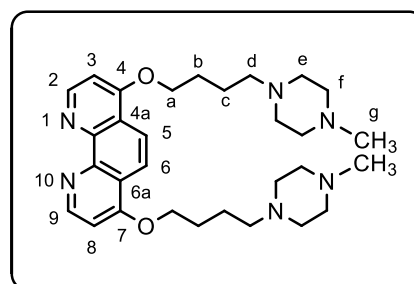
Encontrado: 493,21

¹H-RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8,96 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz, H-2,9), 8,15 (s, 2H, H-5,6), 6,96 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz, H-3,8), 4,27 (t, 4H, $J = 6,2$ Hz, H-a), 2,62 – 2,40 (m, 20H, H-c,d,e), 2,27 (s, 6H, H-f), 2,13 (q ap., 4H, $J = 6,2$ Hz, H-b).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 161,5, 151,1, 146,9, 120,9, 118,9, 103,4, 70,6, 66,9, 55,1, 53,3, 46,0, 26,5.

4,7-Bis{4-[(4-metil)piperazin-1-il]butoxi}1,10-fenantrolina (65)

Seguendo el procedimiento general J se preparó el producto **65** a partir de 34 mg (0,20 mmol) de 4-(4-metilpiperazin-1-il)butan-1-ol (**31**), 22 mg (0,56 mmol) de hidruro de sodio, 26 mg (0,10 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 56 μ L (0,28 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 36 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 69%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3070, 2940, 2871, 2803, 1587, 1453, 1286, 1232.

MS (ESI, m/z) para C₃₀H₄₅N₆O₂ [M + H]⁺

Calculado: 520,36

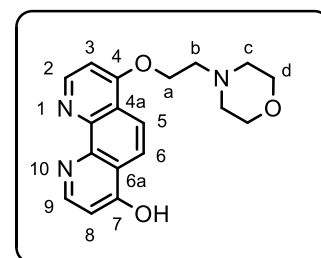
Encontrado: 520,20

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8,96 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz, H-2,9), 8,14 (s, 2H, H-5,6), 6,95 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz, H-3,8), 4,25 (t, 4H, $J = 6,2$ Hz, H-a), 2,49 – 2,31 (m, 20H, H-d,e,f), 2,27 (s, 6H, H-g), 2,00 – 1,96 (m, 4H, H-b), 1,78 – 1,71 (m, 4H, H-c).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 166,5, 149,9, 139,4, 122,7, 121,6, 107,1, 71,1, 58,2, 57,9, 49,5, 42,1, 26,9, 21,9.

4-[2-(Morfolin-4-il)etoxi]-7-hidroxi-1,10-fenantrolina (66)

Siguiendo el procedimiento general K a partir de 2-(morfolin-4-il)etan-1-ol (**26**) y de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina se aisló el producto **66** a partir de la fase acuosa. Esta se neutralizó a pH 7 con ácido clorhídrico 1M y al concentrar la disolución el residuo se lavó con diclorometano. Al evaporar el disolvente se obtuvieron 33 mg del producto **66** como un sólido amarillo.



Rdto.: 20%

MS (ESI, m/z) para C₁₈H₂₀N₃O₃ [M + H]⁺

Calculado: 326,15

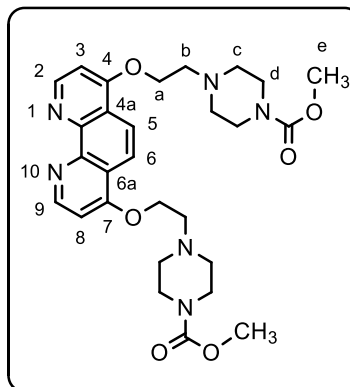
Encontrado: 326,24

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8,68 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-2), 8,29 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, H-9), 7,95 (d, 1H, $J = 9,0$ Hz, H-8), 7,80 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-5), 6,95 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz, H-3), 6,49 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H-6), 4,36 (t, 2H, $J = 5,6$ Hz, H-a), 3,72 (t, 4H, $J = 4,6$ Hz, H-d), 2,97 (t, 2H, $J = 5,6$ Hz, H-b), 2,64 (t, 4H, $J = 4,6$ Hz, H-c).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 178,8, 162,6, 162,0, 150,6, 147,1, 140,2, 125,3, 123,4, 122,0, 120,6, 118,5, 103,9, 67,5, 60,6, 57,5, 51,5.

4,7-Bis{2-[(4-metoxicarbonil)piperazin-1-il]etoxi}1,10-fenantrolina (67)

Siguiendo el procedimiento general J se preparó el producto **67** a partir de 30 mg (0,16 mmol) de metil éster del ácido 4-(2-hidroxiet-1-il)piperazina-1-carboxílico (**33**), 18 mg (0,45 mmol) de hidruro de sodio, 20 mg (0,08 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 46 μ L (0,23 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 39 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 88%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 2915, 2863, 1690, 1624, 1588, 1449, 1118.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_6$ $[\text{M} + \text{H}]^+$

Calculado: 553,28

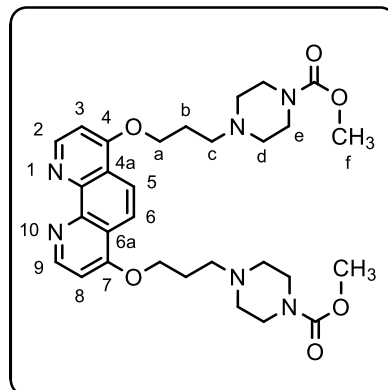
Encontrado: 553,08

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8,98 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H-2,9), 8,13 (s, 2H, H-5,6), 6,97 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H-3,8), 4,37 (t, 4H, $J = 5,4$ Hz, H-a), 3,68 (s, 6H, H-e), 3,52 (s ap. ancho, 8H, H-d), 3,01 (t, 4H, $J = 5,4$ Hz, H-b), 2,63 (s ap. ancho, 8H, H-c).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 161,2, 155,8, 151,1, 146,8, 120,8, 119,0, 103,4, 66,9, 55,8, 53,3, 52,6, 43,7.

4,7-Bis{3-[(4-metoxicarbonil)piperazin-1-il]propoxi}1,10-fenantrolina (68)

Siguiendo el procedimiento general J se preparó el producto **68** a partir de 68 mg (0,33 mmol) del metil éster del ácido 4-(3-hidroxi-prop-1-il)piperazina-1-carboxílico (**34**), 37,4 mg (0,94 mmol) de hidruro de sodio, 43 mg (0,17 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 94 μ L (0,47 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 80 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 82%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3105, 3072, 2948, 2869, 2817, 1704, 1695, 1586, 1449, 1247, 1130.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_6\text{O}_6$ [$\text{M} + \text{H}$]⁺

Calculado: 581,31

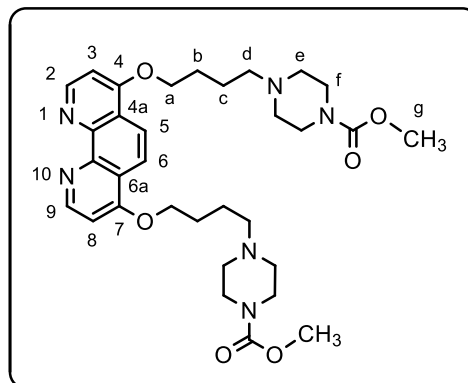
Encontrado: 581,31

¹H-RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8,94 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H-2,9), 8,13 (s, 2H, H-5,6), 6,95 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H-3,8), 4,28 (t, 4H, $J = 6,2$ Hz, H-a), 3,67 (s, 6H, H-f), 3,45 (s ap. ancho, 8H, H-e), 2,50 – 2,30 (m, 12H, H-c,d), 2,13 – 2,05 (m, 4H, H-b).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 161,5, 155,9, 151,2, 146,9, 120,9, 118,9, 103,4, 66,7, 55,0, 53,0, 52,6, 43,7, 26,4.

4,7-Bis{4-[(4-metoxicarbonil)piperazin-1-il]butoxi}1,10-fenantrolina (69)

Siguiendo el procedimiento general J se preparó el producto **69** a partir de 32 mg (0,30 mmol) del metil éster del ácido 4-(4-hidroxibut-1-il)piperazina-1-carboxílico (**35**), 34 mg (0,84 mmol) de hidruro de sodio, 39 mg (0,15 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 84 μ L (0,42 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 78 mg del producto deseado como un sólido ligeramente amarillo.



Rdto.: 85%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3069, 2953, 2869, 1708, 1700, 1586, 1449.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{N}_6\text{O}_6$ [$\text{M} + \text{H}$]⁺

Calculado: 609,34

Encontrado: 609,34

¹H-RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8,95 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H-2,9), 8,13 (s, 2H, H-5,6), 6,94 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H-3,8), 4,25 (t, 4H, $J = 6,1$ Hz, H-a), 3,69 (s, 6H, H-h), 3,45 (s ap. ancho, 8H, H-g), 2,48 – 2,40 (m, 12H, H-d,e), 2,00 (q ap., 4H, $J = 6,7$ Hz, H-b), 1,78 (q ap., 4H, $J = 6,7$ Hz, H-c).

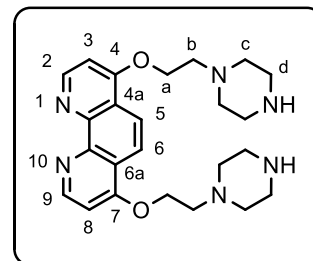
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 161,0, 155,4, 151,3, 146,9, 120,9, 118,6, 102,9, 67,9, 58,0, 51,5, 51,0, 43,7, 26,4, 21,2.

Procedimiento L

A una disolución de 1 equivalente de 4,7-bis{2-[(metoxicarbonil)piperazin-1-il]alcoxi}1,10-fenantrolina (**67** – **69**) en 4 mL de etanol/agua destilada (1:1) se añadieron 4 equivalentes de hidróxido de bario octahidrato y la suspensión resultante se calentó a 80 °C durante 28 horas. Transcurrido este tiempo se añadió a la mezcla de reacción un poco de carbón activo y la mezcla se filtró en caliente sobre celita. Al evaporar el disolvente se disolvió el residuo en 10 mL de agua destilada y se extrajo con diclorometano (3 x 15 mL). Al concentrar la fase acuosa se obtuvieron los productos deseados.

4,7-Bis[2-(piperazin-1-il)etoxi]1,10-fenantrolina (70)

Siguiendo el procedimiento general J se preparó el producto **70** a partir de 47 mg (0,36 mmol) de 2-(piperazin-1-il)etan-1-ol (**40**), 40 mg (1,01 mmol) de hidruro de sodio, 46 mg (0,18 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 100 μ L (0,50 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 61 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Siguiendo el procedimiento general L se preparó el producto **70** a partir de 80 mg (0,14 mmol) de 4,7-bis{2-[(4-metoxicarbonil)piperazin-1-il]etoxi}1,10-fenantrolina (**67**) y 192,3 mg (0,61) mmol de hidróxido de bario. De esta manera se obtuvieron 13 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.

Rdto.: Procedimiento general J 78%

Procedimiento general L 20%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3398, 2945, 1653, 1311, 1092, 620.

MS (ESI, m/z) para C₂₄H₃₃N₆O₂ [M + H]⁺

Calculado: 437,27

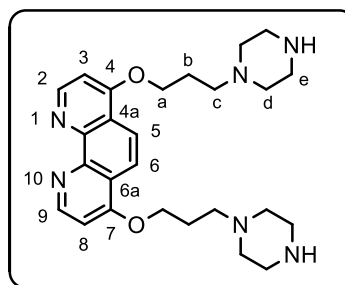
Encontrado: 437,19

¹H-RMN (300 MHz, D₂O), δ (ppm): 8,83 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-2,9), 8,20 (s, 2H, H-5,6), 7,41 (d, 2H, $J = 6,2$ Hz, H-3,8), 4,83 (t, 4H, $J = 4,4$ Hz, H-a), 3,96 (t, 4H, $J = 4,4$ Hz, H-b), 3,81 (t, 8H, $J = 4,9$ Hz, H-c), 3,62 (t, 8H, $J = 4,9$ Hz, H-d).

¹³C-RMN (75 MHz, D₂O), δ (ppm): 163,5, 148,4, 136,9, 120,5, 120,3, 106,0, 64,2, 55,6, 49,1, 40,6.

4,7-Bis[3-(piperazin-1-il)propoxi]1,10-fenantrolina (71)

Seguendo el procedimiento general J se preparó el producto **71** a partir de 106 mg (0,74 mmol) de 3-(piperazin-1-il)propan-1-ol (**42**), 82 mg (2,06 mmol) de hidruro de sodio, 94 mg (0,37 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 208 μ L (1,04 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 130 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Seguendo el procedimiento general L se preparó el producto **71** a partir de 84 mg (0,14 mmol) de 4,7-bis{3-[(4-metoxicarbonil)piperazin-1-il]propoxi}1,10-fenantrolina (**68**) y 192 mg (0,61) mmol de hidróxido de bario. De esta manera se obtuvieron 12 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.

Rdto.: Procedimiento general J 76%

Procedimiento general L 19%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3383, 2922, 1648, 1583, 1456, 1420, 1035.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{N}_6\text{O}_2$ [M + H]⁺

Calculado: 465,30

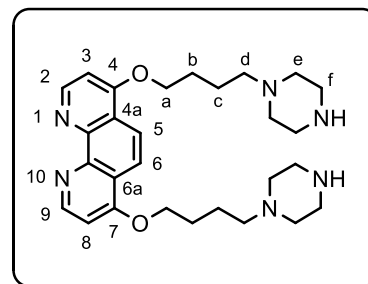
Encontrado: 465,25

¹H-RMN (300 MHz, D₂O), δ (ppm): 8,96 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H-2,9), 8,15 (s, 2H, H-5,6), 6,97 (d, 2H, $J = 5,1$ Hz, H-3,8), 4,29 (t, 4H, $J = 6,2$ Hz, H-a), 2,91 – 2,76 (m, 12H, H-c,d), 2,47 (s ap. ancho, 8H, H-e), 2,15 (q ap., 4H, $J = 6,2$ Hz, H-b).

¹³C-RMN (75 MHz, D₂O), δ (ppm): 161,5, 151,1, 146,8, 120,9, 118,8, 103,3, 66,8, 55,6, 54,6, 45,9, 26,2.

4,7-Bis[4-(piperazin-1-il)butoxi]1,10-fenantrolina (**72**)

Siguiendo el procedimiento general J se preparó el producto **72** a partir de 106 mg (0,67 mmol) de 4-(piperazin-1-il)butan-1-ol (**43**), 74 mg (1,85 mmol) de hidruro de sodio, 86 mg (0,33 mmol) de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina y 184 μ L (0,92 mmol) de éter 15-corona-5. De esta manera se obtuvieron 127 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.



Siguiendo el procedimiento general L se preparó el producto **72** a partir de 85 mg (0,14 mmol) de 4,7-bis{4-[(4-metoxicarbonil)piperazin-1-il]butoxi}1,10-fenantrolina (**69**) y 192 mg (0,61 mmol) de hidróxido de bario. De esta manera se obtuvieron 14 mg del producto deseado, como un sólido ligeramente amarillo.

Rdto.: Procedimiento J 78%

Procedimiento L 20%

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3382, 2945, 1635, 1591, 1430, 1312, 1148, 1089, 630.

MS (ESI, m/z) para $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{NaO}_2$ [M + Na]⁺

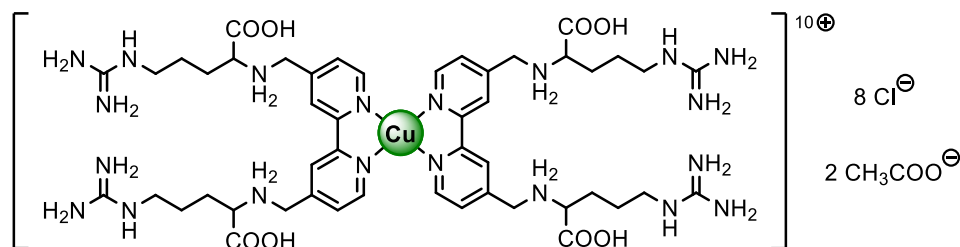
Calculado: 515,27

Encontrado: 515,31

¹H-RMN (300 MHz, D₂O), δ (ppm): 8,96 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz, H-2,9), 8,15 (s, 2H, H-5,6), 6,95 (d, 2H, $J = 5,3$ Hz, H-3,8), 4,26 (t, 4H, $J = 6,7$ Hz, H-a), 2,89 (t, 8H, $J = 4,6$ Hz, H-f), 2,47 – 2,35 (m, 12H, H-d,e), 1,99 (q ap., 4H, $J = 6,7$ Hz, H-b), 1,81 (q ap., 4H, $J = 6,7$ Hz, H-c).

¹³C-RMN (75 MHz, D₂O), δ (ppm): 166,5, 152,4, 149,9, 122,7, 121,6, 107,1, 71,1, 69,7, 57,9, 42,1, 26,9, 21,8.

Complejo $[(L_{11})_2Cu]^{10+} \cdot 2AcO^- \cdot 8Cl^-$ (73)



A una disolución de 27 mg (0,04 mmol) de tetracloruro de 4,4'-bis-*N,N'*-(4-carboxi-1-guanidiniobutan-4-il)amoniometil-2,2'-bipiridina (**11**) en 1 mL de agua destilada pura se añadió una disolución de 4 mg (0,02 mmol) de acetato de cobre(II) monohidrato en 5 mL de agua destilada. El color de la reacción cambió inmediatamente, pasando de amarillo a verde. La reacción se mantuvo a 65 °C durante 22 horas tras las cuales se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente. La suspensión resultante se filtró y el filtrado de color azul verdoso se concentró a la mitad del volumen inicial. El sólido precipitado se desechó después de centrifugación y la disolución resultante se concentró a sequedad obteniéndose de este modo 21 mg del producto deseado como un sólido verde.

Rdto.: 76%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3362, 2963, 1631, 1564, 1411, 1381, 1016.

UV-vis: λ_{\max} (nm) = 310, 296

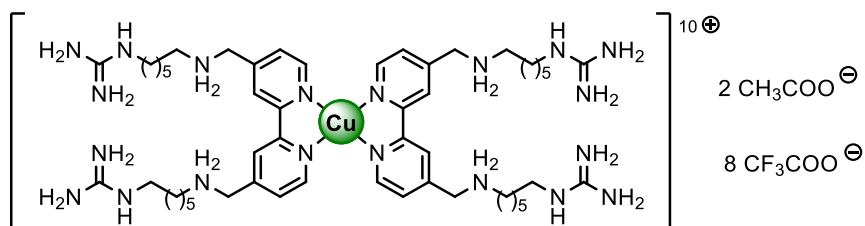
$$\epsilon_{(310 \text{ nm})} = 13139 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

Procedimiento general M

A una disolución de 2 equivalentes del ligando (**14**) en 5 mL de metanol se añadió una disolución de 1 equivalente de sal de cobre(II) o níquel(II): (Cu(CH₃COO)₂·H₂O o Ni(NO₃)₂·6 H₂O) en 5 mL de metanol. La mezcla se dejó con agitación a 65 °C durante 48 horas y luego se concentró a sequedad. El producto resultante se disolvió en la mínima cantidad de metanol y se precipitó con éter etílico frío. La suspensión se dejó a - 20 °C durante 16 horas y luego se eliminó la fase etérea por decantación después de un proceso de centrifugación.

El proceso de precipitación con metanol y éter etílico frío se repitió dos veces más. De esta manera se obtuvieron los productos deseados.

Complejo $[(L_{14})_2Cu]^{10+} \cdot 2AcO^- \cdot 8TfA^-$ (**74**)



Siguiendo el procedimiento general M se preparó el complejo **74** a partir de 22 mg (0,030 mmol) del ligando **14** y 3 mg (0,015 mmol) de acetato de cobre(II) monohidrato obteniendo así 20 mg del complejo **74** como un sólido verde brillante.

Rdto.: 81%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3403, 2926, 2870, 1657, 1635, 1426, 1374, 1169, 1120, 1064.

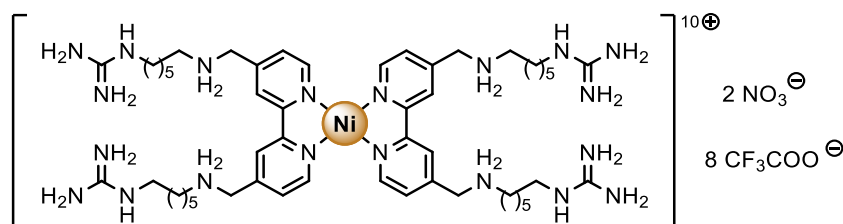
MS (ESI, m/z) para C₅₄H₉₁CuN₂₀O₂ [M + H]⁺

Calculado: 1163,43

Encontrado: 1164,20

UV-vis: λ_{max} (nm) = 310, 297

$\epsilon_{(310\text{ nm})} = 15270 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo [(L₁₄)₂Ni]¹⁰⁺ 2 NO₃⁻ 8 TfA⁻ (75)

Siguiendo el procedimiento general M se preparó el complejo **75** a partir de 22 mg (0,03 mmol) del ligando **14** y 4 mg (0,015 mmol) de nitrato de níquel(II) hexahidrato obteniendo así 22 mg del complejo **75** como un sólido brillante de color arena.

Rdto.: 85%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3418, 3112, 3079, 2929, 2728, 1426, 1396, 1374, 1198, 1116, 1008, 982.

HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₅₂H₈₈N₂₀Ni [M - 2 NO₃ - 8 CF₃COOH]²⁺

Calculado: 525,3427

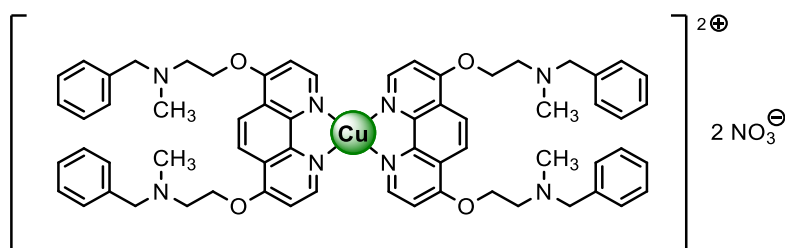
Encontrado: 525,2497

UV-vis: λ_{max} (nm) = 306, 296

$\epsilon_{(306 \text{ nm})} = 638 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Procedimiento general N

A una disolución de 2 equivalentes del ligando (**49**, **55**, **56**, **81** - **89**) en 5 mL de etanol se añadió una disolución de 1 equivalente de sal de cobre(II) o níquel (II) en 5 mL de etanol y se dejó con agitación a 65 °C durante 48 horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el producto resultante se disolvió en la mínima cantidad de metanol y se precipitó con éter etílico frío. La suspensión se dejó a -20 °C durante 16 horas, tras las cuales se eliminó la fase etérea por decantación después de un proceso de centrifugación. El proceso de precipitación con metanol y éter etílico frío se repitió dos veces más y de esta manera se obtuvieron los productos deseados.

Complejo [(L₄₉)₂Cu]²⁺ 2 NO₃⁻ (76)

Siguiendo el procedimiento general N se preparó el complejo **76** a partir de 207 mg (0,40 mmol) del ligando **49** y 49 mg (0,20 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniéndose así 240 mg del complejo **76** como un sólido verde brillante.

Rdto.: 72%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3060, 3027, 2878, 2843, 2790, 1582, 1352, 1206, 1023.

HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₆₄H₆₈CuN₉O₇ [M – NO₃]⁺

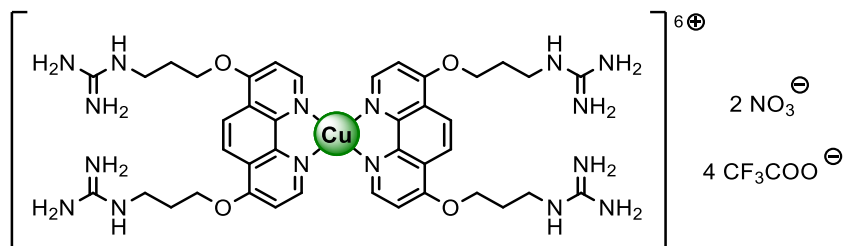
Calculado: 1137,4529

Encontrado: 1137,4526

UV-vis: λ_{max} (nm) = 342, 306, 265

$\epsilon_{(342 \text{ nm})} = 7955 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo $[(L_{55})_2Cu]^{6+} 4NO_3^- 2TfA^-$ (77)



Seguendo el procedimiento general N se preparó el complejo **77** a partir de 46 mg (0,072 mmol) del ligando **55** y 9 mg (0,036 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 17 mg del complejo **77** como un sólido verde brillante.

Rdto.: 31%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3381, 3186, 2965, 1674, 1581, 1433, 1384, 1356, 1302, 1202, 1131, 722.

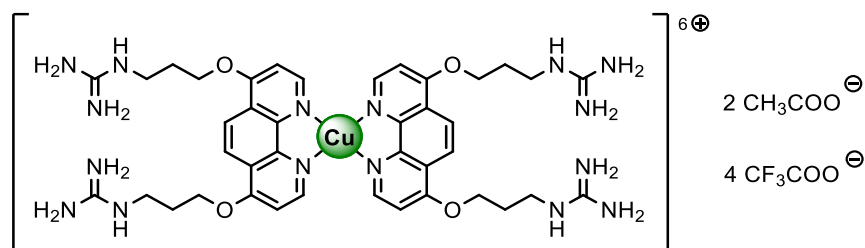
MS (FAB, m/z) para C₄₀H₅₂CuN₁₇O₇ [M - 4 CF₃COOH - NO₃]⁺

Calculado: 945,4

Encontrado: 945,6

UV-vis: λ_{\max} (nm) = 338, 314, 265

$\epsilon_{(338 \text{ nm})} = 6289 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo [(L₅₅)₂Cu]⁶⁺ 2AcO⁻ 4TfA⁻ (78)

Siguiendo el procedimiento general N se preparó el complejo **78** a partir de 40 mg (0,064 mmol) del ligando **55** y 6 mg (0,032 mmol) de acetato de cobre(II) monohidrato obteniendo así 38 mg del complejo **78** como un sólido verde brillante.

Rdto.: 83%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3373, 3180, 1676, 1581, 1433, 1354, 1203, 1131, 722.

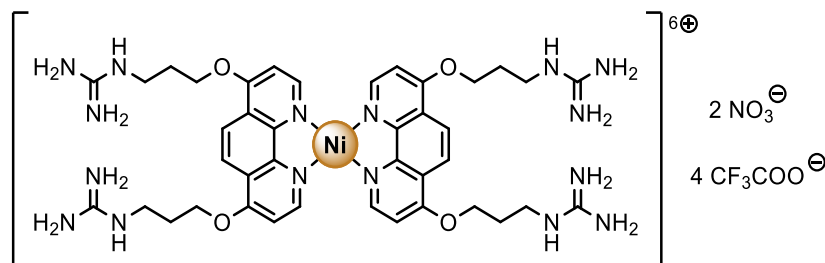
HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₄₂H₅₅CuN₁₆O₆ [M - 4 CF₃COOH - CH₃COO]⁺

Calculado: 942,3786

Encontrado: 942,3725

UV-vis: λ_{max} (nm) = 339, 314, 264

$\epsilon_{(339 \text{ nm})} = 7126 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo [(L₅₅)₂Ni]⁶⁺ 2NO₃⁻ 4TfA⁻ (79)

Seguendo el procedimiento N se preparó el complejo **79** a partir de 45 mg (0,070 mmol) del ligando **55** y 10 mg (0,035 mmol) de nitrato de níquel(II) hexahidrato obteniendo así 27 mg del complejo **79** como un sólido brillante de color arena.

Rdto.: 49%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3357, 3173, 2952, 1674, 1580, 1424, 1395, 1353, 1202, 1126, 1041.

MS (FAB, m/z) para C₄₀H₅₂N₁₇Ni O₇ [M - 4 CF₃COOH - NO₃]⁺

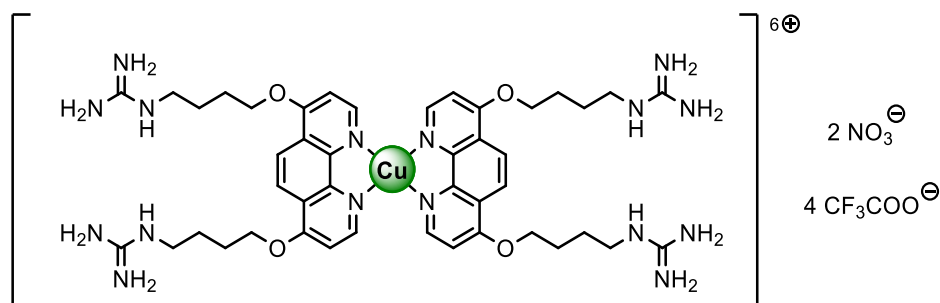
Calculado: 940,4

Encontrado: 940,4

UV-vis: λ_{\max} (nm) = 339, 312, 265

$\epsilon_{(339 \text{ nm})} = 7188 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo [(L₅₆)₂Cu]⁶⁺ 2NO₃⁻ 2TfA⁻ (**80**)



Seguendo el procedimiento general N se preparó el complejo **80** a partir de 59 mg (0,088 mmol) del ligando **56** y 11 mg (0,044 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 44 mg del complejo **80** como un sólido verde brillante.

Rdto.: 66%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3362, 3187, 2952, 2881, 1631, 1672, 1384, 1194.

HRMS (ESI-TOF, m/z) para $C_{44}H_{62}CuN_{18}O_{10}$ [M - 2 CF_3COOH - 2 CF_3COO]⁺

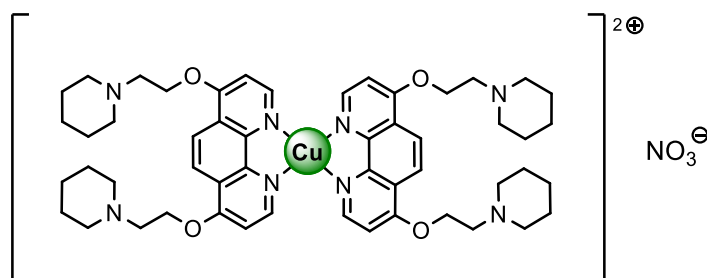
Calculado: 1065,4192

Encontrado: 1065,7144

UV-vis: λ_{max} (nm) = 338, 314, 265

$\epsilon_{(338\text{ nm})} = 7388\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo [(L₅₇)₂Cu]²⁺ 2NO₃⁻ (81)



Siguiendo el procedimiento general N se preparó el complejo **81** a partir de 15 mg (0,034 mmol) del ligando **57** y 4 mg (0,017 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 12 mg del complejo **81** como un sólido verde brillante.

Rdto.: 78%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 2922, 2855, 1429, 1385, 1355, 1116, 1053.

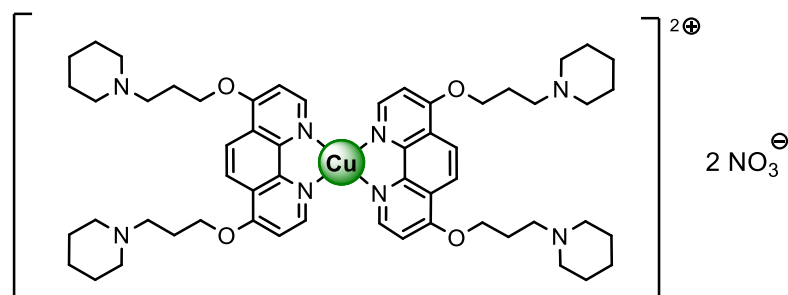
HRMS (ESI-TOF, m/z) para $C_{52}H_{68}CuN_9O_7$ [M - NO₃]⁺

Calculado: 993,4537

Encontrado: 992,7378

UV-vis: λ_{max} (nm) = 312, 302, 265

$\epsilon_{(312\text{ nm})} = 15189\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo $[(L_{58})_2Cu]^{2+} 2NO_3^-$ (82**)**

Siguiendo el procedimiento general N se preparó el complejo **82** a partir de 21 mg (0,046 mmol) del ligando **58** y 6 mg (0,023 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 19 mg del complejo **82** como un sólido verde brillante.

Rdto.: 77%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3101, 2937, 2862, 1586, 1452, 1433, 1381, 1355, 1116, 1064.

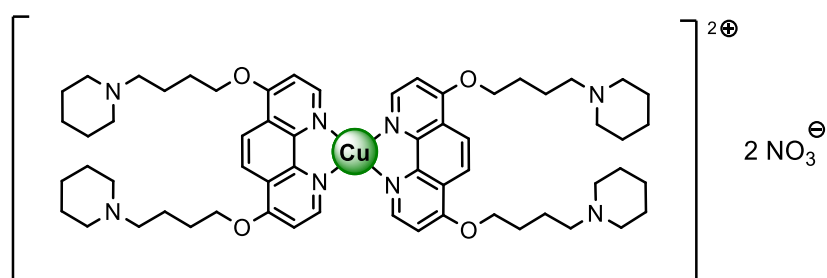
HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₅₆H₇₆CuN₉O₇ [M – NO₃]⁺

Calculado: 1049,5164

Encontrado: 1049,5185

UV-vis: λ_{\max} (nm) = 313, 302, 265

$\epsilon_{(313 \text{ nm})} = 13398 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo $[(L_{59})_2Cu]^{2+} 2NO_3^-$ (83**)**

Siguiendo el procedimiento general N se preparó el complejo **83** a partir de 22 mg (0,046 mmol) del ligando **59** y 6 mg (0,023 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 19 mg del complejo **83** como un sólido verde oscuro.

Rdto.: 70%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 2922, 1553, 1426, 1385, 1161, 1116.

HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₆₀H₈₅CuN₁₀O₁₀ [M + H]⁺

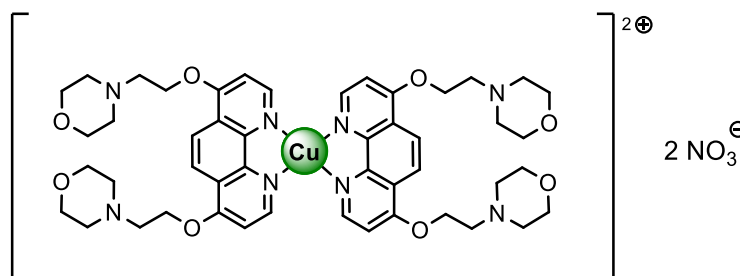
Calculado: 1168,5846

Encontrado: 1170,3259

UV-vis: λ_{\max} (nm) = 314, 302, 265

ϵ (nm) = 11795 L·mol⁻¹·cm⁻¹

Complejo [(L₆₀)₂Cu]²⁺ 2NO₃⁻ (**84**)



Siguiendo el procedimiento general N se preparó el complejo **84** a partir de 22 mg (0,050 mmol) del ligando **60** y 6 mg (0,025 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 21 mg del complejo **84** como un sólido verde brillante.

Rdto.: 82%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3097, 2926, 2858, 1579, 1426, 1381, 1302, 1113, 1027.

HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₄₈H₆₀CuN₈O₈ [M - 2 NO₃]⁺

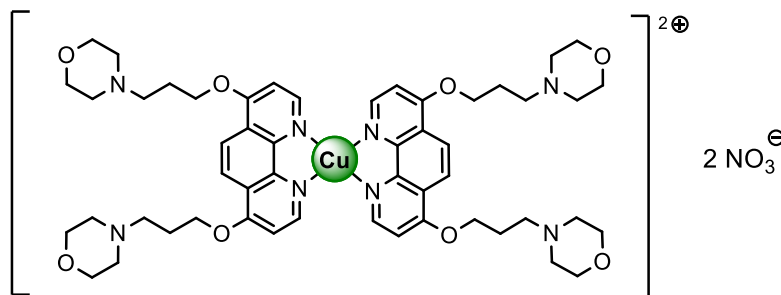
Calculado: 939,3830

Encontrado: 939,3808

UV-vis: λ_{\max} (nm) = 312, 301, 265

$\varepsilon_{(312 \text{ nm})} = 15570 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo $[(L_{61})_2\text{Cu}]^{2+} 2\text{NO}_3^-$ (85**)**



Siguiendo el procedimiento general N se preparó el complejo **85** a partir de 20 mg (0,044 mmol) del ligando **61** y 5 mg (0,022 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 19 mg del complejo **85** como un sólido verde brillante.

Rdto.: 83%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3101, 2944, 2862, 1583, 1426, 1359, 1310, 1116, 1053.

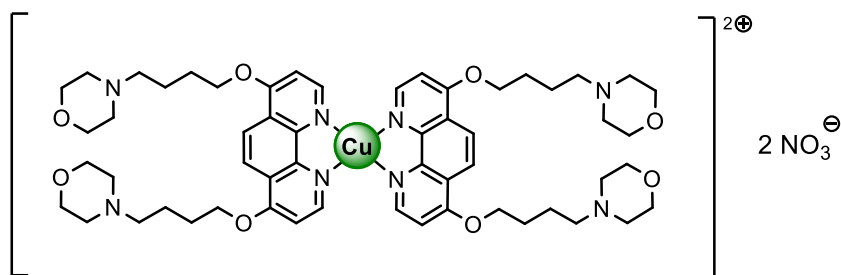
HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₅₂H₆₈CuN₈O₈ [M - 2 NO₃]⁺

Calculado: 995,4450

Encontrado: 995,4450

UV-vis: λ_{\max} (nm) = 313, 302, 265

$\varepsilon_{(313 \text{ nm})} = 14770 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo [(L₆₂)₂Cu]²⁺ 2NO₃⁻ (86)

Seguendo el procedimiento general N se preparó el complejo **86** a partir de 82 mg (0,17 mmol) del ligando **62** y 21 mg (0,083 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 70 mg del complejo **86** como un sólido verde oscuro.

Rdto.: 72%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 2933, 2870, 2825, 1605, 1553, 1385, 1363, 1109, 1049.

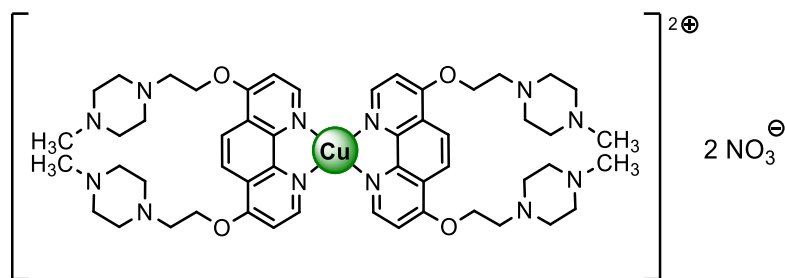
HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₅₆H₇₆CuN₈O₈ [M - 2 NO₃]⁺

Calculado: 1051,5082

Encontrado: 1051,7356

UV-vis: λ_{max} (nm) = 314, 260, 303

$\epsilon_{(314 \text{ nm})} = 13123 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo [(L₆₃)₂Cu]²⁺ 2NO₃⁻ (87)

Siguiendo el procedimiento general N se preparó el complejo **87** a partir de 31 mg (0,07 mmol) del ligando **63** y 8 mg (0,03 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 30 mg del complejo **87** como un sólido verde brillante.

Rdto.: 83%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3097, 2933, 2851, 1422, 1377, 1351, 1116, 1060.

HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₅₂H₇₂CuN₁₂O₄ [M - 2 NO₃]⁺

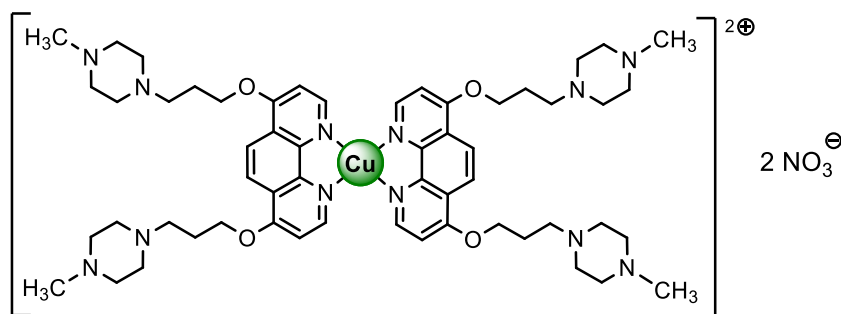
Calculado: 991,5095

Encontrado: 991,5093

UV-vis: λ_{max} (nm) = 313, 301, 265

$\epsilon_{(313 \text{ nm})}$ = 14143 L·mol⁻¹·cm⁻¹

Complejo [(L₆₄)₂Cu]²⁺ 2NO₃⁻ (**88**)



Siguiendo el procedimiento general N se preparó el complejo **88** a partir de 19 mg (0,038 mmol) del ligando **64** y 5 mg (0,019 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 16 mg del complejo **88** como un sólido verde brillante.

Rdto.: 76%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 2922, 2855, 1650, 1430, 1374, 1322, 1101.

HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₅₆H₈₀CuN₁₂NaO₄ [M - 2 NO₃ + Na]⁺

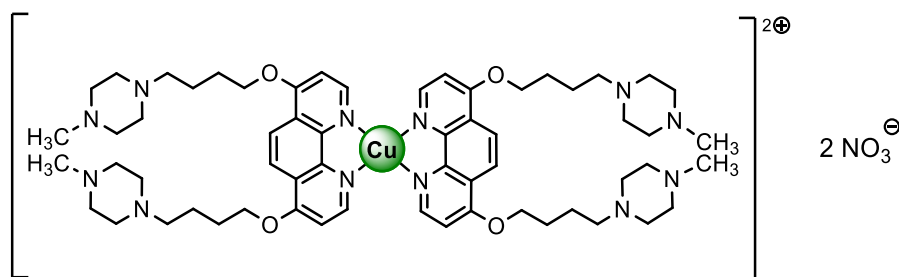
Calculado: 1070,119

Encontrado: 1070,7533

UV-vis: λ_{\max} (nm) = 313, 302, 265

$\epsilon_{(313 \text{ nm})} = 9810 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo $[(L_{64})_2Cu]^{2+} 2NO_3^-$ (**89**)



Siguiendo el procedimiento general N se preparó el complejo **89** a partir de 20 mg (0,038 mmol) del ligando **65** y 5 mg (0,019 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 16 mg del complejo **89** como un sólido verde oscuro.

Rdto.: 72%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 2944, 2866, 1650, 1605, 1549, 1460, 1426, 1385, 1195.

HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₆₀H₈₉CuN₁₄O₁₀ [M + H]⁺

Calculado: 1228,6182

Encontrado: 1228,7423

UV-vis: λ_{\max} (nm) = 316, 301, 255

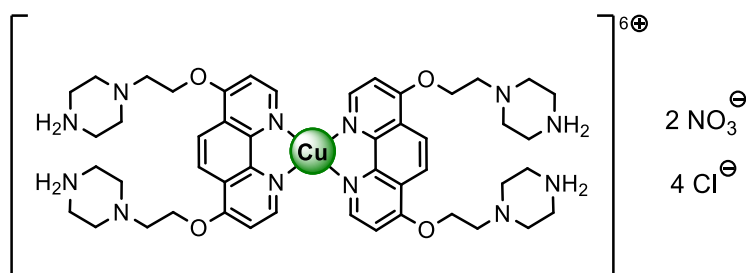
$\epsilon_{(316 \text{ nm})} = 17837 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Procedimiento general O

A una disolución de 2 equivalentes de ligandos (**90** - **92**) en 5 mL de agua destilada se añadieron aproximadamente 4 equivalentes de ácido clorhídrico del 1% y una disolución de 1 equivalente de nitrato de cobre(II) trihidrato en agua destilada. La mezcla se dejó con agitación a 65 °C durante 48 horas tras las cuales

la mezcla de reacción se concentró a sequedad. El sólido obtenido se lavó con metanol (3 x 8 mL) y así se obtuvieron los productos deseados.

Complejo $[(L_{70})_2Cu]^{6+} 4Cl^- 2NO_3^-$ (**90**)



Seguendo el procedimiento general O se preparó el complejo **90** a partir de 65 mg (0,15 mmol) del ligando **70**, y 925 μ L (0,30 mmol) de ácido clorhídrico en disolución acuosa al 1% y 18 mg (0,075 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 62 mg del complejo **90** como un sólido verde claro.

Rdto.: 73%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm^{-1}): 3399, 3074, 3015, 2959, 1578, 1430, 1396, 1355, 1303, 1124, 1090.

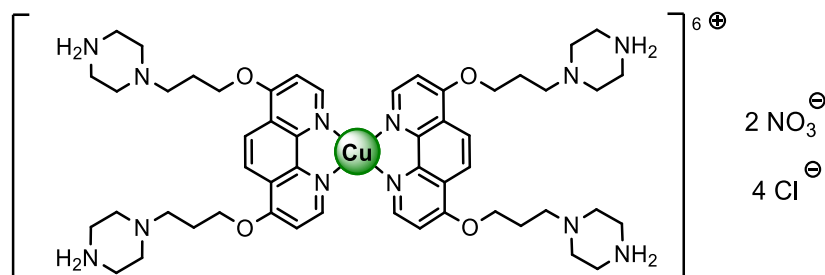
HRMS (ESI-TOF, m/z) para $C_{48}H_{64}CuN_{12}O_4$ $[M - 4 HCl - 2 NO_3]^+$

Calculado: 935,4469

Encontrado: 935,3078

UV-vis: λ_{max} (nm) = 312, 302, 265

$\epsilon_{(312 \text{ nm})} = 10769 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo $[(L_{71})_2Cu]^{6+} 4Cl^- 2NO_3^-$ (91)

Siguiendo el procedimiento general O se preparó el complejo **91** a partir de 98 mg (0,21 mmol) del ligando **71**, y 1,3 mL (0,42 mmol) de ácido clorhídrico en disolución acuosa al 1% y 26 mg (0,11 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 87 mg del complejo **91** como un sólido verde claro.

Rdto.: 69%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3418, 3030, 2963, 1579, 1426, 1385, 1359, 1302, 1225, 1042.

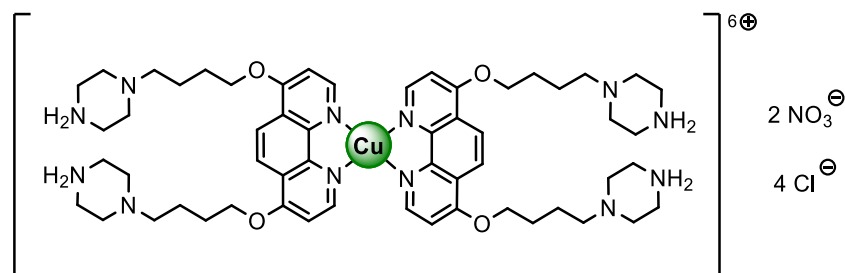
HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₅₂H₇₂CuN₁₂O₄ [M - 2 NO₃, - 4 HCl]⁺

Calculado: 991,5095

Encontrado: 991,5076

UV-vis: λ_{\max} (nm) = 313, 302, 265

$\epsilon_{(313 \text{ nm})} = 15462 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Complejo $[(L_{72})_2Cu]^{6+} 4Cl^- 2NO_3^-$ (92)

Siguiendo el procedimiento general O se preparó el complejo **92** a partir de 104 mg (0,21 mmol) del ligando **72** y 1,3 mL (0,42 mmol) de ácido clorhídrico en disolución acuosa al 1% y 26 mg (0,10 mmol) de nitrato de cobre(II) trihidrato obteniendo así 91 mg del complejo **92** como un sólido verde claro.

Rdto.: 65%

P.f. > 300 °C

IR (KBr), $\bar{\nu}$ (cm⁻¹): 3403, 3079, 3015, 2926, 1624, 1583, 1430, 1385, 1355, 1310, 1172, 1109, 1045.

HRMS (ESI-TOF, m/z) para C₅₆H₈₀CuN₁₂O₄ [M - 2 NO₃, - 4 HCl]⁺

Calculado: 1047,5721

Encontrado: 1051,7249

UV-vis: λ_{\max} (nm) = 314, 303, 265

$\epsilon_{(314 \text{ nm})} = 12441 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

4.2 Estudios de interacción y actividad biológica

4.2.1 Estudios de interacción ligando-ADN por desnaturalización térmica

4.2.1.1 Desnaturalización térmica del ADN por FRET

El experimento de la desnaturalización térmica de ADN por FRET fue realizado empleando un equipo para PCR cuantitativa ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), en formato de microplaca de 96 pocillos (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, Life Technologies Corporation). Todos los oligonucleótidos utilizados en este experimento, el cuádruple F21T (5'- FAM – GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG – TAMRA - 3') y el dúplex F10T (5'- FAM – TAT AGC TA TA/Sp18/TA TA GCT ATA – TAMRA - 3'), fueron sintetizados y purificados mediante HPLC en la casa comercial IDT. Se emplearon tres tampones distintos en este ensayo: para el ADN cuádruple-G F21T, un tampón de cacodilato de litio rico en cationes potasio: 10 mM KCl, 90 mM LiCl, 10 mM cacodilato de litio (pH = 7,2) y un tampón de cacodilato de litio rico en cationes sodio: 100 mM NaCl, 10 mM cacodilato de litio

(pH = 7,2). Para el ADN dúplex F10T se empleó un tampón de cacodilato de sodio: 10 mM cacodilato de sodio, 100 mM LiCl, (pH = 7,2).

Primero se disolvieron todos los oligonucleótidos en agua (grado BPC) y se prepararon disoluciones madre a concentración 50 μ M. Para el plegamiento de ADN se emplearon tampones concentrados (2x). A partir de las disoluciones madre de ADN, tampones (2x) y agua (BPC grade) se prepararon disoluciones con la concentración 0,25 μ M de ADN en los tampones correspondientes. Todas estas disoluciones se calentaron a 90 °C durante 5 minutos y luego se dejaron enfriar, lentamente, durante 3 horas. Las disoluciones preparadas se dejaron a 4 °C durante una noche.

Los productos objeto de estudio se disolvieron en agua o en DMSO, y se obtuvieron disoluciones madre con concentración aproximada 1 mM. Las concentraciones exactas se determinaron por espectroscopia de UV-visible. A continuación, se prepararon disoluciones de compuesto 5 μ M ó 50 μ M en cada tampón.

En la microplaca de 96 pocillos se mezclaron 40 μ L de la disolución de ADN (0,25 μ M) con las disoluciones de compuesto estudiado (5 μ M o 50 μ M) y el tampón correspondiente hasta obtener un volumen total de 50 μ L. Para cada compuesto estudiado, se preparó una serie de 11 muestras con la concentración de ligando comprendida entre 0 y 1 μ M (ó entre 0 y 10 μ M) manteniendo la concentración de ADN constante en cada pocillo (0,2 μ M).

Los valores de fluorescencia correspondientes al fluoróforo FAM se registraron a una longitud de onda de 516 nm, tras su excitación a 492 nm. El protocolo experimental consistió en una incubación de 5 min a 24 °C, seguida de una rampa de temperatura con velocidad de calentamiento 1 °C/min. Los valores de fluorescencia se registraron a cada grado de temperatura. Finalmente, las intensidades de fluorescencia obtenidas se normalizaron entre los valores 0 y 1 y se representaron en una gráfica: fluorescencia normalizada (FN) en el eje y; escala de temperatura (°C) en el eje x.

La temperatura media de desnaturalización aparente ($T_{1/2}$) se define como la temperatura a la que la fluorescencia normalizada alcanza el valor de 0,5. Para evaluar la estabilización del ADN producida por el ligando se utiliza el valor de

incremento de temperatura media de desnaturalización ($\Delta T_{1/2}$), determinado de acuerdo con la fórmula A.

$$\Delta T_{1/2} = {}^x T_{1/2} - {}^o T_{1/2} \text{ (fórmula A)}$$

Fórmula A: $\Delta T_{1/2}$ – diferencia entre la temperatura media de desnaturalización del ADN en presencia y en ausencia de ligando ($^o C$); ${}^x T_{1/2}$ – temperatura media de desnaturalización aparente del ADN en presencia de ligando y a concentración x , $x = (0,1 - 10 \mu M)$ ($^o C$); ${}^o T_{1/2}$ – temperatura media de desnaturalización del ADN en ausencia de ligando

4.2.1.2 Desnaturalización térmica del ADN por FRET competitivo

Una variante del experimento anterior consiste en la adición, además de las secuencias del ADN cuádruple F21T marcadas con etiquetas fluorescentes, de alícuotas de una secuencia oligonucleotídica no marcada, en exceso estequiométrico. El protocolo experimental es idéntico al ya descrito, pero incorporando la secuencia de ADN competidora ds26 (5'- CAA TCG GAT CGA ATT TCG ATC CGA TTG - 3') a concentraciones de 3 y 10 μM , lo que supone un gran exceso estequiométrico en relación a la concentración inicial de 0,2 μM del ADN cuádruple-G. La concentración del ligando se mantiene constante en todos los pocillos (1 μM).^[171,216]

De los datos obtenidos y de los cambios de la temperatura media de desnaturalización ($\Delta T_{1/2}$) observados en presencia y ausencia del oligonucleótido competidor ds26 se puede calcular un valor de selectividad ${}^{FRET}S$, tal y como se muestra en la fórmula 1. Si el valor de la selectividad de los ligandos ${}^{FRET}S$ se aproxima a 1, los ligandos se consideran que muestran una alta selectividad hacia el ADN cuádruple-G.^[171]

$${}^{FRET}S = \Delta T_{1/2} (10 \mu M \text{ ds26}) / \Delta T_{1/2} (\text{sin ds26}) \text{ (fórmula 1)}$$

Fórmula 1. ${}^{FRET}S$ – selectividad del ligando hacia el ADN cuádruple-G, $\Delta T_{1/2} (10 \mu M \text{ ds26})$ - temperatura media de desnaturalización en presencia del oligonucleótido competidor ds26 a

*concentración 10 μ M, $\Delta T_{1/2}$ (**sin ds26**) - temperatura media de desnaturalización en ausencia del oligonucleótido ds26*

4.2.2 Estudio de la interacción por medidas espectroscópicas

4.2.2.1 Medidas de interacción por dicroísmo circular

Los experimentos de dicroísmo circular se llevaron a cabo empleando un espectrofotómetro Jasco J-715. Todas las medidas se realizaron con cubetas de cuarzo, de paso de luz de 5 mm. La termostatación de las muestras a 25 °C se realizó mediante un sistema Peltier.

Para la realización de este experimento se empleó el oligonucleótido Tel-22 y tampones 110 mM a pH 7,2 con dos condiciones iónicas diferentes – tampón de cacodilato con iones de potasio (10 mM cacodilato de litio, 90 mM cloruro de litio, 10 mM cloruro de potasio) y tampón de cacodilato con iones de sodio (10 mM cacodilato de litio, 100 mM cloruro de sodio). A partir de la disolución madre de Tel-22 (~ 500 μ M) se prepararon disoluciones de oligonucleótidos de concentración 250 μ M con los dos tampones (2x) (tampón de cacodilato con iones de potasio y tampón de cacodilato con iones de sodio). A continuación se calentaron las disoluciones a 90 °C durante 5 minutos y después se enfriaron a 0 °C formando las estructuras secundarias características. Las disoluciones preparadas se dejaron a 4 °C hasta el día siguiente.

Para las medidas de interacción se preparó 1 mL de la disolución de ADN 3,95 μ M y se registró el espectro en ausencia de ligando. A continuación se añadieron alícuotas de 2 μ L de una disolución del ligando 1980 μ M, se mantuvieron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente y se volvió a registrar el espectro de DC en el intervalo de longitud de onda 220 – 350 nm. La relación entre las concentraciones molares del ligando (L) y el ADN varió desde 1:1 hasta 5:1. La dilución de la disolución de ADN en el punto final siempre se mantuvo por debajo del 1%.

4.2.2.2 Ensayo de desplazamiento de ligandos fluorescentes (G4-FID)

El instrumento empleado para todas las medidas de fluorescencia fue un espectrofluorímetro SLM 8100 AMINCO. La longitud de onda de luz polarizada de excitación fue 501 nm y los datos se registraron, en el rango comprendido entre 510 y 750 nm, inmediatamente y después de 5 minutos tras cada adición. Todas las medidas se realizaron con cubetas de cuarzo, de paso de luz de 10 mm. La sonda fluorescente, el naranja de tiazol, fue adquirida a Sigma Aldrich.

Los tampones utilizados en este experimento fueron tampón de cacodilato con iones de sodio (cacodilato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH = 7,2) y tampón de cacodilato con iones de potasio (cacodilato de sodio 10 mM, 100 mM KCl, pH = 7,2). Los oligonucleótidos empleados en este experimento fueron, para el ADN cuádruple-G, Tel-22 en condiciones iónicas de sodio y de potasio y, para el ADN dúplex, ds17 en condiciones iónicas de potasio. A partir de las disoluciones madre se prepararon disoluciones de oligonucleótidos 250 μ M (concentración en cadenas de oligonucleótido) en el tampón correspondiente. Las tres disoluciones de los oligonucleótidos se calentaron a 90 °C durante 5 minutos y después se enfriaron – las disoluciones del ADN cuádruple-G, inmediatamente a 0 °C y la disolución de ADN dúplex, gradualmente, hasta 25 °C durante 3 horas. Las disoluciones preparadas se dejaron a 4 °C durante una noche.

También se prepararon las disoluciones de la sonda fluorescente y del compuesto estudiado. La disolución de naranja de tiazol se preparó a concentración 2 mM en DMSO, y se mantuvo a - 20 °C y en la oscuridad, como máximo, un año. La disolución del compuesto estudiado se preparó a una concentración 500 μ M en agua, o bien en mezcla de disolventes DMSO-agua, el mismo día del ensayo.

En primer lugar, se registró el espectro de una disolución de 3 mL de ADN cuádruple-G o de ADN dúplex (0,25 μ M) en su tampón correspondiente. A continuación se añadieron 0,75 μ L de la disolución de naranja de tiazol 2 mM y se registraron los espectros inmediatamente y después de 5 minutos de equilibrado (ADC_0). Posteriormente, a la misma cubeta se añadieron alícuotas de la disolución 500 μ M o 2 mM (según el caso) del compuesto estudiado y se registró el espectro después de cada adición transcurridos 5 minutos.

El porcentaje de desplazamiento de naranja de tiazol (%DTO) se determinó midiendo el área bajo la curva de fluorescencia (ADC_x) de los 12 espectros determinados experimentalmente, en el rango 510 – 750 nm (a intervalos de tiempo de 5 minutos). Tras las sucesivas adiciones de ligando se puede observar (o no) una disminución del porcentaje de TO unido al ADN ($\%TOU_x$). El nuevo porcentaje del TO unido al ADN se recalcula a partir del área debajo de la curva ADC_x , registrada a concentración x del ligando presente en el medio, según la fórmula 2:

$$\%TOU_x = (100 \cdot ADC_x) / ADC_o \text{ (fórmula 2)}$$

El porcentaje del TO desplazado de la unión al ADN (% DTO) se recalcula según la fórmula 3:

$$\%DTO = 100 - \%TOU_x \text{ (fórmula 3)}$$

Fórmulas 2 y 3. $\%TOU_x$ – porcentaje de TO unido al ADN, ADC_x – área bajo la curva de fluorescencia registrada a concentración x , ADC_o – área debajo de la curva de fluorescencia de la disolución del ADN y TO, $\%DTO$ – porcentaje de TO desplazado de la unión con el ADN

Los valores del porcentaje de TO desplazado del ADN (%DTO) por el ligando de interés se representan en una gráfica frente la concentración del ligando utilizado. Posteriormente, se puede determinar el valor de la selectividad (**S**) o selectividad estimada (**Est. S**) de unión del ligando a las dos estructuras del ADN cuádruple-G en relación al ADN dúplex. Para el cálculo de la selectividad **S** se utilizan los valores de ^{50}DC (concentración del ligando a la que se consigue desplazar un 50% del TO unido al ADN) obtenidos para cada estructura (fórmula 4).^[163c]

$$S = {}^5\text{DC}_{(\text{ADN dúp lex})} / {}^5\text{DC}_{(\text{ADN cuádruple-G})} \text{ (fórmula 4)}$$

Fórmula 4. S – selectividad de unión del ligando a las dos estructuras del ADN cuádruple-G en relación al ADN dúp lex, ${}^5\text{DC}$ – concentración del ligando a la que se consigue desplazar un 50% del TO unido al ADN dúp lex o ADN cuádruple

En caso de que el ligando no llegue a desplazar el 50% del TO de su unión con el ADN, no se puede calcular la selectividad S según la fórmula 4, pero se puede obtener una selectividad estimada (**Est. S**), tal y como se muestra en la fórmula 5. Esta se determina comparando la concentración máxima (c_{max}) del ligando a la cual se consigue desplazar el porcentaje determinado de TO en el dúp lex ds17 con la concentración del ligando (${}^x\text{DC}$) que produce el mismo %DTO pero en la disolución del ADN cuádruple.^[163c]

$$\text{Est. S} = c_{\text{max}} / {}^x\text{DC} \text{ (fórmula 5)}$$

Fórmula 5. Est. S – selectividad estimada de unión entre el ligando y las dos estructuras del ADN cuádruple-G en relación al ADN dúp lex, c_{max} – concentración máxima a la que se consigue un determinado desplazamiento de TO (%DTO < 50%) de su unión al ADN dúp lex, ${}^x\text{DC}$ concentración de ligando que produce el mismo %DTO en el ADN cuádruple

4.2.3 Estudios cinéticos y termodinámicos entre ligandos y ADN cuádruple-G

Diálisis de equilibrio competitiva

Los oligonucleótidos de ADN cuádruple-G (Tel-22: 5'-AGG GTT AGG GTT AGG GTT AGG G-3') y de ADN dúp lex (ds17a: 5'-CCA GTT CGT AGT AAC CC-3' y ds17b: 5'- GGG TTA CTA CGA ACT GG-3') fueron adquiridos a IDT (Integrated DNA Technologies). Las membranas de diálisis (Spectra/Por® molecular porous membrane tubing MWCO: 3,5 – 5,0 kDa; Ø 6,4 mm) fueron adquiridas a Spectrum Laboratories Inc. Las disoluciones acuosas de surfactantes en grado de biología molecular, dodecilsulfato sódico (10%) y tritón-X 100 (10%), fueron

adquiridas a Sigma Aldrich. Los tampones utilizados en este experimento fueron tampón fosfato de sodio (10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 100 mM NaCl, pH = 7,2) y tampón fosfato de potasio (10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 100 mM KCl, pH = 7,2).

Los oligonucleótidos comerciales se disolvieron en agua (grado BPC) para obtener una disolución madre de concentración aproximada 500 μM . La concentración exacta se determinó por ultravioleta visible a 260 nm y a 90 °C utilizando los coeficientes de extinción de cada oligonucleótido (Tel-22: $\epsilon = 228500 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; ds17a: $\epsilon = 160900 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, ds17b: $\epsilon = 167400 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Las disoluciones madre de todos oligonucleótidos se congelaron en nitrógeno líquido y luego se mantuvieron a -20 °C, como máximo, un año. A partir de las disoluciones madre se prepararon disoluciones de oligonucleótidos con concentración 75 μM en unidades monoméricas (tétradas para el ADN cuádruple Tel-22 o pares de bases para el ADN dúplex ds17) en el tampón fosfato correspondiente. Ambas disoluciones de oligonucleótidos se calentaron a 90 °C durante 5 minutos y después se enfriaron – la disolución del ADN cuádruple-G inmediatamente, a 0 °C, y la disolución de ADN dúplex lentamente, hasta 25 °C, durante 3 horas. Las disoluciones preparadas se dejaron a 4 °C durante una noche.

Para cada experimento de diálisis se utilizaron 4 bolsas de diálisis, previamente lavadas con agua milli-Q. Dos de ellas se llenaron con 200 μL de la disolución de ADN cuádruple-G (75 μM u.m.) y las otras dos con 200 μL de la disolución de ADN dúplex (75 μM u.m.). Las 4 bolsas de diálisis se introdujeron en un vaso de precipitados que contenía 225 mL de una disolución $\sim 2 \mu\text{M}$ del producto estudiado. El vaso de precipitados se cerró herméticamente con parafilm, se cubrió con papel de aluminio y se dejó con agitación durante 24 h, a temperatura ambiente. Una vez terminado el proceso de diálisis, las disoluciones contenidas en cada bolsa de diálisis fueron transferidas a tubos eppendorf y se prepararon disoluciones con 90 μL de contenido de cada bolsa y con 10 μL de una disolución acuosa de detergente (10%). A continuación se determinaron las concentraciones del producto libre (**c**) en la disolución del dialisato y las concentraciones del producto dentro de las bolsas (**c**) por determinaciones de absorbancia utilizando los coeficientes de extinción para el ligando en presencia o ausencia del detergente. Para determinar la constante de asociación aparente

entre el producto y el ADN cuádruple-G o entre el producto y el ADN dúplex se empleó la fórmula 7.

$$c_u = c_b - c_l \text{ (fórmula 6)}$$

$$K_a = \frac{c_u}{c_l \cdot \{(c_{ADN}) - c_u\}} \text{ (fórmula 7)}$$

Fórmulas 6 y 7. K_a - constante de asociación (M^{-1}); c_b - concentración de ligando en la bolsa; c_l - concentración del ligando libre; c_u - concentración del ligando unido al ADN; c_{ADN} - concentración del ADN en unidades monoméricas

Para estimar un valor de selectividad del compuesto estudiado en su unión con el ADN cuádruple-G frente a su unión con el ADN dúplex, se empleó la fórmula 8.

$$S = K_a \text{ (ADN cuádruple-G)} / K_a \text{ (ADN dúplex)} \text{ (fórmula 8)}$$

Fórmula 8. S - selectividad, K_a - constante de asociación ligando-ADN cuádruple-G o ligando-ADN dúplex (M^{-1})

4.2.4 Viscosimetría

El ADN de timo de ternera (Deoxyribonucleic acid, Activated, Type XV) fue adquirido a Sigma Aldrich. El tampón utilizado en este experimento fue 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH = 7,2. Para la realización de las medidas viscosimétricas se empleó un viscosímetro capilar del modelo ViscoSystem AVS 470. La temperatura de las muestras se mantuvo a $25 \pm 0,01$ °C mediante un baño termostatzado.

El ADN de timo de ternera comercial se disolvió primero en 5 mL de tampón fosfato y se dejó con agitación a 0 °C durante 8 horas. Luego se prepararon 25 mL de una disolución madre, cuya concentración exacta se determinó por ultravioleta visible a 260 nm utilizando el coeficiente de extinción del ADN ($\epsilon = 12800 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

En primer lugar, se prepararon 6 mL de una disolución del ADN 300 – 500 μM (en nucleótidos) y se registró, 20 veces, el tiempo que emplea la disolución en recorrer la distancia entre los dos meniscos del viscosímetro. Luego se procedió a la adición de pequeñas alícuotas de disoluciones concentradas (0,6 – 1,5 mM) de los ligandos objeto de estudio en el mismo tampón y manteniendo la concentración de ADN constante, o variable, según el caso. En el caso de concentración del ADN variable el porcentaje máximo de dilución se mantuvo inferior al 5%. Después de cada alícuota añadida se volvieron a registrar las 20 medidas de tiempo y se registró el cambio de la viscosidad de las disoluciones ADN-ligando, en relación con la disolución de ADN-libre.

Con el tiempo promedio resultante de las medidas realizadas, y utilizando la constante intrínseca del viscosímetro, se calcularon las viscosidades absolutas para cada punto de la valoración, tal y como muestra la fórmula 10.

$$\mu = \mathbf{K} \cdot \mathbf{t} \text{ (fórmula 10)}$$

*Fórmula 10. μ – viscosidad absoluta [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$], \mathbf{K} - constante del viscosímetro [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$],
 \mathbf{t} – tiempo promedio (20 determinaciones, en s)*

Para el tratamiento matemático de los datos se calcularon los valores $(\mu_x/\mu_o)^{1/3}$, donde μ_o es el valor de la viscosidad absoluta de la disolución de ADN y μ_x representa la viscosidad absoluta de la disolución ADN-ligando después de la adición de cada alícuota x de compuesto. Los valores de $(\mu_x/\mu_o)^{1/3}$ para cada punto se representaron frente a la relación molar de concentraciones ligando - ADN ($[\text{L}]/[\text{ADN}]$). Los resultados obtenidos se ajustaron a una regresión lineal, obteniéndose los valores de pendiente para dichas rectas, los cuales se pueden relacionar directamente con el modo de unión al ADN de las moléculas estudiadas.

Así, se ha establecido que compuestos con valores de pendiente próximos a 1 se comportan como monointercalantes clásicos, mientras que aquellos compuestos que originan pendientes próximas a 0 no intercalan (si se unen al ADN lo harán en los surcos o por unión externa electrostática). Por otra parte,

los compuestos que dan lugar a rectas con valores de pendiente próximos a 2 serían bisintercalantes.

4.2.5 Estudios de la actividad biológica

Los estudios biológicos, concretamente el ensayo de citotoxicidad con sulforodamina-B y el protocolo de amplificación de repeticiones del oligonucleótido con la secuencia telomérica (el ensayo TRAP-LIG), que se presentan a continuación fueron realizados durante una estancia en la University College London en el grupo de investigación del Profesor Stephen Neidle.

4.2.5.1 Ensayo de citotoxicidad con sulforodamina B

Las líneas celulares RCC4 – de carcinoma renal, A549 – de carcinoma de pulmón, MCF7 – de carcinoma de pecho, PANC y MIA-Pa-Ca-2 – de carcinoma de páncreas fueron adquiridas a la Colección Europea de Cultivos Celulares, y la línea de células WI38, una línea de fibroblastos no cancerosos, a la American Type Culture Collection. El tampón fosfato salino (GIBCO 14040), tripsina (GIBCO 25300), el medio para el cultivo de células MEM de Dulbecco (GIBCO 21969) y los suplementos de la nutrición celular L-glutamina (2 mM, Gibco 25030) y aminoácidos esenciales (1%, Gibco 11140) fueron adquiridos a Invitrogen, UK. La sulforodamina B (SRB), la base TRIS y la hidrocortisona fueron adquiridas a Acros Organics, UK. El medio MEM (M2279) y el ácido tricloroacético (TCA) se adquirieron a Sigma-Aldrich Reino Unido; el suero fetal de ternera (S1810) a Biosera, UK; las placas de 96 pocillos a Nunc de Dinamarca y el hemocitómetro de Neubauer a Asistente, Alemania. Las medidas de absorbancia se realizaron en un lector de placas Spectrostar Omega, BMG Labtech, Alemania.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en cultivo en monocapa en matraces de cultivo de 75 cm² bajo una atmósfera de 5% CO₂ humidificado y a 37 °C. Todas las incubaciones se realizaron bajo estas condiciones. Para las líneas celulares MCF7, RCC4 y A549 se empleó el medio MEM de Dulbecco

suplementado con L-glutamina, aminoácidos esenciales (1%), suero fetal de ternera (10%) e hidrocortisona (0,5 mg/mL). Para MIA-Pa-Ca-2 y PANC-1 se utilizó el medio MEM de Dulbecco, suplementado con L-glutamina (2 mM) y suero fetal de ternera (10%). El medio de cultivo MEM con L-glutamina (2 mM), aminoácidos esenciales (1%) y suero fetal de ternera (10%) se utilizó para la línea celular WI38. Para resembrar las células, se lavaron primero con tampón fosfato salino, se trataron con tripsina, y se volvieron a sembrar en medio fresco, con una densidad celular de aproximadamente 1×10^4 células por un mililitro del medio.

En primer lugar, se contaron las células con el hemocitómetro de Neubauer y se diluyeron a la concentración requerida en 20 mL de medio. Entre 1000 y 4000 de células de todas las líneas celulares mencionadas (MCF7, A549, MIA-Pa-Ca-2, PANC-1, RCC4 y WI38) se sembraron en 160 μ L del medio celular correspondiente, en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Después de la incubación de 24 horas, los compuestos estudiados se disolvieron en el medio de cultivo y se añadieron 40 μ L de las disoluciones con diferentes concentraciones a la microplaca. De esta manera, se obtuvieron muestras de un total volumen de 200 μ L, con el compuesto estudiado en un rango de concentraciones entre 0 y 50 μ M. Las células se incubaron durante 96 horas. Después se desechó el medio y las células se conservaron con 10% de TCA en agua, durante 30 min, a 4°C. Tras la eliminación del TCA, las células se lavaron con agua cinco veces y se secaron a 60°C durante 1 hora. A continuación se incubaron las células con una disolución de SRB (80 μ L, 0,4% en ácido acético 1%) durante 15 min y a temperatura ambiente. La disolución de SRB se eliminó, los pocillos se lavaron con ácido acético al 1% (200 μ L) y la placa se secó a 60°C durante 1 hora. Finalmente se añadió a cada pocillo una disolución de base TRIS y las placas se agitaron suavemente durante 5 min. Los datos de absorbancia se midieron a una longitud de onda de 540 nm en el lector de placas. Los datos se normalizaron entre 0 y 100 (0 para el control negativo – sin células y sin producto estudiado; 100 para el control positivo - células no tratadas con el compuesto estudiado). La absorbancia normalizada se representó en una gráfica frente la concentración del compuesto estudiado. Finalmente, se determinó el valor de concentración IC_{50}

(concentración de inhibición) como la concentración del ligando a la que se alcanzó el 50% de la intensidad de absorbancia normalizada.

4.2.5.2 Protocolo de amplificación de repeticiones del oligonucleótido con la secuencia telomérica (ensayo TRAP-LIG)

Los oligonucleótidos del cebador TS (5'-AAT TCG CCG AGC AGA GTT-3') y cebador inverso ACX (5'-GCG CGG (CTTACC) 3 CTA ACC-3') fueron adquiridos a Integrated DNA Technologies. El kit de purificación de nucleótidos QIA fue adquirido a Qiagen, los dNTPs 10 mM a Quanta Biosciences, el SYBR Green (10000x) a Aldrich y la Taq polimerasa (Red hot) a ABgene, UK. El tampón TRAP (10x) que contenía 200 mM Tris-HCl (pH 8,3), 630 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 10 mM EGTA y 0,5% (v/v) de Tween 20 se preparó en el laboratorio.

La línea celular de carcinoma pancreático humano MIA-Pa-Ca-2 se mantuvo en el medio celular MEM de Dulbecco suplementado con L-glutamina (2 mM) y suero fetal de ternera (10%) a 37 °C y 5% CO₂. La proteína total se extrajo a partir de células en crecimiento exponencial y se usó como fuente de telomerasa. La extracción de proteína total celular y cuantificación se llevó a cabo utilizando el ensayo de Bradford. Las disoluciones madre de los compuestos estudiados se prepararon en agua (DEPC) a una concentración de 1 mM. El equipo de laboratorio utilizado para este experimento fue un termociclador con gradiente (Indiamart), una centrífuga (0 - 13000 rpm), un equipo de centrifugación tipo Speed Vac, un equipo de electroforesis, un agitador (Luckham Rotatest Shaker) y un lector de geles (Syngene).

El ensayo TRAP se realizó en tres pasos:

- (I) Elongación a partir del cebador inicial por la telomerasa en presencia de ligando estudiado
- (II) Eliminación del ligando estudiado
- (III) Amplificación de los productos de elongación por PCR

Elongación a partir del cebador inicial por la telomerasa en presencia del ligando estudiado

Todas las disoluciones empleadas en la primera etapa se prepararon sobre hielo. Primero se preparó una mezcla maestra, consistente en 2 partes (P) del cebador TS (0,1 µg/µL), 8 partes del tampón TRAP (10x), 1 parte de BSA (0,1 mg/mL), 1 parte de dNTPs (2,5 mM cada uno) y 44 partes de agua DEPC – en total 56 partes. A partir de esta mezcla se preparó el control negativo como una mezcla de 12 µL de agua con 28 µL de la mezcla maestra inicial. Luego se añadieron a la mezcla maestra (4P-2) partes de extracto de proteína (500 ng/µL) diluido en tampón de lisis. A continuación se añadieron 30 µL de la mezcla de proteína a tubos de PCR que contenían 10 µL de las disoluciones, a distinta concentración y recién preparadas, del ligando. El control positivo se preparó con 10 µL de agua y con 30 µL de la mezcla maestra. El paso inicial de elongación se llevó a cabo durante 30 min a 30°C, seguido por un incremento de temperatura a 94°C, mantenido durante 5 minutos.

La eliminación del ligando

Con el objetivo de purificar el producto de la elongación y eliminar los ligandos se empleó el kit de purificación rápida de nucleótidos QIA (Qiagen). Se utilizaron dos tampones, PN y PE, para arrastrar el ligando y las últimas impurezas, antes de la elución del ADN de la columna, realizada con agua. Las muestras purificadas se secaron al vacío en una centrífuga a 45 °C durante 45 minutos. Antes de la tercera etapa de amplificación se volvieron a disolver los productos obtenidos en 40 µL de agua.

Amplificación de los productos de elongación por PCR

Para la amplificación de los productos de elongación mediante PCR se preparó una segunda mezcla maestra, adecuada para la etapa de PCR. Se mezclaron 2 partes de cebador inverso ACX (10 µM), 2 partes de cebador TS (0,1 µg/µL), 10 partes de tampón TRAP (10x), 1 parte de BSA (0,1 mg/mL), 1 parte de dNTPs (2,5 mM cada uno), 0,8 partes de Taq polimerasa y 3,2 partes de agua.

Se añadieron 10 μL de esta mezcla a las disoluciones del producto de elongación previamente disuelto en 40 μL de agua y se amplificó durante 35 ciclos de PCR: 94°C/30 s, 61°C/1 min y 72°C/1 min. Los productos obtenidos por amplificación se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (10%), a 240 V durante 40 minutos. Finalmente, para visualizar las cadenas de ADN de distinta longitud separadas por electroforesis, se sumergió el gel en una disolución de SYBR Green durante 45 minutos. Los resultados se cuantificaron mediante un lector de geles y su software correspondiente.

Los datos relativos a la intensidad de fluorescencia se obtuvieron mediante el escaneo y la integración de la intensidad total de fluorescencia de cada conjunto de productos de PCR. Las integrales obtenidas se normalizaron frente el control positivo. Todas las muestras se corrigieron restando la integral del control negativo. Los datos para todos los ligandos estudiados se recogieron en un intervalo de concentraciones concretas para obtener curvas dosis-respuesta a partir de las cuales se obtuvieron los valores de $^{tel}IC_{50}$. Estos valores representan las concentraciones necesarias para producir la inhibición del 50% de la actividad del enzima, correspondiente a una disminución del 50% de la intensidad de fluorescencia total en cada conjunto de productos de PCR, en relación al control positivo.

5. Conclusions

The main conclusions from this doctoral thesis are presented in this section divided into two parts: synthetic achievements and *in vitro* DNA-interaction and biological activity studies.

5.1 Synthetic achievements

A 1,10-diquaternized derivative of 1,10-phenanthroline, substituted at 4 and 7 positions, was obtained over 6 reaction steps with a 54% global yield (figure 94).

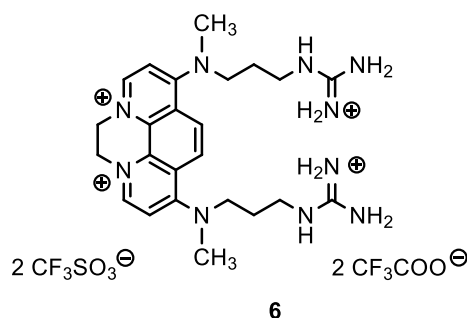


Figure 94. Compound **6**

Two ligands, derivatives of 2,2'-bipyridine di-substituted at positions 4 and 4' with an α -amino acid L-arginine (**11**) or hexan-6-amine-1-guanidinium (**14**) were obtained with a 58% and 61% global yield, respectively (figure 95). On the other hand, their correspondent analogues of 1,10-phenanthroline, di-substituted at 4 and 7 positions with the same substituents (**16**, **17**) could not be obtained in their purest forms (figure 96).

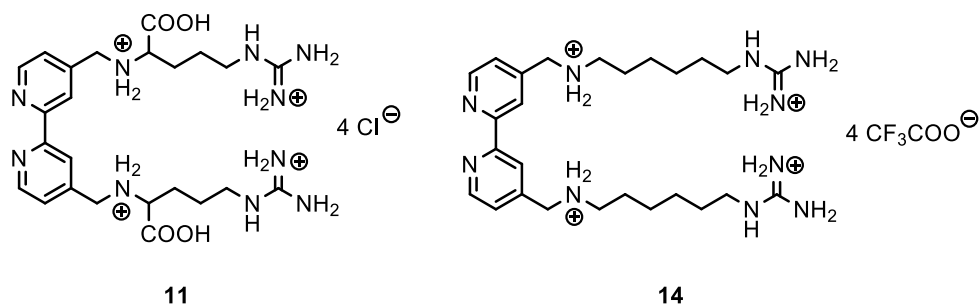


Figure 95. Two ligands, derivatives of 2,2'-bipyridine di-substituted at 4 and 4' positions with the α -amino acid L-arginine (**11**) or hexan-6-amine-1-guanidinium (**14**)

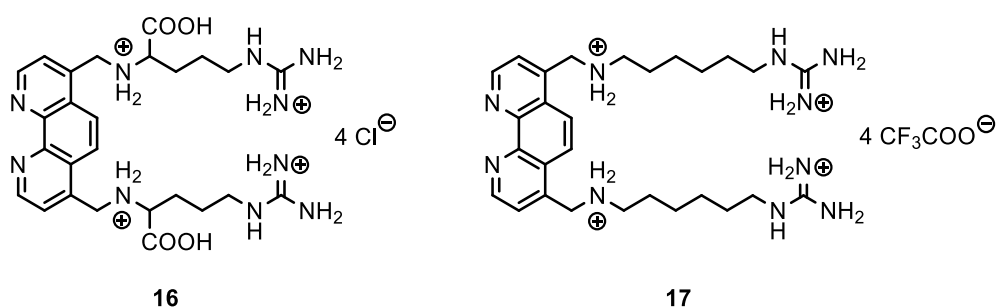
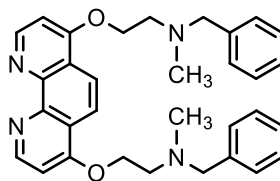


Figure 96. Two ligands, derivatives of 1,10-phenanthroline di-substituted at 4 and 7 positions with the α -amino acid L-arginine (**16**) or hexan-6-amine-1-guanidinium (**17**)

Regarding the preparation of the 4,7-diethers of the 1,10-phenanthroline system:

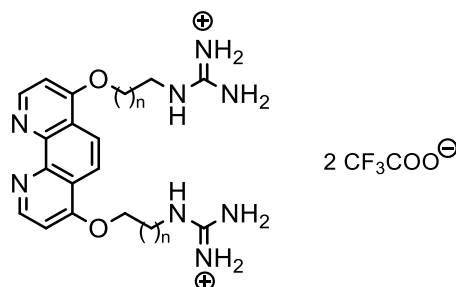
- Several attempts to obtain the derivatives of 1,10-phenanthroline, di-substituted at the 4 and 7 positions with side chains that contained anthracene or phenazine as terminal groups, were unsuccessful.
- The only ligand synthesized that contained an aromatic unit incorporated in the side chains was compound **49** (figure 97), which was obtained in one of the synthetic routes attempted, with an excellent global yield of 99%.



49

Figure 97. Ligand **49**

- Two ligands (**55**, **56**), with a guanidinium group as a terminal group in the side chains, were successfully prepared (figure 98).

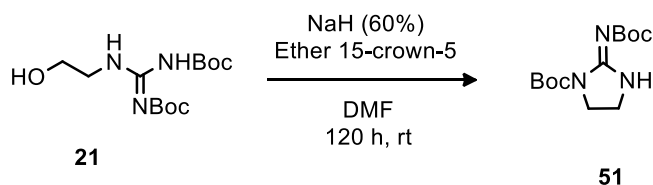


55: n = 2

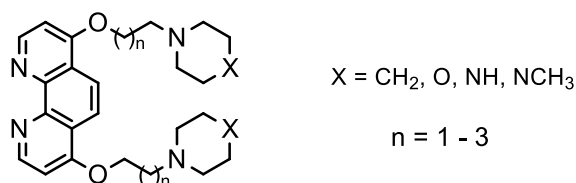
56: n = 3

Figure 98. Ligands **55** and **56**

- Their correspondent ethyl analogue (n = 1) could not be obtained because of the intramolecular cyclization of the alcohol **21** during the nucleophilic substitution reaction (scheme 38).

Scheme 38. Intramolecular cyclization of the compound **21**

- Twelve ligands, di-ethers containing aliphatic heterocycles (e.g. piperidine, morpholine, piperazine and *N*-methylpiperazine) as terminal groups in their side chains, were prepared with an overall yield between 19 – 71% (figure 99).



(57 - 65)

Figure 99. Twelve di-ether ligands containing aliphatic heterocycles (e.g. piperidine, morpholine, piperazine and *N*-methylpiperazine) as terminal groups in their side chains

On the other hand, several Cu(II) metal complexes were obtained from the previously synthesized ligands (**11**, **14**, **49**, **55** – **65**). The ratio metal to ligand was 1:2 and their general structure is represented in figure 100.

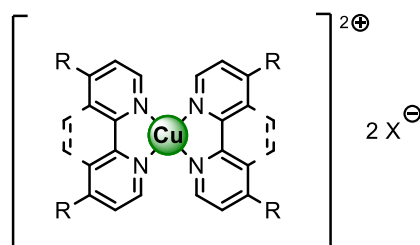


Figure 100. General structure of Cu(II) complexes; R – side chains

In addition, two metal complexes of Ni(II) were also prepared (**77**, **79**) from ligands **14** and **55**. As in the case of Cu(II) complexes, the ratio metal to ligand was 1:2 and their structures are represented in figure 101.

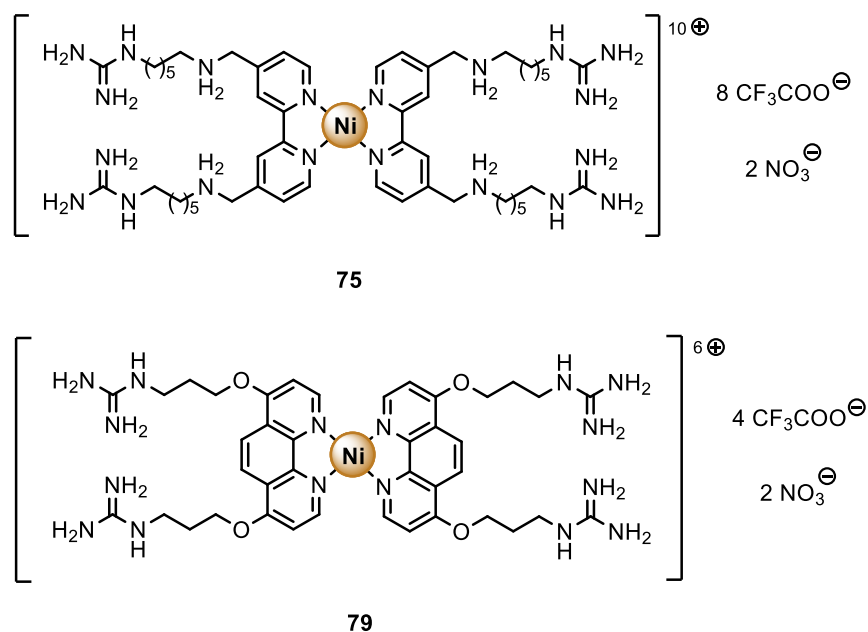


Figure 101. Ni(II) complexes **75** and **79**

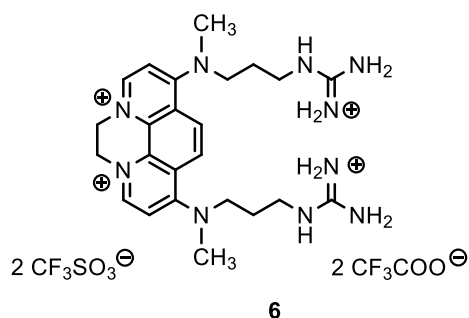
In general, most of the initial goals of this PhD thesis regarding ligand synthesis were accomplished, although we have encountered serious problems in the preparation and/or the purification of several derivatives, such as the 1,10-phenanthroline ethers linked to aromatic subunits. The preparation of the final G-quadruplex ligands, the metal complexes of Cu(II) or Ni(II) was, however, quite straightforward, once that the reaction and isolation conditions were optimized, which allowed us to access a variety of metal complexes in good yields.

Full structural characterization was difficulted by the impossibility of recording NMR spectra on these paramagnetic complexes. Intensive efforts have been made to characterize the metal complexes prepared in this work by X-ray crystallography, but thus far they have been unsuccessful. Further attempts are currently underway.

5.2 In vitro DNA-interaction studies & biological activity studies

The results and conclusions of this thesis, regarding DNA interactions, are summarized in this section and organized according to structural families.

Diquaternized 1,10-phenanthroline derivative (**6**)



The diquaternized 1,10-phenanthroline derivative **6** has demonstrated high affinity towards G-quadruplex DNA, especially towards the mixture of hybrid topologies (QK), which are assumed to form in solution in the presence of potassium ions. The compound **6** stabilized these G-quadruplex structures by ~ 14 °C (as indicated by FRET melting assays, $\Delta T_{1/2}$ value at $1 \mu\text{M}$), and the anti-parallel topology (QNa), formed in the presence of sodium ions, by $\sim 3,5$ °C. The preference of the compound **6** to bind G-quadruplex DNA under potassium conditions was confirmed also by the value of the association constants (K_a) determined by competition equilibrium dialysis. The association constants for QK and QNa were $18,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $13,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectively, with a moderate selectivity ratio G-quadruplex DNA *vs.* DNA duplex: 8 fold for QK and 3 fold for QNa. The TRAP-LIG experiment performed at UCL in the group of Prof. S. Neidle revealed a good inhibitory activity of telomerase. The determined $^{\text{tel}}\text{IC}_{50}$ value was only $6,6 \mu\text{M}$. On the other hand, the SRB-test performed on different cancer cell lines did not show any cytotoxic activity of the compound **6**. All IC_{50} values were higher than $50 \mu\text{M}$, the maximum concentration range employed in the experiment. This disagreement between the results obtained through the TRAP-

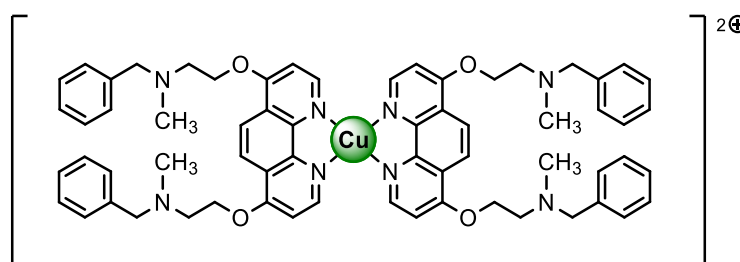
LIG and SRB assays could be caused by a low cellular uptake of the tetra-ionized compound or by the absence of a significant cytotoxic effect.

Metal complexes based on 4,4'-disubstituted-2,2'-bipyridine ligands (73 – 75)

In the case of metal complexes derived from 4,4'-disubstituted-2,2'-bipyridine ligands (73 – 75), it was impossible to perform competition equilibrium dialysis, because the UV spectra of the tested compounds and DNA overlapped, which prevented measurement of the ligand concentration in the different compartments. Moreover, the stabilization effect on the G-quadruplex (QK) in the FRET melting assay was very low or null – the $\Delta T_{1/2}$ values obtained for the QK and the metal complexes were 0,5 °C (73), 3,5 °C (74) and 0,0 °C (75).

Metal complexes based on 4,7-disubstituted-1,10-phenanthroline ligands

Compound 76 demonstrated a very weak effect on G-quadruplex DNA stabilization in the FRET melting assay - the $\Delta T_{1/2}$ values obtained for G-quadruplex structures were only 0,5 °C, probably due to the absence of the positively charged final groups in the side chains that would interact with the DNA grooves and/or loops.

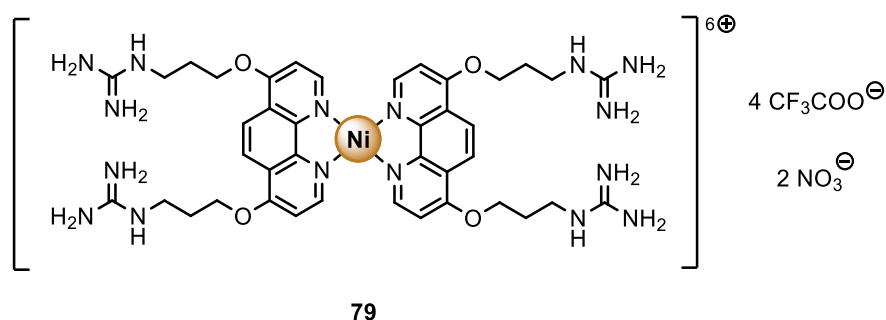


On the contrary, products that contained positively charged guanidinium groups in the side chains, such as a 77, 79 or 80, were found to be very effective G-quadruplex stabilizers (table 17).

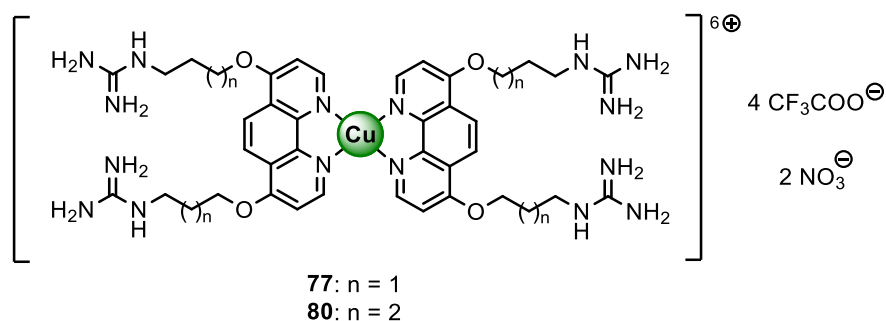
Product	QK	QNa	DNA duplex
77	12,8 ± 0,3	9,8 ± 2,9	3,3 ± 0,9
79	20,8 ± 0,9	19,3 ± 2,5	6,5 ± 1,0
80	14,3 ± 0,9	13,9 ± 2,7	2,0 ± 0,0

Table 17. $\Delta T_{1/2}$ values obtained by FRET melting assay ($1 \mu\text{M}$ compound)

In this series, the Ni(II) complex **79**, produced the highest degree of G-quadruplex stabilization, with $\Delta T_{1/2}$ values for both G-quadruplex structures of ~ 20 °C, while the $\Delta T_{1/2}$ value for DNA duplex was 6,5 °C.



The Cu(II) complexes **77** and **80** were very good G-quadruplex stabilizers as well. Among these, compound **80** was a better quadruplex stabilizer, probably due to its longer side chains.



The three compounds demonstrated a high stabilization effect on G-quadruplexes in the standard FRET melting assay, but this effect was reduced in

the presence of an excess amount of a competitive sequence of non-labeled duplex DNA (ds26) in the competitive version of the FRET melting assay (figure 102). The compound that showed a better behavior in this case was compound **80**, under potassium ionic conditions.

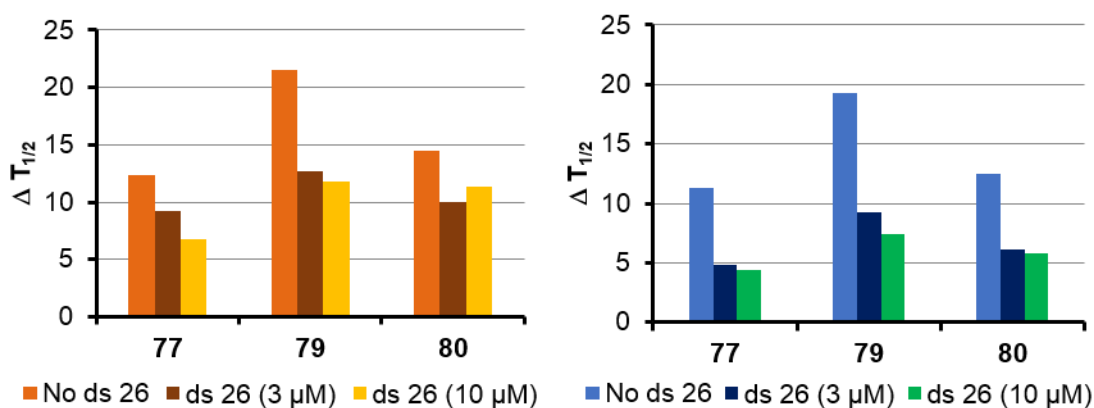


Figure 102. Changes in $\Delta T_{1/2}$ in the presence or in the absence of the non-labeled competitive sequence ds 26 in the competitive FRET melting assay; left graph in orange color – QK; right graph in blue - QNa

A high preference of compounds **77**, **79** and **80** to bind G-quadruplex DNA was confirmed by competition equilibrium dialysis. The association constants for QK, QNa and duplex DNA, as well as the selectivity ratios G-quadruplex *vs.* duplex DNA, are summarized in table 18.

Product	G-quadruplex DNA $K_a \cdot 10^{-6} (M^{-1})$	Duplex DNA $K_a \cdot 10^{-6} (M^{-1})$	Selectivity
77	0,56 ± 0,06	0,14 ± 0,03	~ 4
	2,79 ± 0,00	1,18 ± 0,19	~ 2
79	0,35 ± 0,02	0,09 ± 0,02	~ 4
	0,27 ± 0,04	0,07 ± 0,00	~ 4
80	1,04 ± 0,23	0,22 ± 0,01	~ 5
	0,59 ± 0,10	0,16 ± 0,00	~ 4

Table 18. Association constants K_a (M^{-1}) for G-quadruplex and duplex DNA, and estimated determined in sodium (blue) and potassium (orange) salt conditions

The Ni(II) complex **79** showed the lowest affinity (the lowest association constants) towards G-quadruplex DNA, but maintained the same selectivity ratio in both salt conditions (4 fold). The Cu(II) complex **77** seemed to bind preferentially the quadruplex topologies formed under potassium conditions, but displayed a lower selectivity ratio (2 fold). On the contrary, the Cu(II) complex **80** preferred to interact with the anti-parallel quadruplex conformation formed under the sodium ionic conditions, displaying the highest selectivity value (5 fold) of all metal complexes containing guanidinium groups in their side chains.

Products **77** and **79** had a similar behavior in the G4-FID assay. Both compounds were able to displace TO at a low micromolar concentration and reached the complete TO displacement (DTO). This effect was observed with all tested DNA structures (QK, QNa and duplex DNA), as shown in the figure 103, which indicates that selectivities under the conditions of these experiments are low.

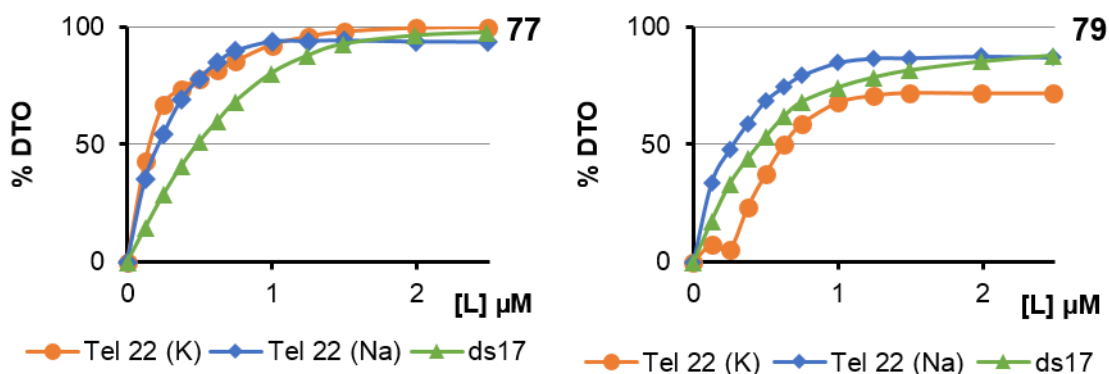


Figure 103. Thiazole orange displacement obtained on the G4-FID assay

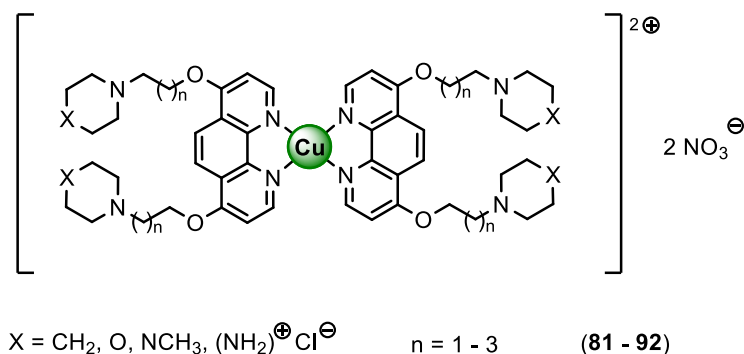
Finally, TRAP-LIG and SRB assays were performed on compounds **77** and **79**. Their $^{tel}IC_{50}$ values in a TRAP-LIG assay were in the range of low micromolar, and very similar IC_{50} values were obtained in the SRB-test, performed on MIA-Pa-Ca 2 cell line, as shown in table 19.

Product	TRAL-LIG $^{tel}IC_{50}$ (μM)	SRB-assay IC_{50} (μM)
77	7,2	10,3
79	27,0	25,3

Table 19. $^{tel}IC_{50}$ and IC_{50} values obtained by TRAP-LIG and SRB assays

This agreement on the obtained results by the two types of experiments seems to indicate that compounds **77** and **79** have antitumor activity and they can act as telomerase inhibitors. Unfortunately, in our preliminary studies, we have found that both compounds display also a significant cytotoxicity against the healthy fibroblast cell line, WI38. We are currently investigating this issue.

A last group of Cu(II) complexes prepared in this work is the family of 4,7-disubstituted-1,10-phenanthroline derivatives containing nitrogen aliphatic heterocycles in their side chains, such as a piperidine, morpholine, *N*-methylpiperazine and piperazine (compounds **81** – **92**).



A very interesting phenomenon was observed for this family regarding the stabilization of the G-quadruplex DNA structure under potassium conditions (QK). It was found that the ideal length of the side chain between the oxygen and the heterocyclic nitrogen was the corresponding to three carbon atoms. Irrespective of the nitrogen heterocycle, the compound with the three carbon side chains always demonstrated the strongest stabilization effect on QK, as shown in table 20. Moreover, the Cu(II) complex that contains two piperazine moieties was, in general, the ligand that produced the highest stabilization of quadruplex DNA.

	<i>Piperidine</i>	<i>Morpholine</i>	<i>N-methylpiperazine</i>	<i>Piperazine</i>
<i>n</i> = 1	0,7 ± 0,0	0,1 ± 0,1	6,0 ± 0,3	3,0 ± 0,4
<i>n</i> = 2	9,5 ± 0,4	5,7 ± 0,0	7,4 ± 0,4	15,0 ± 0,6
<i>n</i> = 3	0,3 ± 0,3	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,0	10,0 ± 0,8

Table 20. $\Delta T_{1/2}$ values obtained by FRET melting assay on QK

The strongest quadruplex stabilizers containing the piperazine heterocycle: *n* = 2 (**91**) and *n* = 3 (**92**), whose $\Delta T_{1/2}$ were equal or higher than 10 °C, were then tested by the competitive FRET assay. In this experiment we found out that the quadruplex stabilizing effect of these metal complexes was reduced in the presence of the excess amount of a competitive non-labeled duplex DNA sequence (ds26), as shown in figure 104. This effect was more pronounced in the case of QK structures than in the case of QNa DNA, and slightly higher for compound **91** than for compound **92**.

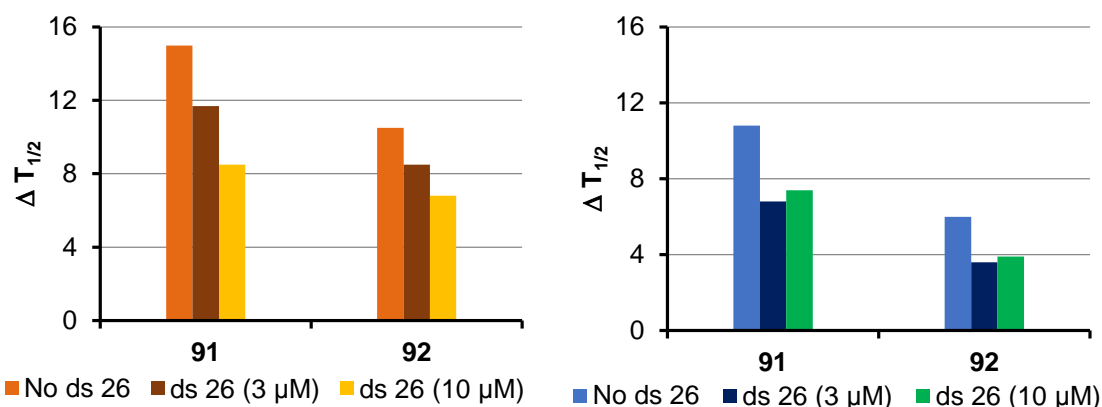


Figure 104. Changes of the $\Delta T_{1/2}$ in the presence or in the absence of the non-labeled competitive sequence ds26 in the competitive FRET melting assay; left graph in orange color – QK; right graph in blue – QNa

An increased affinity of compounds **91** and **92** towards G-quadruplex DNA was observed by competition equilibrium dialysis. The association constants for QK, QNa and duplex DNA, as well as the selectivity ratios G-quadruplex vs. duplex DNA, are summarized in table 21.

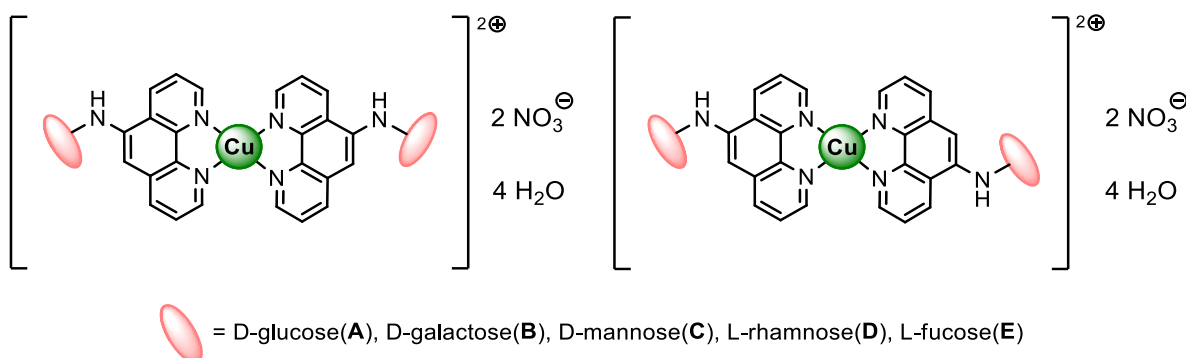
Product	G-quadruplex DNA $K_a \cdot 10^{-6} (M^{-1})$	Duplex DNA $K_a \cdot 10^{-6} (M^{-1})$	Selectivity
91	0,60 ± 0,03	0,08 ± 0,00	~ 7
	0,53 ± 0,03	0,07 ± 0,00	~ 8
92	0,55 ± 0,02	0,19 ± 0,04	~ 3
	1,18 ± 0,01	0,17 ± 0,00	~ 7

Table 21. Association constants $K_a (M^{-1})$ for G-quadruplex and duplex DNA and estimated selectivity determined in sodium (blue) and potassium (orange) salt conditions

For compound **91**, similar K_a values were determined for G-quadruplex DNA as well as duplex DNA, irrespective of the salt conditions employed. It also showed a good selectivity towards the G-quadruplex structures (7 and 8 fold). On

the other hand, compound **92** displayed a very good affinity ($1,18 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) and selectivity (7x) towards the QK structure.

Finally, several compounds prepared in collaboration with members of the research group during this PhD thesis were tested *in vitro*. First, a series of *N*-(1,10-phenanthroline-5-yl)- β -glycopyranosylamines Cu(II) complexes (**A** – **E**) were examined for their ability to recognize G-quadruplex DNA structures.



All compounds belonging to this family have shown the capability of recognizing G-quadruplex DNA under sodium and potassium conditions, although they were found to be relatively weak quadruplex ligands. The stabilization effect on G-quadruplexes in a FRET melting assay was almost 0 °C at the reference compound concentration of 1 μM . Therefore, the concentrations were increased up to 10 μM and the $\Delta T_{1/2}$ values obtained at this ligand concentration were between 7,9 – 14,4 °C for QK and 17,2 – 29,0 °C for QNa.

The association constants obtained by the competition equilibrium dialysis ranged from $0,6 - 2,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ for QNa and $1,6 - 10,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ for QK. The selectivity ratios were clearly higher under potassium ionic conditions, and varied between 8 and 11 fold. Under sodium ionic conditions, the selectivity reached only values of 2 and 3 (table 22), indicating that these metal complexes have a clear preference to bind the hybrid G-quadruplex DNA structures formed in the presence of potassium ions.

Product	G-quadruplex DNA $K_a \cdot 10^{-4} (M^{-1})$	Duplex DNA $K_a \cdot 10^{-4} (M^{-1})$	Selectivity
A	1,3 ± 0,2	0,6 ± 0,0	~ 2
	7,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	~ 11
B	1,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1	~ 2
	6,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	~ 8
C	2,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0	~ 2
	10,3 ± 0,9	1,0 ± 0,1	~ 10
D	1,6 ± 0,1	0,7 ± 0,1	~ 2
	10,8 ± 0,1	1,2 ± 0,1	~ 9
E	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,0	~ 3
	1,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1	~ 8

Table 22. Association constants K_a (M^{-1}) for G-quadruplex and duplex DNA and estimated selectivity determined in sodium (blue) and potassium (orange) salt conditions

All products (**A – E**) behaved similarly in the G4-FID assay. The ^{50}DC values varied from 6,2 – 9,0 μM for QK and from 5 – 13,4 μM for QNa (figure 105). As these products were not able to displace TO from quadruplex DNA in an effective manner, it seems that these compounds do not compete with TO when they bind to DNA. We hypothesize that they are binding instead to the grooves and/or loops of the quadruplex structure.^[228]

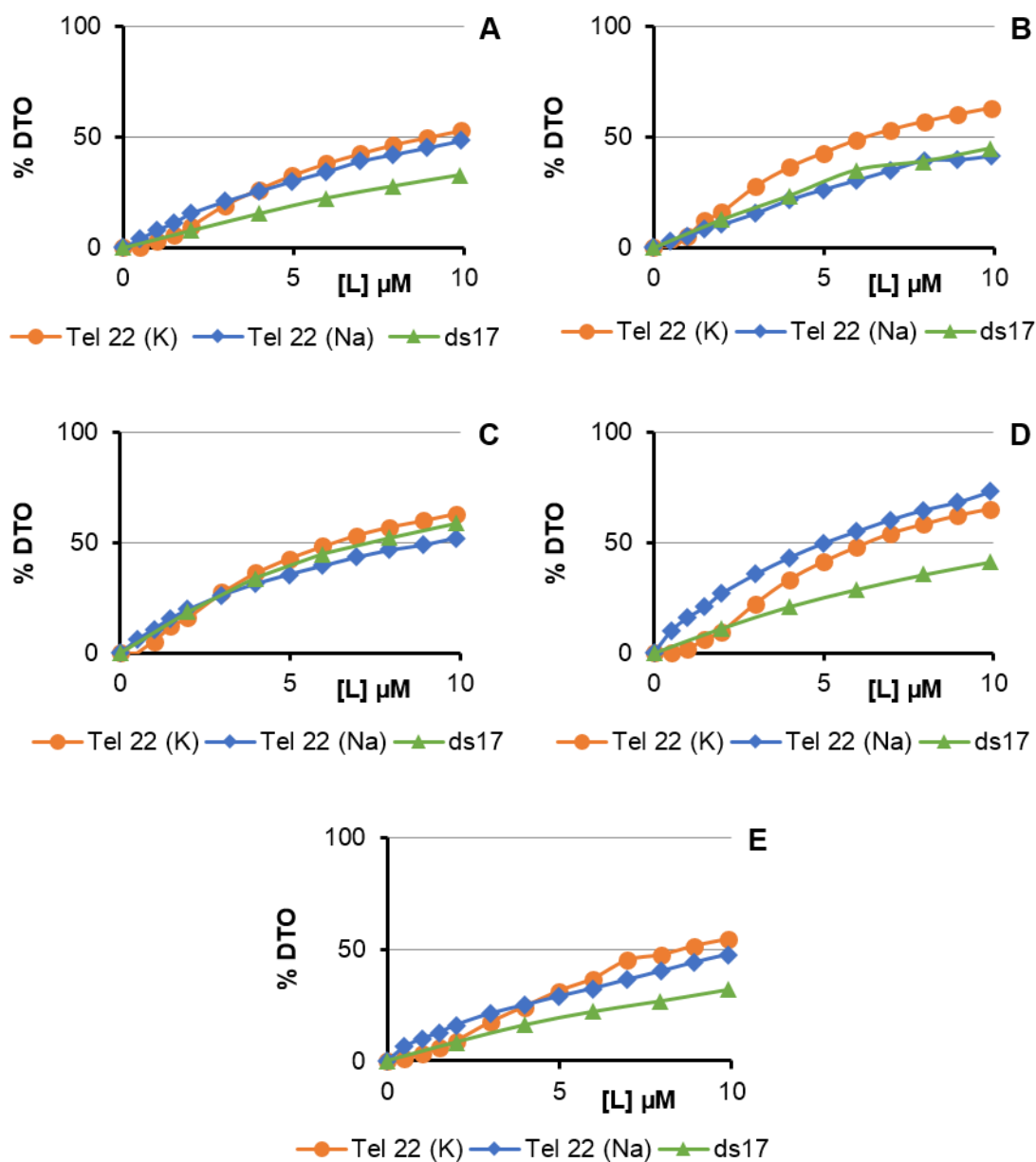
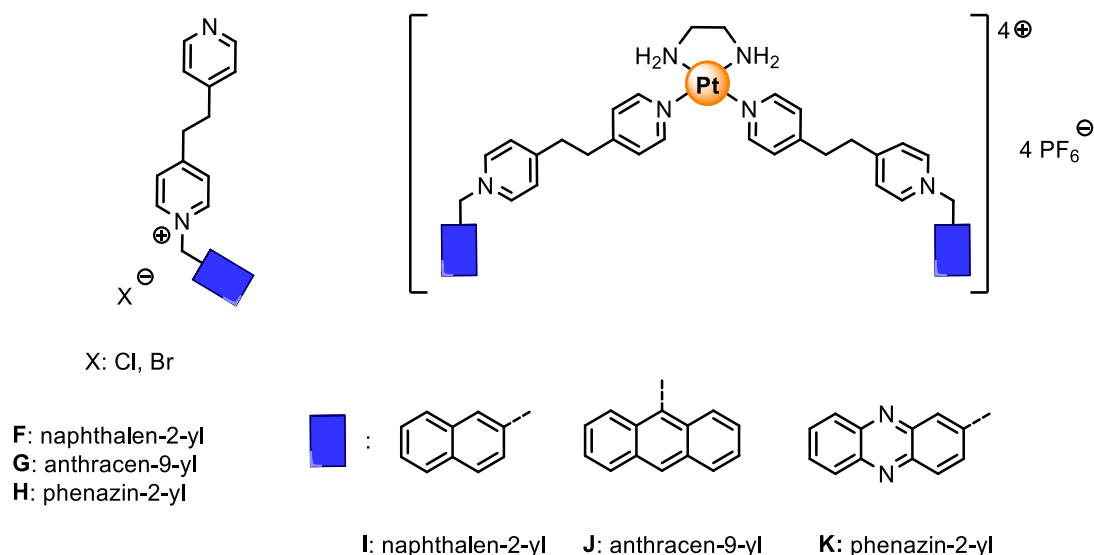


Figure 105. Thiazole orange displacement obtained in the G4-FID assay (A - E)

Finally, three 1,2-ethylene-4,4'-bipyridine ligands substituted with naphthalene (F), anthracene (G) or phenazine (H) and their platinum(II) (I - K) complexes were tested on their ability to interact with DNA.



Compounds **F - H** were initially designed as DNA monointercalators, while the platinum(II) complexes (**I - K**) were designed as DNA bis-intercalators. The results obtained by viscometric measurements revealed that the ligand **G** was a monointercalator and the platinum complexes **G** and **J** were bis-intercalators. Compounds **H** and **F & I**, containing naphthalene units were found to be partial intercalators (table 23). In parallel experiments with quadruplex DNA, the compounds of this series did not show better affinity for the quadruplex structures, than for duplex DNA.

Product	Slope	Classification
F	0,31 ± 0,04	Groove binder/Partial intercalator
G	0,84 ± 0,06	Monointercalator
H	0,65 ± 0,02	Partial intercalator
I	0,88 ± 0,06	Partial intercalator
J	1,85 ± 0,11	Bis-intercalator
K	1,59 ± 0,02	Bis-intercalator

Table 23. Slope values and classification of ligand interaction between products **F - K** and duplex DNA

Anexos

Anexo I

Espectros de RMN y Masas

- Espectro 1: ^1H -RMN (500 MHz, CD_3OD) – producto **6**
- Espectro 2: ^{13}C -RMN (125 MHz, CD_3OD) – producto **6**
- Espectro 3: ^2D -HMBC (500 MHz, CD_3OD) – producto **6**
- Espectro 4: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) – producto **43**
- Espectro 5: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) – producto **43**
- Espectro 6: ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) – producto **45**
- Espectro 7: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) – producto **49**
- Espectro 8: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) – producto **49**
- Espectro 9: ^1H -RMN (300 MHz, CD_3OD) – producto **55**
- Espectro 10: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) – producto **57**
- Espectro 11: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) – producto **57**
- Espectro 12: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) – producto **58**
- Espectro 13: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) – producto **59**
- Espectro 14: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) – producto **59**
- Espectro 15: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) – producto **60**
- Espectro 16: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) – producto **60**
- Espectro 17: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) – producto **61**
- Espectro 18: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) – producto **63**
- Espectro 19: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) – producto **63**
- Espectro 20: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) – producto **64**
- Espectro 21: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) – producto **64**
- Espectro 22: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) – producto **65**
- Espectro 23: ^1H -RMN (300 MHz, D_2O) – producto **71**

Espectro 24: **HRMS** (ESI-TOF) – producto **76**

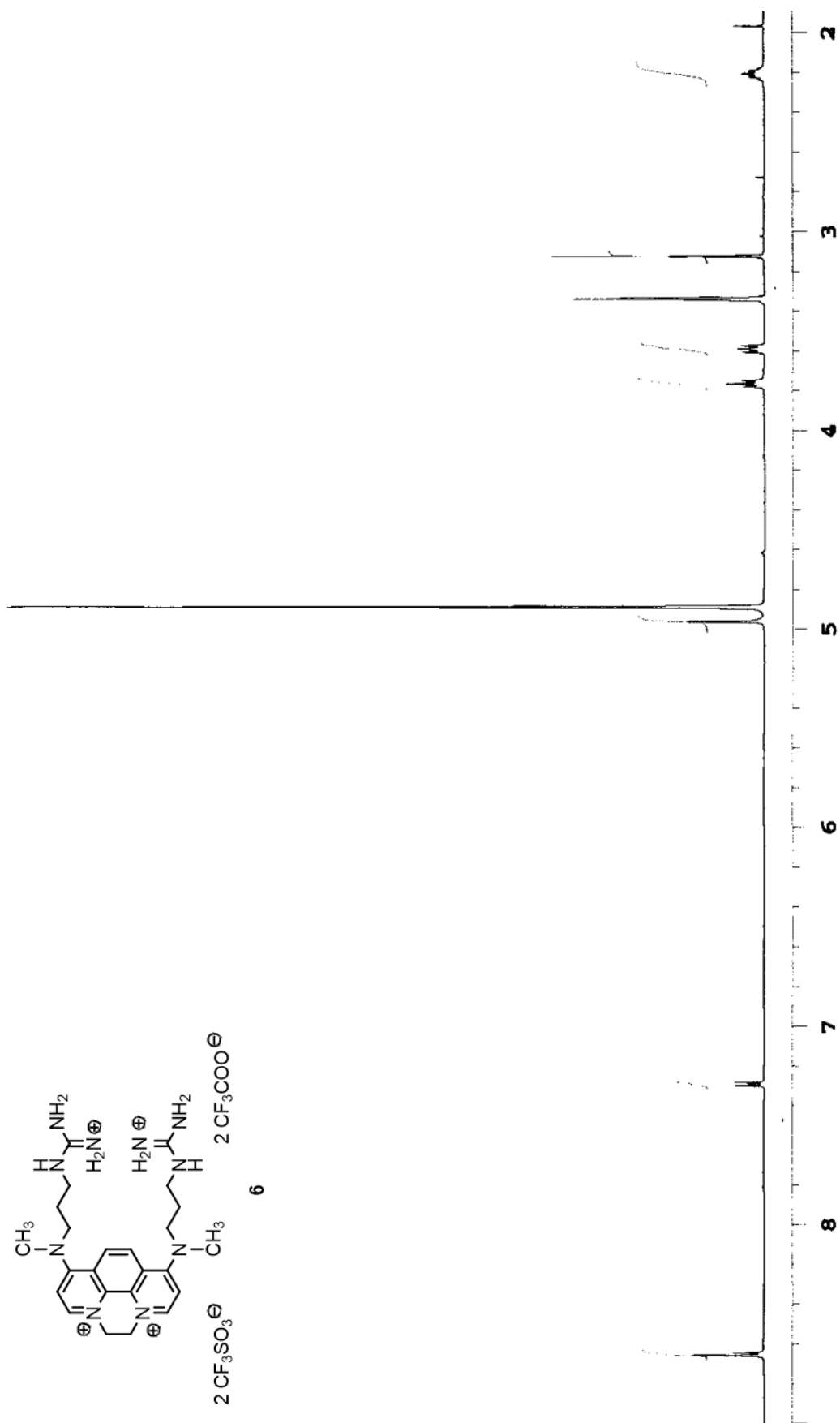
Espectro 25: **HRMS** (ESI-TOF) – producto **79**

Espectro 26: **HRMS** (ESI-TOF) – producto **80**

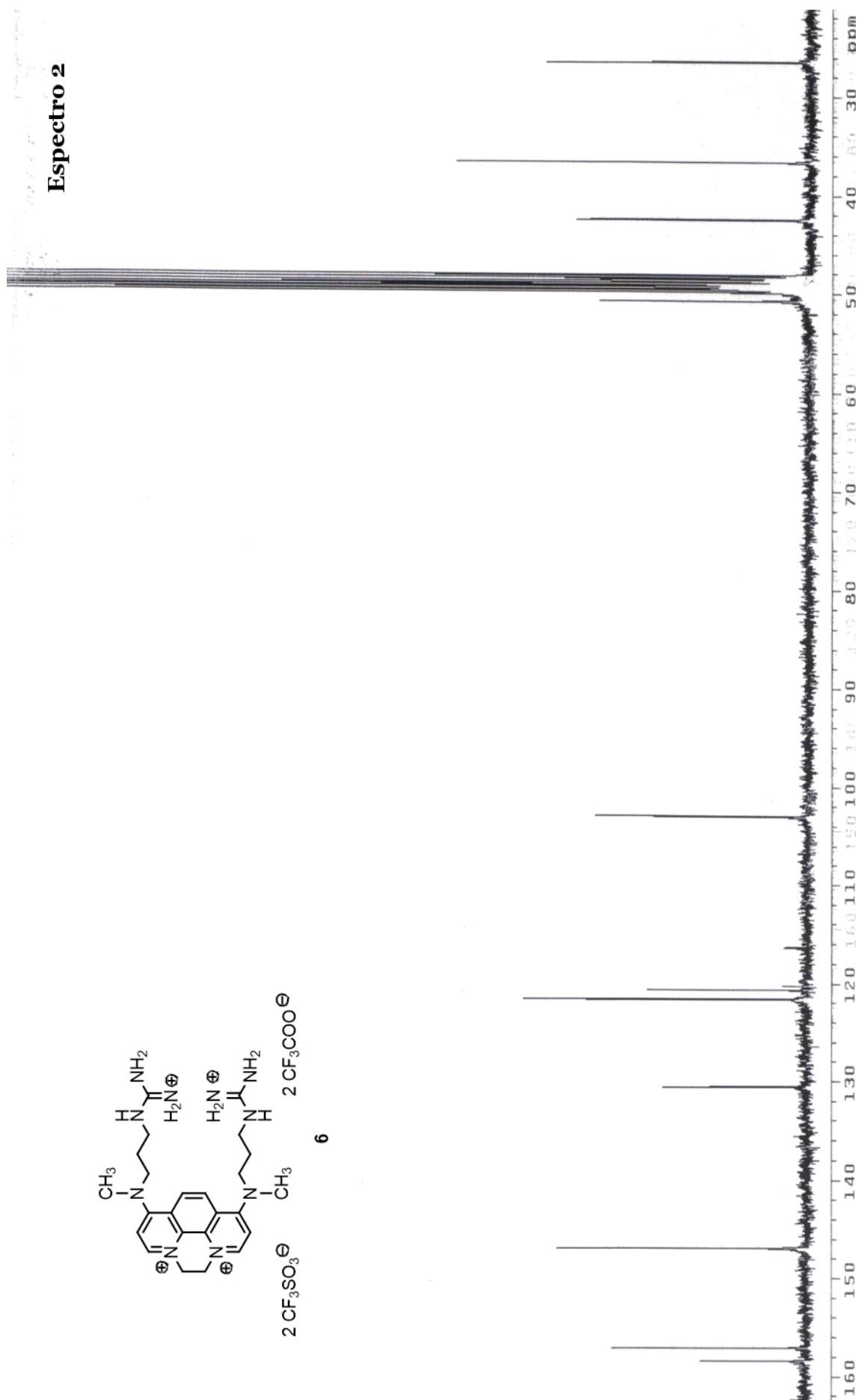
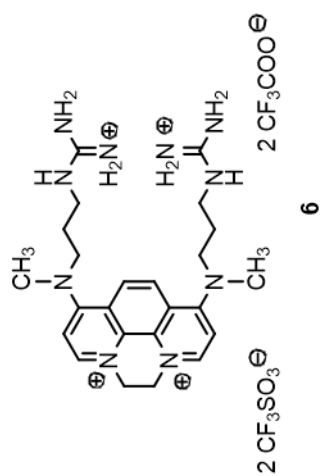
Espectro 27: **HRMS** (ESI-TOF) – producto **86**

Espectro 28: **HRMS** (ESI-TOF) – producto **87**

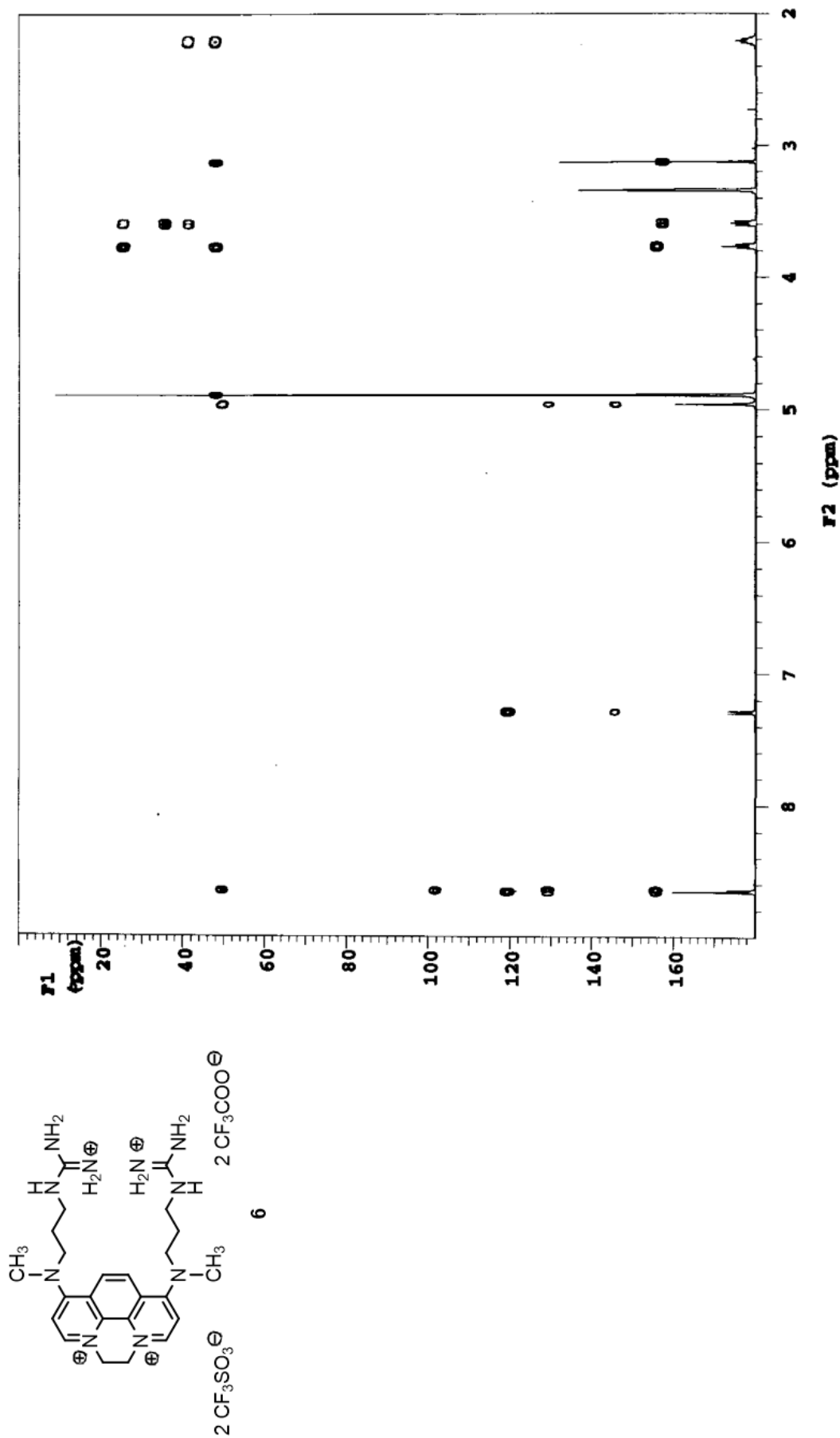
Espectro 1



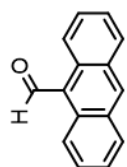
Espectro 2



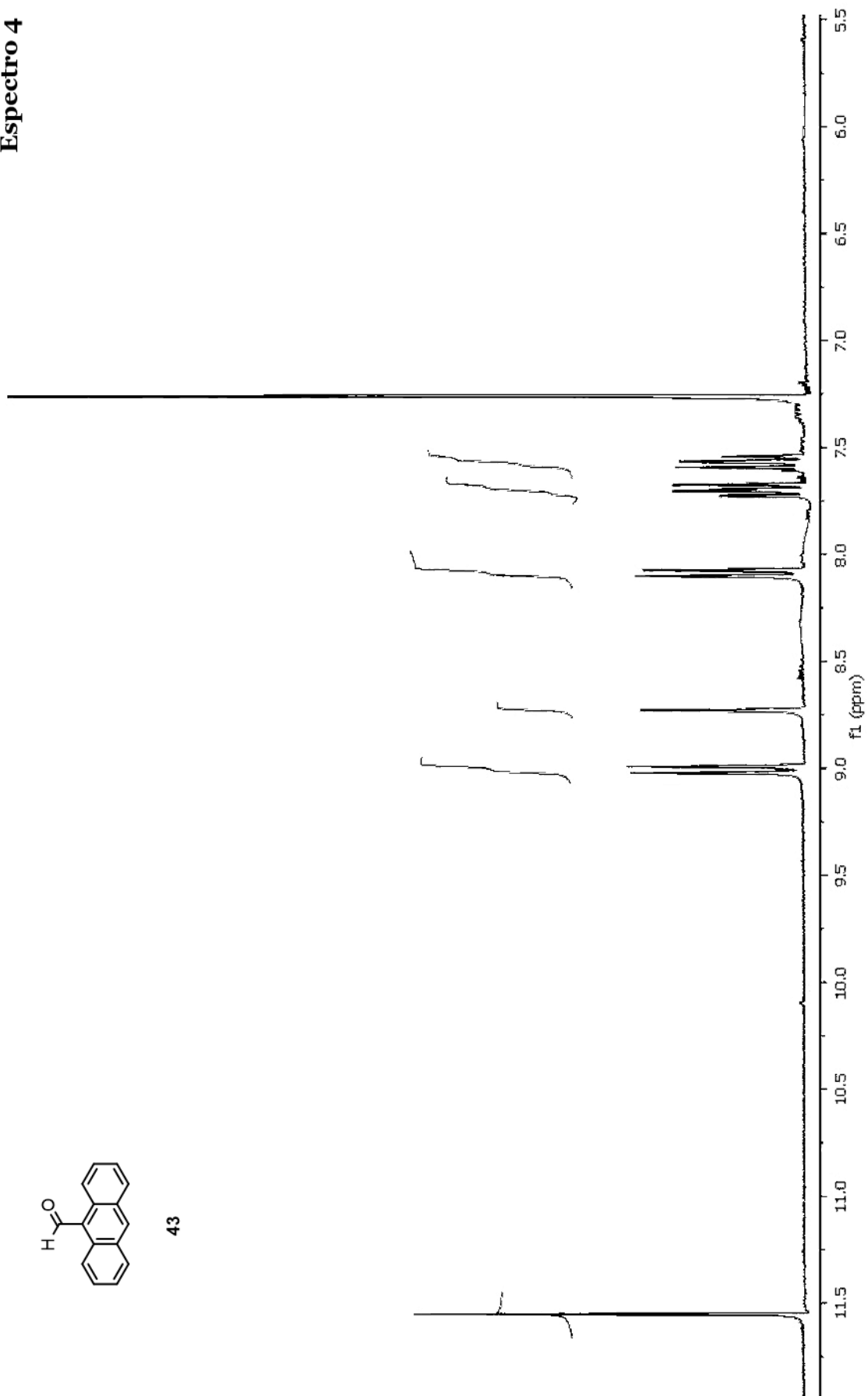
Espectro 3



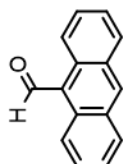
Espectro 4



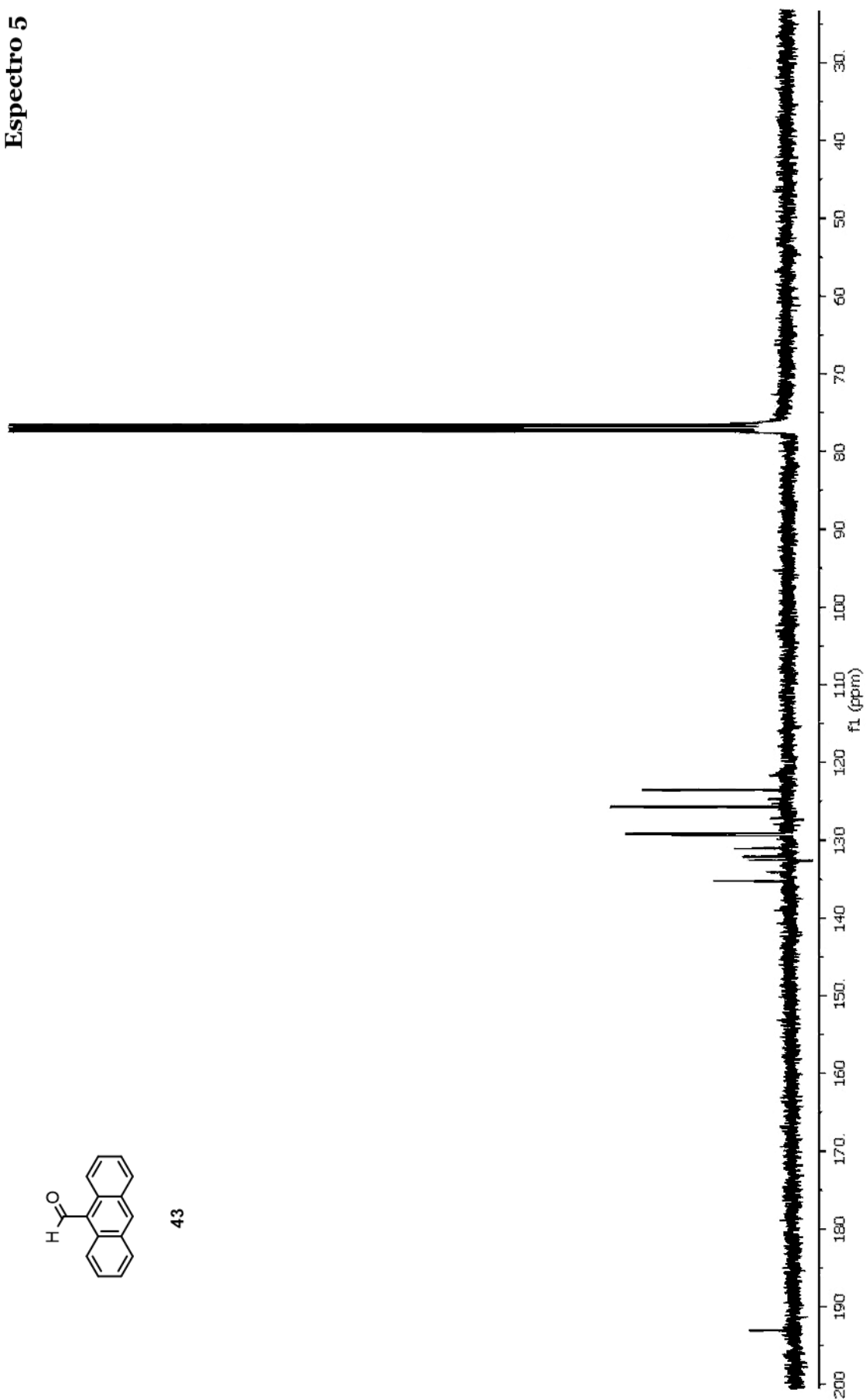
43



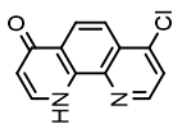
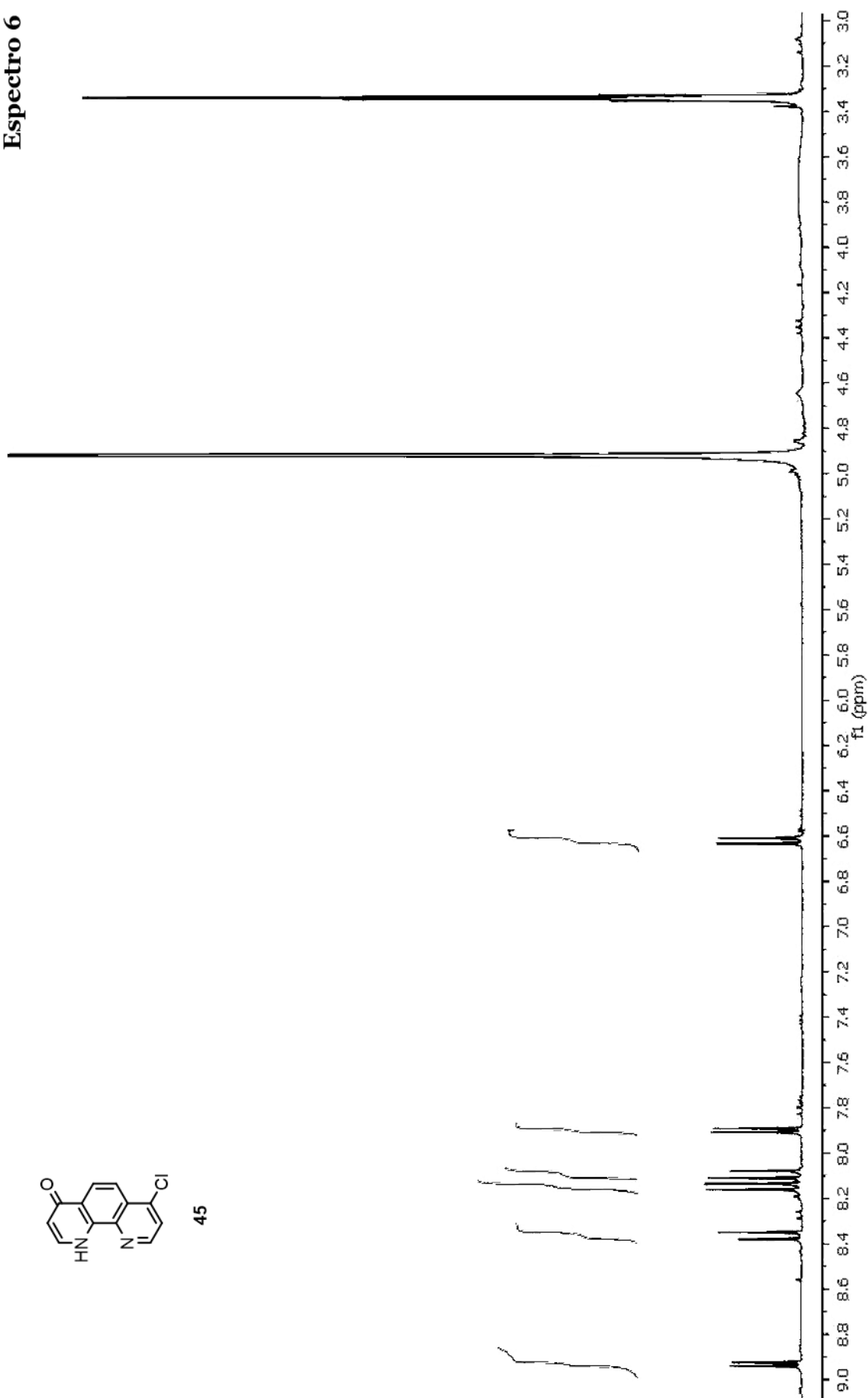
Espectro 5



43

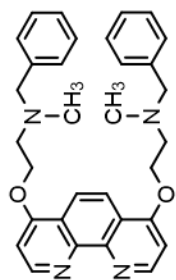


Espectro 6

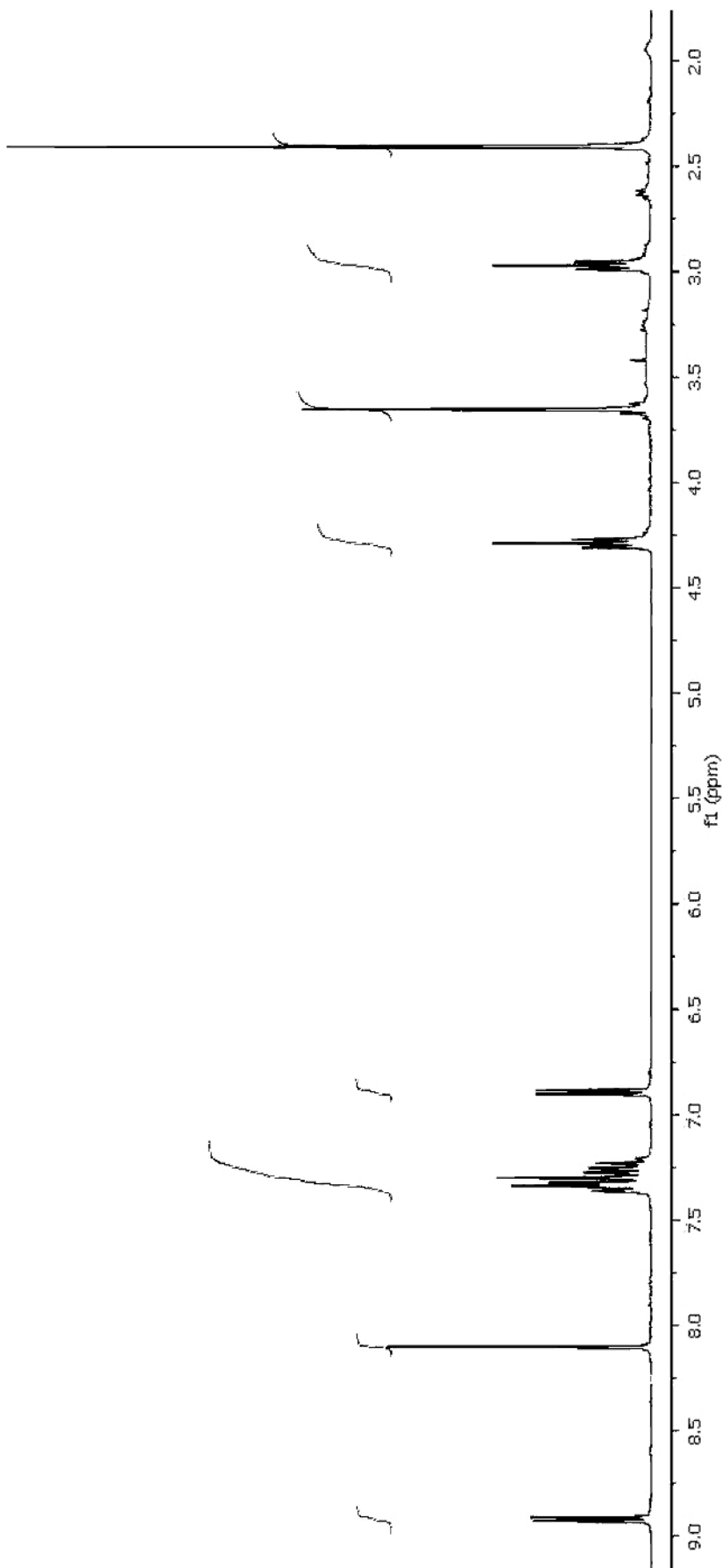


45

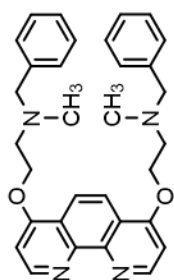
Espectro 7



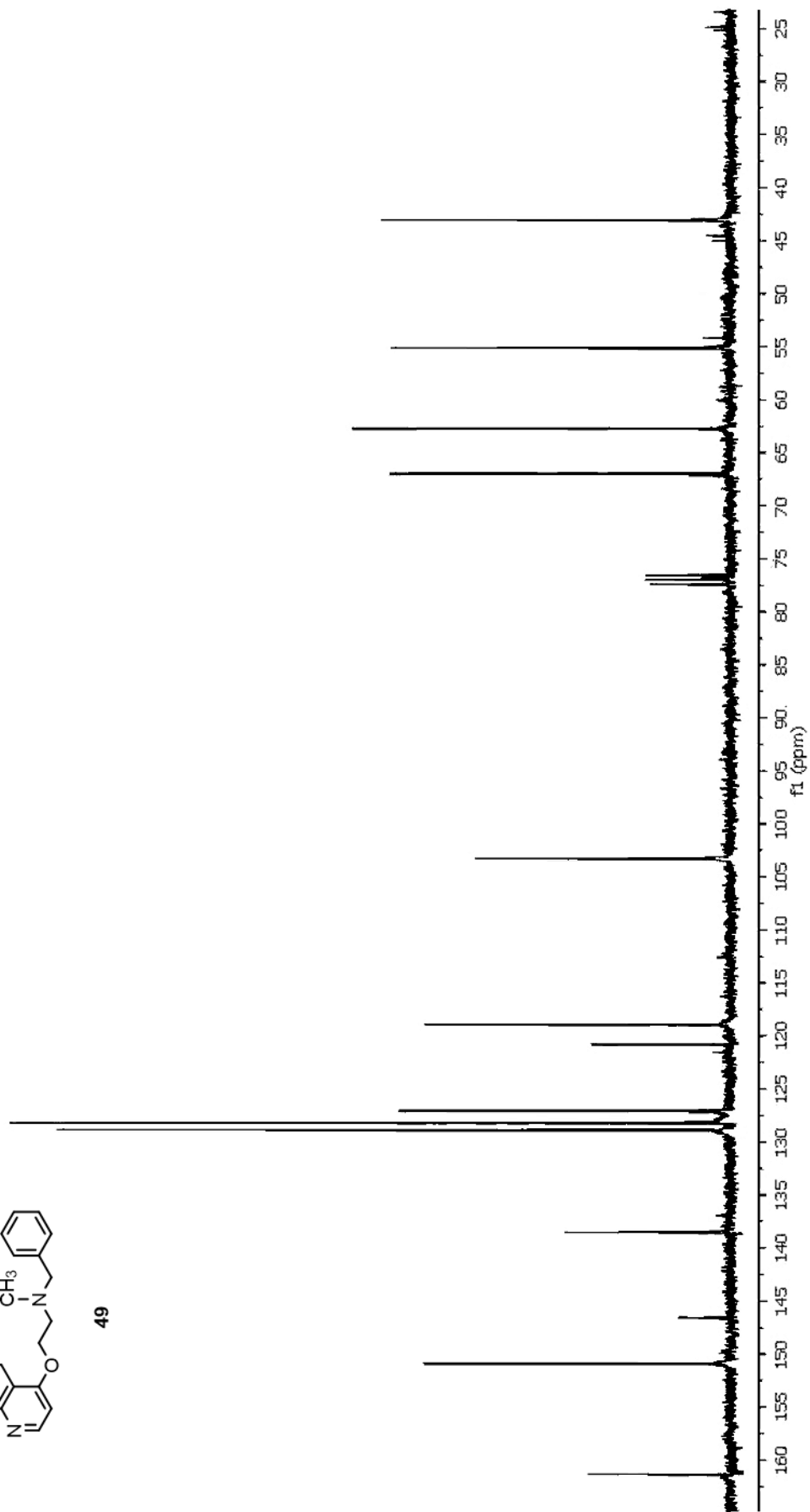
49



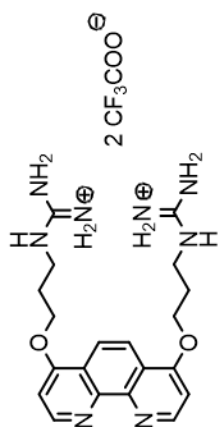
Espectro 8



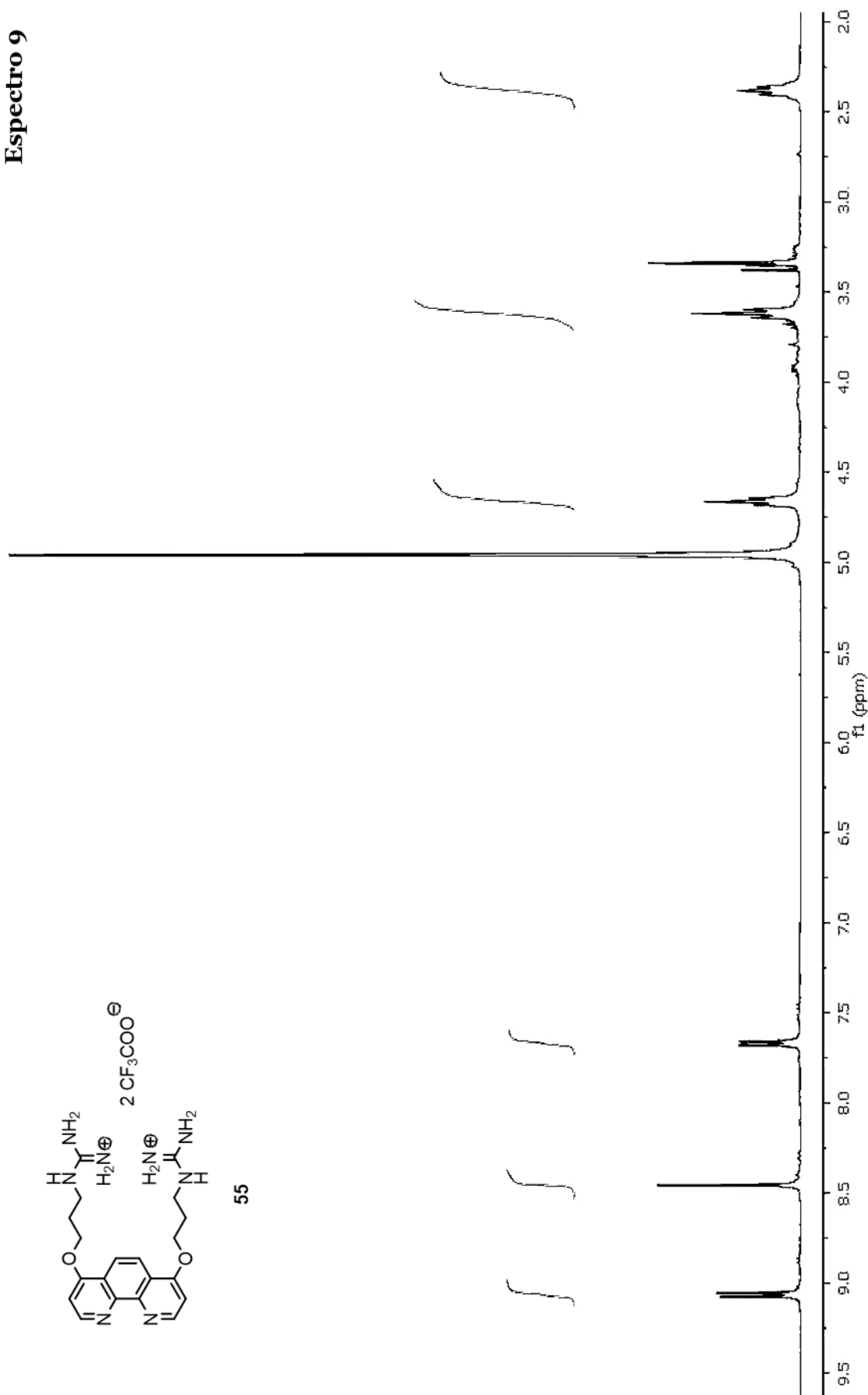
49



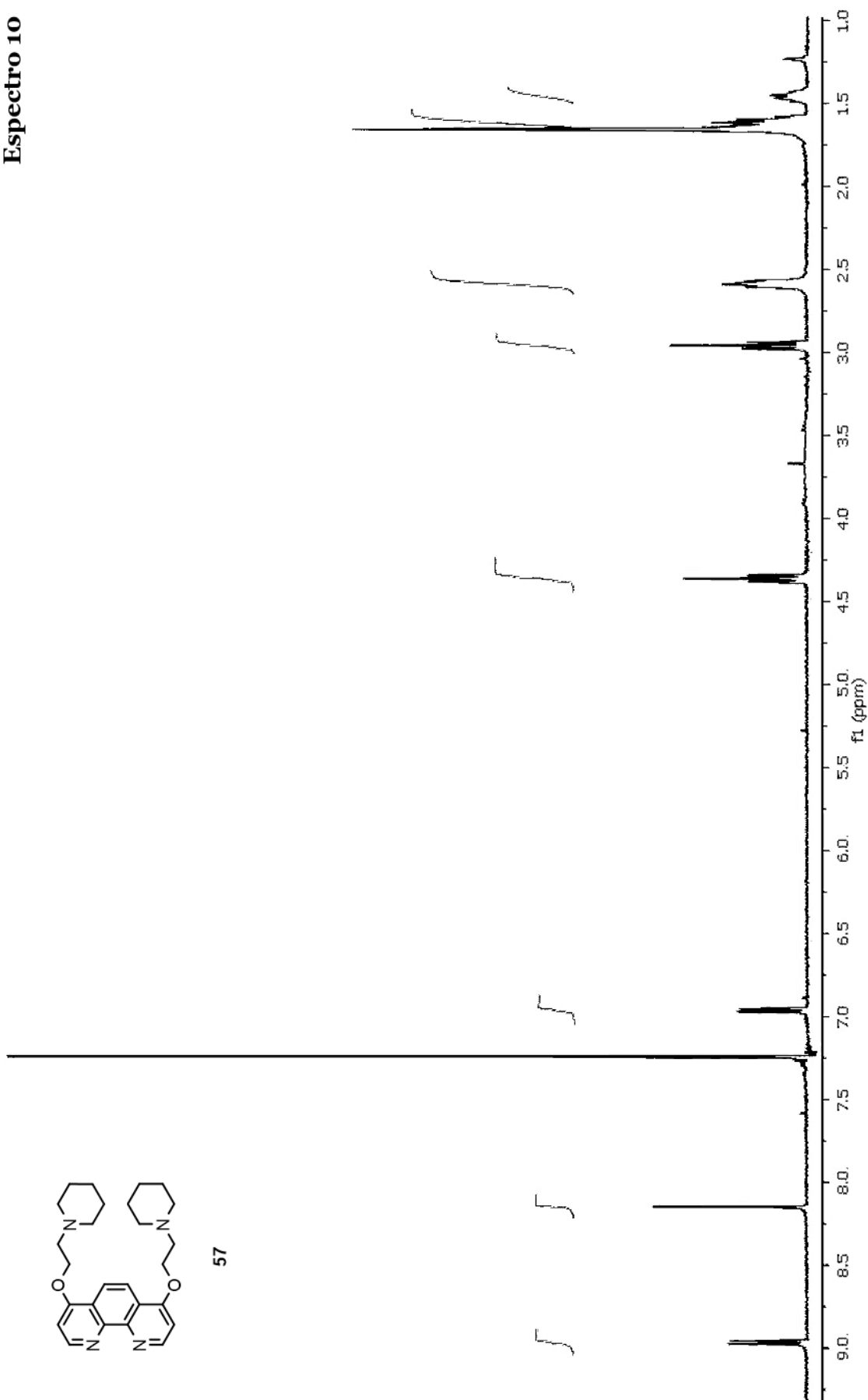
Espectro 9



55

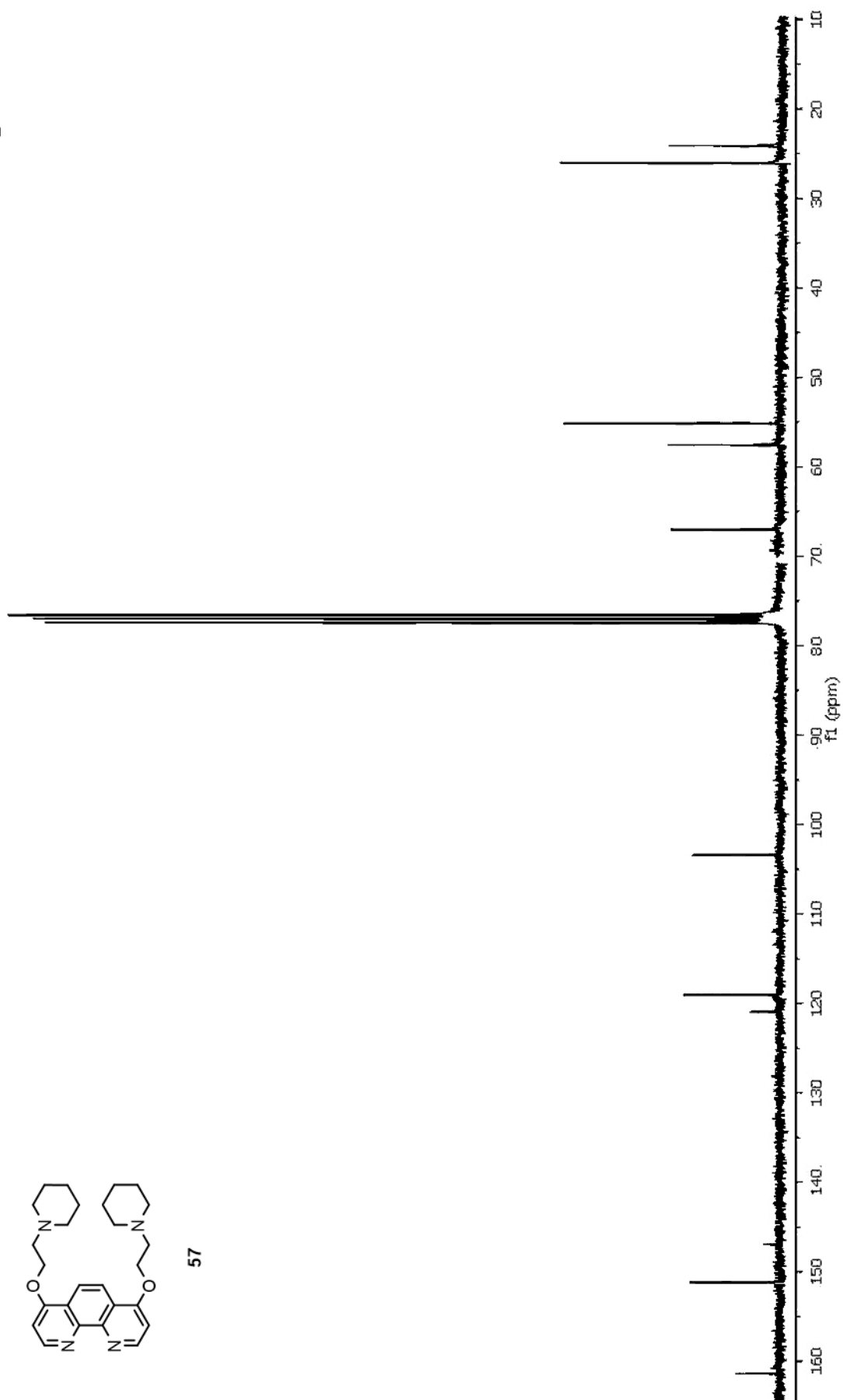


Espectro 10



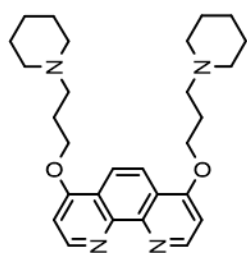
57

Espectro 11

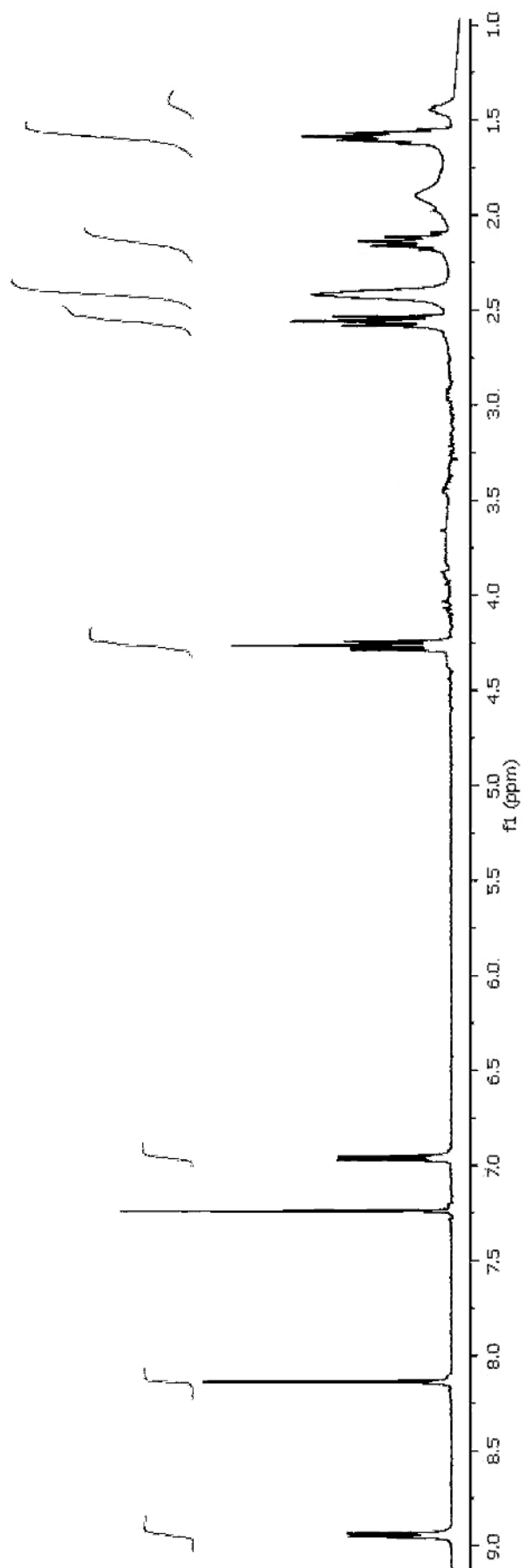


57

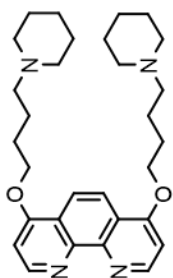
Espectro 12



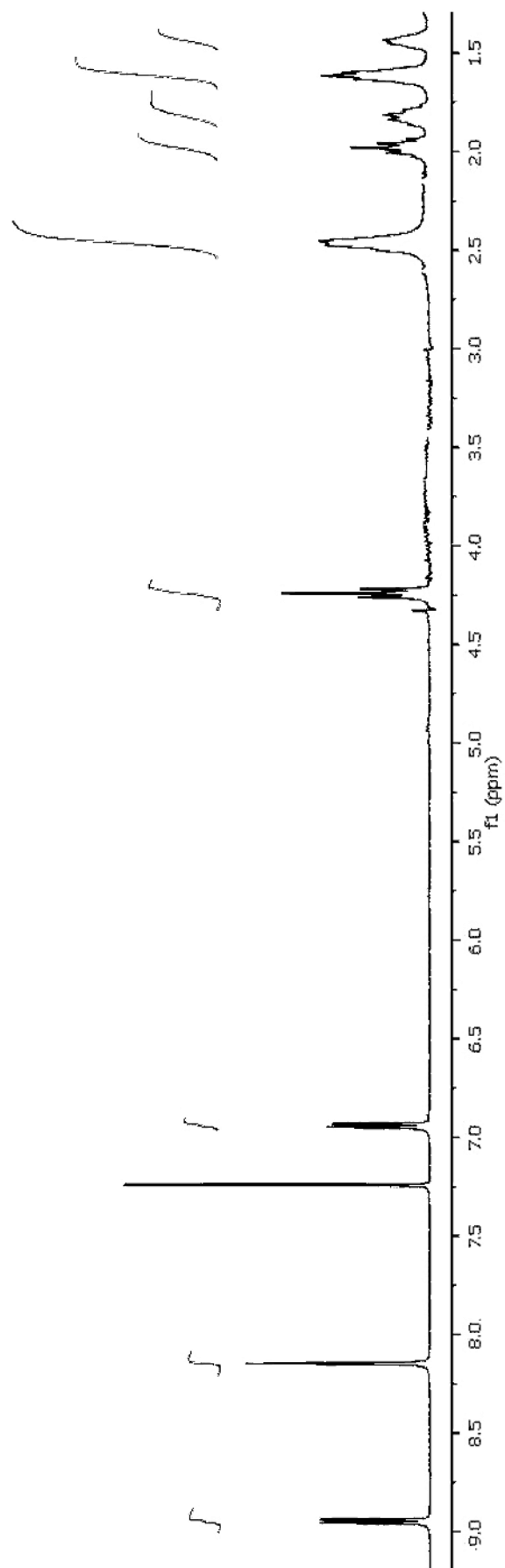
58



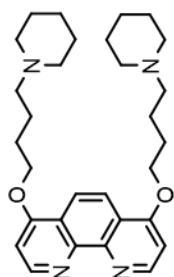
Espectro 13



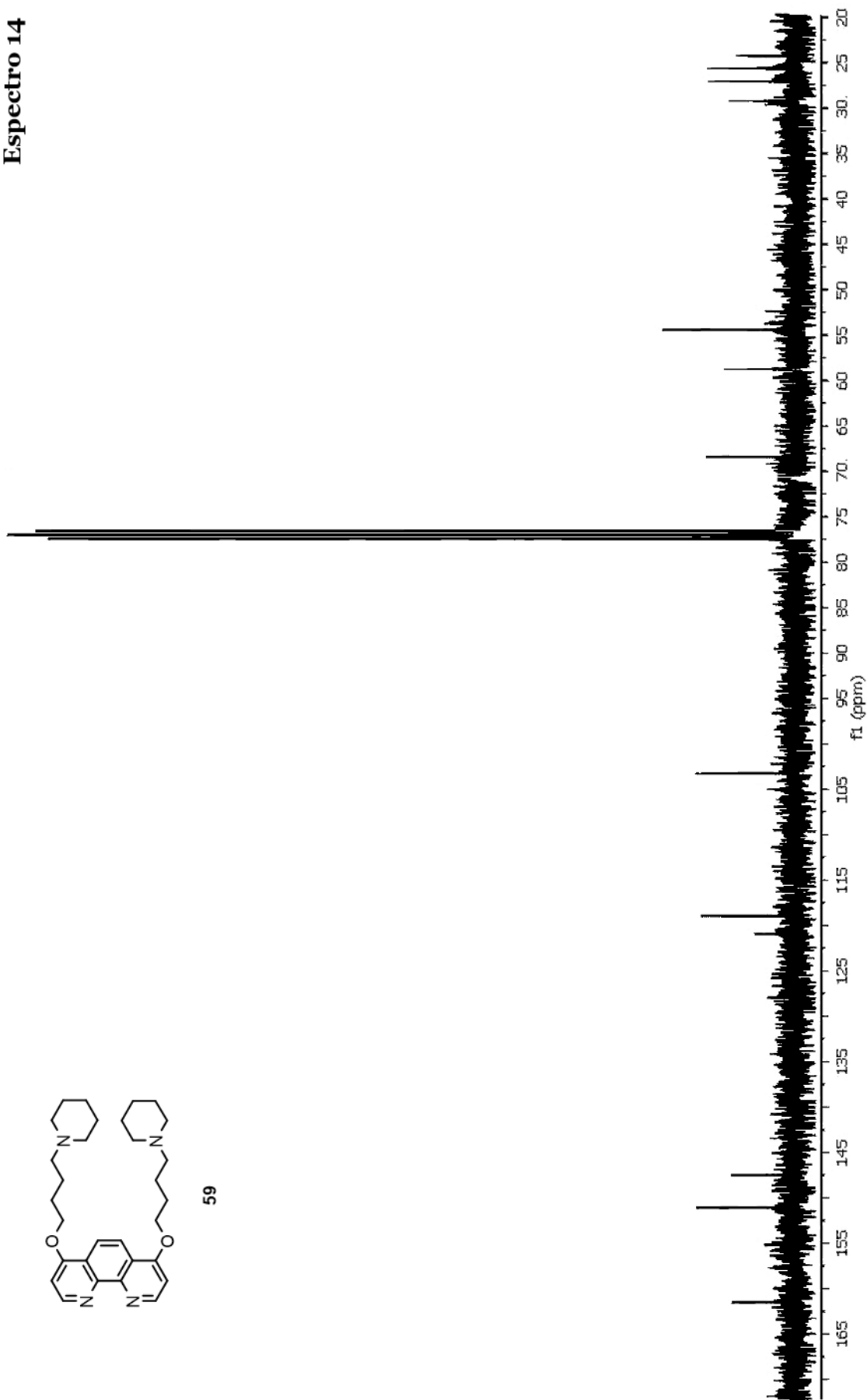
59



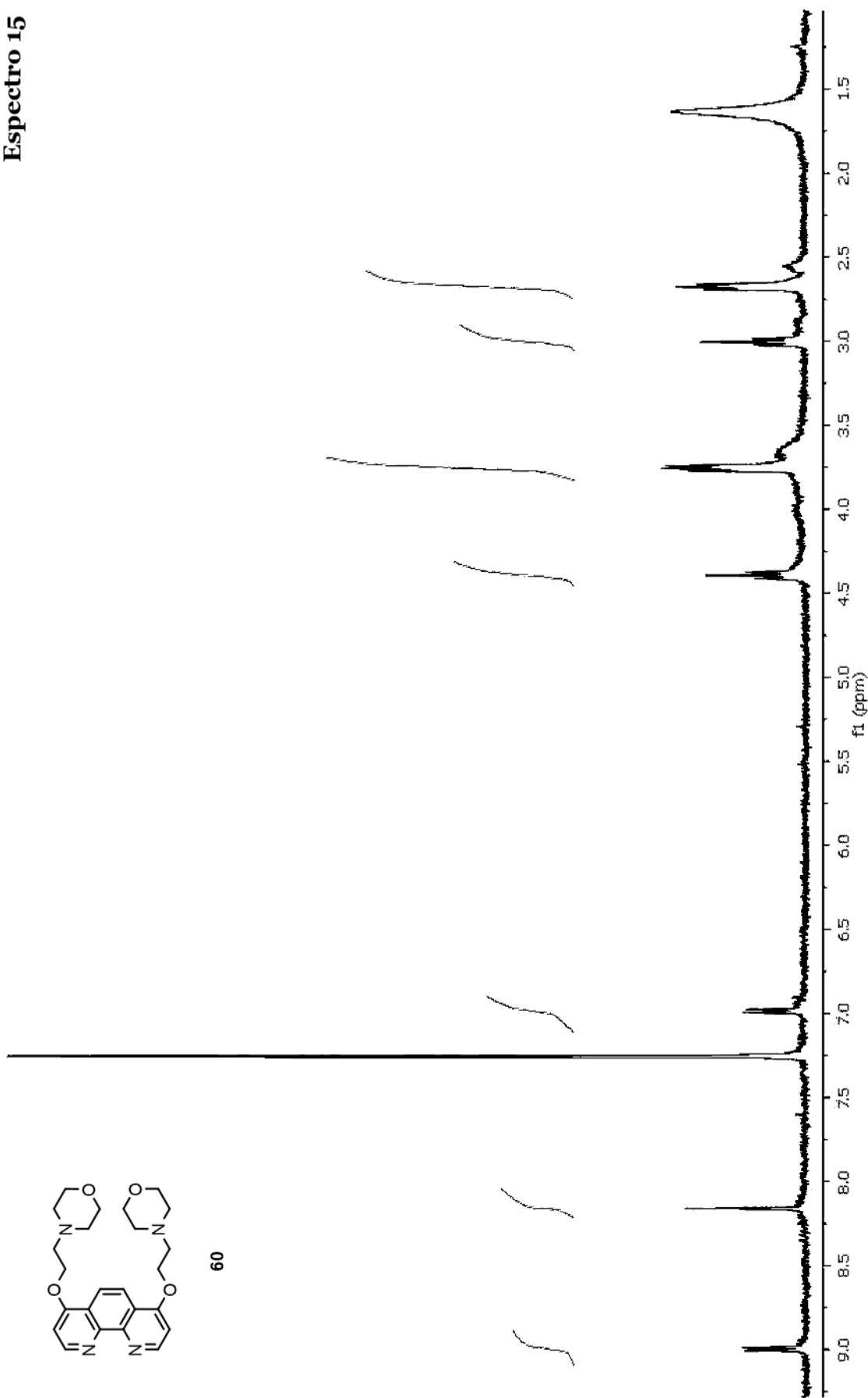
Espectro 14



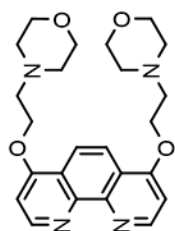
59



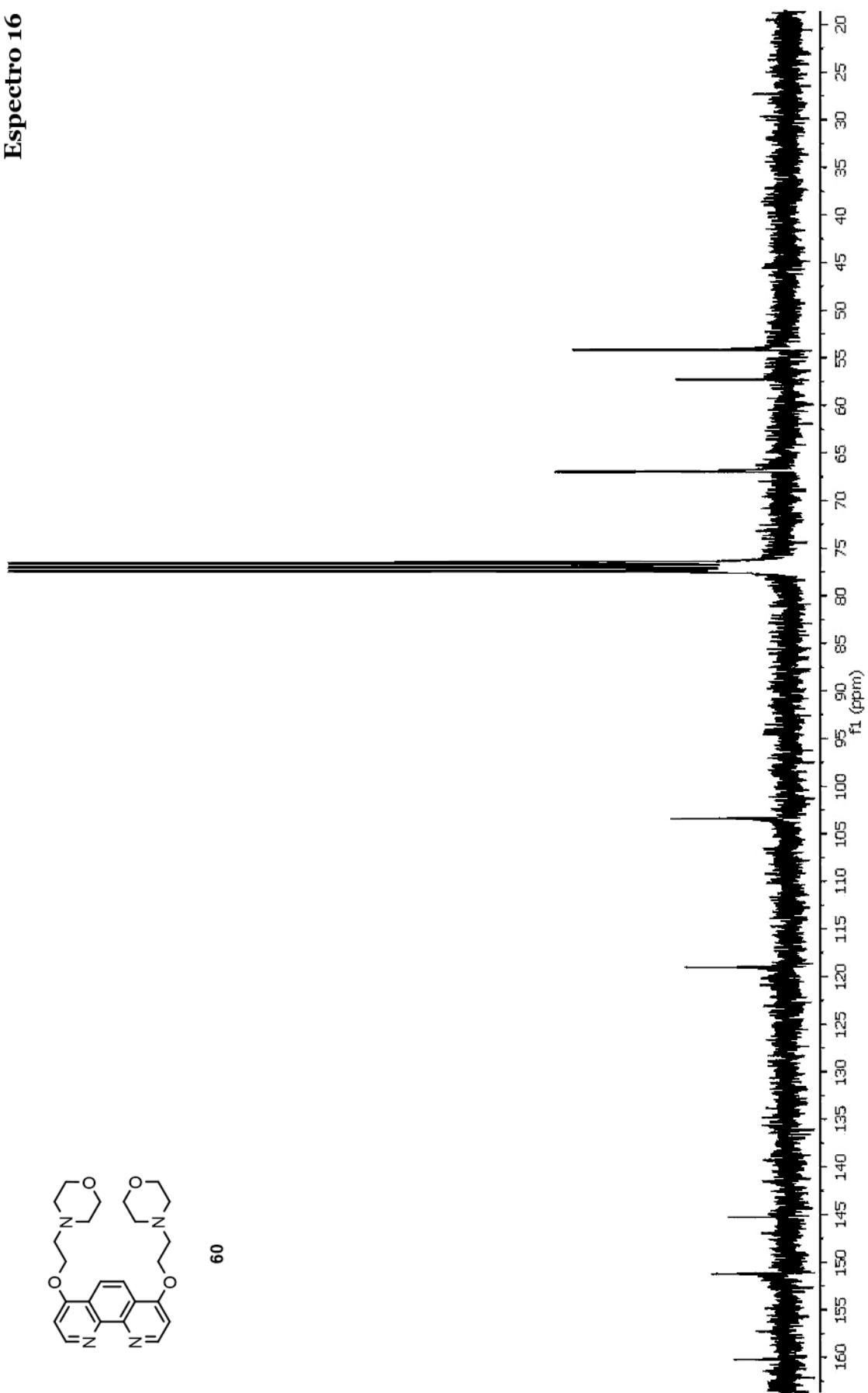
Espectro 15



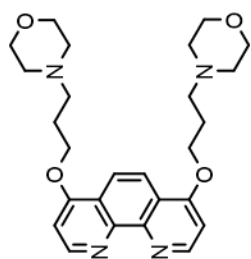
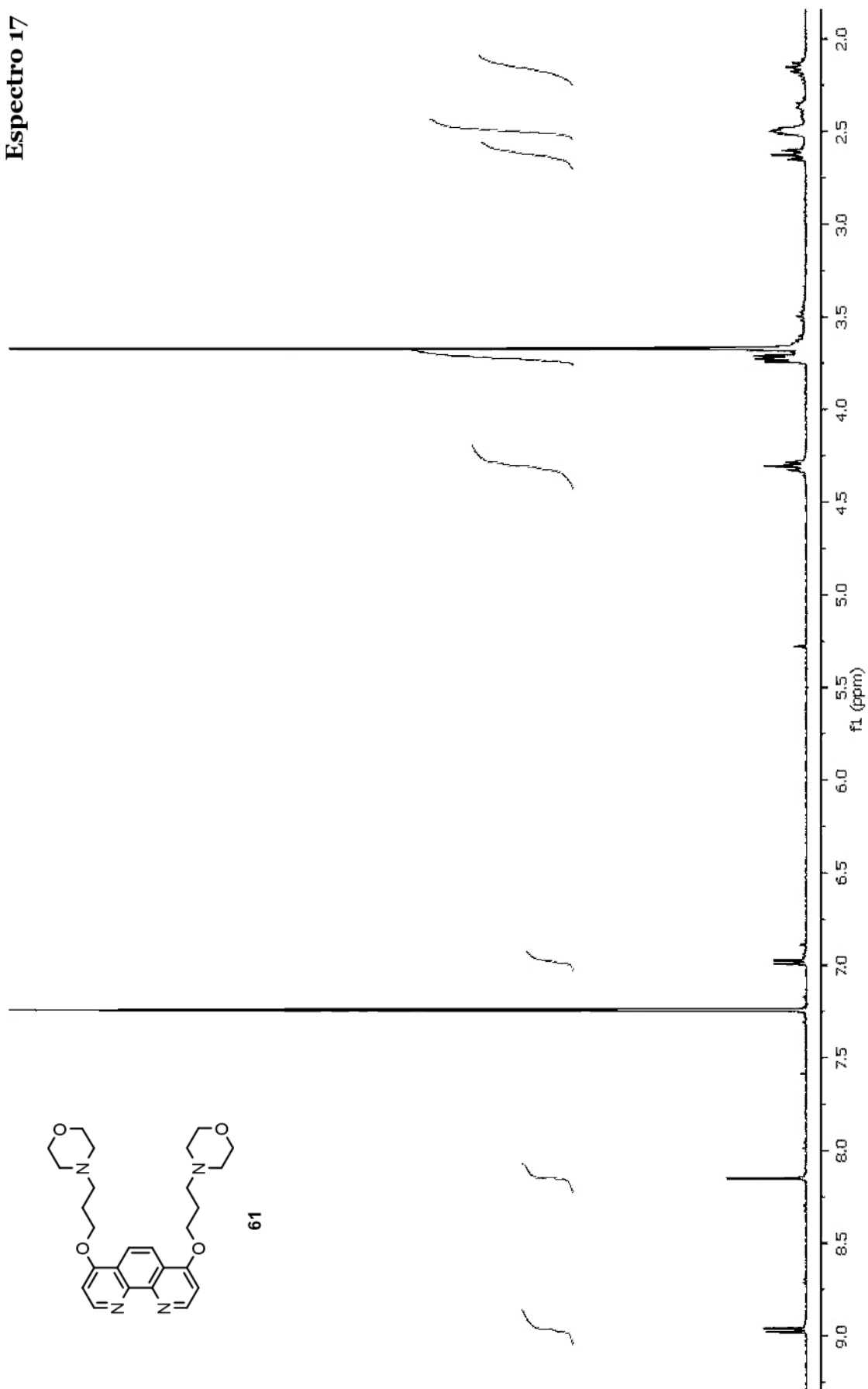
Espectro 16



60

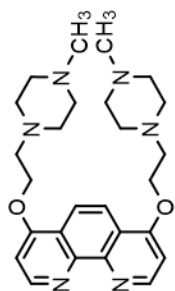


Espectro 17

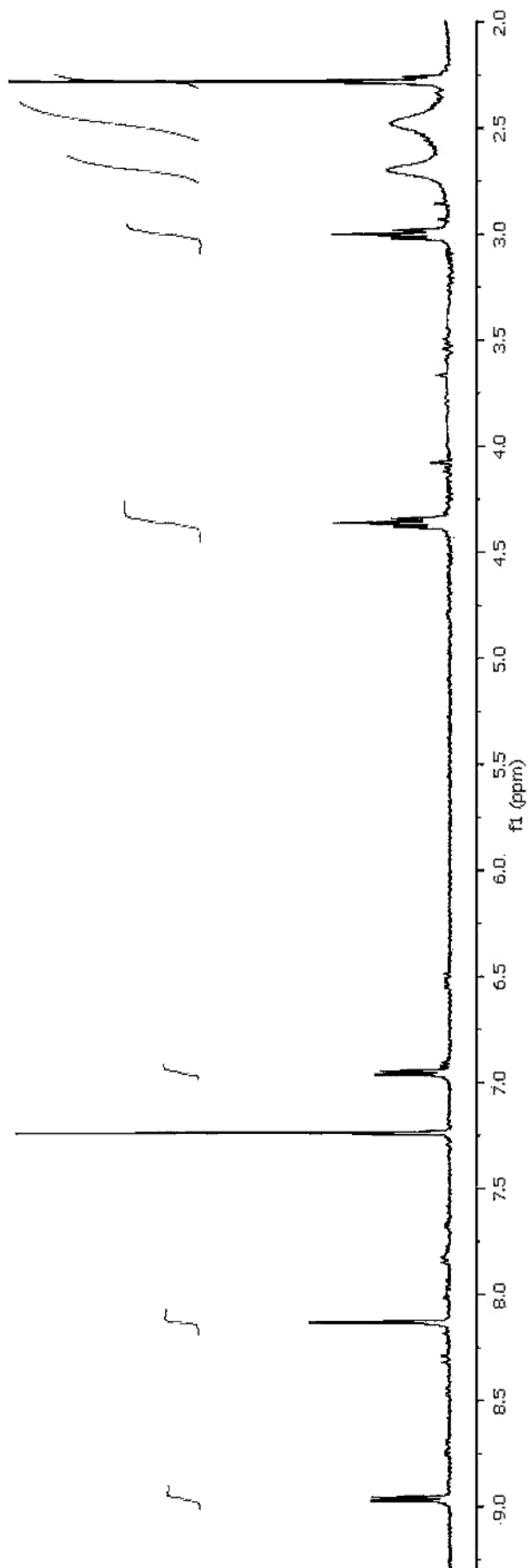


61

Espectro 18



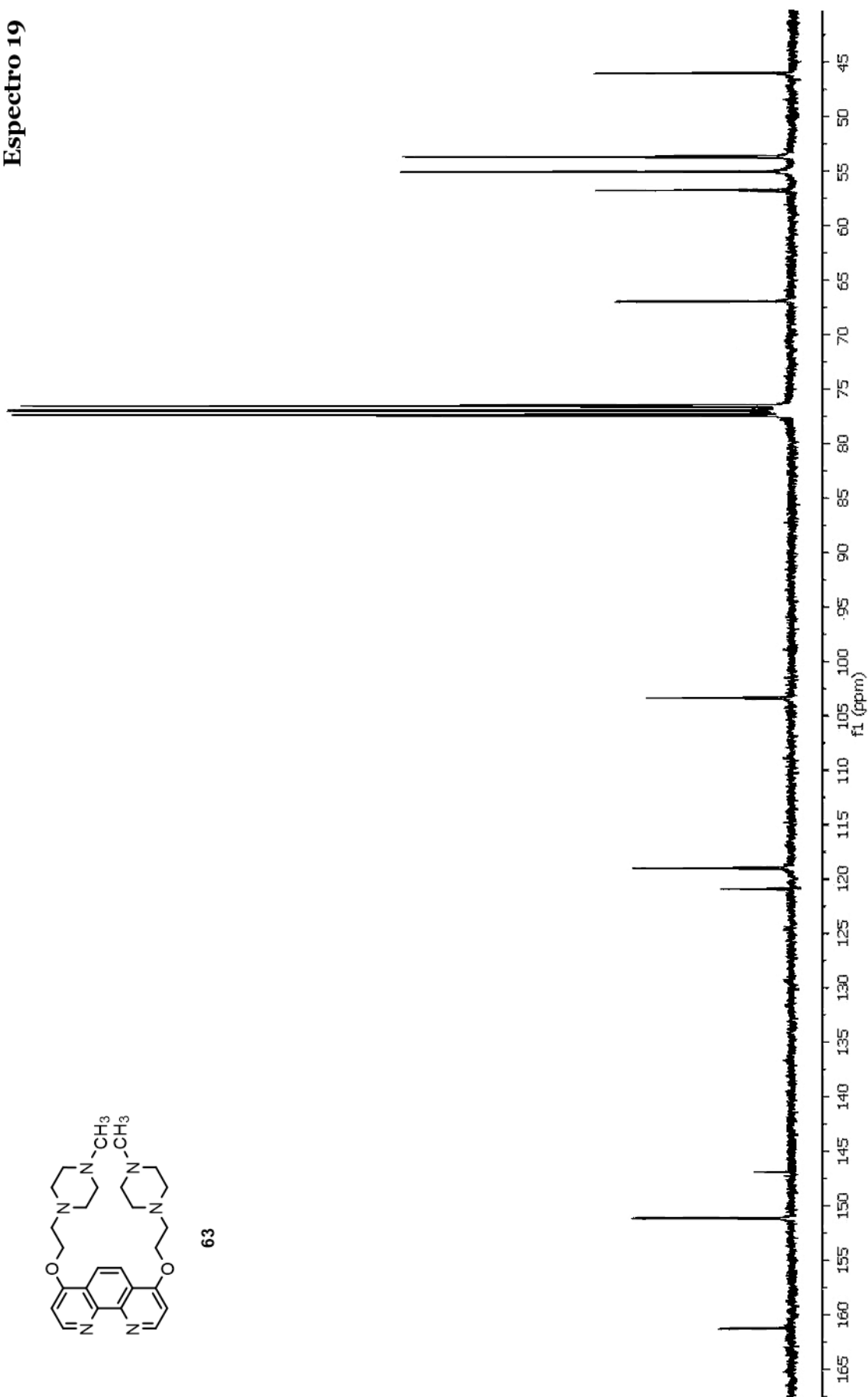
63



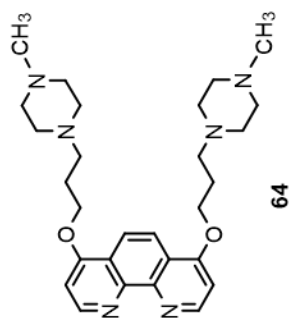
Espectro 19



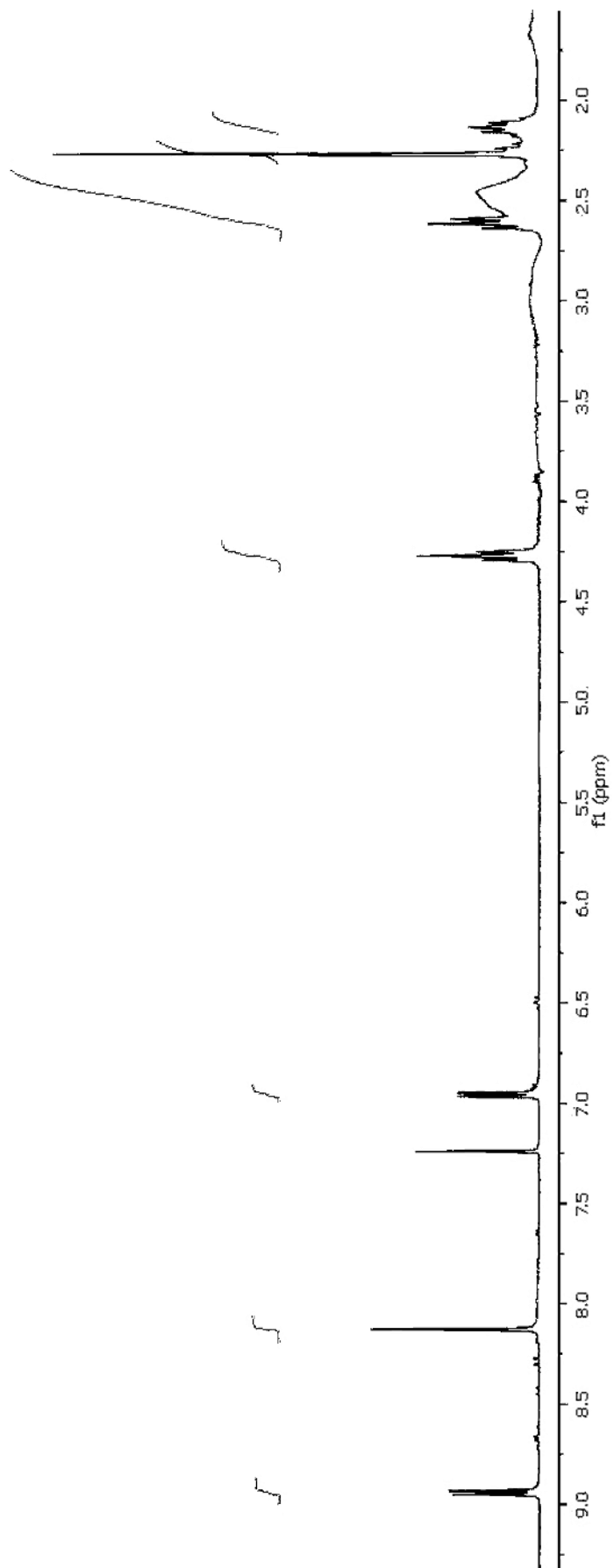
63



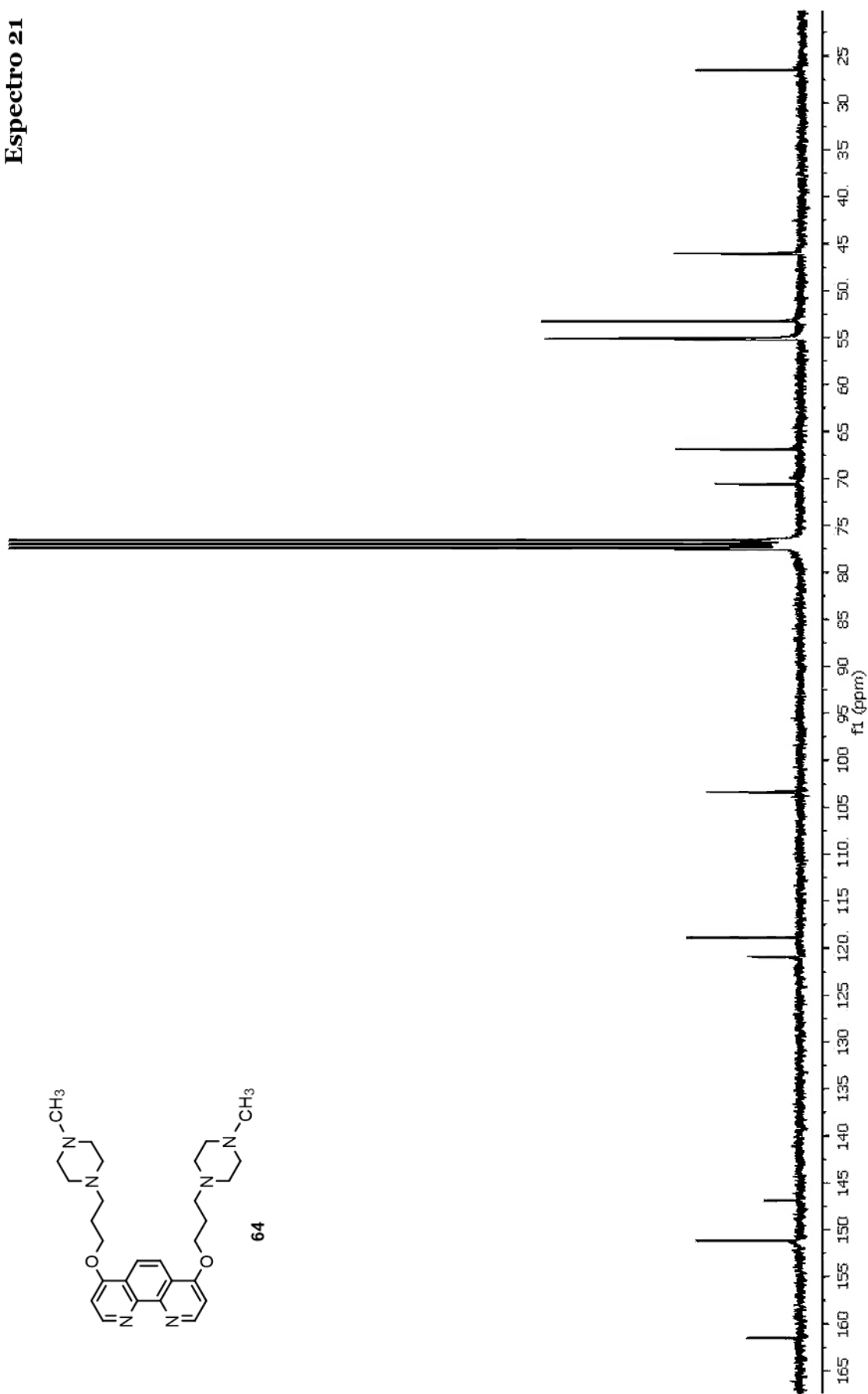
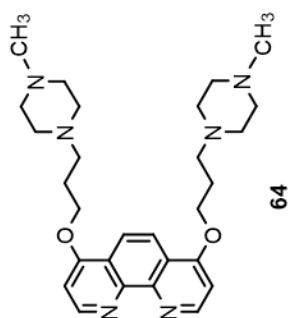
Espectro 20



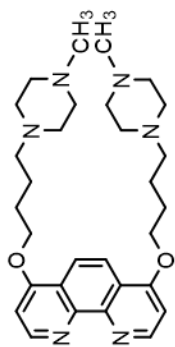
64



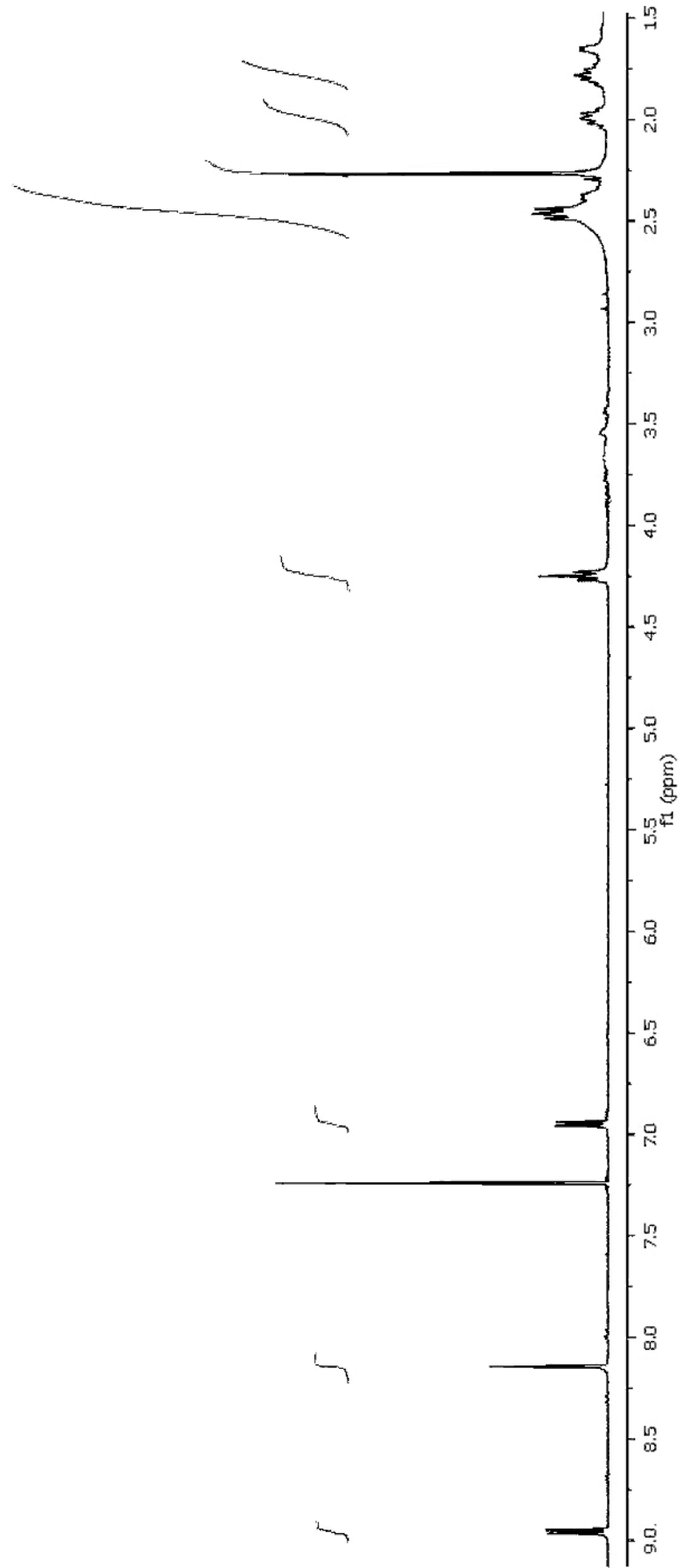
Espectro 21



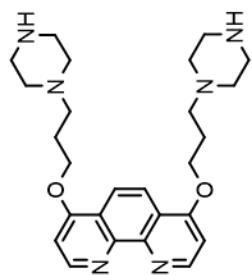
Espectro 22



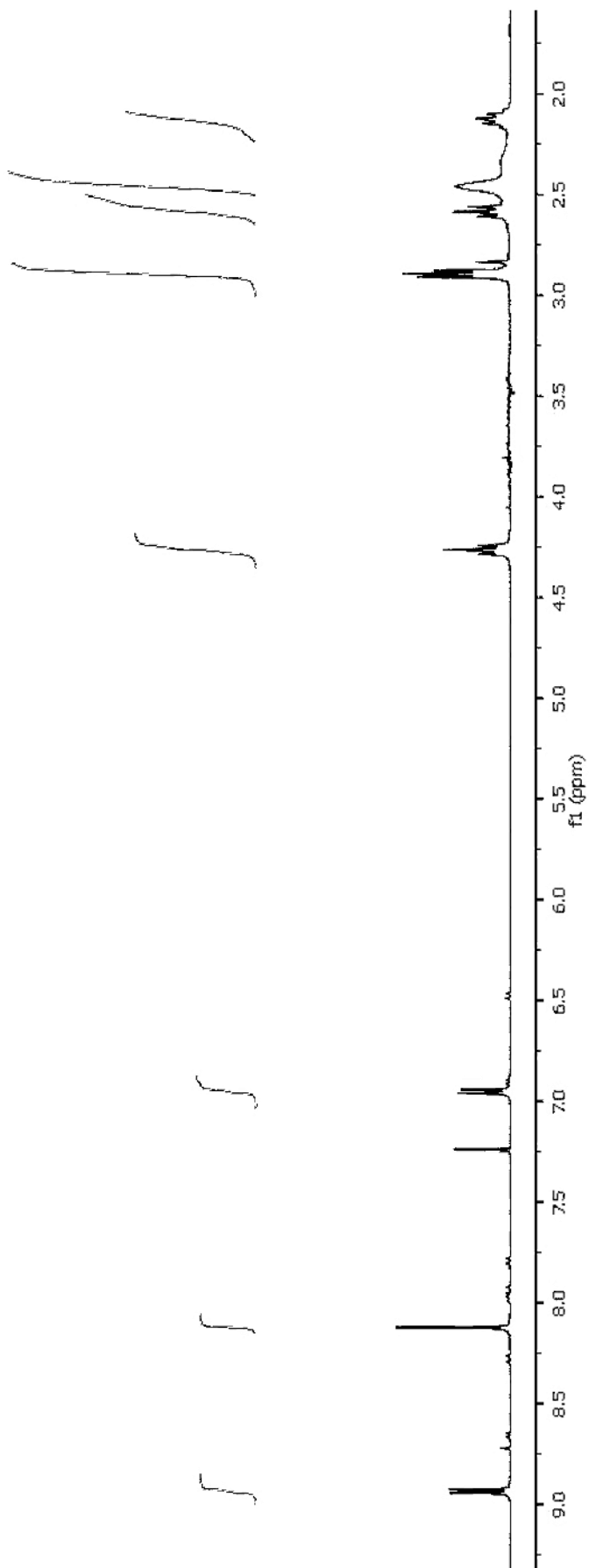
65



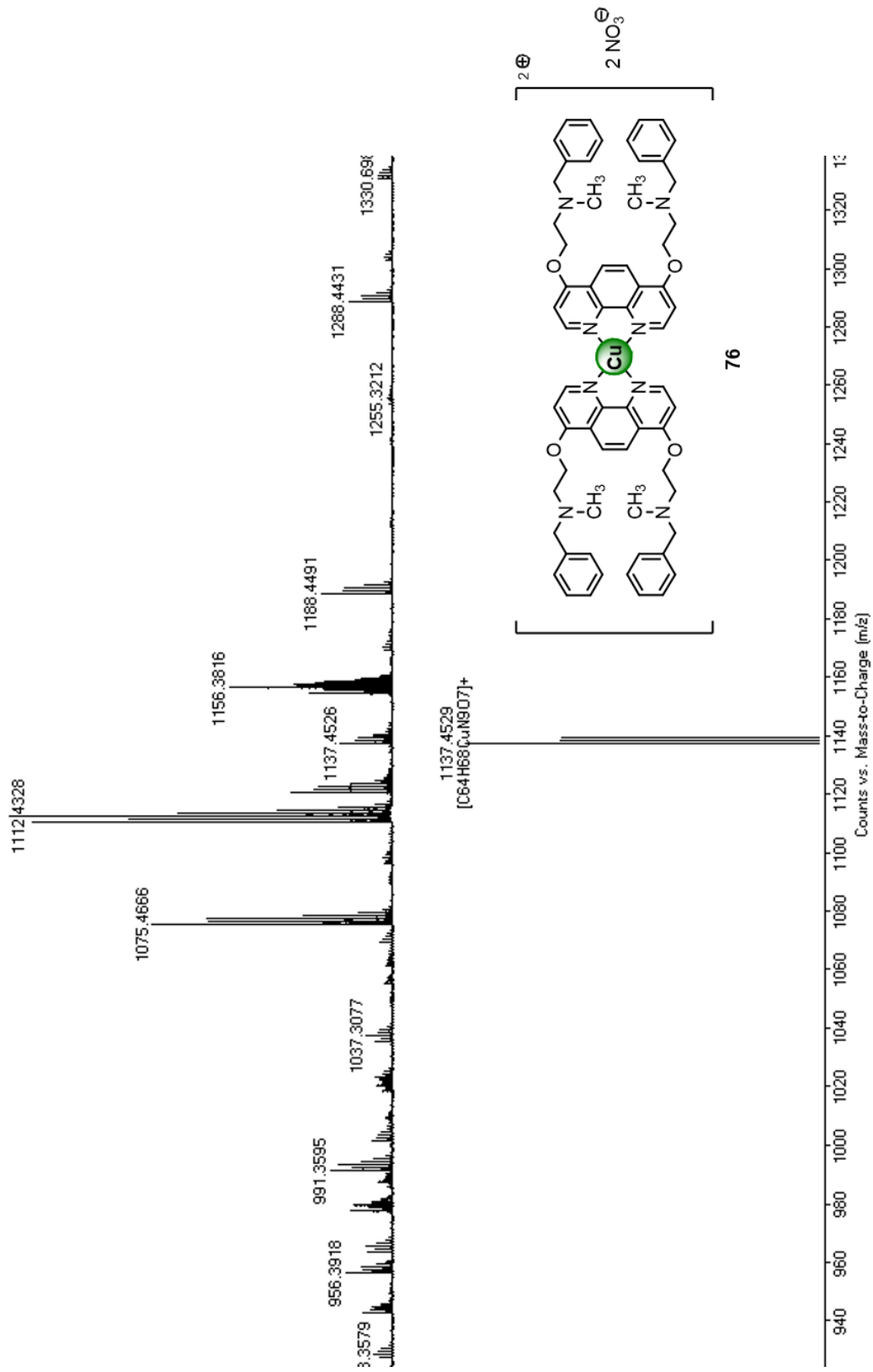
Espectro 23



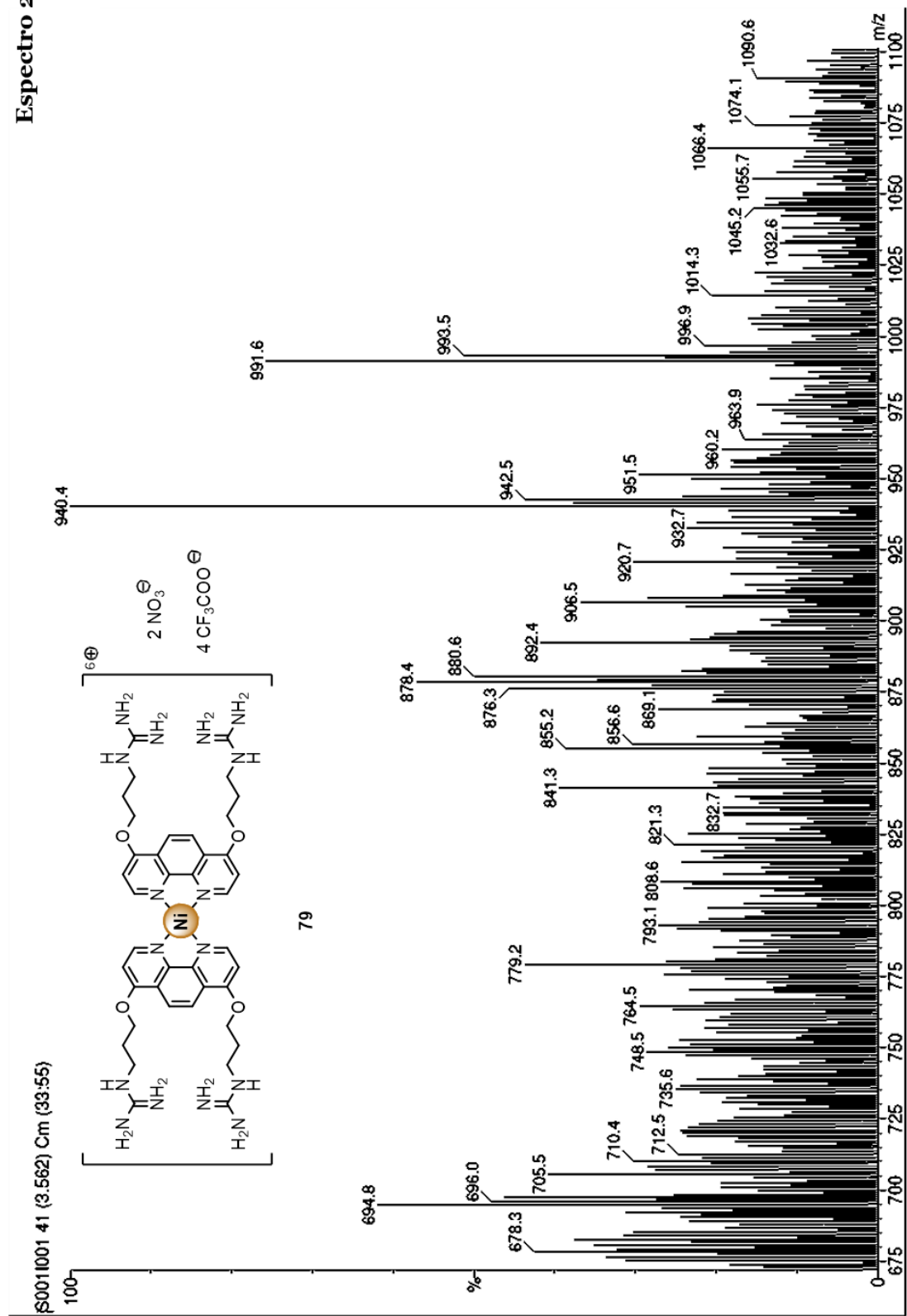
71

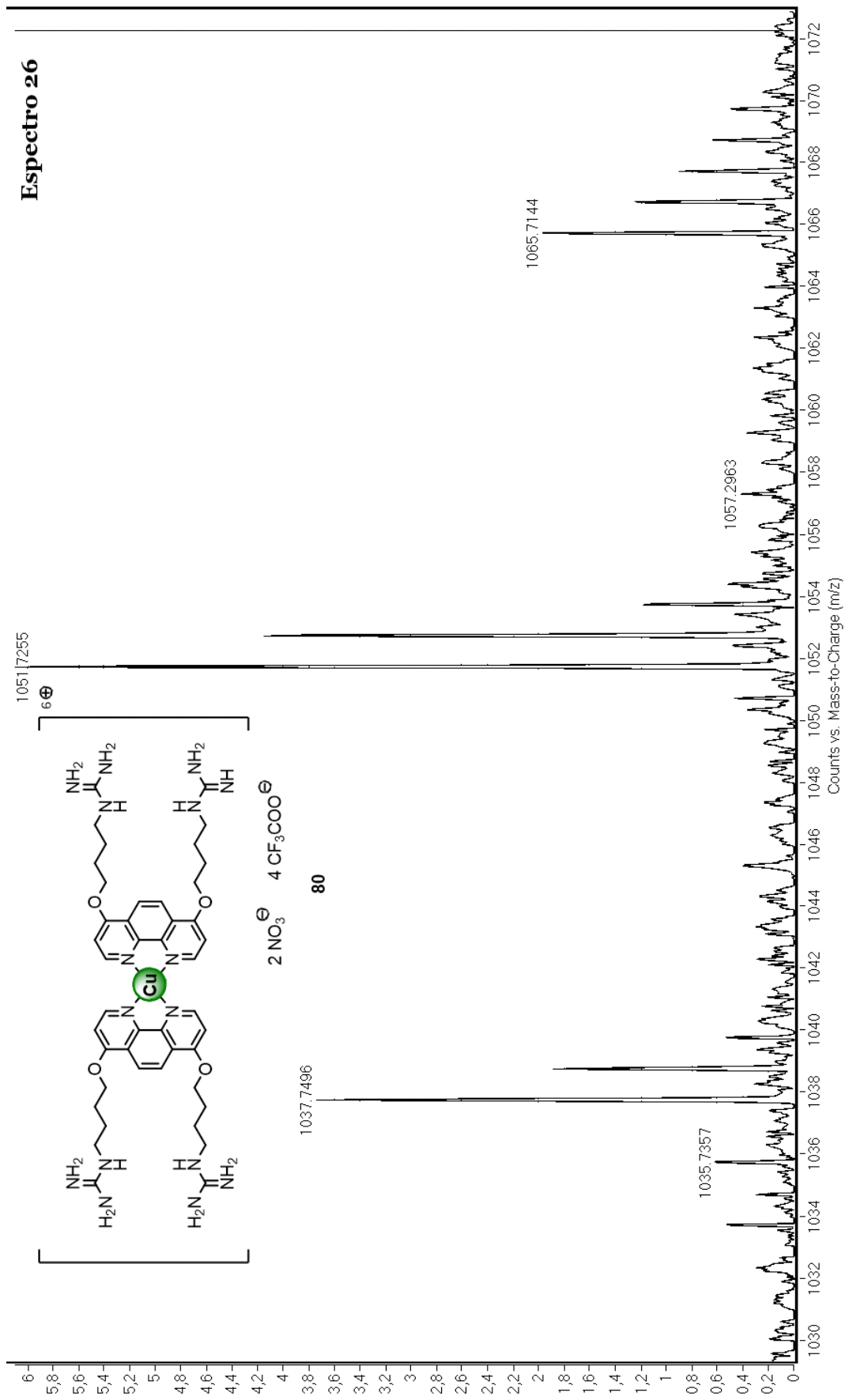


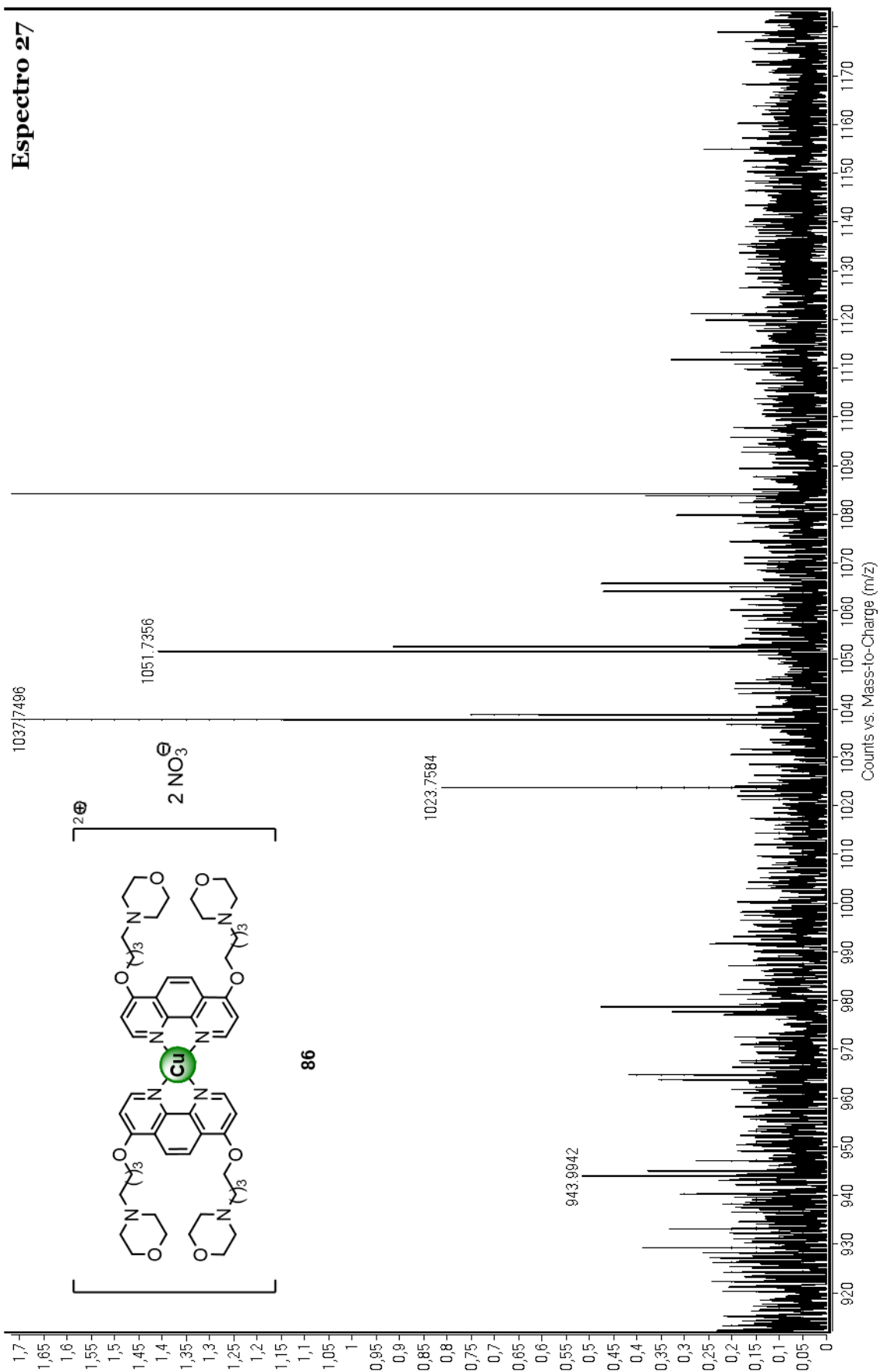
Espectro 24



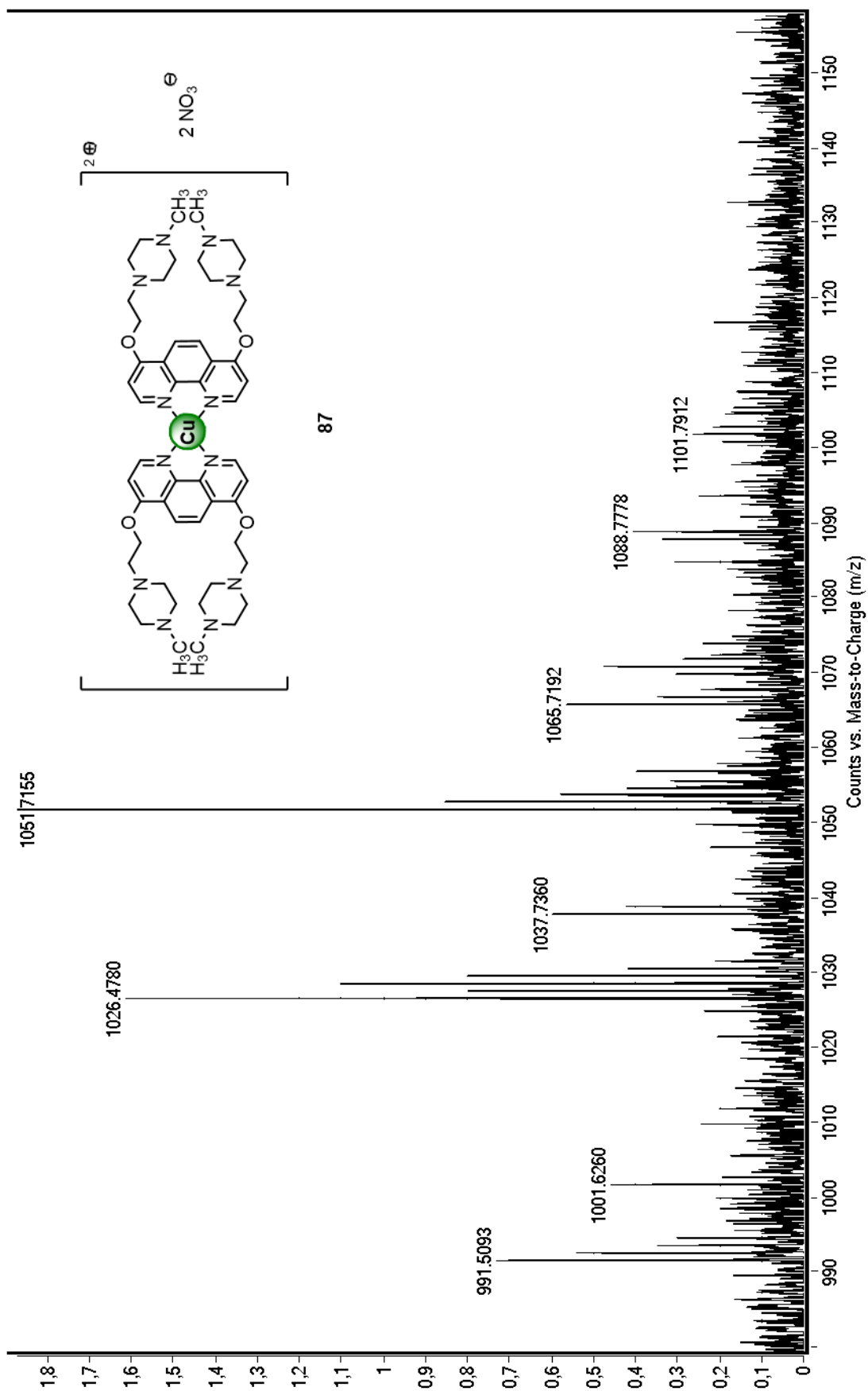
Espectro 25







Espectro 28

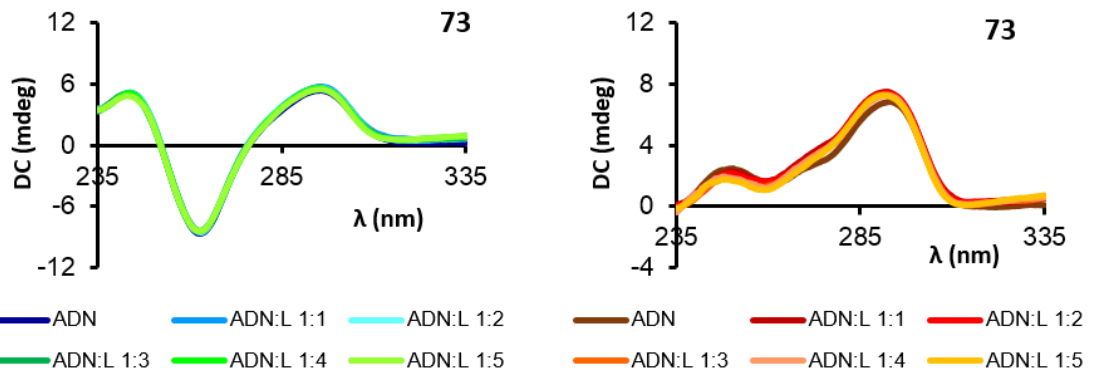


Anexo II

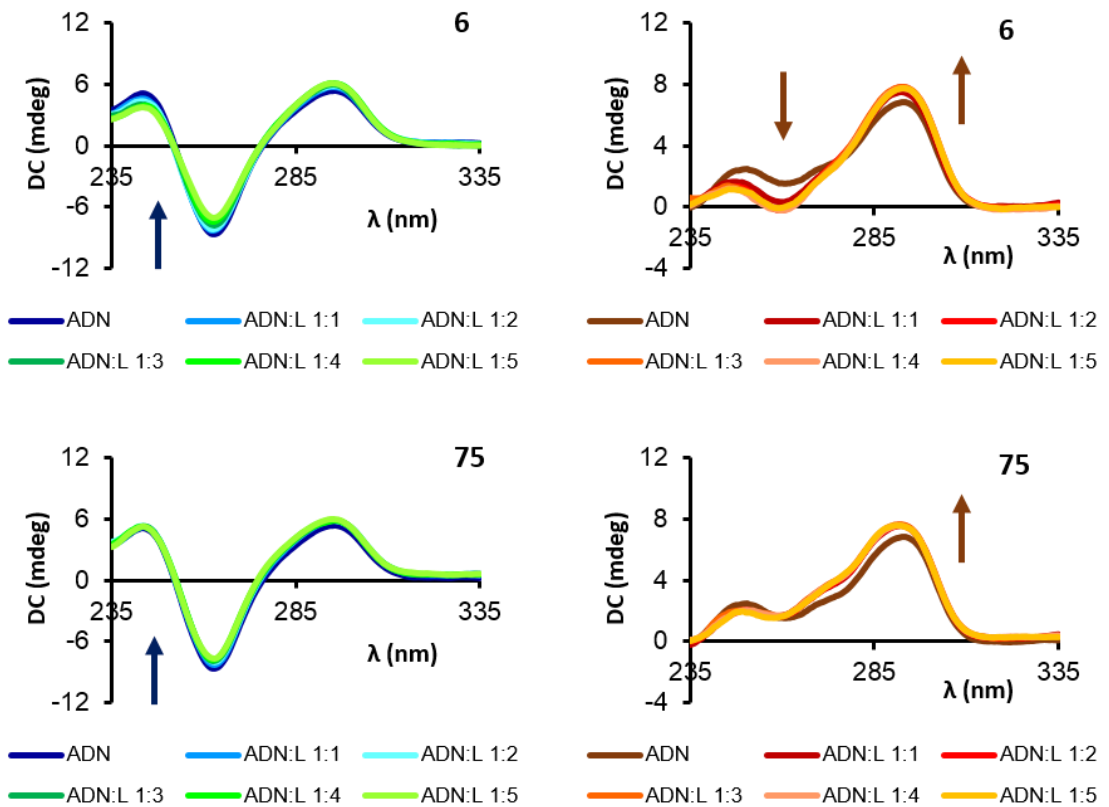
Espectros de dicroísmo circular

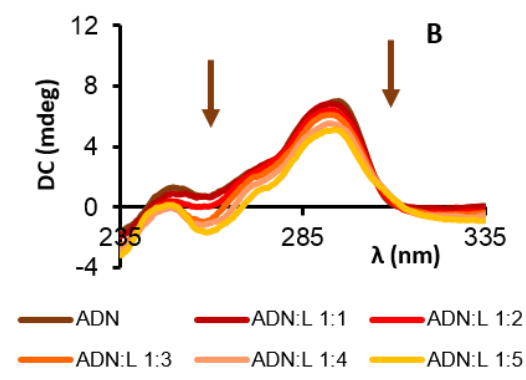
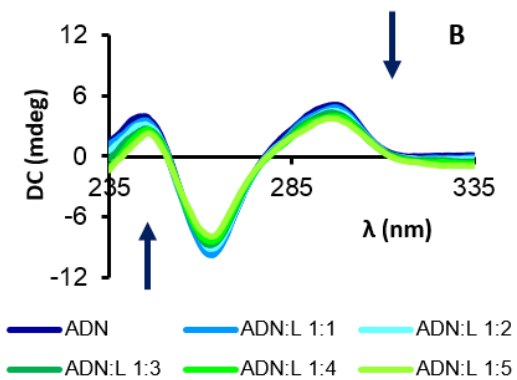
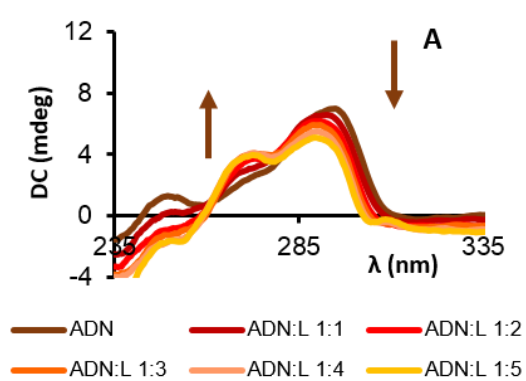
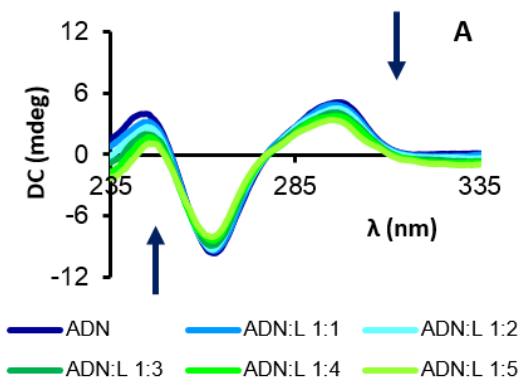
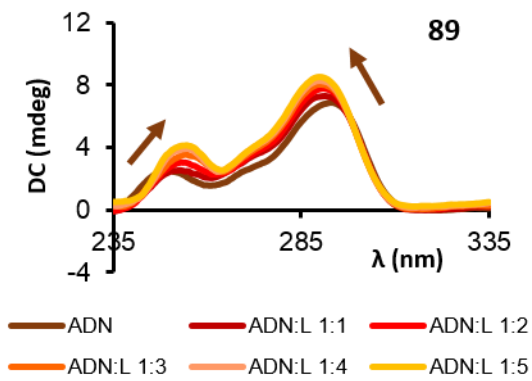
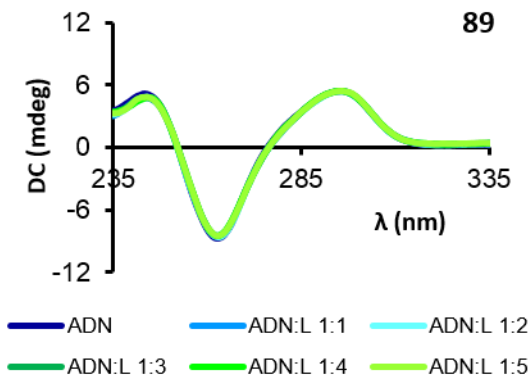
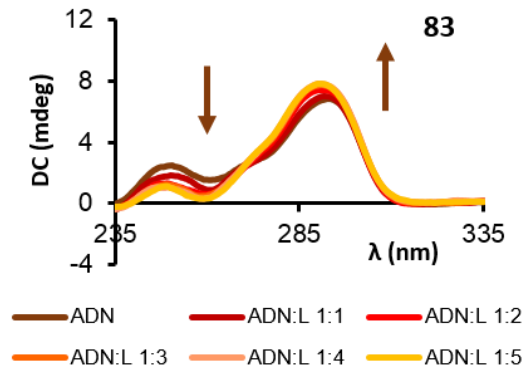
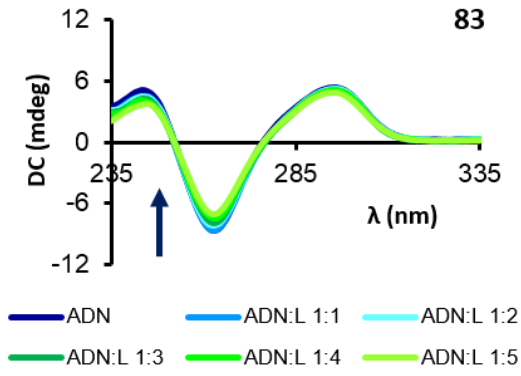
Las gráficas azul-verde representan las condiciones iónicas en sodio, mientras las gráficas rojo-naranjas representan la interacción entre el ADN cuádruple-G y ligando en condiciones iónicas de potasio.

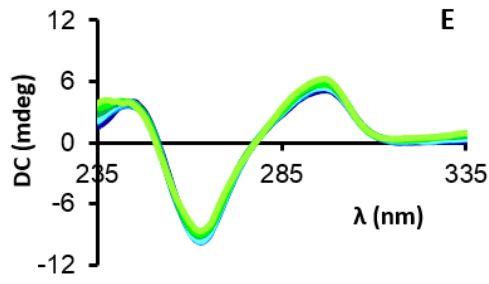
Compuestos que no producen ningún cambio en el espectro de DC



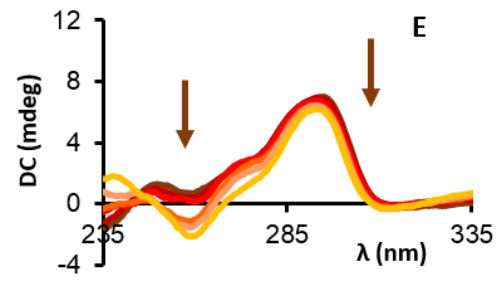
Compuestos que producen ligeros cambios en el espectro de DC







— ADN — ADN:L 1:1 — ADN:L 1:2
— ADN:L 1:3 — ADN:L 1:4 — ADN:L 1:5



— ADN — ADN:L 1:1 — ADN:L 1:2
— ADN:L 1:3 — ADN:L 1:4 — ADN:L 1:5

