

**ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL**  
(FOR EVALUATION OF THE ACT DOCTORAL THESIS)

Año académico (academic year): 2017/18

DOCTORANDO (candidate PHD): **SIERRA TORNERO, SARA**  
D.N.I./PASAPORTE (Id.Passport): **\*\*\*\*070P**  
PROGRAMA DE DOCTORADO (Academic Committee of the Programme): **D446-QUÍMICA**  
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA (Department): **QUÍMICA ANALÍTICA, QUÍMICA FÍSICA E INGENIERÍA QUÍMICA**  
TITULACIÓN DE DOCTOR EN (Phd title): **DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**

En el día de hoy 14/12/17, reunido el tribunal de evaluación, constituido por los miembros que suscriben el presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral **con Mención Internacional** (In today assessment met the court, consisting of the members who signed this Act, the candidate defended his doctoral thesis with mention as International Doctorate), elaborada bajo la dirección de (prepared under the direction of) LOURDES GUDE RODRÍGUEZ // M<sup>a</sup>. JOSÉ FERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ.

Sobre el siguiente tema (Title of the doctoral thesis): **SÍNTESIS DE LIGANDOS DE ADN CUÁDRUPLE-G DERIVADOS DE 1,10-FENANTROLINA. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL<sup>3</sup> de **(no apto, aprobado, notable y sobresaliente)** (After the defense and defense of the thesis, the court agreed to grant the GLOBAL RATING (fail, pass, good and excellent): **SOBRESALIENTE**

Alcalá de Henares, a 14 de Diciembre de 2017



Fdo. (Signed): FELIX SALDU



Fdo. (Signed): OLALLA VAZQUEZ



Fdo. (Signed): ANA M. GOMEZ

FIRMA DEL ALUMNO (candidate's signature),



Fdo. (Signed): SARA SIERRA

Con fecha 20 de diciembre de 2017, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- Conceder la Mención de "Cum Laude"  
 No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada



<sup>3</sup> La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad. (The grade may be "fail" "pass" "good" or "excellent". The panel may confer the distinction of "cum laude" if the overall grade is "Excellent" and has been awarded unanimously as such after secret voting.)

INCIDENCIAS / OBSERVACIONES:  
(Incidents

/

Comments)

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 20 de diciembre, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por *SIERRA TORNERO, SARA*, el día 14 de diciembre de 2017, titulada *SÍNTESIS DE LIGANDOS DE ADN CUÁDRUPLE-G DERIVADOS DE 1,10-FENANTROLINA. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención “cum laude”, arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

***MENCIÓN “CUM LAUDE”***

Alcalá de Henares, 5 de enero de 2018  
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS  
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO



Juan Ramón Velasco Pérez

**Copia por e-mail a:**

Doctorando: SIERRA TORNERO, SARA

Secretario del Tribunal: ANA MARÍA GÓMEZ LÓPEZ. Investig. Cient. Instituto de Química Orgánica General. CSIC

Director/a de Tesis: LOURDES GUDE RODRÍGUEZ // M<sup>a</sup>. JOSÉ FERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ







Universidad  
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO  
Servicio de Estudios Oficiales de  
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D<sup>a</sup> \_\_\_\_\_  
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo  
presentado la misma en formato:  soporte electrónico  impreso en papel, para el depósito de la  
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: \_\_\_\_\_ se procede, con  
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_



Fdo. El Funcionario



Programa de Doctorado en Química

***Síntesis de ligandos de ADN cuádruple-G  
derivados de 1,10-fenantrolina. Estudios de  
interacción y actividad biológica***

Tesis Doctoral presentada por

**Sara Sierra Tornero**

Directoras:

Dra. Lourdes Gude Rodríguez

Dra. María José Fernández Domínguez

Alcalá de Henares, 2017

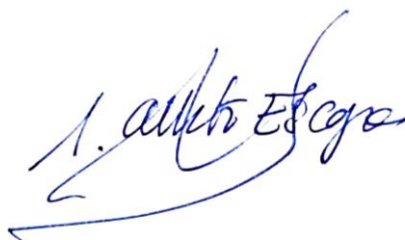


El Dr. D. **Jesús Alberto Escarpa Miguel**, Coordinador del Programa de Doctorado en **Química**, **INFORMA** que la Tesis Doctoral titulada:

***"Síntesis de ligandos de ADN cuádruple-G derivados de 1,10-fenantrolina. Estudios de interacción y actividad biológica"***

presentada por **Dña Sara Sierra Tornero**, bajo la dirección de la **Dra. Dña. Lourdes Gude Rodríguez** y de la **Dra. Dña María José Fernández Domínguez**, reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para ser defendida ante un tribunal.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares a 17 de octubre de 2017.



**Fdo.: Dr. Jesús Alberto Escarpa Miguel**



Las abajo firmantes, la **Dra. Dña. Lourdes Gude Rodríguez** y la **Dra. Dña. María José Fernández Domínguez**, Profesoras Titulares del Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica de la Universidad de Alcalá **certifican**, que la Memoria presentada por **Dña. Sara Sierra Tornero**, con el título:

***"Síntesis de ligandos de ADN cuádruple-G derivados de 1,10-fenantrolina.  
Estudios de interacción y actividad biológica"***

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 por la Universidad de Alcalá.

Y para que así conste, firman el presente certificado.

*Alcalá de Henares, octubre de 2017*



**Fdo.: Dra. Lourdes Gude Rodríguez**      **Fdo.: Dra. María José Fernández Domínguez**





*Durante el trascurso de una tesis doctoral son muchas las horas que uno está en el laboratorio y muchas las personas que acaban siendo partícipes de muchos buenos momentos y experiencias.*

*En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directoras de Tesis, la Dra. Lourdes Gude Rodríguez y la Dra. María José Fernández Domínguez, por haberme acogido en su grupo de investigación y por la confianza depositada en mí durante estos años.*

*A la Universidad de Alcalá por las distintas becas predoctorales concedidas (introducción, iniciación a la investigación y FPI), así como por la ayuda de movilidad recibida para la realización de la estancia predoctoral. Agradezco asimismo a los distintos organismos que han proporcionado la financiación necesaria para llevar a cabo esta tesis doctoral, principalmente a la Unión Europea, MICINN y MINECO (Proyectos PIRG05-GA-2009-248368, CTQ2011-26822 y CTQ2012-32711).*

*Al Dr. Cristóbal López, a la Dra. Ana María Gómez y la Dra. Clara Uriel por acogerme en su grupo de investigación durante los dos veranos que disfruté de la beca JAE INTRO del CSIC. A los compañeros que tuve durante ese período: Albano, Juan, Mayca, Silvia y Marina. Y, más especialmente a Fernando, por emplear su tiempo para enseñarme como trabajar y estar pendiente de mí durante esos meses y, sobre todo, por las risas y los buenos momentos que pasamos en laboratorio.*

*Gracias a todos los compañeros de laboratorio que han formado parte del grupo de investigación a lo largo de estos años. Laura, o “La fuente” por todos los buenos ratos pasados al inicio de doctorado. A “las chicas de TFG” Sofía, Vero y María por la alegría y energía con la que siempre vinisteis al laboratorio y porque gracias a vosotras pude sacar adelante algunas de las partes de esta tesis doctoral. A Sebastian, mi compi alemán, con el que pasé muy buenos momentos tanto fuera como dentro del laboratorio y con el que aprendí que es muy divertido enseñar y explicar refranes y frases hechas a quién está aprendiendo castellano 😊.*

*A Katerina, porque eres la mejor amiga y compañera que se puede tener. Gracias por enseñarme todo lo que sabías hasta el momento en el laboratorio; por tus esquemas y dibujos divertidos sobre el papel para que entendiera en todo momento el experimento que estaba haciendo; por animarme siempre a aprender cosas nuevas y apuntarme a congresos; por resolverme todas las dudas incluso cuando no estabas en el laboratorio; por los consejos que me has dado, tanto profesionales como personales; por enseñarme*

*la cultura checa y, lo más importante, hacerme saber que la cerveza checa es la mejor 😊.*

*A Fabiana, mi compañera del laboratorio de al lado, compañera de piso y amiga. Gracias por todos los consejos que me diste, por las charlas en la cocina y por todos los momentos que hemos compartido.*

*A mis Javis y a Marina, mis compañeros en el día a día en el laboratorio durante estos dos últimos años. Gracias por las “reuniones” de grupo en el montaditos, por los cafés en nuestra Nespresso, por vuestras “traiciones”, por los viajes que hemos hecho y por el inolvidable mambo italiano. A Javi R., por todo lo que me has hecho reír con sus tonterías e historias diarias que han hecho más ameno el último tramo de la tesis; por ese camino de Santiago que, a pesar de que fue duro, nunca olvidaré; por enseñarme tu famosa lista, por ambientar el laboratorio con música de Manolo Escobar y por recordarme que un plato es un plato y un vaso es un vaso. A Javi G., por tu entusiasmo y positivismo; por las conversaciones sobre todo tipo temas con un buen café o con un desayuno; por introducirme en el mundo de las carrot cakes; por ampliar mi vocabulario con palabras como fastuoso o Juan Lanás; por los viajes en Hildegard y, sobre todo, por enseñarme que hay vida más allá del laboratorio jeje. A Marina, por poner ese punto de cordura a “nuestras reuniones de grupo” con los Javis y por los buenos momentos vividos en nuestros viajes.*

*También tengo que darles las gracias a mis compañeros de carrera Ángel Luis, Maite, Azahara, Inma, Adrián, Dani y Lorena por todos los momentos vividos durante la carrera y por seguir recordándolos cada vez que nos vemos. Gracias por seguir estando ahí presentes y sobre todo por los ánimos que me habéis dado estos años.*

*Muchas gracias al profesor Marco Bandini de la universidad de Bologna por haberme permitido realizar la estancia predoctoral en su grupo de investigación. Durante ese periodo tuve la suerte de tener muy buenos compañeros y conocer a personas que nunca olvidaré. Gracias a Chris, por sus conversaciones mientras hacíamos columnas y por los momentos tan divertidos que pasamos en Bologna. A Betta y a Assunta, por ser tan buenas compañeras y amigas durante mis cuatro meses de estancia. A Betta, por estar siempre dispuesta a ayudarme y a integrarme en todas las actividades tanto fuera como dentro del laboratorio. A Assunta, gracias por acogerme como una más desde el primer minuto, por compartir tu campana conmigo 😊, por ayudarme*

*siempre que lo necesité y, sobre todo, por no perder la sonrisa nunca. “Grazie mille ragazze, avete fatto sentirmi come a casa. Vi voglio bene.”*

*En estas frases de agradecimiento no puedo olvidar a mi familia. Quiero dar las gracias especialmente a mis padres, Eloy y Joaquina, porque sin los esfuerzos que habéis hecho a lo largo de vuestras vidas yo no habría podido llegar hasta aquí. Gracias por el apoyo que me habéis dado siempre y gracias por enseñarme que con esfuerzo y constancia se puede conseguir lo que uno se proponga. Os quiero y nunca os cambiaría.*

*A mis hermanos, Fernando, Jesús y Alba, porque siempre habéis estado presentes durante este período de mi vida. A Fernando, porque nunca se me olvidará la frase que me dijiste un día: “nunca dejes que nadie ni nada te límite para conseguir lo que quieres”. A Jesús porque, aunque no seas consciente de ello tienes parte de “culpa” de que eligiese la Química como profesión. A Alba, por ser mi compañera de la infancia y por esa capacidad que tienes de entenderme solo con mirarme. Gracias por estar siempre ahí.*

*A mis sobrinas, Jimena y Carmen, porque con vuestros juegos, inquietudes, y sobre todo vuestras sonrisas habéis conseguido que los baches que hay que superar a lo largo de una tesis sean mucho más llevaderos. Y, sobre todo, me habéis hecho recordar que de vez en cuando hay que mirar la vida y la ciencia con los ojos de un niño. A mi sobrina Luna, porque a pesar de tener menos de un año de edad me has enseñado que luchando todo se supera.*

*Y, por último, quiero darle las gracias a Fran, por haber ido a aquel congreso en Bilbao sin el cual no nos habríamos conocido. Gracias por tu apoyo constante, por tu comprensión, por hacerme reír y por compartir el día a día conmigo. Y, sobre todo, por haberme acompañado en esta etapa de mi vida que, sin duda, habría sido más complicada sin tu presencia. Gracias por ser como eres y por estar presente tanto en los buenos como en los no tan buenos momentos.*

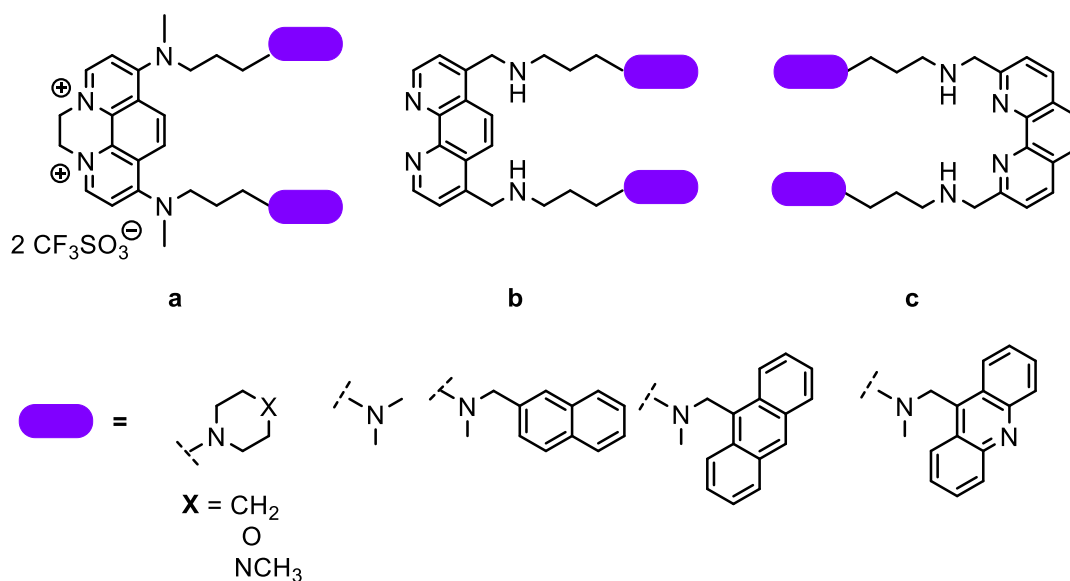


## Summary

In this doctoral thesis we have mainly focused on the synthesis and structural characterization of 1,10-phenanthroline derivatives capable of recognizing and stabilizing G-quadruplex DNA secondary structures.

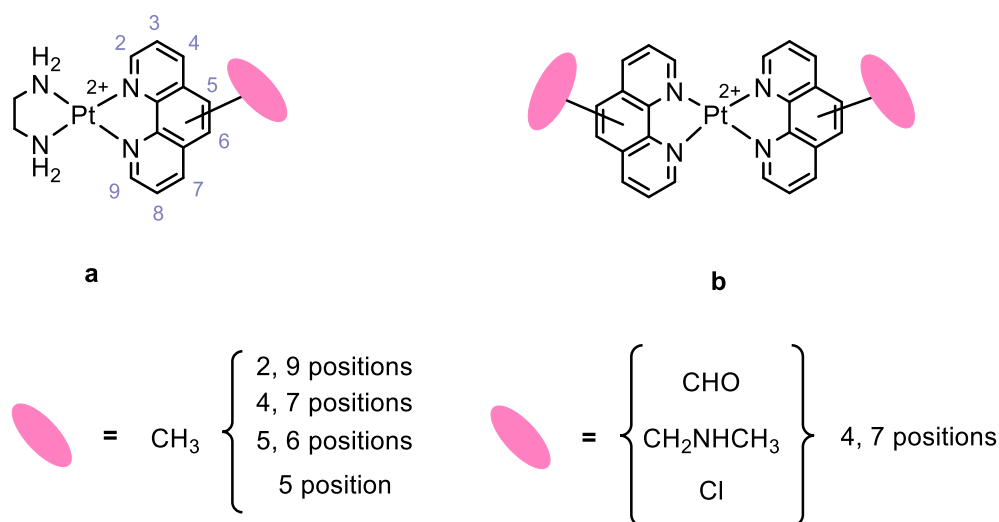
We have chosen as a target the human telomeric DNA sequence, with the purpose of setting a basis for the discovery of novel anticancer compounds based on 1,10-phenanthroline derivatives and their Pt(II) complexes. Moreover, we have studied the nature of G-quadruplex DNA/ligand interactions and biological activity using several biophysical and biochemical techniques.

Different families of ligands based on 1,10-phenanthroline or the diquaternized 1,10-phenanthroline core (figure 1) were synthesized first. The ligands were disubstituted with nitrogen-containing side chains at the 4 and 7 positions (figure 1, a and b), or at the 2 and 9 positions (figure 1c). All side chains contained as a terminal group an aliphatic heterocycle, such as a piperidine, morpholine or *N*-methylpiperazine, or an aromatic moiety, such as naphthalene, anthracene or acridine.



**Figure 1.** General structure of **(a)** diquaternized 1,10-phenanthroline ligands **(b)** 4 and 7 disubstituted 1,10-phenanthrolines **(c)** and 2 and 9 disubstituted 1,10-phenanthroline ligands

On the other hand, we have set the appropriate synthetic methodologies for the preparation of Pt(II) complexes with 1,10'-phenanthroline (phen) derivatives of different nature: mixed phen-ethylenediamine complexes (figure IIa) or 2:1 (ligand to metal) phen complexes (figure IIb). To this purpose, we have first used commercial 1,10-phen compounds with simple substituents to optimize the reaction conditions. Then, we have applied these conditions to the preparation of other Pt(II) complexes in which 1,10-phen is tethered, at the 4- and 7- positions, to nitrogen-containing hydrocarbon chains with different terminal groups.



**Figure II.** General structure of **(a)** mixed 1,10-phenanthroline and ethylenediamine Pt(II) complexes and **(b)** 2:1 (ligand to metal) Pt(II) complexes

After that, DNA interaction and biological activity studies were carried out with most of the synthesized compounds. In all experiments, the interactions between the tested compounds and telomeric G-quadruplex DNA were studied, both under potassium or sodium-rich conditions, and with duplex DNA. Different biophysical techniques were employed, such as a DNA melting assay monitored by fluorescence resonance energy transfer (FRET) and circular dichroism. Competitive experiments were also performed 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 duplex DNA oligonucleotide sequence were employed. Furthermore, the biological activity was preliminary assessed in tumor cultured cells by means of the MTT assay.

Most of the compounds studied in this work have demonstrated good capability of binding quadruplex DNA, several of them with significant selectivity. In addition, the compounds have exhibited different degrees of biological antitumor activity (micromolar or submicromolar) *in vitro*. The results from this work will be published shortly.

In addition to the work described herein, and as a requirement within the International Doctorate Program of UAH, I visited the research group of Dr. Marco Bandini (Department of Chemistry "G. Ciamician" the Alma Mater Studiorum- University of Bologna) for four months in 2016. During this short stay abroad, I was involved in the completion of an organocatalytic project entitled "*TBAF catalyzed one-pot synthesis of allenyl-indoles*", which was published in *Organic Chemistry Frontiers* this year.





## Glosario de abreviaturas y acrónimos

%DTO	Porcentaje de desplazamiento de naranja de tiazol
$\delta$	Desplazamiento químico (ppm)
$\varepsilon$	Coefficiente de extinción ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )
$\Delta$	Reflujo
$\lambda$	Longitud de onda (nm)
(Boc) <sub>2</sub> O	Dicarbonato de di-( <i>terc</i> -butilo)
$\Delta G$	Variación de energía libre de Gibbs
$\Delta H$	Variación de la entalpía
$\Delta S$	Variación de la entropía
$\Delta T_m$	Incremento de la temperatura media de desnaturalización del ADN
<sup>13</sup> C-HSQC	Espectro de correlación bidimensional <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C a un enlace
<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup> C
<sup>19</sup> F-RMN	Resonancia magnética nuclear de <sup>19</sup> F
<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup> H
<sup>195</sup> Pt-RMN	Resonancia magnética nuclear de <sup>195</sup> Pt
360A	Compuesto de referencia como ligando selectivo de ADN cuádruple
2,9-dmphen	2,9-Dimetil-1,10-fenantrolina
3,5,6,8-tphen	3,5,6,8-Tetrafenil-1,10-fenantrolina
4,7-dCHOpen	1,10-Fenantrolina-4,7-dicarbaldehído
4,7-dmamphen	4,7-Bis-( <i>N</i> -metil)aminometil 1,10-fenantrolina
4,7-dmphen	4,7-Dimetil-1,10-fenantrolina
5-mphen	5-Metil-1,10-fenantrolina

## Glosario de abreviaturas y acrónimos

---

5,6-dmphen	5,6-Dimetil-1,10-fenantrolina
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Antr	Antraceno
Acr	Acridina
Ar	Arilo
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BI	Bisintercalante
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
BPC	Alto grado de pureza de agua ( <i>Biotechnology Performance Certified</i> )
BSU6039	Ligando de ADN cuádruple-G derivado de acridina
°C	Grado centígrado
C	Citosina
c	Cuadruplete
ca	Cuadruplete aparente
$C_{ADN}$	Concentración de ADN
CDI	Carbonildiimidazol
$c_b$	Concentración de ligando dentro de la bolsa de diálisis
cm	Centímetro
$c_u$	Concentración de ligando unido al ADN
d	Doblete
DC	Dicroísmo circular
DCF	4,7-Dicloro-1,10-fenantrolina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
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
En	Etilendiamina
ESI	Ionización por electrospray ( <i>ElectroSpray Ionization</i> )
Et <sub>2</sub> 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
FAM	6-Carboxifluoresceína
FID	<i>Fluorescence Intercalator Displacement (assay)</i>
FN	Fluorescencia normalizada
FRET	Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia ( <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> )
G	Guanina
G4	Cuádruple-G
G4-FID	Ensayo de desplazamiento de ligandos fluorescentes (ADN cuádruple)
HeLa	Línea celular de carcinoma de cérvix uterino
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )

## Glosario de abreviaturas y acrónimos

---

HT-29	Línea celular de adenocarcinoma de colon
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 <sub>50</sub>	Concentraciones necesarias de ligando para la inhibición del 50% de la actividad de la telomerasa (TRAP-LIG) o la inhibición del 50% crecimiento celular (ensayo MTT)
IDT	Integrated DNA Technologies
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento (Hz)
<i>k</i>	Pendiente de la recta
<i>K</i>	Constante del viscosímetro ( $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$ )
<i>K<sub>a</sub></i>	Constante de asociación ( $\text{M}^{-1}$ )
<i>K<sub>a</sub>(C)</i>	Constante de asociación con el ADN cuádruple ( $\text{M}^{-1}$ )
<i>K<sub>a</sub>(D)</i>	Constante de asociación con el ADN dúplex ( $\text{M}^{-1}$ )
kDa	Unidad de masa atómica ( <i>kiloDalton</i> )
L	Ligando
m	Multiplete
m/z	Relación masa/carga
MCF7	Línea celular de carcinoma de mama
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahercio
MI	Monointercalante
mL	Mililitro

mM	Milimolar
mmol	Milimol
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
Naft	Naftaleno
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido en su forma reducida
N.D.	Sin determinar
NEt <sub>3</sub>	Trietilamina
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
nm	Nanómetro
NOESY	Espectroscopia del efecto nuclear de Overhauser
nt	Nucleótidos
P.f.	Punto de fusión
PC3	Línea celular de carcinoma de próstata
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
Phen	1,10-Fenantrolina
PIPER	Ligando de ADN cuádruple-G derivado del perileno
ppm	Partes por millón
pte.	Pendiente
py	Piridina
q	Quintuplete
Rdto.	Rendimiento

## *Glosario de abreviaturas y acrónimos*

---

RHPS4	Ligando de ADN cuádruple-G derivado pentacíclico de acridina
RMN	Resonancia magnética nuclear
Rpm	Revoluciones por minuto
RPWE	Línea celular de próstata sana
S	Selectividad
s	Singlete
sa	Singlete aparente
SDS	Dodecilsulfato sódico
Sp18	Espaciador de 18 átomos que forma parte del oligonucleótido F10T
SPR	Resonancia de Plasmón de Superficie ( <i>Surface Plasmon Resonance</i> )
SRB	Sulforrodamina B
T	Temperatura, Timina
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TAMRA	6-Carboxitetrametilrodamina
Tel-22	Oligonucleótido de 22 nucleótidos para formar el ADN cuádruple-G (secuencia telomérica)
<sup>tel</sup> IC <sub>50</sub>	Concentraciones necesarias para la inhibición del 50% de la actividad de la telomerasa en el ensayo TRAP-LIG
TERRA	<i>Telomeric repeat-containing RNA</i>
THF	Tetrahidrofurano
T <sub>m</sub>	Temperatura media de desnaturalización del ADN
TO	Naranja de tiazol ( <i>Thiazole orange</i> )
TOCSY	Espectroscopia de correlación total

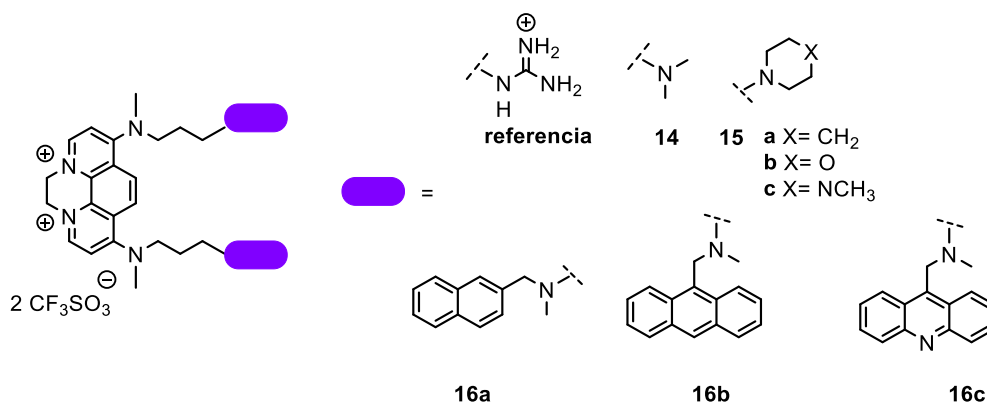


TRAP	Protocolo de amplificación de repeticiones de la secuencia telomérica ( <i>Telomere Repeat Amplification Protocol</i> )
TRAP-LIG	Protocolo de amplificación de repeticiones de la secuencia telomérica en ausencia de ligando ( <i>Telomere Repeat Amplification Protocol without ligand</i> )
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
u.m.	Unidades monoméricas
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Ultravioleta visible
US	Ligando con modo de unión al surco del ADN dúplex
v/v	Proporción volumen/volumen
$\mu_0$	Viscosidad absoluta de una disolución de ADN
$\mu_x$	Viscosidad absoluta de una disolución ADN-ligando
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\bar{\nu}$	Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )

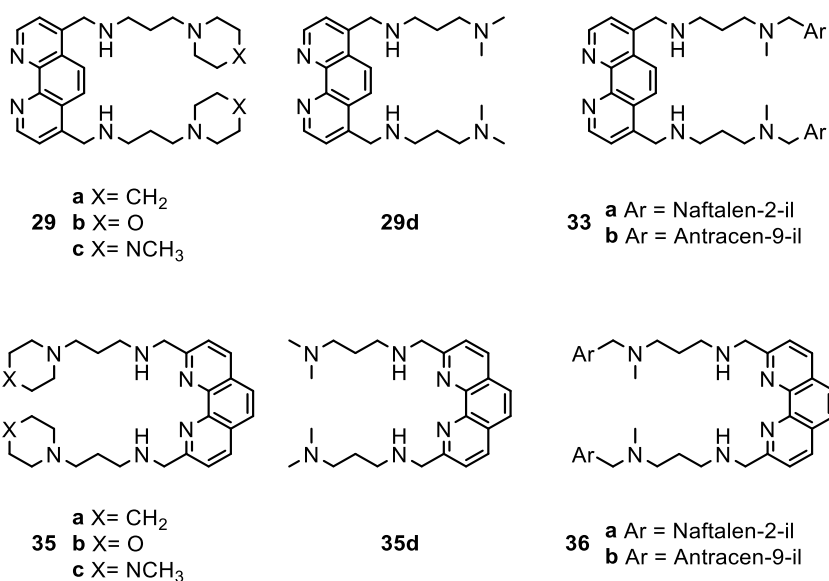


## Glosario de estructuras

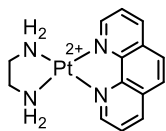
### Familia de compuestos dicuaternizados



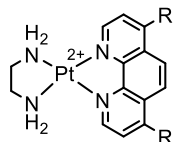
### Familia de derivados de 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 4 y 7 (29a-d y 33a-b) y 2 y 9 (35a-d y 36a-b)



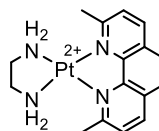
## Familia de complejos mixtos de Pt(II)-1,10-fenantrolina-etilendiamina



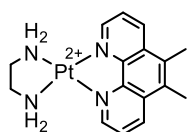
40



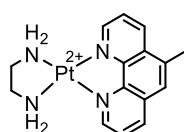
41 a R = CH<sub>3</sub>  
b R = CHO  
c R = Cl  
d R = CH<sub>2</sub>NHCH<sub>3</sub>



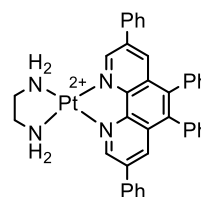
42a



43

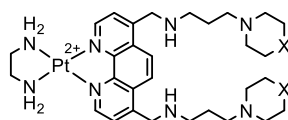


44

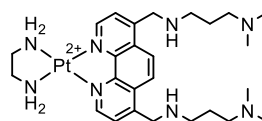


45

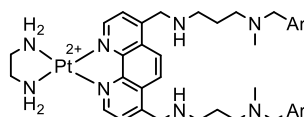
## Familia de complejos mixtos de Pt(II) con derivados de 1,10-fenantrolina conteniendo cadenas laterales



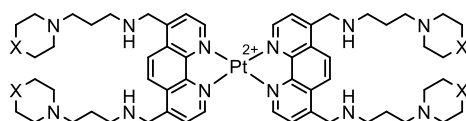
47 a X = CH<sub>2</sub>  
b X = O  
c X = NCH<sub>3</sub>



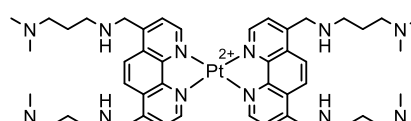
47d



48 a Ar = Naftalen-2-il  
b Ar = Antracen-2-il

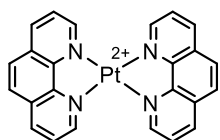


49 a X = CH<sub>2</sub>  
c X = NCH<sub>3</sub>

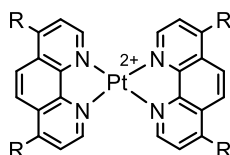


49d

**Familia de complejos de Pt(II) con estequiometría 2:1 (ligando-metal) obtenidos a partir de derivados comerciales de 1,10-fenantrolina**

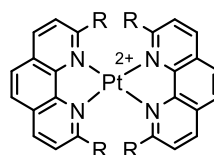


50



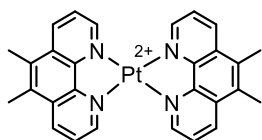
51

a R = CH<sub>3</sub>  
b R = CHO  
c R = Cl

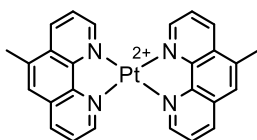


52

a R = CH<sub>3</sub>  
b R = CHO

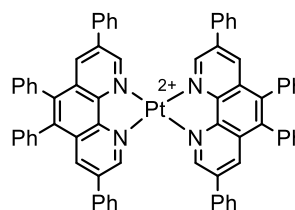


53



54

(mezcla de isómeros)



55



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	1
<b>1.1 Introducción</b> .....	3
<b>1.2 Objetivos</b> .....	8
<b>1.3 Organización</b> .....	12
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	13
<b>2.1 ADN como diana terapéutica</b> .....	15
<b>2.1.1 El ADN-B</b> .....	15
<b>2.2 ADN CUÁDRUPLE-G: Antecedentes y descripción estructural</b> .....	19
<b>2.2.1 Factores estabilizadores del cuádruple: interacciones <math>\pi</math>-<math>\pi</math></b> .....	22
<b>2.2.2 Factores estabilizadores del cuádruple: catión metálico</b> .....	23
<b>2.2.3 Topologías</b> .....	25
<b>2.3 Relevancia biológica del ADN cuádruple-G</b> .....	28
<b>2.3.1 Cuádruple-G telomérico y telomerasa</b> .....	29
• La telomerasa .....	31
<b>2.3.2 Transcripción y replicación</b> .....	33
• Regiones promotoras .....	33
• Oncogenes .....	34
<b>2.3.3 Replicación e inestabilidad genómica</b> .....	37
• Orígenes de replicación .....	38
<b>2.3.4 Traducción</b> .....	39
<b>2.4 Ligandos de ADN cuádruple-G</b> .....	40
<b>2.4.1 Modos de unión al ADN Cuádruple-G</b> .....	40
<b>2.4.2 Características de los ligandos de cuádruple-G</b> .....	42
• Selectividad hacia el cuádruple .....	42
<b>2.4.3 Tipos de ligandos de cuádruple-G</b> .....	43



2.4.3.1	Ligandos de ADN cuádruple-G: Antecedentes .....	44
2.4.3.2	Derivados de la 1,10-fenantrolina.....	57
•	Derivados de la 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 2 y 9.....	58
•	Derivados de la 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 4 y 7.....	63
•	Otros derivados de la 1,10-fenantrolina .....	64
2.4.3.3	Complejos metálicos de derivados de 1,10-fenantrolina .....	65
•	Complejos de cobre(II) y níquel(II) .....	66
•	Complejos de rutenio(II) .....	69
•	Complejos de platino(II) .....	71
<b>3.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>77</b>
<b>3.1</b>	<b>Síntesis .....</b>	<b>79</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Síntesis de derivados de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada .....</b>	<b>79</b>
<b>3.1.1.1</b>	<b>Síntesis de derivados de etilendiamina.....</b>	<b>80</b>
•	Síntesis del derivado dicuaternizado 2 .....	80
•	Síntesis de derivados sustituidos con aminas heterocíclicas (6) .....	81
•	Síntesis de los derivados con resto aromático 8a-b. ....	83
<b>3.1.1.2</b>	<b>Síntesis de derivados de propilendiaminas.....</b>	<b>84</b>
•	Síntesis de metilaminas sustituidas con sistemas heterocíclicos alifáticos (11a-c) .....	84
•	Síntesis de las metilaminas con resto aromático (12a-c) .....	85
•	Síntesis de los derivados de 1,10-fenantrolina dicuaternizados 14, 15a-c y 16a-c .....	88
<b>3.1.2</b>	<b>Síntesis de compuestos derivados del sistema 1,10-fenantrolina sustituido en las posiciones 4 y 7 .....</b>	<b>89</b>
<b>3.1.2.1</b>	<b>Síntesis de amino derivados.....</b>	<b>91</b>
<b>3.1.2.2</b>	<b>Síntesis de derivados a partir de la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina .....</b>	<b>92</b>
•	Síntesis de la 4,7-bis(bromometil)-1,10-fenantrolina (20) .....	94
•	Síntesis de derivados de tipo amido .....	96

---

• Síntesis de la 4,7-bis(aminometil)-1,10-fenantrolina (25).....	99
<b>3.1.2.3</b> Síntesis de aminometil derivados .....	101
• Síntesis de derivados de la 1,10-fenantrolina con cadenas nitrogenadas en posiciones 4,7 conteniendo aminas heterocíclicas (29a-d) .....	101
• Síntesis de derivados de la 1,10-fenantrolina con cadenas nitrogenadas en posiciones 4,7 conteniendo grupos aromáticos (33a-b).....	105
<b>3.1.3</b> Síntesis de compuestos derivados del sistema 1,10-fenantrolina sustituido en las posiciones 2 y 9 .....	107
<b>3.1.4</b> Síntesis de la 3,5,6,8-tetrafenil-1,10-fenantrolina .....	109
<b>3.1.5</b> Síntesis de complejos de platino(II) .....	110
<b>3.1.5.1</b> Síntesis de complejos de Pt(II) mixtos tipo 1:1:1 .....	112
• Síntesis de complejos mixtos 1:1:1 con ligandos de 1,10-fenantrolina comerciales.....	113
• Síntesis de complejos mixtos 1:1:1 con ligandos de 1,10-fenantrolina con cadenas laterales en las posiciones 4 y 7 .....	114
<b>3.1.5.2</b> Síntesis de los complejos de Pt(II) de tipo 2:1 .....	122
• Síntesis de complejos tipo (2:1) con ligandos de 1,10-fenantrolina con cadenas laterales en las posiciones 4 y 7 .....	124
• Síntesis de complejos de tipo (2:1) con ligandos de 1,10-fenantrolina comerciales.....	127
<b>3.2. Estudios de interacción</b> .....	130
<b>3.2.1</b> Técnicas empleadas para evaluar la interacción entre los distintos ligandos y el ADN.....	132
<b>3.2.1.1</b> Diálisis de Equilibrio Competitiva.....	132
<b>3.2.1.2</b> Dicroísmo circular (DC).....	134
<b>3.2.1.3</b> Desnaturalización térmica del ADN por FRET .....	135
<b>3.2.1.4</b> Desnaturalización térmica del ADN por FRET competitivo.....	137
<b>3.2.1.5</b> Viscosimetría .....	138

<b>3.2.1.6</b> Ensayo de viabilidad celular con MTT .....	139
<b>3.2.2.</b> Estudio de los derivados de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada.....	141
• Resultados obtenidos por diálisis de equilibrio competitiva .....	141
• Resultados obtenidos por dicroísmo circular .....	144
• Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET.....	148
• Resultados obtenidos por viscosimetría.....	151
• Resultados obtenidos por el ensayo de citotoxicidad MTT.....	152
<b>3.2.3.</b> Estudio de los derivados de 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 4, 7 .....	154
• Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET.....	154
• Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET competitivo	156
• Resultados obtenidos por el ensayo de citotoxicidad MTT.....	159
<b>3.2.4.</b> Estudio de los derivados de 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 2, 9 .....	160
• Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET.....	160
• Resultados obtenidos por determinación de la selectividad por FRET competitivo .....	162
<b>3.2.5</b> Estudio de los complejos mixtos de Pt(II)-1,10-fenantrolina-etilendiamina .....	166
• Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET.....	167
• Resultados obtenidos por determinación de la selectividad por FRET competitivo .....	168
• Resultados obtenidos por el ensayo de citotoxicidad MTT.....	171
<b>3.2.6</b> Estudio de los complejos de Pt(II) con derivados de 1,10-fenantrolina conteniendo cadenas laterales .....	172
• Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET.....	173
• Resultados obtenidos por determinación de la selectividad por FRET competitivo .....	175
• Resultados obtenidos por el ensayo de citotoxicidad MTT.....	178

---

<b>3.2.7</b> Estudio de los complejos de Pt(II) con estequiometría 2:1 (ligando:metal) obtenidos a partir de derivados comerciales de 1,10-fenantrolina .....	179
• Desnaturalización térmica por FRET.....	180
• Resultados obtenidos por determinación de la selectividad por FRET competitivo .....	183
• Resultados obtenidos por el ensayo de citotoxicidad MTT.....	186
<b>3.2.8.</b> Estudio comparativo de los diferentes compuestos analizados en el trabajo ...	187
• Estudio comparativo de los complejos de Pt(II) mixtos y tipo (2:1) con ligandos de 1,10-fenantrolina comerciales .....	187
• Estudio comparativo de los diferentes compuestos formados por derivados de la 1,10-fenantrolina que contienen cadenas laterales polinitrogenadas .....	189
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	193
<b>4.1. Parte experimental: Síntesis</b> .....	195
<b>4.1.1 Materiales y métodos</b> .....	195
<b>4.1.2</b> Síntesis de derivados de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada .....	196
♦ Procedimiento general A para la preparación de las aminas 7a-b.....	198
♦ Procedimiento general B para la preparación de los derivados dicuaternizados 8a-b.....	200
♦ Procedimiento general C para la preparación de las aminas primarias 9a-b... ..	203
♦ Procedimiento general D para la preparación de los carbamatos 10a-c ...	204
♦ Procedimiento general E para la preparación de las metilaminas 11a-c....	207
♦ Procedimiento general F para la preparación de las aminas 12a-c.....	209
♦ Procedimiento general G para la preparación de los derivados dicuaternizados 14, 15a-c, 16a-c.....	211
<b>4.1.3</b> Síntesis de derivados de 1,10-fenantrolina sustituidos en las posiciones 4 y 7 ..	219
<b>4.1.3.1</b> Preparación de aminometil derivados .....	222

◆	Procedimiento general H para la preparación de las iminas 28a-c .....	222
◆	Procedimiento general I para la preparación de 29a-d y 33a-b .....	224
◆	Procedimiento general J para la síntesis de las aminas 30a-b.....	228
◆	Procedimiento general K para la obtención de 31a-b .....	230
◆	Procedimiento general L para la síntesis de 32a-b .....	232
<b>4.1.4</b>	<b>Síntesis de derivados de 1,10-fenantrolina sustituidos en las posiciones 2, 9 ....</b>	<b>236</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Síntesis de la 3,5,6,8-tetrafenil-1,10-fenantrolina .....</b>	<b>241</b>
<b>4.1.6</b>	<b>Preparación de Complejos de Pt(II) .....</b>	<b>242</b>
<b>4.1.6.1</b>	<b>Síntesis de complejos mixtos de Pt(II) 1:1:1 .....</b>	<b>243</b>
◆	Procedimiento general M para la preparación de complejos mixtos tipo (1:1:1) .....	243
◆	Procedimiento general N para la preparación de complejos con cloros como ligandos .....	248
◆	Procedimiento general O para la preparación de complejos mixtos tipo 1:1:1 .....	251
<b>4.1.6.2</b>	<b>Síntesis de complejos mixtos de Pt(II) 1:1:1 .....</b>	<b>256</b>
◆	Procedimiento general P para la preparación de complejos 1,10-fenantrolina-Pt(II) (2:1) .....	256
◆	Procedimiento general Q para la preparación de complejos 1,10-fenantrolina-Pt (2:1).....	258
<b>4.2</b>	<b>Estudios de interacción y actividad biológica .....</b>	<b>264</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Estudios de interacción ligando-ADN por desnaturalización térmica .....</b>	<b>264</b>
<b>4.2.1.1</b>	<b>Desnaturalización térmica del ADN por FRET .....</b>	<b>264</b>
<b>4.2.1.2</b>	<b>Desnaturalización térmica del ADN por FRET competitivo.....</b>	<b>267</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Estudio de la interacción por medidas espectroscópicas: .....</b>	<b>268</b>
<b>4.2.2.1</b>	<b>Medidas de interacción por dicroísmo circular .....</b>	<b>268</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Estudios termodinámicos entre ligandos y ADN cuádruple-G: Diálisis de equilibrio competitiva.....</b>	<b>268</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Viscosimetría .....</b>	<b>270</b>

<b>4.2.5 Estudios de la actividad biológica .....</b>	<b>273</b>
<b>5.CONCLUSIONS.....</b>	<b>275</b>
<b>ANEXO A: Técnicas para el estudio de interacciones ADN cuádruple-ligando .....</b>	<b>285</b>
<b>A.1 Técnicas para el estudio de interacciones ADN cuádruple-ligando y evaluación de la actividad biológica .....</b>	<b>287</b>
<b>A.1.1. Ensayos de desnaturalización térmica.....</b>	<b>288</b>
• Espectroscopia de Ultravioleta visible.....	288
• Desnaturalización térmica por FRET.....	289
• Dicroísmo circular (DC) .....	291
<b>A.1.2 Determinación de la afinidad o capacidad de unión .....</b>	<b>292</b>
• Ensayo de desplazamiento de ligandos fluorescentes (G4-FID) .....	292
• Estudios cinéticos y termodinámicos de la asociación ligando-ADN cuádruple- .....	295
• Resonancia de plasmón de superficie (SPR).....	295
• Valoraciones por calorimetría isotérmica .....	296
• Diálisis de equilibrio competitiva.....	297
<b>A.1.3. Experimentos espectroscópicos estructurales .....</b>	<b>298</b>
• Espectrometría de masas (EM).....	298
• Difracción de rayos X .....	299
• Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	300
<b>A.1.4 Ensayos de actividad biológica .....</b>	<b>301</b>
• Ensayo de la inhibición de la telomerasa .....	301
• Protocolo TRAP-LIG.....	301
<b>A.1.5 Ensayos en cultivos celulares.....</b>	<b>302</b>
• Ensayo de Citotoxicidad con MTT.....	302
<b>ANEXO B: Técnica complementaria .....</b>	<b>305</b>

*Índice*

---

<b>B.1. Viscosimetría</b> .....	307
<b>ANNEX C: Short stay abroad</b> .....	309



# **1. Introducción y objetivos**

*“El camino del progreso no es ni rápido ni fácil”*

*Marie Curie*

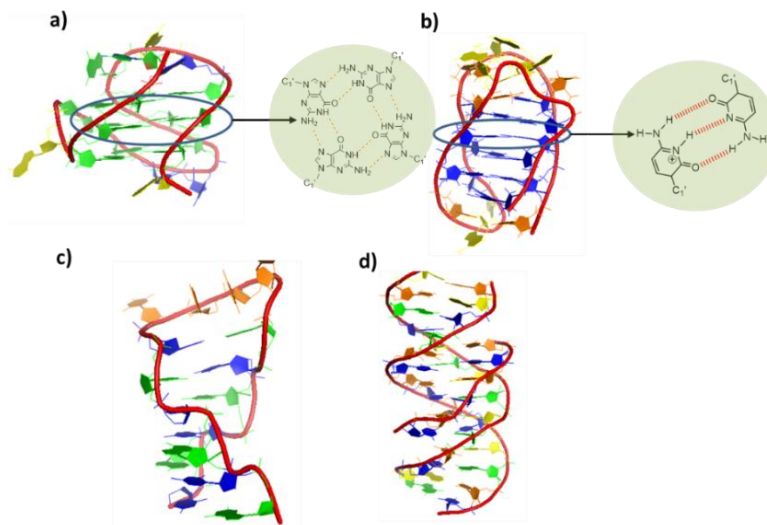




## 1.1 INTRODUCCIÓN

El ADN (ácido desoxirribonucleico) es la biomolécula encargada de almacenar y transmitir la información genética empleada en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos. Esta información se encuentra en unos segmentos específicos denominados genes y el resto de secuencias del ADN, aunque no contengan información genética, ejercen funciones en la regulación del uso de la misma.<sup>1</sup> El ADN comúnmente se presenta como una asociación de dos cadenas de oligonucleótido, formando la conocida estructura secundaria de doble hélice (de tipo B).

Aparte de la estructura canónica de doble hélice, el ADN puede adoptar diversas estructuras secundarias no canónicas (Figura 1). Hasta la fecha han sido descritas, como mínimo, diez de estas estructuras (de tipo no-B) que se pueden formar bajo las condiciones fisiológicas apropiadas. Algunos ejemplos de estructuras no canónicas del ADN, como el cuádruple-G (1a), el motivo-i (1b), la doble hélice del ADN tipo Z (1c) o la estructura intramolecular del ADN triple (1d)<sup>2</sup> se muestran en la figura 1.

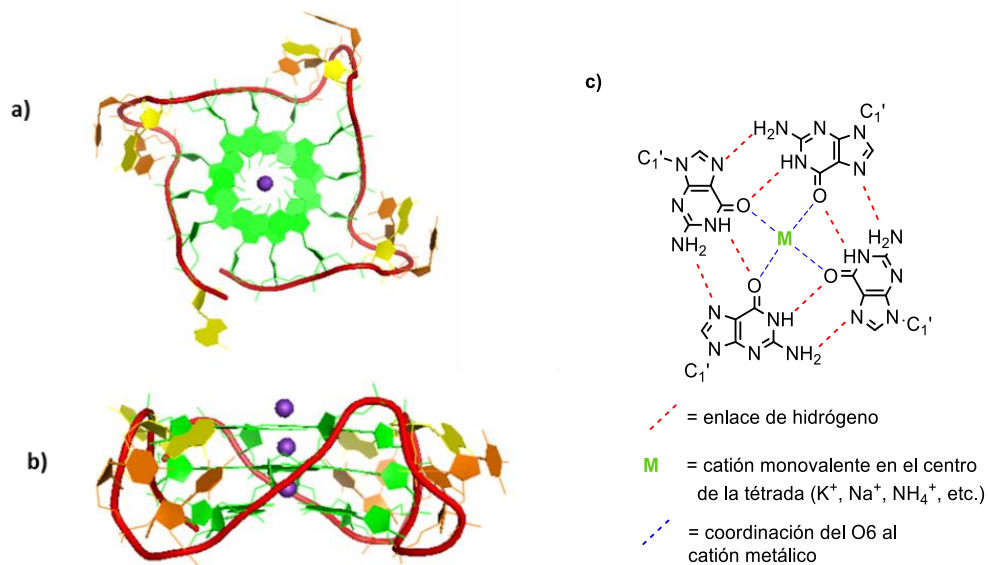


**Figura 1.** Representación de estructuras no canónicas del ADN. **(a)** cuádruple-G (PDB id: 2KZD). **(b)** motivo-i (i-tetrámero) (PDB id: 1EL2), **(c)** estructura horquilla en una estructura de ADN-Z (PDB id: 1D16), **(d)** estructura triple (PDB id: 1BWG)

<sup>1</sup> Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. In *Molecular Biology of the Cell*; Garland Science: 2008.

<sup>2</sup> Wang, G.; Vasquez, K. M. *DNA Repair* 2014, 19, 143-151.

De todas las estructuras secundarias no canónicas descritas en la bibliografía, la más estudiada es el ADN cuádruple-G. 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 que interaccionan entre sí a través de ocho enlaces de hidrógeno de tipo *Hoogsteen* (Figura 2, c).<sup>3</sup>



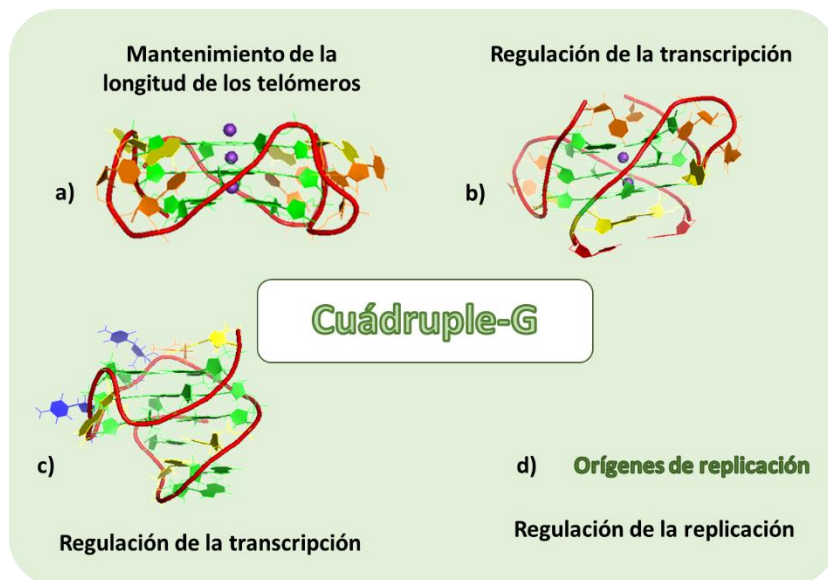
**Figura 2.** (a) Vista vertical y (b) vista lateral de una de las estructuras del ADN cuádruple-G de secuencia telomérica (PDB id: 1KF1); (c) cuatro guaninas agrupadas en una tétrada, estabilizada por ocho puentes de hidrógeno y por un catión monovalente en el centro

Actualmente se conocen más de 716.000 secuencias con alto contenido en guanina dentro del genoma humano. Todas ellas son regiones con alta probabilidad de formación de estructuras de cuádruple-G<sup>4</sup> y su localización y naturaleza evolutiva está altamente conservada, lo que indica la gran importancia de las funciones genómicas de estas estructuras. Podemos encontrarlas en regiones con importantes funciones dentro del genoma. Los telómeros, los orígenes de replicación, los extremos 5'UTR (del inglés *Untranslated Region*) del ARN mensajero, o en zonas próximas a promotores de

<sup>3</sup> Collie, G. W.; Parkinson, G. N. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5867-5892.

<sup>4</sup> Chambers, V. S.; Marsico, G.; Boutell, J. M.; Smith, G. P.; Di Antonio, M.; Balasubramanian, S. *Nat Biotechnol* **2015**, *33*, 877-881.

oncogenes, entre otros, son las regiones más ampliamente estudiadas hasta el momento<sup>5</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** (a) Cuádruple telomérico (PDB id: 1KF1) (b) ARN cuádruple (PDB id: 3IBK); (c) cuádruple de la secuencia *c-kit* (PDB id: 2O3M) (d) orígenes de replicación

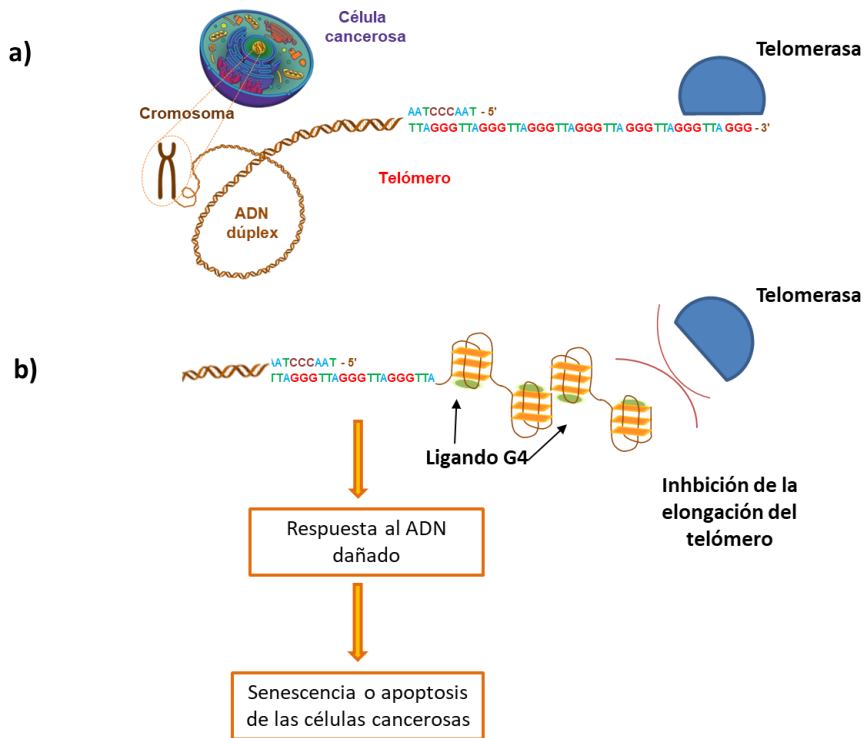
La estabilización de los cuádruples por interacción con pequeñas moléculas puede modificar distintos procesos a nivel celular dependiendo de la región genómica en la que se encuentren. Por ello, el estudio estructural de los cuádruples, así como las consecuencias derivadas de su estabilización por pequeñas moléculas son de gran interés en la actualidad.

Una de las regiones ricas en guaninas con relevancia biológica más estudiada 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 de los cromosomas sin pérdidas en la información genética, mantener su estabilidad y proteger los extremos de los mismos frente a la unión con otros cromosomas.

La longitud de los telómeros es regulada por la telomerasa, una enzima del tipo transcriptasa inversa encargada de adicionar fragmentos repetitivos de ADN

<sup>5</sup> Rhodes, D.; Lipps, H. J. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 8627-8637.

((TTAGGG)<sub>n</sub>) al extremo 3' del telómero. En aproximadamente el 85% de las células cancerosas se ha observado que la actividad de la telomerasa humana es muy significativa, impidiendo que estas alcancen la etapa de senescencia o experimenten apoptosis.<sup>6,7,8</sup> Por ello, una de las múltiples aplicaciones terapéuticas asociadas al diseño de ligandos del ADN cuádruple-G está relacionada con la inhibición indirecta de la telomerasa por estabilización del cuádruple-G telomérico (Figura 4).



**Figura 4. (a)** Adición al extremo 3' de la secuencia TTAGGG por parte de la telomerasa **(b)** Inhibición de la actividad de la telomerasa mediante la estabilización del ADN cuádruple-G telomérico

Otro de los procesos que se ve afectado por la interacción de pequeñas moléculas con el cuádruple-G es el proceso de transcripción de algunos oncogenes. La

<sup>6</sup> Avilion, A. A.; Piatyszek, M. A.; Gupta, J.; Shay, J. W.; Bacchetti, S.; Greider, C. W. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 645-650.

<sup>7</sup> Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L. C.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. *Science (Washington, D. C.)* **1994**, *266*, 2011-2015.

<sup>8</sup> Shay, J. W.; Bacchetti, S. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 787-791.

estabilización de las secuencias ricas en guaninas en las proximidades de los promotores puede reprimir o alterar la transcripción génica.

Además, han sido detectadas estructuras de cuádruple-G en secuencias de ARN mensajero, lo puede provocar alteraciones en la etapa de traducción de genes y en regiones próximas al ADN telomérico, como las denominadas secuencias TERRA (del inglés, *telomeric repeat-containing RNA*).

Y, por último, y menos estudiado, la presencia de estructuras de cuádruple-G en los alrededores de los orígenes de replicación se postula como un factor determinante en el establecimiento del lugar preciso del inicio de la horquilla de replicación.

## 1.2 OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es la síntesis y caracterización de distintos derivados de 1,10-fenantrolina disustituidos, así como de algunos de sus correspondientes complejos de Pt(II), con el fin de obtener potenciales ligandos de ADN cuádruple-G que estén dotados de actividad antitumoral.

Para ello, se abordará, en primer lugar, la preparación de derivados basados en el sistema de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada y sustituida en las posiciones 4 y 7 con cadenas alifáticas que contienen aminas heterocíclicas o sistemas aromáticos (Figura 5).

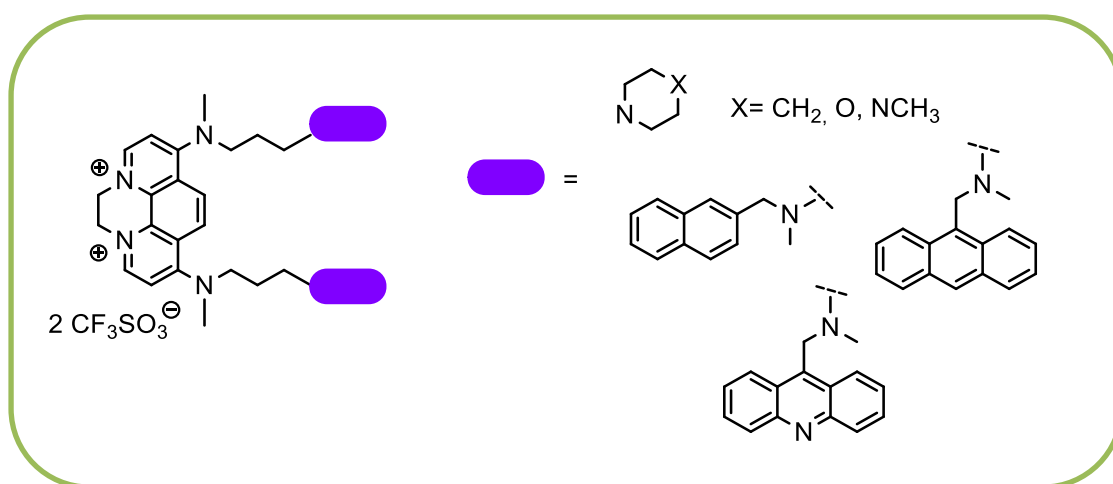
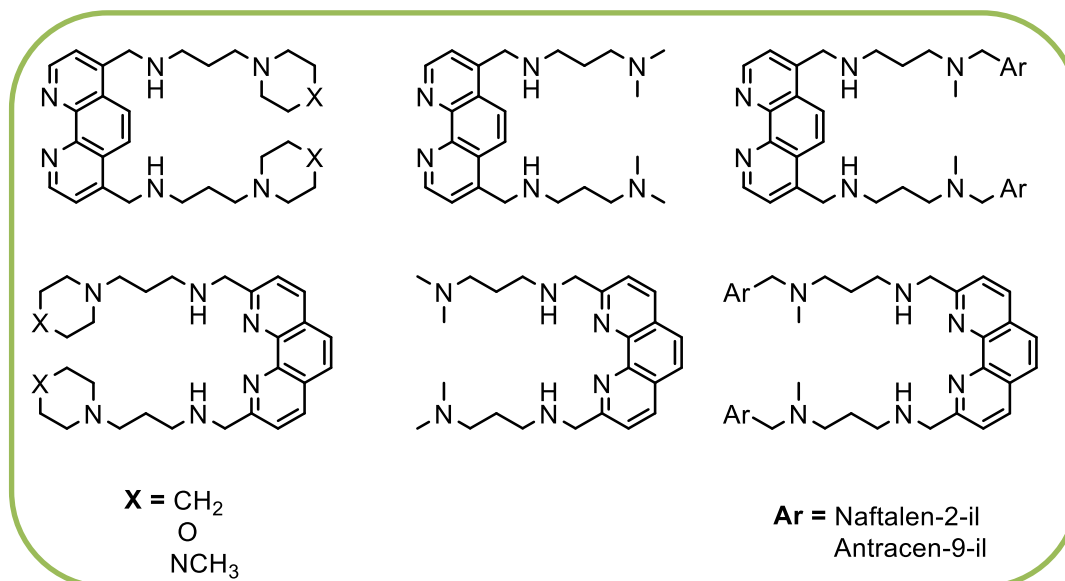


Figura 5. Derivados de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada

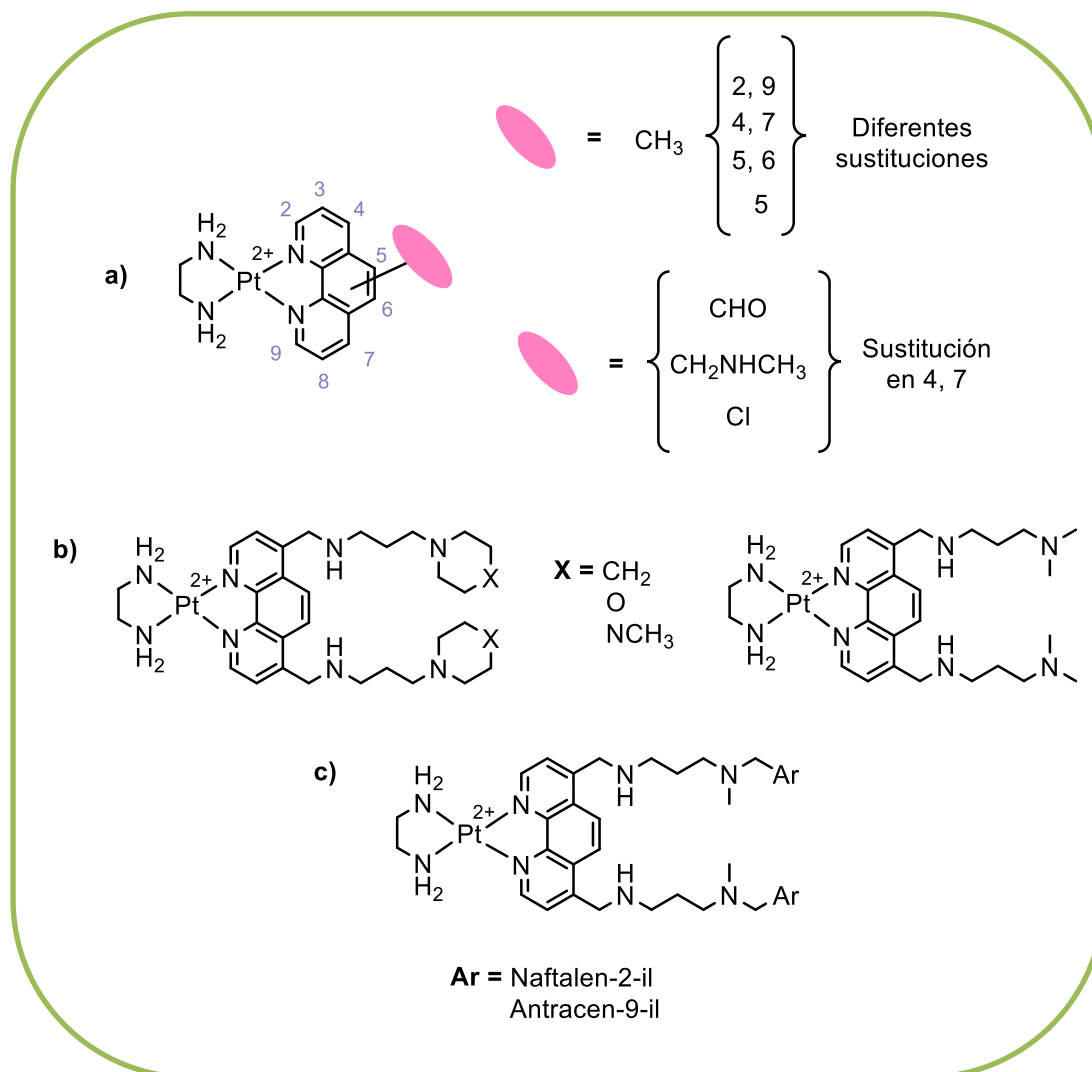
Por otra parte, en este trabajo se aborda la preparación de ligandos derivados de la 1,10-fenantrolina sin cuaternizar (Figura 6) sustituidos en las posiciones 4 y 7 o 2 y 9 con cadenas alifáticas análogas a las de los compuestos dicuaternizados recogidos en la figura 5.



**Figura 6.** Derivados de la 1,10-fenantrolina 4,7-disustituida o 2,9-disustituida

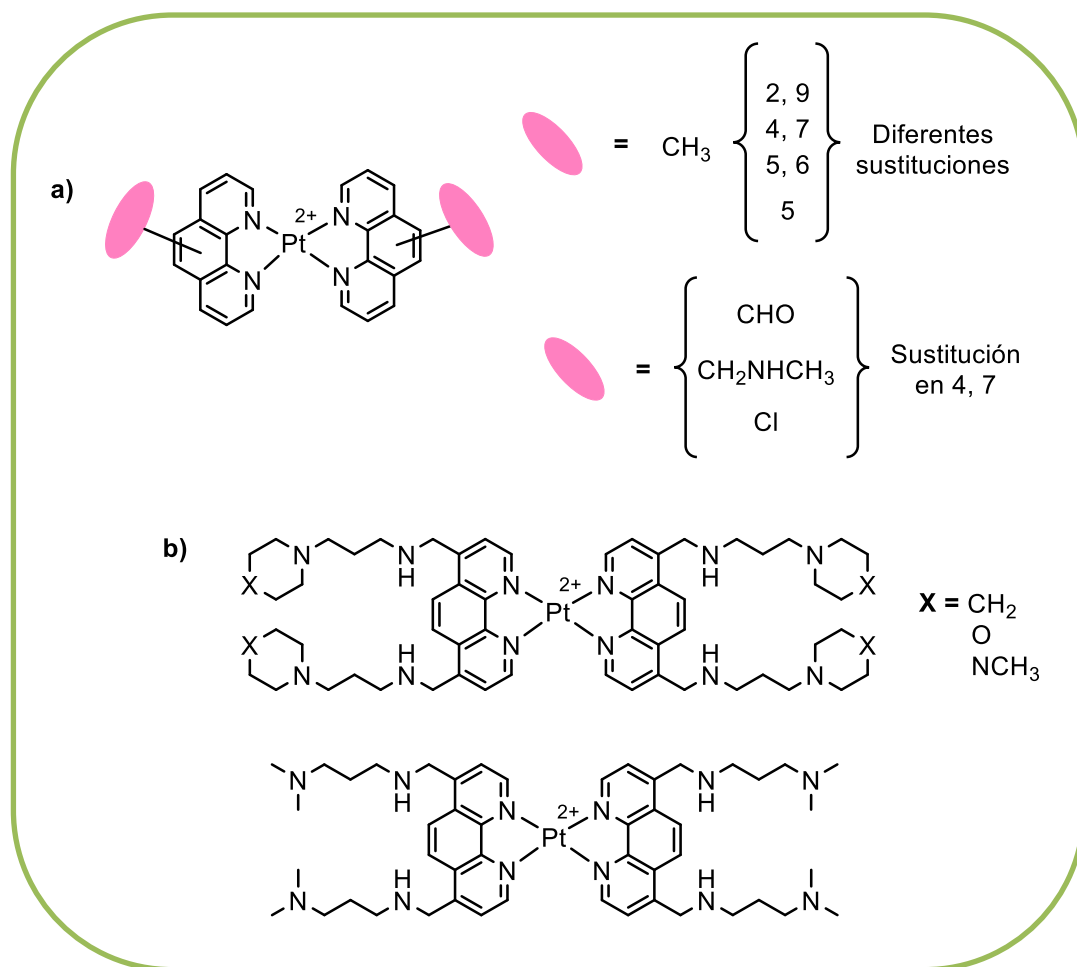
Una vez obtenidos estos ligandos orgánicos, el siguiente objetivo es la preparación de distintos complejos de Pt(II). Por una parte, se pretende preparar complejos mixtos de Pt(II) con 1,10-fenantrolina y etilendiamina. Para ello, se emplearán como ligandos los compuestos mostrados en la figura 6, así como diferentes derivados comerciales (Figura 7).





**Figura 7.** Complejos mixtos de 1,10-fenantrolina-etilendiamina (a) con 1,10-fenantrolinas comerciales, (b) y (c) con derivados disustituídos en las posiciones 4 y 7

Además, un aspecto importante que esta tesis pretende abordar es la optimización de la síntesis de complejos de Pt(II) de 1,10-fenantrolina de tipo 2:1 (ligando:metal), teniendo en cuenta la falta de ejemplos de estos sistemas en la literatura y la dificultad de obtener dichos derivados (Figura 8).



**Figura 8.** Complejos 2:1 (ligando:metal) **(a)** con 1,10-fenantrolinas comerciales y **(b)** con derivados disustituídos en las posiciones 4 y 7

El segundo bloque de objetivos de este trabajo es la realización de experimentos de interacción entre el ADN, fundamentalmente ADN cuádruple-G, y los distintos compuestos orgánicos y metalo-orgánicos preparados, con el fin de caracterizar el posible reconocimiento molecular. Además, también se realizará un estudio preliminar de actividad biológica en células en cultivo, para así evaluar las potenciales aplicaciones de los compuestos sintetizados como agentes antitumorales.

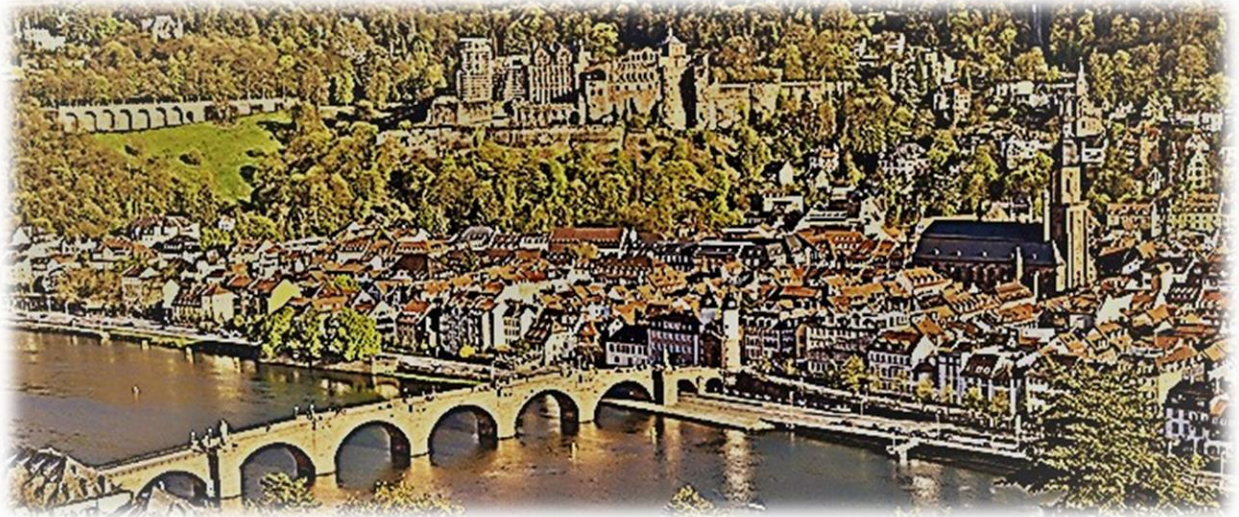
### **1.3 ORGANIZACIÓN**

Esta memoria se ha distribuido en 5 capítulos: la presente introducción, una sección de antecedentes bibliográficos sobre el cuádruple-G y los ligandos más relevantes estudiados en la literatura, la discusión de resultados, la parte experimental, y las conclusiones. Por último, se adjuntarán tres anexos dos de ellos con una descripción de las técnicas biofísicas empleadas habitualmente en el estudio de interacciones ADN-ligando cuádruple-G y un anexo con el trabajo realizado durante la estancia predoctoral en la Univesità degli Studi di Bologna (Italia) en el grupo de investigación del profesor Marco Bandini.

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 junto con la discusión de los mismos, y una segunda parte en la que se detallan los resultados de interacción y de actividad biológica.

La parte experimental recoge, de igual manera, los procedimientos experimentales de síntesis y la caracterización de los compuestos obtenidos en esta tesis doctoral, así como los protocolos utilizados en los ensayos de interacción y actividad biológica llevados a cabo.

En el capítulo final se resumen los resultados más relevantes obtenidos a lo largo del trabajo y se recogen las conclusiones más significativas que se derivan del trabajo realizado en esta tesis doctoral.



## **2. Antecedentes**

*“La ciencia siempre vale la pena porque sus descubrimientos, tarde o temprano, siempre se aplican”*

*Severo Ochoa*

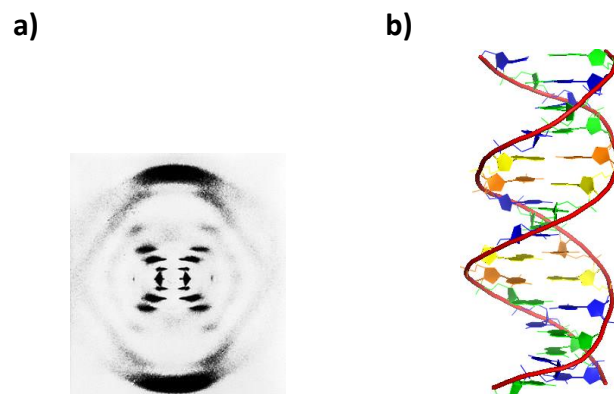


## 2.1 ADN COMO DIANA TERAPÉUTICA

### 2.1.1 El ADN-B

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es la biomolécula encargada de almacenar la información genética, así como las instrucciones necesarias para el desarrollo y funcionamiento de los organismos vivos y algunos virus. No solo almacena toda esta información, sino que también es responsable de su transmisión. Junto con el ácido ribonucleico (ARN) y las proteínas, es una de las biomoléculas esenciales para la vida de todos los organismos vivos.

Su descubrimiento se produjo en 1868, cuando Friedrich Miescher aisló por primera vez del núcleo celular un precipitado al que denominó nucleína.<sup>9</sup> Observó que esta sustancia contenía un alto contenido en fosfatos por lo que no podían ser proteínas. Dicha sustancia es lo que actualmente conocemos como ácido desoxirribonucleico. Fue en 1953 cuando Franklin,<sup>10,11</sup> Wilkins,<sup>12</sup> Watson y Crick,<sup>13</sup> gracias a sus trabajos con rayos X, elucidaron la estructura secundaria del ADN a la que denominamos doble hélice B (Figura 9).



**Figura 9. (a)** Patrón de difracción de rayos X de la doble hélice<sup>11</sup> **(b)** Estructura tridimensional de la doble hélice (PDB id: 2M2C)

<sup>9</sup> Dahm, R. *Hum. Genet.* **2008**, *122*, 565-581.

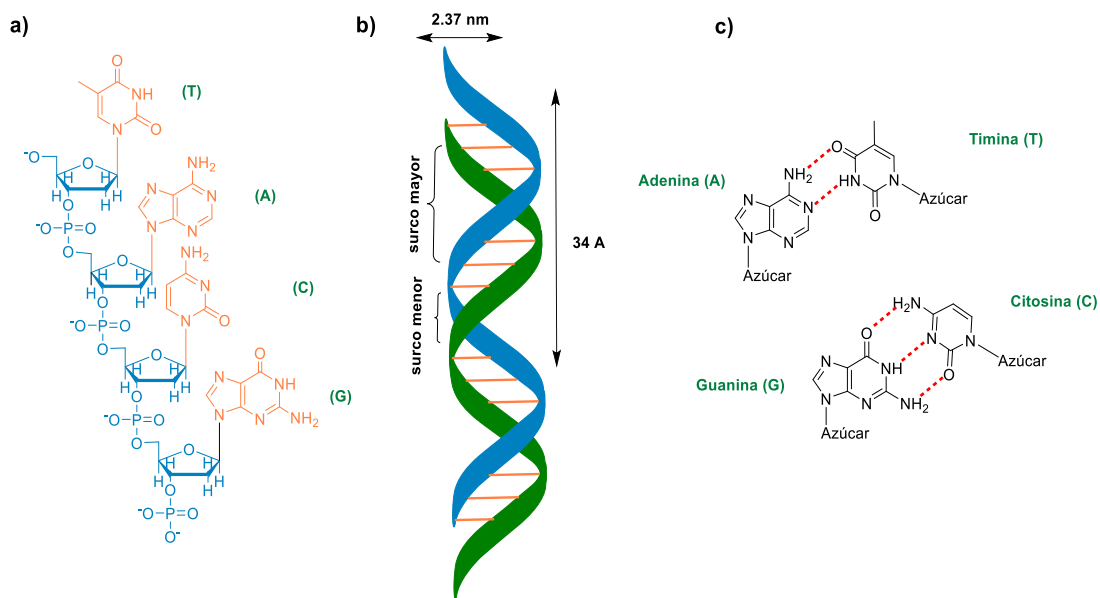
<sup>10</sup> Franklin, R. E.; Gosling, R. G. *Nature (London, U. K.)* **1953**, *172*, 156-157.

<sup>11</sup> Franklin, R. E.; Gosling, R. G. *Nature (London, U. K.)* **1953**, *171*, 740-741.

<sup>12</sup> Wilkins, M. H. F.; Stokes, A. R.; Wilson, H. R. *Nature (London, U. K.)* **1953**, *171*, 738-740.

<sup>13</sup> Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature (London, U. K.)* **1953**, *171*, 737-738.

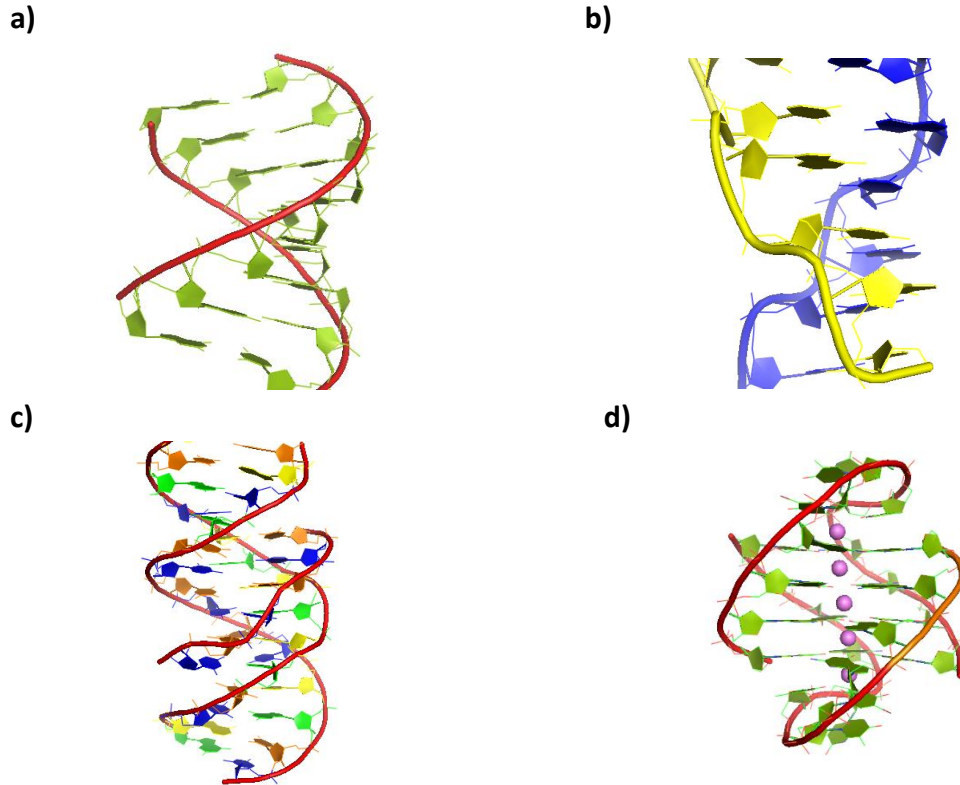
Desde el punto de vista de su composición, el ADN es una biomolécula relativamente sencilla. Está formada por nucleótidos, todos ellos constituidos por la unión de una 2'-desoxirribosa, una base nitrogenada y un grupo fosfato. Hay cuatro tipos de bases nitrogenadas presentes en el ADN: adenina (A), guanina (G) (bases púricas), citosina (C) y timina (T) (pirimidínicas). Los nucleótidos se unen entre sí a través de enlaces fosfodiéster entre los grupos fosfato 3'-OH del anillo de desoxirribosa de un nucleótido con el 5'-OH del siguiente (Figura 10a). La hibridación de dos cadenas de polinucleótidos complementarias y en sentido antiparalelo da lugar a la doble hélice B (Figura 10b). Es una estructura termodinámicamente estable gracias a los enlaces de hidrógeno establecidos entre las bases complementarias (Figura 10c) y, especialmente, por la presencia de interacciones  $\pi$  de apilamiento entre pares de bases consecutivos.



**Figura 10. (a)** Composición química de la hebra de ADN. En azul, el esqueleto de azúcar-fosfato y en naranja las bases nitrogenadas. **(b)** Representación de la doble hélice **(c)** Pares de bases Watson y Crick; A-T dos enlaces de hidrógeno, G-C tres enlaces de hidrógeno

La doble hélice B, es la estructura que preferentemente adopta el ADN en condiciones fisiológicas. Sin embargo, existen otras estructuras secundarias adoptadas

por el ADN como pueden ser la doble hélice A<sup>14, 15</sup> y la doble hélice Z,<sup>16, 17</sup> la triple hélice H,<sup>18,19</sup> three way-DNA<sup>20,21</sup> junction o el ADN cuádruple-G (Figura 11).



**Figura 11.** Diferentes estructuras secundarias del ADN **(a)** Doble hélice A (PDB id: 2ANA) **(b)** Doble hélice Z (PDB id: 2DCG) **(c)** Triple hélice (PDB id: 1BWG) **(d)** Cuádruple-G (PDB id: 1JPQ)

Asimismo, dentro de cada una de estas morfologías pueden existir distintas topologías que dependerán de las condiciones fisiológicas, y la secuencia y zona del genoma en la que se encuentren.

<sup>14</sup> McCall, M.; Brown, T.; Kennard, O. *J. Mol. Biol.* **1985**, *183*, 385-396.

<sup>15</sup> Lu, X.; Shakked, Z.; Olson, W. K. *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 819-840.

<sup>16</sup> Wang, A. H. J.; Quigley, G. J.; Kolpak, F. J.; Crawford, J. L.; Van Boom, J. H.; Van der Marel, G.; Rich, A. *Nature (London)* **1979**, *282*, 680-686.

<sup>17</sup> Rich, A.; Zhang, S. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 566-572.

<sup>18</sup> Frank-Kamenetskii, M. D.; Mirkin, S. M. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64*, 65-95.

<sup>19</sup> Vasquez, K. M.; Glazer, P. M. *Q. Rev. Biophys.* **2002**, *35*, 89-107.

<sup>20</sup> Shlyakhtenko, L. S.; Rekes, D.; Lindsay, S. M.; Kuttyavin, I.; Appella, E.; Harrington, R. E.; Lyubchenko, Y. L. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1994**, *11*, 1175-1189.

<sup>21</sup> Leontis, N. B.; Hills, M. T.; Piotta, M.; Malhotra, A.; Nussbaum, J.; Gorenstein, D. G. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1993**, *11*, 215-223.





## **2.2 ADN CUÁDRUPLE-G: Antecedentes y descripción estructural**

Cuarenta años antes del descubrimiento de la estructura de doble hélice del ADN, Bang observó que las disoluciones concentradas de ácidos nucleicos ricos en guanina presentaban propiedades físicas similares a las de un gel.<sup>25</sup>

Décadas más tarde, en 1962, Gellert, Lipset y Davies<sup>26</sup> estudiaron el comportamiento de disoluciones de monofosfatos de 3'- y 5'-guanina, similares a los estudiados previamente por Bang.<sup>25</sup> Los patrones de difracción de rayos X obtenidos mostraron ciertas similitudes a los obtenidos por Franklin y Wilkins para la doble hélice<sup>11</sup> (Figura 13). A la vista de estos resultados, Gellert predijo la existencia de fuertes interacciones de tipo Van der Waals e interacciones  $\pi$  entre los sistemas aromáticos, además de la unión entre los nucleótidos tipo fosfodiéster como se había descrito en el caso de la doble hélice-B.

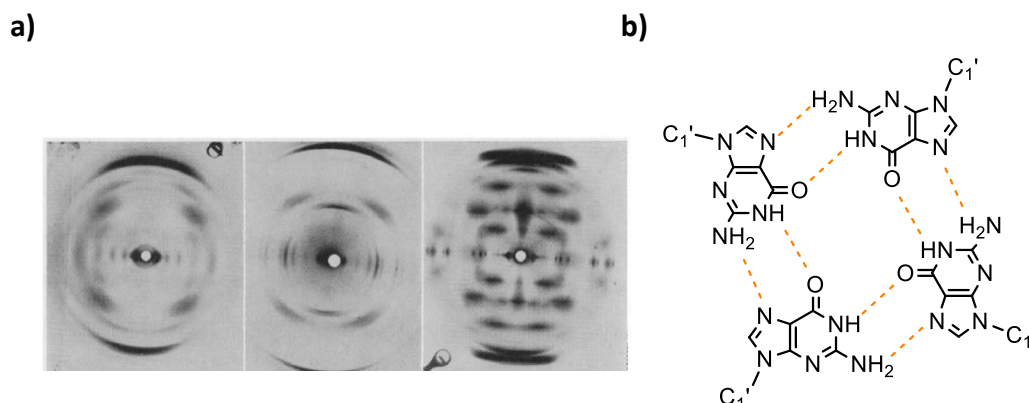
A diferencia de la estructura del ADN-B, Gellert y colaboradores propusieron una estructura basada en la autoasociación de cuatro guaninas en un mismo plano. Para proponer y justificar esta asociación entre las guaninas, tuvieron que asumir que los enlaces de hidrógenos establecidos no eran del tipo Watson-Crick sino los predichos por Donohue<sup>27</sup> en 1956. En dicho trabajo, Donohue explicaba la posibilidad de la autoasociación de los diferentes nucleótidos ya que si la asociación de las bases nitrogenadas fuese únicamente tipo Watson-Crick se debería asumir la existencia de la misma proporción de nucleótidos G-C y A-T.

---

<sup>25</sup> Bang, I. *Biochem. Z.* **1910**, 26, 293-311.

<sup>26</sup> Gellert, M. F.; Lipsett, M. N.; Davies, D. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1962**, 48, 2013-2018.

<sup>27</sup> Donohue, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1956**, 42, 60-65.



**Figura 13. (a) Patrones de difracción del cuádruple<sup>26</sup> (b) Autoasociación de guaninas**

Estas hipótesis fueron confirmadas por los trabajos realizados por Ralph, Connors y Khorana<sup>28</sup> en los cuales mostraban la asociación y alta estabilidad térmica que presentan los tri y tetra desoxirribonucleótidos de guanina. Estos estudios sugerían la existencia de estructuras secundarias alternativas a la doble hélice.

El interés por los tetrámeros de guanina creció cuando en la década de los 80, Blackburn y colaboradores observaron la presencia de este tipo de estructuras intramoleculares en el ADN telomérico.<sup>29</sup> Estos estudios pusieron de manifiesto la posibilidad de que la formación de estas estructuras en el telómero tuviese alguna función determinada en el mantenimiento de su longitud. Desde ese momento, el estudio de las estructuras secundarias de ADN basadas en tetrámeros de guanina, así como la relevancia biológica de ellas aumentó considerablemente.

Las secuencias de nucleótidos ricas en guaninas son capaces de asociarse en una estructura formada por cuatro cadenas en las que la estructura base son los cuartetos de guanina. Tanto en el caso del ADN cuádruple<sup>30</sup> (en adelante G4) como del ARN<sup>31</sup> se forman fácilmente en disolución generando una gran variedad de estructuras.<sup>32,33</sup>

<sup>28</sup> Ralph, R. K.; Connors, W. J.; Khorana, H. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 2265-2266.

<sup>29</sup> Henderson, E.; Hardin, C. C.; Walk, S. K.; Tinoco, I.; Blackburn, E. H. *Cell (Cambridge, Mass.)* **1987**, *51*, 899-908.

<sup>30</sup> Sen, D.; Gilbert, W. *Nature (London)* **1988**, *334*, 364-366.

<sup>31</sup> Kim, J.; Cheong, C.; Moore, P. B. *Nature (London)* **1991**, *351*, 331-332.

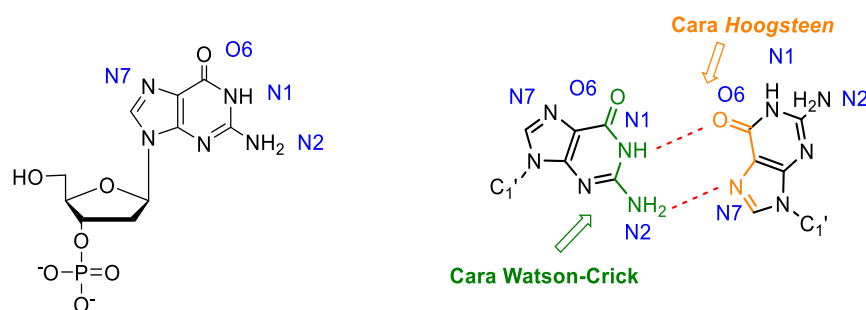
<sup>32</sup> Patel, D. J.; Phan, A. T.; Kuryavyi, V. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7429-7455.

<sup>33</sup> Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Patel, D. J. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 288-298.

La orientación de la hebra, la conformación de los enlaces glicosídicos (*syn* o *anti*) de las guanosinas que forman parte del cuarteto, y el tamaño y secuencia de los bucles que conectan los cuartetos de guanina contribuyen a la complejidad y diversidad estructural del cuádruple-G. Esta diversidad contrasta con la predecible estructura del ADN-B. Dicha complejidad estructural es la que ha despertado interés químico en el desarrollo de moléculas con capacidad de estabilizar el ADN G4.

Actualmente, se conocen más de 716.000 secuencias en el genoma humano con capacidad de formar estructuras de ADN cuádruple-G.<sup>4</sup> Entre ellas, encontramos el ADN telomérico, regiones promotoras de oncogenes y ARN mensajero (ARNm). Como consecuencia de ello, el ADN cuádruple se considera una diana para el estudio de diversos procesos biológicos a nivel celular, entre ellos los procesos asociados a la formación de tumores. Por lo tanto, conocer bien la estructura de los cuádruples, así como las condiciones fisiológicas en las que se forman, son esenciales para el diseño de nuevas moléculas capaces de unirse a dichas estructuras.

La estructura básica adoptada por los ácidos nucleicos con secuencias ricas en guaninas está basada en su autoasociación. Los enlaces de hidrógeno se forman utilizando las caras Watson-Crick y Hoogsteen<sup>34</sup> de las guaninas (Figura 14).



**Figura 14. (a)** Numeración del nucleótido guanosín monofosfato **(b)** autoasociación por enlace de hidrógeno

La asociación de cuatro guaninas del modo descrito en la figura 14, forma lo que se denomina tétrada, la cual se considera la estructura base del cuádruple-G. La tétrada es una unidad plana y cíclica estabilizada por ocho enlaces de hidrógeno (N1-O6 y N2-

<sup>34</sup> Hoogsteen, K. *Acta Crystallogr.* **1963**, *16*, 907-916.

N7) en los cuales se utilizan ambas caras de la base nitrogenada (Watson-Crick y Hoogsteen). Los oxígenos de las guaninas (O6) apuntan al centro de la estructura formando un canal interno con potencial negativo que será estabilizado por la presencia de cationes metálicos que se intercalarán en el canal (Figura 15). Por último, las interacciones  $\pi$ - $\pi$  establecidas entre las diferentes tétradas de cada estructura contribuirán en la estabilización del cuádruple.

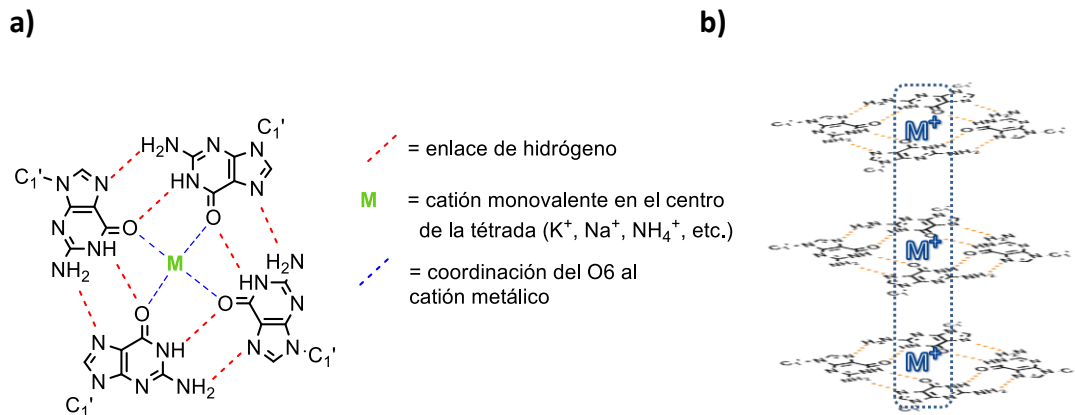


Figura 15. (a) Tétrada de guaninas (b) Apilamiento de las tétradas y canal iónico

### 2.2.1 Factores estabilizadores del cuádruple: interacciones $\pi$ - $\pi$

Del mismo modo que ocurre en otras estructuras secundarias de ácidos nucleicos, la estabilización por interacciones de apilamiento entre las bases nitrogenadas es fundamental, produciéndose en este caso la interacción  $\pi$ - $\pi$  entre guaninas de tétradas contiguas. Debido a que el apilamiento de las bases es uno de los factores que más estabilización aporta, el incremento del número de tétradas aumenta la estabilidad global del cuádruple. Normalmente, el número de tétradas es igual al número de guaninas consecutivas en la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, en la secuencia telomérica (TTAGGG)<sub>n</sub>, el número de tétradas por estructura son tres (Figura 16a). La formación de estructuras de mayor orden, normalmente dímeros, a través del apilamiento de las tétradas externas, proporciona una estabilización adicional (Figura 16b).

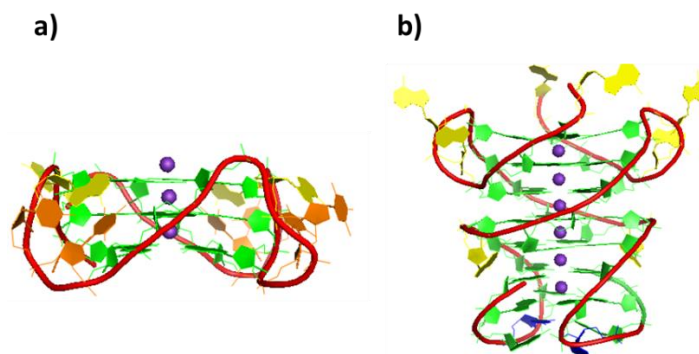


Figura 16. (a) Cuádruple telomérico (PDB id: 1KF1) (b) Dímero (PDB id: 4H29)

### 2.2.2 Factores estabilizadores del cuádruple: catión metálico

Pinnaivaia y colaboradores observaron el primer indicio de la formación de cavidades aniónicas en el interior de estructuras del tipo cuádruple-G.<sup>35</sup> Las cavidades podían formar selectivamente complejos con cationes lo suficientemente pequeños para introducirse en la cavidad, pero lo bastante grandes como para establecer interacciones con los oxígenos de forma análoga a la unión entre los metales alcalinos con los éteres corona.<sup>36</sup>

Más tarde, tras el descubrimiento de la existencia de cuádruple-G en la secuencia telomérica de numerosos organismos,<sup>29</sup> Williamson y colaboradores propusieron la primera estructura de cuádruple-G.<sup>37</sup> En estos estudios se describe la importancia de los cationes metálicos para la formación del cuádruple, su estequiometría y estabilidad. Se postuló que el  $\text{Li}^+$  es demasiado pequeño para unirse en el centro de la téttrada mientras que el  $\text{Na}^+$  encaja perfectamente. Otros cationes como el  $\text{K}^+$  y  $\text{Cs}^+$  se insertan entre los planos de dos téttradas contiguas.<sup>35</sup> Recogiendo los datos de numerosos estudios, una

<sup>35</sup> Pinnaivaia, T. J.; Marshall, C. L.; Mettler, C. M.; Fisk, C. L.; Miles, H. T.; Becker, E. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 3625-3627.

<sup>36</sup> Frensdorff, H. K. *J. Amer. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 600-606.

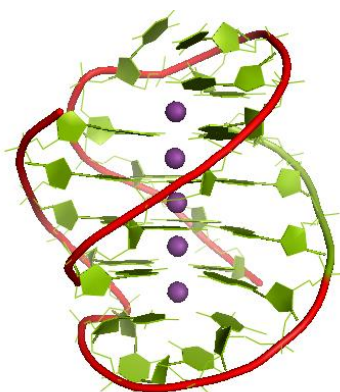
<sup>37</sup> Williamson, J. R.; Raghuraman, M. K.; Cech, T. R. *Cell (Cambridge, Mass.)* **1989**, *59*, 871-880.

estimación sobre la estabilización del cuádruple-G por efecto de los cationes sigue la siguiente tendencia:  $\text{Sr}^{2+} > \text{K}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{NH}_4^+, \text{Na}^+, \text{Rb}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Cs}^+$ .<sup>38,39,40</sup>

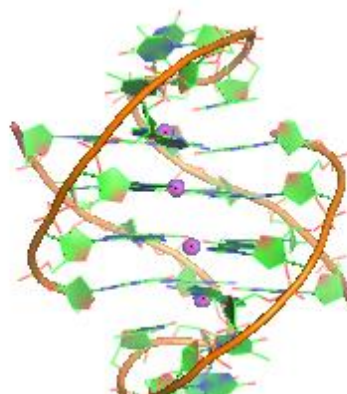
De los cationes mencionados previamente, los que se consideran más relevantes, fisiológicamente hablando, son el  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ . De entre estos dos cationes, hay que destacar el  $\text{K}^+$  ya que la concentración de estos iones en condiciones fisiológicas dentro del núcleo de la célula ( $\approx 140 \text{ mM}$ ) es superior a la del  $\text{Na}^+$  ( $\approx 10 \text{ mM}$ ).

La posición de estos cationes en la téttrada depende de su radio iónico. En el caso de los cationes  $\text{Na}^+$  ( $0.95 \text{ \AA}$ ), esta posición es más variable ya que al poseer un tamaño menor pueden insertarse mejor en el plano de la téttrada (Figura 17). En el caso del  $\text{K}^+$  ( $1.33 \text{ \AA}$ ), de mayor tamaño, se sitúan a una distancia equidistante entre dos téttradas, estableciendo interacción con ocho oxígenos simultáneamente. Por este motivo, la estructura formada por iones  $\text{K}^+$  es la preferida, además de por su menor energía de deshidratación.<sup>41</sup>

a)



b)



**Figura 17. (a) Cuádruple en condiciones iónicas de  $\text{K}^+$  (PDB id: IJPQ) (b) Cuádruple en condiciones iónicas de  $\text{Na}^+$  (PDB id: IJB7)**

---

<sup>38</sup> Venczel, E. A.; Sen, D. *Biochemistry* **1993**, *32*, 6220-6228.

<sup>39</sup> Kankia, B. I.; Marky, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10799-10804.

<sup>40</sup> Włodarczyk, A.; Grzybowski, P.; Patkowski, A.; Dobek, A. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 3594-3605.

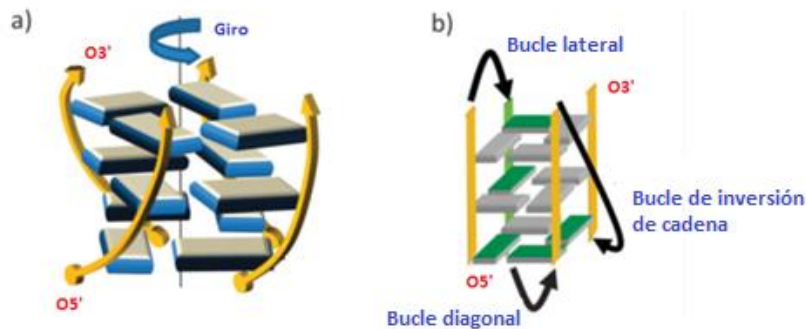
<sup>41</sup> Hud, N. V.; Plavec, J. *Quadruplex Nucleic Acids, 1st edition*, **2006**, ISBN 978 0 85404 374 3, 100-130, Editorial Springer.

### 2.2.3 Topologías

Los G4 se pueden definir como estructuras formadas por cuatro cadenas y al menos dos tétradas de guanina. Estas estructuras no canónicas muestran un eje helicoidal hacia la derecha al igual que el ADN dúplex, con un giro de  $30^\circ$  y un diámetro de 25 Å (Figura 18a). Otra característica estructural es que el esqueleto de fosfatos genera cuatro surcos que acomodan de forma bien definida a moléculas de agua (Figura 18).

Una de las principales características que diferencia la estructura del cuádruple de la del ADN-B es su diversidad estructural. Dicha diversidad estructural viene determinada por los siguientes factores: número de tétradas (mínimo dos), número y tipo de bucles, número de hebras que lo forman y sentido de dichas hebras (paralelo o antiparalelo).

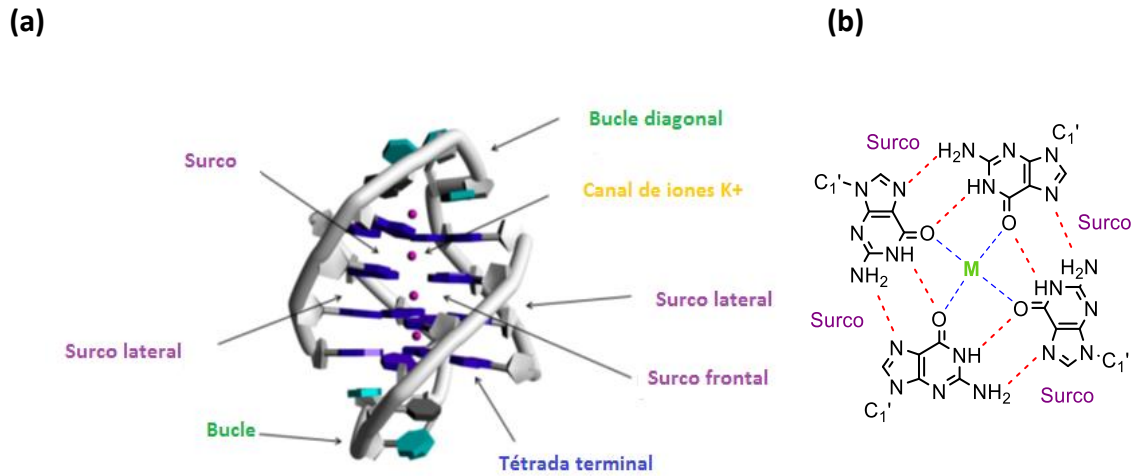
El factor que más variabilidad estructural aporta es la tipología de los bucles. Están formados por las bases nitrogenadas que se encuentran desemparejadas en la estructura. A grandes rasgos, existen tres tipos de bucles para esas estructuras:<sup>42</sup> **a)** bucles laterales, que unen esqueletos antiparalelos en la misma tétrada; **b)** bucles diagonales, que unen hebras antiparalelas en la misma superficie; **c)** bucles de inversión de cadena, que unen hebras paralelas adyacentes en tétradas opuestas (Figura 18b y Figura 19).



**Figura 18. (a)** Representación del giro en la estructura **(b)** Representación de los bucles (figura modificada a partir de la referencia 3)

<sup>42</sup> Esposito, V.; Galeone, A.; Mayol, L.; Oliviero, G.; Virgilio, A.; Randazzo, L. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1155-1159

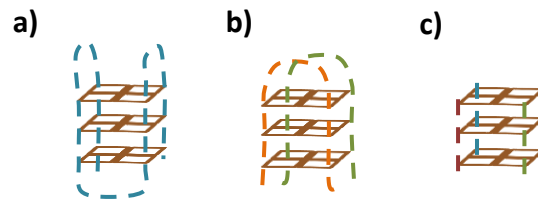




**Figura 19.** (a) Representación gráfica del cuádruple con algunas de sus características estructurales marcadas <sup>43</sup> (PDB id: 1JPQ) (b) Localización de los surcos con respecto a la tétrada

Otro de los factores que aportan diversidad estructural es el número de hebras de oligonucleótido que forman la estructura. Por definición, el cuádruple está formado por cuatro cadenas de nucleótidos. Sin embargo, estas cadenas pueden pertenecer a la misma hebra del oligonucleótido o a distintas. Como se recoge en la figura 20, en términos generales los cuádruples pueden estar formados por:

- a) una hebra plegada tres veces sobre sí misma (intramolecular).
- b) dos hebras, las cuales suelen ser idénticas (cuádruple bimolecular) y plegadas sobre sí mismas una vez.
- c) tres o cuatro hebras (cuádruple tetramolecular)

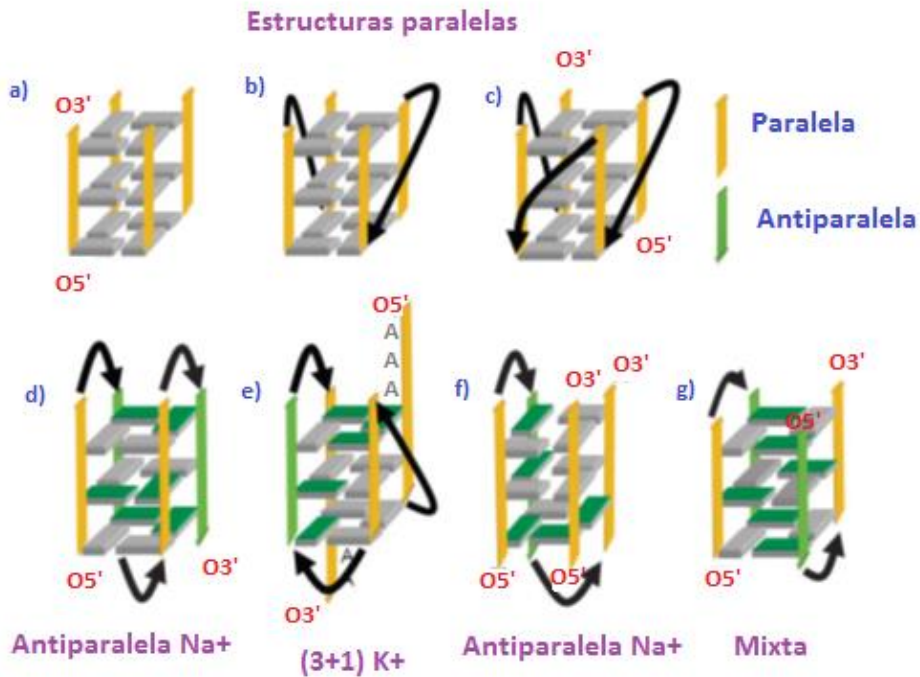


**Figura 20.** Estructuras secundarias de cuádruples (a) mono-, (b) bi- y (c) tetramoleculares con tres tétradas de guaninas. Las diferentes cadenas están marcadas con distintos colores (rojo, naranja, verde y azul).

<sup>43</sup> Neidle, S. J. *Med. Chem.* **2016**, *59*, 5987-6011.

Por otro lado, las hebras pueden disponerse de forma paralela, antiparalela o mixta (Figura 21). Esta disposición depende del número de bucles formados que puede variar de uno a cuatro y, además, de la forma que adoptan dependiendo del tipo de conexión entre las hebras (Figura 18b).

Asimismo, se ha observado que la formación de una topología u otra es dependiente del catión presente en el medio ( $K^+$ ,  $Na^+$  o  $NH_4^+$ ).<sup>44,45</sup> Un ejemplo de la complejidad estructural de los cuádruples son las diferentes topologías adoptadas por la secuencia telomérica dependiendo del catión presente en el medio ( $Na^+$  o  $K^+$ ) y de su concentración (Figura 21). Actualmente, para una única secuencia, la telomérica, se conocen siete topologías diferentes.<sup>3</sup>



**Figura 21.** Topologías adoptadas por la secuencia telomérica (figura modificada de la referencia 3)

<sup>44</sup> Crnugelj, M.; Hud, N. V.; Plavec, J. J. *Mol. Biol.* **2002**, *320*, 911-924.

<sup>45</sup> Crnugelj, M.; Sket, P.; Plavec, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7866-7871.

## 2.3 RELEVANCIA BIOLÓGICA DEL CUÁDRUPLE-G

La localización de las regiones con alto contenido en guanina en el genoma humano no es aleatoria.<sup>46</sup> Dichas secuencias se localizan en regiones específicas del genoma que poseen una función determinada, de relevante importancia biológica y están altamente conservadas entre las diferentes especies.<sup>47</sup> Estas regiones con alto contenido en guaninas han sido detectadas, sobre todo, en el genoma de diversas especies de mamíferos. Además, se han detectado en el ADN de organismos menos complejos (bacterias<sup>48</sup> y virus<sup>49,50,51</sup>) y en ARN humano. Los telómeros, además de ser la zona con la mayor abundancia de secuencia poliG, fueron una de las primeras regiones del genoma en las que se detectaron dichas secuencias. En el caso de los humanos estas secuencias están formadas de 5 a 10000 pares de bases y la secuencia repetitiva es TTAGGG. Otra de las regiones con alto contenido en guanina son las regiones próximas a los promotores de oncogenes, lo que indica la importancia de estas secuencias en la expresión génica. Algo más interesante y que ha sido observado más recientemente, es que en el 90% de los orígenes de replicación del ADN, la densidad de secuencias poliG es elevada y estas secuencias están próximas a orígenes de replicación que son usados con elevada frecuencia.<sup>52,53,54</sup>

Con respecto a ARN, ha sido determinado que, en aproximadamente 3000 genes humanos, las secuencias poliG están presentes en el extremo 5'UTR del ARN mensajero (ARNm), lo que podría reprimir o alterar el proceso de traducción.<sup>55,56</sup> Una de estas regiones donde se ha identificado secuencias poliG es en TERRA, el ARNm producto de la transcripción de la secuencia de ADN telomérico<sup>57</sup> (Figura 22).

---

<sup>46</sup> Rhodes, D.; Lipps, H. J. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 8627-8637.

<sup>47</sup> Konig, S. L. B.; Evans, A. C.; Huppert, J. L. *Biomol. Concepts* **2010**, *1*, 197-213.

<sup>48</sup> Beaudoin, J.; Perreault, J. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 5898-5911.

<sup>49</sup> Sundquist, W. I.; Heaphy, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 3393-3397.

<sup>50</sup> Norseen, J.; Johnson, F. B.; Lieberman, P. M. *J. Virol.* **2009**, *83*, 10336-10346.

<sup>51</sup> Tuesuwan, B.; Kern, J. T.; Thomas, P. W.; Rodriguez, M.; Li, J.; David, W. M.; Kerwin, S. M. *Biochemistry* **2008**, *47*, 1896-1909.

<sup>52</sup> Cayrou, C.; Gregoire, D.; Coulombe, P.; Danis, E.; Mechali, M. *Methods (Amsterdam, Neth.)* **2012**, *57*, 158-164.

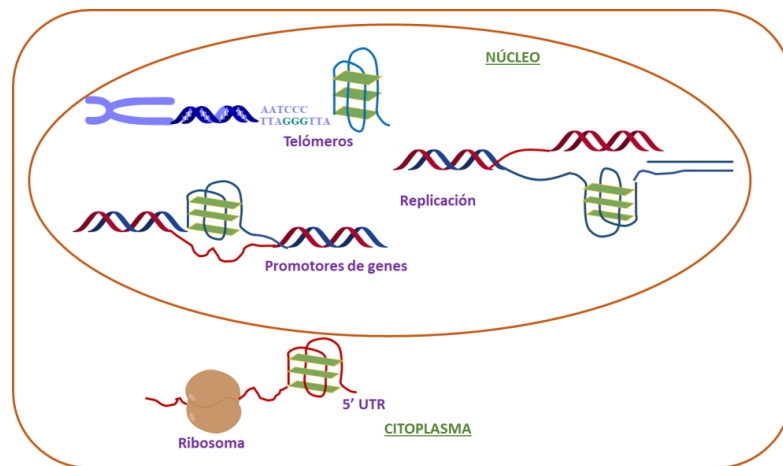
<sup>53</sup> Cayrou, C.; Coulombe, P.; Vigneron, A.; Stanojic, S.; Ganier, O.; Peiffer, I.; Rivals, E.; Puy, A.; Laurent-Chabalier, S.; Desprat, R.; Mechali, M. *Genome Res.* **2011**, *21*, 1438-1449.

<sup>54</sup> Besnard, E.; Babled, A.; Lapasset, L.; Milhavet, O.; Parrinello, H.; Dantec, C.; Marin, J.; Lemaitre, J. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 837-844.

<sup>55</sup> Bugaut, A.; Balasubramanian, S. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 4727-4741.

<sup>56</sup> Beaudoin, J.; Perreault, J. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 5898-5911.

<sup>57</sup> Xu, Y.; Suzuki, Y.; Ito, K.; Komiyama, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 14579-14584.



**Figura 22.** Representación de los distintos procesos celulares afectados por la formación del cuádruple

Todas estas observaciones sobre la presencia y conservación de las secuencias poliG en regiones relevantes del genoma han dado pie a cuestionarse el papel de la formación de las estructuras de cuádruple-G. Por lo tanto, en lo que se centran actualmente los estudios en este campo de investigación es en la detección *in vivo* los diferentes cuádruples-G, para poder determinar sus distintas funciones celulares.

A continuación, se explicarán cada uno de los procesos mencionados y las consecuencias biológicas que producen.

### 2.3.1 Cuádruple-G telomérico y telomerasa

Los telómeros son los extremos de los cromosomas y están formados por regiones de ADN no codificante. Estas regiones están formadas por 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. Por lo tanto, los telómeros son imprescindibles para la protección de la información genética, y además juegan un papel muy importante en el envejecimiento celular.

En las células somáticas, los telómeros se acortan progresivamente provocando así el envejecimiento celular. En el punto máximo de acortamiento de los telómeros, la célula adquiere un estado denominado senescencia celular por el cual deja de dividirse.

La senescencia celular es el fenómeno por el cual las células diploides normales dejan de dividirse como consecuencia del acortamiento de los telómeros hasta lo que se denomina límite Hayfflick.<sup>58</sup> Este estado de las células es normalmente irreversible, y además generalmente conduce a las células hacia la apoptosis.<sup>59</sup>

Los telómeros humanos están formados por la repetición de una secuencia de seis nucleótidos 5'-(TTAGGG)<sub>n</sub>-3'. La longitud habitual del ADN telomérico oscila de 3 a 15 kilobases en forma de doble cadena a excepción de los últimos 100-200 nucleótidos en el extremo 3' que se encuentran en forma de ADN de cadena sencilla. Es en esta zona del telómero de ADN cadena de sencilla donde se da la formación de las estructuras de cuádruple-G.<sup>4,59</sup>

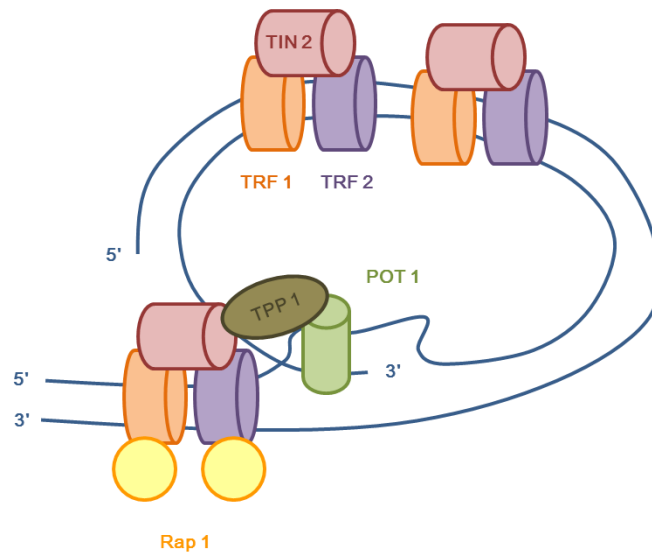
En las células vivas, los telómeros están rodeados de una gran variedad de proteínas entre las que se encuentra el complejo "shelterin".<sup>60</sup> Este complejo está formado por seis proteínas (Figura 23) y, entre otras funciones, permite a la célula distinguir el ADN telomérico de zonas de ADN celular que hay que reparar. De lo contrario, el ADN telomérico sería modificado de forma errónea.

---

<sup>58</sup> Hayflick, L.; Moorhead, P. S. *Exp Cell Res* **1961**, *25*, 585-621.

<sup>59</sup> Neidle, S. *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*, 1<sup>st</sup> edition, **2012**, ISBN 978 0 12 375138 6, Editorial Elsevier.

<sup>60</sup> De Lange, T. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 2100-2110.



**Figura 23.** 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.<sup>61</sup>

- **La telomerasa**

El interés sobre el ADN cuádruple-G telomérico surgió cuando en el año 1985 Greider y 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 secuencias repetitivas de ADN al extremo del mismo.<sup>62</sup> Posteriormente, fue aislado el complejo enzimático responsable del alargamiento del telómero y al que se denominó telomerasa.

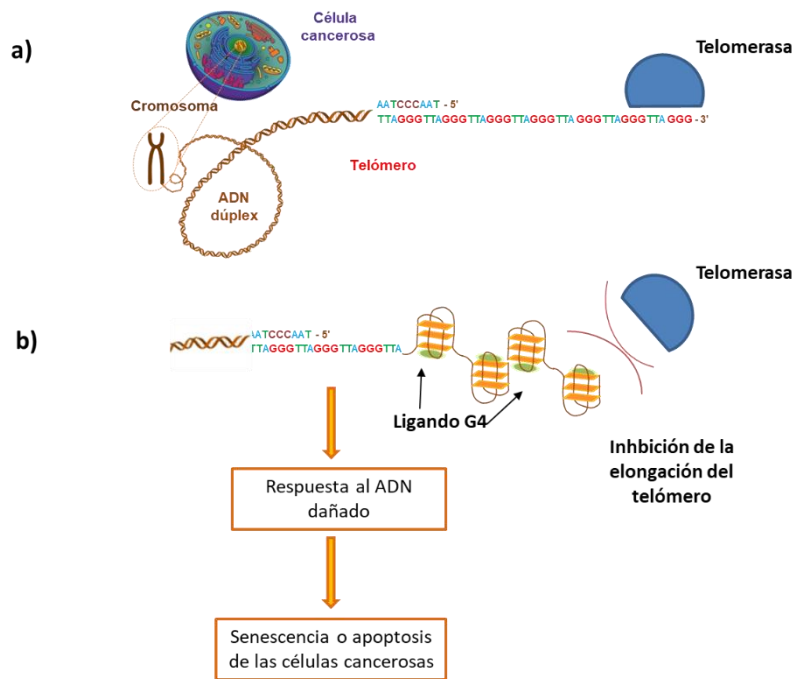
El complejo ribonucleoproteico de la telomerasa está formado por dos subunidades principales: un componente proteico con la actividad de transcriptasa inversa (hTERT – *human Telomerase Reverse Transcriptase*) y un componente de ARN (hTR – *human Telomerase RNA component*). La subunidad hTERT, es la subunidad catalítica de la telomerasa y es la encargada de ensamblar las secuencias de desoxirribonucleótidos al extremo 3' del telómero. Para que esto ocurra es necesaria la subunidad hTR que es una plantilla de ARN complementario y sirve como molde para

<sup>61</sup> Tesis doctoral Katerina Duskova, UAH (2016).

<sup>62</sup> Greider, C. V.; Blackburn, E. H. *Cell* **1985**, *43*, 405-413.

sintetizar la secuencia telomérica repetitiva. Solo así puede ser eficiente la adición de los nucleótidos (Figura 4).<sup>63</sup>

La telomerasa está sobreexpresada en el 85-90% de las células cancerosas,<sup>4,8</sup> lo que impide que estas alcancen la etapa de senescencia o apoptosis. Por ello, la telomerasa es uno de los elementos claves en la "inmortalización de las células" y, además, es uno de los factores esenciales para que las células somáticas se conviertan en células cancerosas e "inmortales".<sup>64</sup>



**Figura 4. (a)** Adición al extremo 3' de la secuencia TTAGGG por parte de la telomerasa. **(b)** Inhibición de la actividad de la telomerasa mediante la estabilización del ADN telomérico

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

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

<sup>64</sup> Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell (Cambridge, MA, U. S.)* 2011, 144, 646-674.

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 (Figura 4b). Por otra parte, la propia región telomérica también es considerada como diana terapéutica en la actualidad, y no solo se persigue la inhibición de la telomerasa, sino que existe un enorme interés en el diseño de compuestos dirigidos al telómero.

### **2.3.2 Transcripción y replicación**

- **Regiones promotoras**

Las regiones promotoras de genes están implicadas en procesos de proliferación y crecimiento celular.<sup>65,66</sup> Aproximadamente el 50% de los genes humanos contienen regiones ricas en G/C y más deficientes en A/T. Entre otras, codifican proteínas que intervienen en procesos de crecimiento celular, previenen la diferenciación celular o están implicadas en procesos de apoptosis. Además, la formación de cuádruple-G es más elevada en oncogenes que si lo comparamos con genes supresores de tumores<sup>67</sup>(ej.: p53).

Durante el proceso de transcripción es necesario que el ADN dúplex se abra perdiendo su estructura de doble hélice. Es en este momento cuando es viable la formación de estructuras de cuádruples. La proximidad de las secuencias de poliG en torno a los lugares de inicio de la transcripción indica que las estructuras de ADN cuádruple-G tienen un papel en la regulación de la transcripción, sin embargo, actualmente es difícil predecir los efectos biológicos que causa. Se han localizado secuencias poliG delante y detrás de los puntos de inicio de la transcripción, así como en intrones. Se espera que las distintas localizaciones tengan distintos efectos biológicos, aunque actualmente no se tengan suficientes datos para predecirlo.

El ADN dúplex se despliega justo antes del proceso de transcripción. La hebra sencilla, rica en guaninas, se pliega formando la estructura de cuádruple-G que puede ser acompañada por la formación del motivo-i en la hebra complementaria rica en

---

<sup>65</sup> Yang, D.; Okamoto, K. *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 619-646.

<sup>66</sup> Rustighi, A.; Tessari, M. A.; Vascotto, F.; Sgarra, R.; Giancotti, V.; Manfioletti, G. *Biochemistry* **2002**, *41*, 1229-1240.

<sup>67</sup> Eddy, J.; Maizels, N. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3887-3896.



citocinas.<sup>68</sup> De este modo, se impide la unión del factor de transcripción al promotor inhibiendo la transcripción o alterándola (Figura 24).

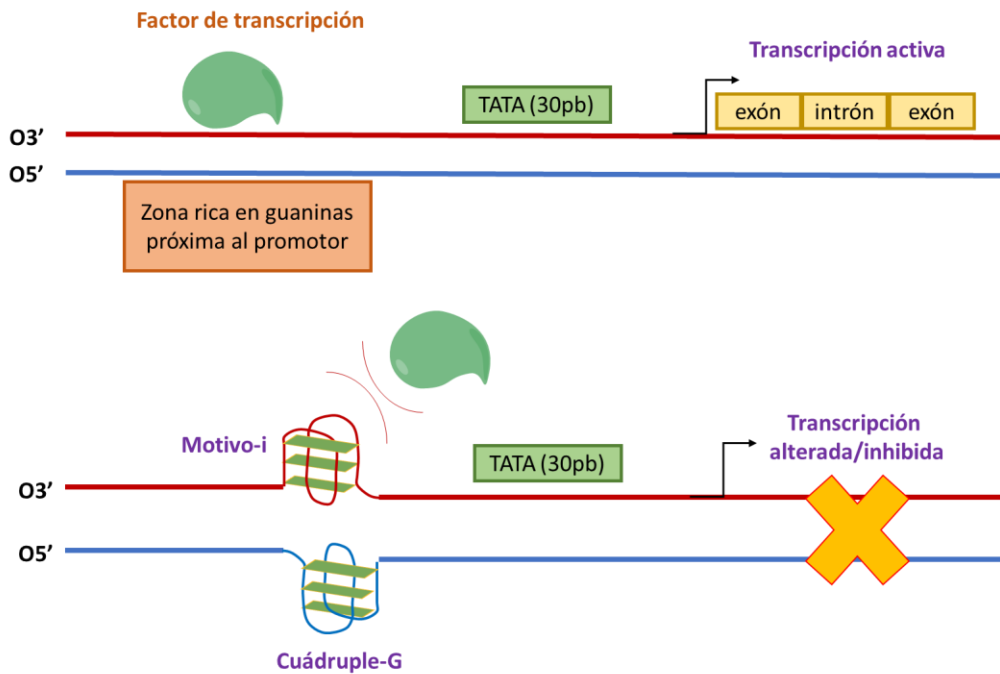


Figura 24. Regulación transcripcional a través de la estabilización y desestabilización de cuádruple-G y del motivo-i

- **Oncogenes**

Se ha prestado especial interés en los promotores contiguos a proto-oncogenes ya que codifican proteínas involucradas en el crecimiento y división celular u otros procesos celulares que se ven afectados en las células cancerosas. El ejemplo más estudiado es el c-myc<sup>69</sup> donde se identificó una región rica en guaninas situada “aguas arriba” de dos promotores. Uno de los estudios realizados para comprobar que la formación de estructuras cuádruples en regiones próximas a promotores de oncogenes se realizó adicionando una molécula estabilizadora del ADN cuádruple-G (TMPyP4). De

<sup>68</sup> Brooks, T. A.; Kendrick, S.; Hurley, L. *Febs J.* **2010**, 277, 3459-3469.

<sup>69</sup> Simonsson, T.; Pecinka, P.; Kubista, M. *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1167-1172.

este modo, se observó una reducción de la actividad transcripcional, corroborando la hipótesis.<sup>70</sup>

Diferentes estudios han demostrado la existencia de estructuras de cuádruple-G en regiones próximas a otros promotores de proto-oncogenes. Algunos ejemplos significativos son: c-kit,<sup>71,72</sup> k-ras,<sup>73</sup> hTERT,<sup>74,75</sup> Bcl-2,<sup>76</sup> VEGF,<sup>77</sup> HIF-1,<sup>78</sup> c-myc,<sup>79</sup> PDGF-A,<sup>80</sup> siendo el c-myc el más estudiado de todos ellos.

El estudio de la inhibición de la expresión de estos oncogenes a través de la estabilización del cuádruple es importante ya que todos ellos se ven involucrados en procesos cancerosos. Según propusieron Hanahan y Weinberg<sup>64,81</sup> existen seis rasgos distintivos en estos procesos: autosuficiencia para las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de no crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis, potencial replicativo ilimitado, invasión de los tejidos, y metástasis. Cada uno de estos procesos está relacionado con una o varias regiones de promotores de oncogenes capaces de formar estructuras de cuádruple-G (Figura 25).

---

<sup>70</sup> Seenisamy, J.; Rezler, E. M.; Powell, T. J.; Tye, D.; Gokhale, V.; Joshi, C. S.; Siddiqui-Jain, A.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8702-8709.

<sup>71</sup> Rankin, S.; Reszka, A. P.; Huppert, J.; Zloh, M.; Parkinson, G. N.; Todd, A. K.; Ladame, S.; Balasubramanian, S.; Neidle, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10584-10589.

<sup>72</sup> Fernando, H.; Reszka, A. P.; Huppert, J.; Ladame, S.; Rankin, S.; Venkitaraman, A. R.; Neidle, S.; Balasubramanian, S. *Biochemistry* **2006**, *45*, 7854-7860.

<sup>73</sup> Cogoi, S.; Xodo, L. E. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2536-2549.

<sup>74</sup> Palumbo, S. M. L.; Ebbinghaus, S. W.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10878-10891.

<sup>75</sup> Lim, K. W.; Lacroix, L.; Yue, D. J. E.; Lim, J. K. C.; Lim, J. M. W.; Phan, A. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12331-12342.

<sup>76</sup> Dai, J.; Chen, D.; Jones, R. A.; Hurley, L. H.; Yang, D. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5133-5144.

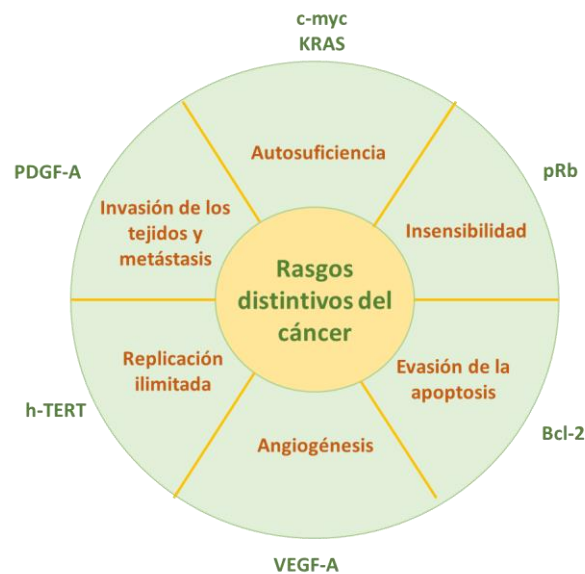
<sup>77</sup> Sun, D.; Guo, K.; Rusche, J. J.; Hurley, L. H. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6070-6080.

<sup>78</sup> De Armond, R.; Wood, S.; Sun, D.; Hurley, L. H.; Ebbinghaus, S. W. *Biochemistry* **2005**, *44*, 16341-16350.

<sup>79</sup> Palumbo, S. M. L.; Memmott, R. M.; Uribe, D. J.; Krotova-Khan, Y.; Hurley, L. H.; Ebbinghaus, S. W. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1755-1769.

<sup>80</sup> Qin, Y.; Rezler, E. M.; Gokhale, V.; Sun, D.; Hurley, L. H. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7698-7713.

<sup>81</sup> Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell (Cambridge, Mass.)* **2000**, *100*, 57-70.



**Figura 25.** Rasgos distintivos de los procesos cancerosos

A continuación, se enumeran algunos de estos promotores y los procesos en los que están involucrados.

**a) c-myc:** Es el promotor más estudiado en relación con la formación de estructuras de ADN cuádruple. Es un factor de transcripción que juega un papel esencial en el control del crecimiento celular, así como en los procesos de inducción de la apoptosis. La sobreexpresión de c-myc está relacionada con gran número de carcinomas (colon, próstata, pulmón, osteosarcomas o leucemia, entre otros).

**b) Bcl-2:** Este promotor se encarga de codificar una proteína de membrana mitocondrial que produce la inhibición de la apoptosis celular.

**c) c-KIT:** La proteína c-KIT es un receptor de tirosín quinasa.

**d) VEGF-A:** La proteína codificada por este factor de transcripción induce el crecimiento de las células endoteliales y está implicado en los procesos de angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos).

**d) h-TERT:** Este promotor regula la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa. Esta mutado en una gran variedad de cánceres humanos, produciendo la sobreexpresión de la telomerasa.

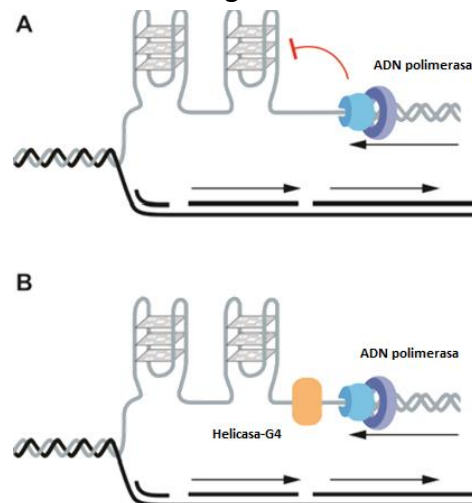
**e) K-RAS:** La proteína codificada por este proto-oncogén participa en vías de señalización celular, crecimiento e inhibición de apoptosis.

La interacción selectiva de pequeñas moléculas capaces de estabilizar las estructuras del cuádruple puede modular la expresión de los genes codificados por las secuencias promotoras y, como consecuencia, modificar la respuesta biológica.

### 2.3.3 Replicación e inestabilidad genómica

El proceso de la replicación del ADN da opciones a la formación de estructuras cuádruples ya que transitoriamente el ADN se despliega generándose dos hebras de ADN sencillo. En principio esto podría suponer el estancamiento de la replicación. Sin embargo, este problema se ve resuelto con la actuación de las helicasas que desestabilizan los cuádruples y permiten que la ADN polimerasa continúe con el proceso de replicación (Figura 26).

La ausencia de helicasas o una mutación en estas impide el desplegamiento de los G4 durante la replicación y, como consecuencia de ello, se produce un paro en la replicación, daño en el ADN e inestabilidad genómica.



**Figura 26.** Cuádruple-G y replicación (Figura modificada a partir de la referencia 46) **(a)** La actividad de la ADN polimerasa se ve bloqueada por la formación de estructuras cuádruples **(b)** Las helicasas desestabilizan el cuádruple permitiendo a la polimerasa continuar con su actividad.

Por lo tanto, la estabilización del cuádruple-G en aquellas patologías en las cuales las helicasas presenten alguna mutación que les impida ejercer su función, podría conducir a inestabilidad genómica.

- **Orígenes de replicación**

Recientemente los métodos desarrollados para la identificación de los orígenes de replicación mostraron un nuevo papel de los G4 en la replicación del ADN. Estos análisis muestran que las secuencias ricas en guaninas<sup>82,83,84</sup> son muy abundantes en los orígenes de replicación de células de ratón y humanas. Alrededor del 80% de los orígenes se superponen con secuencias poliG. Un estudio del genoma detectó la existencia de aproximadamente 80.000 orígenes de replicación en cinco líneas celulares humanas diferentes y, además, determinó que no todas las secuencias poliG se superponen con un origen de replicación, es decir, en ocasiones se localizan antes o después del origen. Esto sugiere que los cuádruples pueden ser determinantes para el establecimiento de los orígenes de replicación, aunque no son el único factor.<sup>85</sup> El hallazgo de que los G4s desempeñan un papel positivo en la iniciación de la replicación fue una sorpresa, ya que, como se ha visto en el apartado anterior, los cuádruples se consideraron generalmente como un impedimento para la progresión de las horquillas de replicación.

Será importante determinar si los G4s con alta estabilidad térmica tienen más probabilidades de estar implicados en el control de los orígenes de la replicación. La función específica de los cuádruples en los orígenes de replicación sigue siendo poco clara. Otro de los campos a estudiar es la determinación de cómo y cuándo los G4s actúan durante la activación del origen. Se sugiere que la mayoría de los cuádruples adyacentes al origen se pliegan en el momento de la activación de origen y funcionan como barreras de replicación transitorias *in vivo*. Será importante determinar si este

---

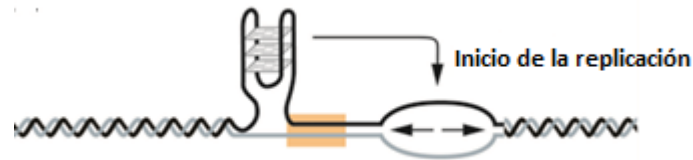
<sup>82</sup> Cayrou, C.; Coulombe, P.; Puy, A.; Rialle, S.; Kaplan, N.; Segal, E.; Mechali, M. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 658-667.

<sup>83</sup> Cayrou, C.; Coulombe, P.; Vigneron, A.; Stanojic, S.; Ganier, O.; Peiffer, I.; Rivals, E.; Puy, A.; Laurent-Chabalier, S.; Desprat, R.; Mechali, M. *Genome Res.* **2011**, *21*, 1438-1449.

<sup>84</sup> Besnard, E.; Babled, A.; Lapasset, L.; Milhavet, O.; Parrinello, H.; Dantec, C.; Marin, J.; Lemaitre, J. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19*, 837-844.

<sup>85</sup> Picard, F.; Cadoret, J.; Audit, B.; Arneodo, A.; Alberti, A.; Battail, C.; Duret, L.; Prioleau, M. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004282/1-e1004282/19, 19.

plegado precede a la activación del origen o simplemente se produce de manera pasiva cuando la doble hélice se abre en el origen.

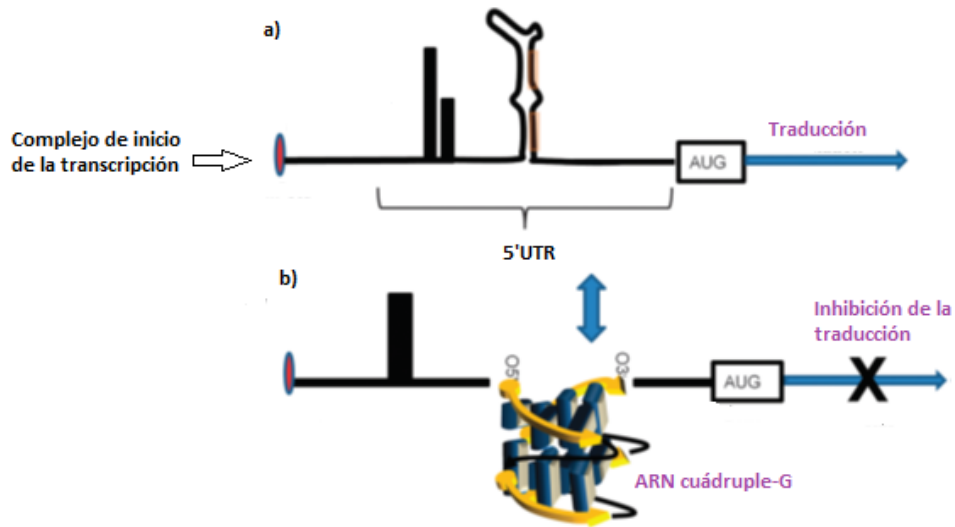


*Figura 27. Cuádruple-G y orígenes de replicación (Figura modificada a partir de la referencia 46)*

### **2.3.4 Traducción**

Las secuencias ricas en guaninas no solo están presentes en el ADN, sino que también pueden formarse en fragmentos de ARN. El descubrimiento de la formación de cuádruples en secuencias de ARNm de muchos genes humanos ha suscitado mucho interés. Se encuentran en el extremo 5' de las regiones no traducidas (5'UTR). Algunos de los ejemplos son BCL-2, n-RAS, el receptor del estrógeno humano  $\alpha$ , etc.

Existen estudios que demuestran que la formación de G4 en el extremo 5'UTR está involucrada en la regulación post-transcripcional, aunque su función específica dependerá de la posición en la que se encuentren dentro del 5'UTR (Figura 28).



**Figura 28.** Cuádruple-G y orígenes de replicación (figura modificada a partir de la referencia 3)

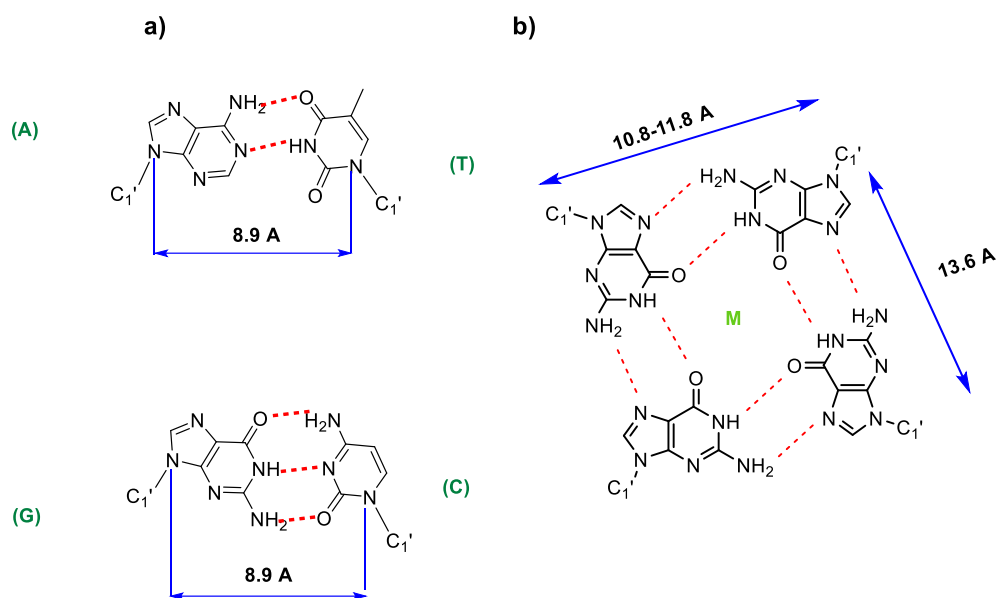
Una de las secuencias de ARN más estudiadas es la secuencia TERRA. Dicha secuencia proviene de la transcripción de la secuencia telomérica lo que permite un correcto mantenimiento de la longitud de los telómeros y de su función. Además, se ha demostrado que las secuencias TERRA son capaces de regular la actividad de la telomerasa uniéndose a la subunidad hTR por complementariedad de bases.

## 2.4 LIGANDOS DE CUÁDRUPLE-G

### 2.4.1 Modos de unión al ADN Cuádruple-G

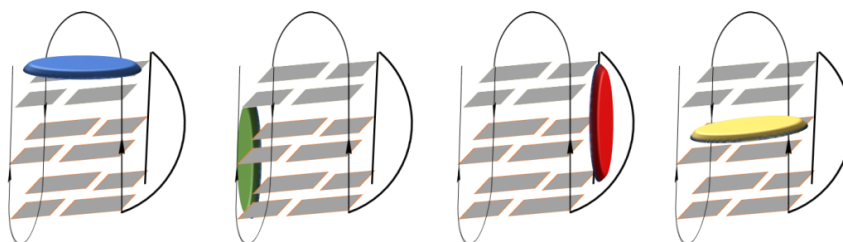
Uno de los principales objetivos en el diseño de moléculas capaces de interactuar y estabilizar el ADN cuádruple es minimizar la afinidad con respecto al ADN dúplex, que es el que se encuentra en mayores proporciones en el medio celular. Uno de los parámetros a considerar es el tamaño de ambas estructuras. La superficie de la tétrada del cuádruple es prácticamente dos veces más grande que la superficie de los

pares de bases en la doble hélice (Figura 29).<sup>86</sup> Por lo tanto, aquellos ligandos con una superficie capaz de estabilizar el cuádruple serán demasiado grandes para interactuar, preferentemente por intercalación, con el ADN dúplex.



**Figura 29.** Comparación de las dimensiones de ADN dúplex y cuádruple **(a)** pares de bases **(b)** tétrada de guaninas

Debido a la geometría del cuádruple existen varias posibilidades de unión de los ligandos: el apilamiento por interacciones  $\pi$  con la tétrada externa, la interacción con el surco o con el bucle y la intercalación. Estos modos de unión se representan en la figura 30.



**Figura 30.** Representación de los modos de unión de ligandos al cuádruple. **(a)** Apilamiento con la tétrada externa **(b)** Interacción con el surco **(c)** Interacción con el bucle **(d)** Intercalación

<sup>86</sup> Ou, T. M.; Lu, Y. J.; Tan, J. H.; Huang, Z. S.; Wong, K. Y.; Gu, L. Q. *ChemMedChem* **2008**, 3, 690-713.



La interacción con la superficie de la tétrada terminal y la interacción con el surco son los modos de unión habituales y los que producen una mayor estabilización. Por el contrario, la unión por intercalación en el caso del cuádruple es un fenómeno energéticamente poco favorable ya que la estructura del cuádruple es muy estable gracias a las interacciones establecidas con los cationes que se encuentran en su canal iónico.<sup>86, 87</sup>

### 2.4.2 Características de los ligandos de cuádruple-G

Debido a las características estructurales del cuádruple y en base a los estudios presentes en la bibliografía a lo largo de las tres últimas décadas, se ha establecido que los ligandos de cuádruple-G han de cumplir las siguientes características.<sup>88,89,90,91</sup>

a) Contener sistemas heteroaromáticos con superficies extensas que interaccionarán vía  $\pi$ - $\pi$  con las superficies aromáticas de las tétradas terminales.

b) Contener al menos una cadena lateral flexible con carga positiva a pH fisiológico para interaccionar con los surcos y/o bucles.

c) Contener una carga positiva, preferentemente en el centro de la estructura, para emular el papel de los cationes presentes en el canal iónico de la estructura del cuádruple.

- **Selectividad hacia el cuádruple**

Actualmente se conocen muchos ejemplos concretos de compuestos que muestran una baja afinidad hacia el ADN dúplex con respecto al cuádruple. Algunos de ellos son compuestos macrocíclicos y compuestos con forma de media luna, como por ejemplo Phen-DC<sub>3</sub> (Figura 31).<sup>92</sup> La selectividad presentada por estos compuestos se debe a la incapacidad para intercalarse en el ADN dúplex. Sin embargo, los compuestos

---

<sup>87</sup> Mergny, J.-L.; Mailliet, P.; Lavelle, F.; Riou, J. F.; Laoui, A.; Helene, C. *Anticancer Drug Des* **1999**, *14*, 327-339.

<sup>88</sup> Sissi, C.; Palumbo, M. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 6489-6509.

<sup>89</sup> Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 627-636.

<sup>90</sup> Ohnmacht, S. A.; Neidle, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2602-2612.

<sup>91</sup> Li, Q.; Xiang, J. F.; Yang, Q. F.; Sun, H. X.; Guan, A. J.; Tang, Y. L. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D1115- D1123.

<sup>92</sup> De Cian, A.; DeLemos, E.; Mergny, J.; Teulade-Fichou, M.; Monchaud, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1856-1857.

heterocíclicos aromáticos que suelen presentar gran afinidad hacia el cuádruple, normalmente, también la presentan hacia el dúplex.

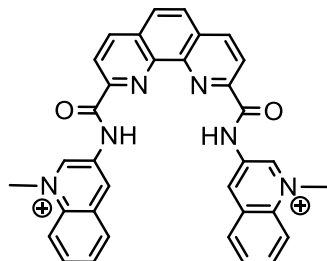


Figura 31. Phen-DC3. Ligando con forma de media luna

Un modo de incrementar la afinidad de los ligandos hacia el cuádruple es incrementar la superficie aromática y el número de sustituyentes en las cadenas laterales del ligando. Sin embargo, un incremento de la afinidad como consecuencia de las propiedades anteriores significa una disminución de su carácter “druglike” (mayor peso molecular y un incremento de las cargas catiónicas). A pesar de ello, varios de estos compuestos tienen efecto anticancerígeno *in vivo*.

### 2.4.3 Tipos de ligandos de cuádruple-G

En 1997, el grupo del profesor Neidle, descubrió la primera serie de moléculas capaces de estabilizar el cuádruple telomérico e inhibir la actividad de la telomerasa.<sup>93,94,95</sup> Desde entonces se han descrito en la bibliografía numerosas estructuras que producen la estabilización de la estructura del cuádruple. Algunos de ellos son BRACO-19 (una acridina trisustituída), Phen-DC3 (derivado de 1,10-fenantrolina), el producto natural telomestatina, TMPyP4 (porfirina catiónica), PIPER (derivado de perileno), RHPS4 (derivado pentacíclico de acridina), naftalenodiimidias o derivados de 2,6-piridina, entre otros.

A continuación, se realiza una breve descripción de los ligandos más representativos de cuádruple-G desarrollados en las últimas tres décadas y una

<sup>93</sup> Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B. E.; Salazar, M.; Kerwin, S. M.; Trent, J. O.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; Hurley, L. H. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2113-2116.

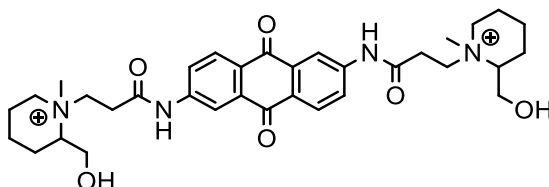
<sup>94</sup> Zahler, A.M.; Williamson, J.R.; Cech, T. R.; Prescott, D. M. *Nature* **1991**, *350*, 718-720.

<sup>95</sup> Harrison, J. R.; Gowan, S. M.; Kelland, L. R.; Neidle, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2463-2468.

descripción más detallada de los derivados de 1,10-fenantrolina (objeto de estudio de esta tesis doctoral). La interacción y la actividad biológica de los ligandos presentados en este apartado se evalúan y comparan mediante el valor de  $^{tel}IC_{50}$  (relacionado a la capacidad de inhibición de la telomerasa), el valor de  $\Delta T_m$  (capacidad de estabilización de los ligandos hacia el ADN) o los valores de las constantes de asociación hacia el ADN. 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  $S = K_a(C)/K_a(D)$ .

### 2.4.3.1 Ligandos de ADN cuádruple-G: Antecedentes

Neidle y colaboradores obtuvieron las primeras moléculas de origen no nucleosídico con capacidad de inhibir la telomerasa a través de la estabilización del cuádruple-G. Fueron derivados de antraquinonas, las cuales están presentes en productos de origen tanto natural como sintético con actividad anticancerosa (adriamicina, mitroxantona) y con capacidad de unión al ADN de doble cadena. En estudios previos realizados por Neidle y colaboradores habían observado que esta serie de moléculas interactuaban con el ADN triple de modo selectivo con respecto al ADN dúplex, lo que les indujo a pensar que podrían ser selectivos asimismo frente al ADN cuádruple.<sup>93,96</sup> El primer compuesto con capacidad de inhibición de la telomerasa por interacción con el cuádruple-G fue una 2,6-diamidoantraquinona (Figura 32).<sup>93</sup>



**Figura 32.** Primer compuesto sintetizado con capacidad inhibidora de la telomerasa

Posteriormente, se estudiaron una serie de antraquinonas disustituidas en diferentes posiciones y con diferentes cadenas laterales<sup>97</sup> como las que se muestran en

---

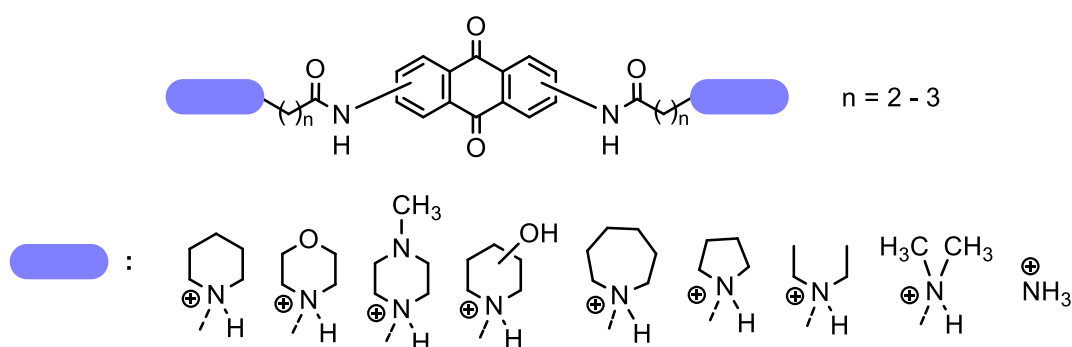
<sup>96</sup> Fox, K. R.; Polucci, P.; Jenkins, T. C.; Neidle, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 7887-7891.

<sup>97</sup> Perry, P. J.; Gowan, S. M.; Rezska, A. P.; Polucci, P.; Jenkins, T. C.; Kelland, L. R.; Neidle, S. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3253-3260.

la figura 33. De los estudios de inhibición de la telomerasa de esta serie de compuestos se extrajeron las siguientes conclusiones con respecto a sus relaciones estructura-actividad: **i)** lo óptimo son dos cadenas laterales cuya longitud sea de dos o tres carbonos, **ii)** el grupo amido es imprescindible, **iii)** los mejores heterociclos para el extremo de la cadena lateral son piperidina y pirrolidina, **iv)** la carga positiva es esencial para la actividad de los compuestos.

Estudios posteriores de RMN, modelado molecular y datos cristalográficos confirmaron las hipótesis de relación estructura-actividad extraídas de los resultados del ensayo de inhibición de la telomerasa.<sup>97,98,99</sup>

El principal problema de las amidoantraquinonas es que, a pesar de poseer actividad inhibidora de la telomerasa, muestran muchos efectos secundarios, como, por ejemplo, una citotoxicidad elevada.



**Figura 33.** Estructura general de las amidoantraquinonas disustituidas

Como alternativa a las antraquinonas fueron diseñados diversos derivados de acridina, con la ventaja de presentar una mejor solubilidad en medio acuoso.<sup>95</sup> 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.<sup>100</sup> Este fenómeno, aparte de mejorar la solubilidad en agua aumenta la deficiencia electrónica en los anillos

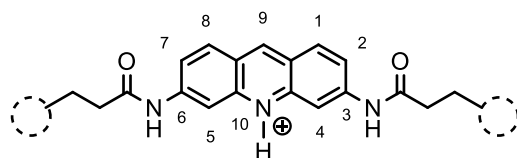
<sup>98</sup> Read, M. A.; Neidle, S. *Biochemistry* **2000**, *39*, 13422-13432.

<sup>99</sup> Zambre, V. P.; Murumkar, P.R.; Giridhar, R.; Yadav, M. R. *J. Mol. Graph. Model.* **2010**, *29*, 229-239.

<sup>100</sup> Albert, A. *The Acridines*, 2<sup>nd</sup> edition, **1966**, Editorial John Wiley & Sons, Inc.

aromáticos, lo que conduce a una interacción por apilamiento más fuerte entre las acridinas y las tétradas externas del cuádruple.

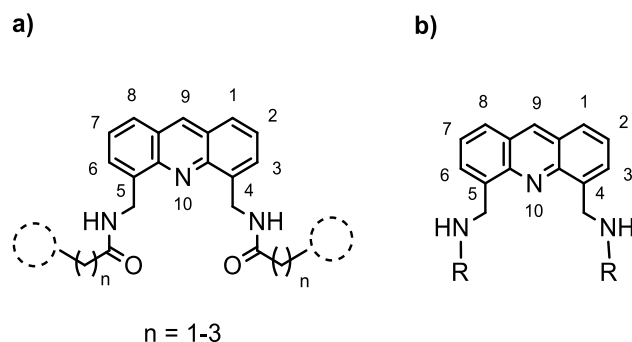
Se describieron una serie de amidoacridinas 3,6-disustituidas, con cadenas laterales similares a las de la serie de antraquinonas previamente mencionada (Figura 34).<sup>101,102</sup>



**Figura 34.** Derivados de amidoacridina disustituidos en las posiciones 3 y 6

Los resultados para la inhibición de la telomerasa en esta serie de compuestos correlacionan con su actividad antiproliferativa y su afinidad hacia el ADN cuádruple, al igual que con la serie de las antraquinonas mostradas en la figura 33. También se pudo observar la importancia de la carga positiva en las cadenas laterales, que es un requisito fundamental para observar actividad biológica.

Más recientemente, fueron descritas otro tipo de acridinas disustituidas en las posiciones 4 y 5, como las que se muestran en la figura 35.<sup>59,103,104</sup>



**Figura 35.** Derivados de amidoacridina disustituidos en las posiciones 4 y 5

<sup>101</sup> Campbell, N. H.; Patel, M.; Tofa, A. B.; Ghosh, R.; Parkinson, G. N.; Neidle, S. *Biochemistry* **2009**, *48*, 1675-1680.

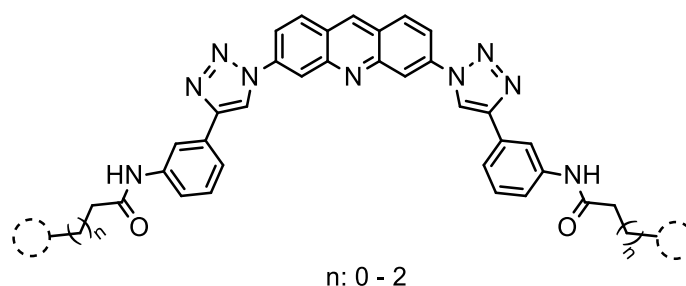
<sup>102</sup> Campbell, N. H.; Smith, D. L.; Reszka, A. P.; Neidle, S.; O'Hagan, D. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1328-1331.

<sup>103</sup> Tan, J. H.; Gu, L. Q.; Wu, J. Y. *Mini Rev. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1163-1178.

<sup>104</sup> Laronze-Cochard, M.; Kim, Y. M.; Brassart, B.; Riou, J. F.; Laronze, J. Y.; Sapi, J. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 3880-3888.

Sorprendentemente en esta serie de compuestos, aquellos que contienen grupos amido en sus cadenas laterales, presentan valores de  $^{tel}IC_{50}$  altos y unos valores de estabilización de ADN cuádruple muy bajos ( $\Delta T_m = 1-3\text{ }^\circ\text{C}$ ). Sin embargo, el valor de  $^{tel}IC_{50}$  ( $0.15\text{ }\mu\text{M}$ ) para algunos de los derivados de la figura 35 son inesperadamente bajos.<sup>104</sup>

Posteriormente, se describió otra serie de acridinas disustituidas en las posiciones 3 y 6 con el grupo 1,2,3-triazol (Figura 36) obtenidas mediante química click.<sup>105</sup>



**Figura 36.** Derivados de acridina sustituidos en las posiciones 3 y 6 con un anillo de triazol

El efecto de la estabilización del ADN cuádruple con el mejor compuesto de esta serie (derivado con pirrolidina) es muy significativo ( $\Delta T_m = 16\text{ }^\circ\text{C}$  a  $1\text{ }\mu\text{M}$ ) en relación con el efecto producido sobre el ADN dúplex. Sin embargo, el valor obtenido en el ensayo de inhibición de la telomerasa ( $^{tel}IC_{50} = 35\text{ }\mu\text{M}$ ) para este compuesto es bastante elevado.<sup>105</sup>

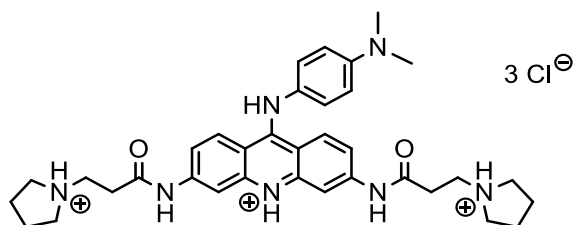
Con el objetivo de mejorar la actividad de inhibición de la telomerasa, su actividad antiproliferativa e incrementar la afinidad y selectividad de las amidoacridinas disustituidas en las posiciones 3 y 6 se incorporó un tercer sustituyente en la posición 9. La hipótesis de partida para mejorar la selectividad por la incorporación de un tercer sustituyente se basó en la posible interacción de las tres cadenas con tres de los surcos del cuádruple. El ADN dúplex solo posee dos surcos, por lo que se postuló que la incorporación de un tercer sustituyente disminuiría su afinidad hacia el dúplex y la incrementaría hacia el cuádruple.<sup>106,107</sup> Con estas premisas se diseñaron cuatro

<sup>105</sup> Sparapani, S.; Haider, S. M.; Doria, F.; Gunaratnam, M.; Neidle, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12263-12272.

<sup>106</sup> Read, M. A.; Harrison, R. J.; Ramagnoli, B.; Taniou, F. A.; Gowan, S. H.; Reszka, A. P.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4844-4849.

<sup>107</sup> Harrison, R. J.; Cuesta, J.; Chessari, G.; Read, M. A.; Basra, S. K.; Reszka, A. P.; Morell, J.; Gowan, S. M.; Incles, C. M.; Taiou, F. A.; Wilson, W. D.; Kelland, L. R.; Neidle, S. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4463-4476.

derivados por modelado molecular. De esta serie, la molécula con mejores resultados fue la denominada BRACO-19 (Figura 37).



**Figura 37.** BRACO-19 es un derivado de acridina trisustituido en las posiciones 3, 6 y 9

BRACO-19 ha demostrado experimentalmente una gran mejora en cuanto a afinidad hacia el ADN cuádruple-G ( $1.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  vs.  $5.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) y en cuanto a actividad inhibidora de la telomerasa ( $^{tel}IC_{50} = 60 \text{ nM}$ ), en comparación con los precursores de acridina disustituidos. Los estudios *in vitro* e *in vivo* revelaron el efecto anticanceroso del compuesto BRACO-19 mediante la inhibición de la telomerasa, concretamente mediante la reducción de la expresión de la unidad catalítica hTERT.<sup>108</sup>

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 38).<sup>107,109,110,111</sup>

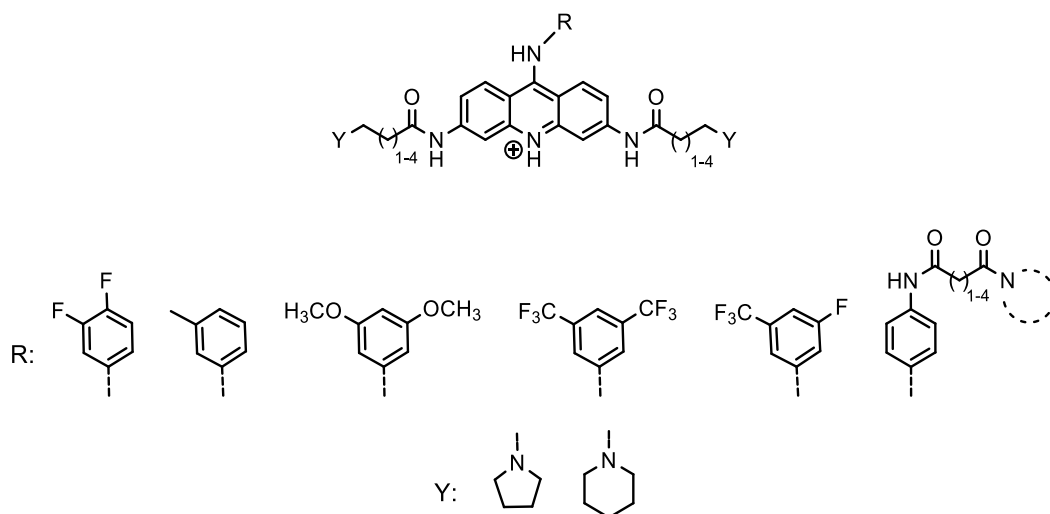
---

<sup>108</sup> Burger, A. M.; Dai, F.; Schultes, C. M.; Reszka, A. P.; Moore, M. J.; Double, J. A.; Neidle, S. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 1489-1496.

<sup>109</sup> Schultes, C.M.; Guyen, B.; Cuesta, J.; Neidle, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4347-4351.

<sup>110</sup> Moore, M. J.; Schultes, C. M.; Cuesta, J.; Cuenca, F.; Gunaratnam, M.; Tanius, F. A.; Wilson, W. D.; Neidle, S. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 582-599.

<sup>111</sup> Martins, C.; Gunaratnam, M.; Stuart, M.; Makwana, V.; Greciano, O.; Reszka, A. P.; Kelland, L. R.; Neidle, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2293-2298.



**Figura 38.** Compuestos análogos a BRACO-19

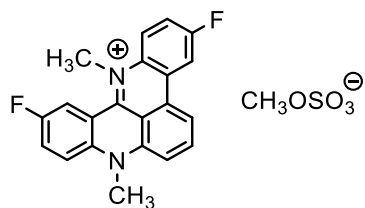
De los estudios realizados con estos derivados se concluyó lo siguiente: **i)** los sustituyentes sin carga en la posición 9 y sustituyentes con cadenas laterales  $-(\text{CH}_2)_2-$  en las posiciones 3 y 6 son necesarios para una buena interacción con el cuádruple. Aumentar la cadena en un carbono más disminuye la afinidad hacia el cuádruple y la capacidad inhibitoria de la telomerasa; **ii)** aumentar la longitud de los sustituyentes en 9 no mejora ni la afinidad hacia el cuádruple ni la inhibición de la telomerasa; **iii)** la selectividad hacia el cuádruple con respecto al dúplex se correlaciona con la afinidad y la inhibición de la telomerasa. A pesar de las numerosas modificaciones estructurales realizadas, ningún análogo de 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, BRACO-19 se encuentra en fase clínica.<sup>112</sup>

Para incrementar la afinidad hacia el cuádruple-G reforzando las interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  ligando-ADN, se estudiaron distintos derivados policíclicos que contienen el núcleo de acridina. De entre todas las sales quino[4,3,2-k, l]acridinio, el compuesto de la serie más prometedor fue el denominado RHPS4 (Figura 39).<sup>113</sup>

<sup>112</sup> Ali, A.; Bhattacharya, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4506-4521.

<sup>113</sup> Cheng, M.; Modi, C.; Cookson, J. C.; Hutchinson, I.; Heald, R. A.; McCarroll, A. J.; Missailidis, S.; Tanius, F.; Wilson, W. D.; Mergny, J.; Laughton, C. A.; Stevens, M. F. G. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 963-975.

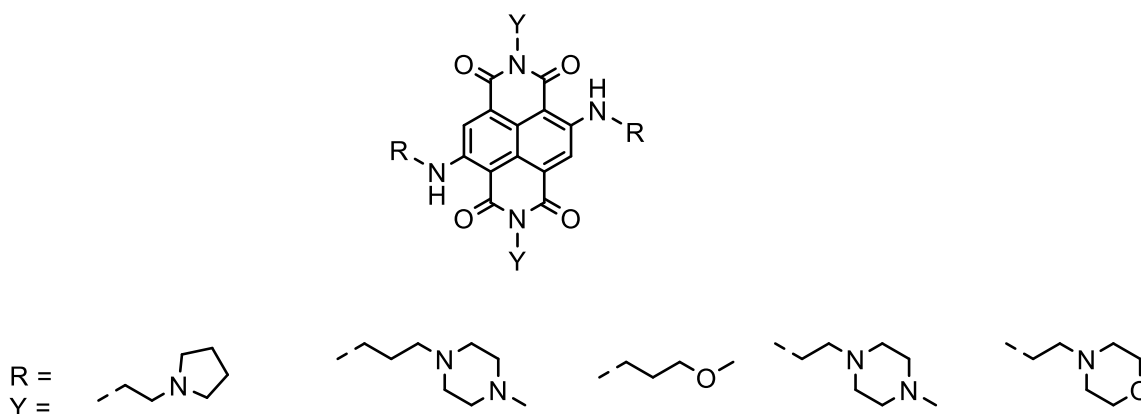




**Figura 39.** Derivado policíclico de acridina RHSP4

RHSP4 es un potente inhibidor de la telomerasa y además es selectivo hacia el cuádruple-G (con una afinidad ocho veces mayor que hacia el ADN dúplex, determinada por valoraciones de fluorescencia).<sup>114, 115</sup>

Otro grupo importante de ligandos de ADN cuádruple policíclicos lo constituyen las naftalenodiimidias tri- o tetrasustituidas. 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 40).



**Figura 40.** Derivados de naftalenodiimidias tetrasustituidas

Varios compuestos de esta serie presentan una excelente capacidad de estabilización del cuádruple con valores de  $\Delta T_m \approx 30$  °C a concentraciones 0.5  $\mu$ M,

<sup>114</sup> Leonetti, C.; Amodei, S.; D'Angelo, C.; Rizzo, A.; Benassi, B.; Antonelli, A.; Elli, R.; Stevens, M. F. G.; D'Incalci, M.; Zupi, G.; Biroccio, A. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *66*, 1138-1146.

<sup>115</sup> Gowan, S. M.; Heald, R.; Stevens, M. F.; Kelland, L. R. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 981-988.

determinada por FRET. 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. Otra ventaja de estos derivados es que, a pesar de su gran tamaño y carga, atraviesan rápidamente la membrana celular. Esto ha podido ser detectado gracias a su intensa fluorescencia.<sup>116, 117</sup>

Otro tipo de derivados con capacidad de estabilización del cuádruple-G son ciertos compuestos macrocíclicos. Entre ellos destacan la telomestatina y las porfirinas. La telomestatina (Figura 41) es un producto natural que fue aislado por primera vez a partir del organismo *Streptomyces anulatus*<sup>118</sup> y que contiene siete unidades del heterociclo oxazol y una de tiazol.

En 2001, se determinó la capacidad inhibitoria de la telomestatina con respecto a la telomerasa, resultando ser un inhibidor de la telomerasa muy potente. Debido a su similitud estructural con la tétrada del cuádruple se sugirió que su actividad inhibitoria era causada por la estabilización de los cuádruples teloméricos.

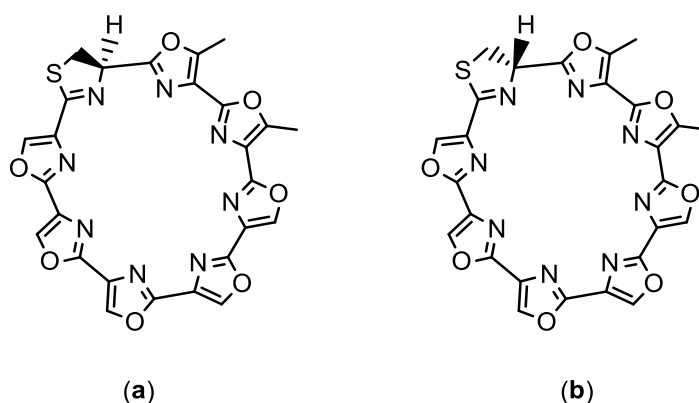


Figura 41. Telomestatina (a) en la configuración R y (b) su estereoisómero S

<sup>116</sup> Cuenca, F.; Greciano, O.; Gunaratnam, M.; Haider, S.; Munnur, D.; Nanjunda, R.; Wilson, W.D.; Neidle, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1668-1673.

<sup>117</sup> Mpima, S.; Ohnmacht, S. A.; Berletta, M.; Husby, J.; Pett, L. C.; Gunaratnam, M.; Hilton, S. T.; Neidle, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 6162-6170.

<sup>118</sup> Shin-ya, K.; Wierzbka, K.; Matsuo, K.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1262-1263.

Sin embargo, hasta la fecha no existen datos estructurales experimentales sobre el tipo de interacción de la telomestatina y el cuádruple. No obstante, estudios de modelado molecular revelan que la molécula de telomestatina, casi plana, es de un tamaño muy similar a la tétrada y por lo tanto el solapamiento es perfecto. Esto concuerda con la elevada constante de afinidad (30 nM).<sup>119,120</sup> Además, es uno de los inhibidores de la telomerasa más potentes que se conocen actualmente ( $^{tel}IC_{50} = 58$  nM).<sup>119,120,121,122</sup> 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. 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.<sup>123,124,125,126</sup>

Por otro lado, 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 mediante interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$ . El primer derivado de porfirina analizado fue el tetracloruro de la tetra-*N*-metilpiridilporfirina, más conocido como TMPyP4 (Figura 42).<sup>127</sup>

---

<sup>119</sup> Kim, M.-Y.; Vankayalapati, H.; Shin-ya, K.; Wierzbica, K.; Hurley, L.H. *J. Amer. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2098–2099.

<sup>120</sup> Luedtke, N.W. *Chimia* **2009**, *63*, 134–139.

<sup>121</sup> De Cian, A.; Cristofari, G.; Reichenbach, P.; De Lemos, E.; Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M. P.; Shin-ya, K.; Lacroix, L.; Lingner, J.; Mergny, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 17347–17352.

<sup>122</sup> Doi, T.; Shibata, K.; Yoshida, M.; Takagi, M.; Tera, M.; Nagasawa, K.; Shin-ya, K.; Takahashi, T. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 387–393.

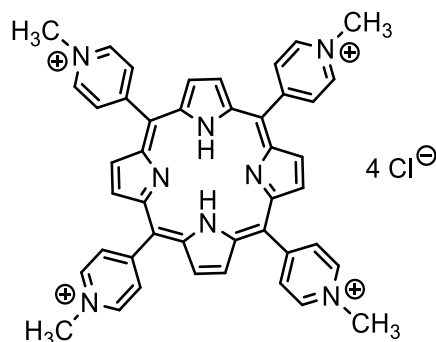
<sup>123</sup> Jantos, K.; Rodriguez, R.; Ladame, S.; Shirude, P. S.; Balasubramanian, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13662–13663.

<sup>124</sup> Minhas, G. S.; Pilch, D. S.; Kerrigan, J. L.; LaVoie, E. J.; Rice, J. E. *Bioorg. Med. Chem. Lett* **2006**, *16*, 3891–3895.

<sup>125</sup> Rzuczek, S. G.; Pilch, D. S.; Liu, A.; Liu, L.; LaVoie, E. J.; Rice, J. E. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3632–3644.

<sup>126</sup> Ohnmacht, S. A.; Ciancimino, C.; Vignaroli, G.; Gunaratnam, M.; Neidle, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 5351–5355.

<sup>127</sup> Anantha, N. V.; Azam, M.; Sheardy, R. D. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2709–2714.



**Figura 42.** Estructura de la tetra-N-metilpiridilporfirina (TMPyP4)

Este compuesto se une al ADN cuádruple-G con baja selectividad (con aproximadamente dos veces más afinidad que con el ADN dúplex). A partir de experimentos adicionales realizados con el TMPyP4 y con varios análogos 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 a  $6.5 \mu\text{M}$  y **c)** efectos sobre la influencia en la transcripción de algunos genes (*c-myc*).<sup>128,129,130</sup>

Posteriormente, se describieron varios complejos metálicos basados en la estructura de TMPyP4, pero ninguno de esos complejos estudiados (Figura 43) ha demostrado una mayor capacidad de inhibir la telomerasa que el propio ligando de partida.<sup>127,130,131,132</sup> No obstante, se ha puesto de manifiesto que la presencia del ion metálico tiene un efecto significativo a nivel de la actividad biológica observada.

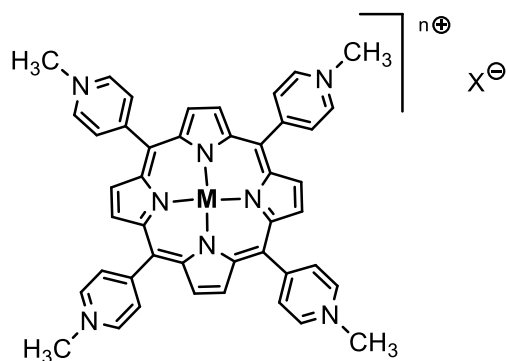
<sup>128</sup> Wang, P.; Ren, L.; He, H.; Liang, F.; Zhou, X.; Tan, Z. *ChemBiochem* **2006**, *7*, 1155-1159.

<sup>129</sup> Grand, C. L.; Han, H.; Muñoz, R. M.; Weitman, S.; Von Hoff, D. D.; Hurley, L. H.; Bearss, D. J. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 565-573.

<sup>130</sup> Shi, D. F.; Wheelhouse, R. T.; Sun, D.; Hurley, L. H. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4509-4523.

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

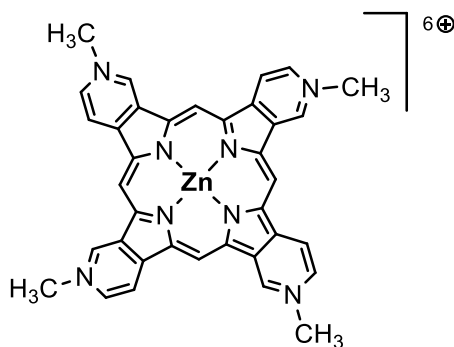
<sup>132</sup> Georgiades, S. N.; Abd Karim, N. H.; Suntharalingam, K.; Vilar, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4020-4034.



**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 43.** Complejos metálicos del ligando TMPyP4

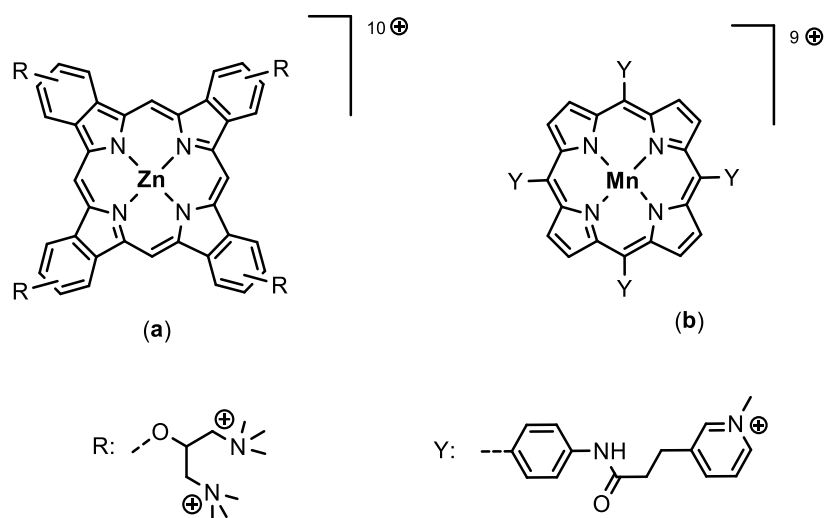
Sin embargo, una mejora significativa en la selectividad de unión al ADN cuádruple frente a la unión al ADN dúplex se logró empleando complejos metálicos de porfirinas con un sistema de piridinas condensadas a cada uno de los anillos de pirrol (Figura 44).<sup>133i</sup>



**Figura 44.** 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 45.

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



**Figura 45.** Porphirinas sustituidas con cuatro cadenas laterales

Ambos tipos de porfirinas (**a**, **b**) demostraron poseer una gran selectividad hacia el ADN cuádruple-G. La constante de asociación para el ADN cuádruple del compuesto **b** es del orden de  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , mientras que para el ADN dúplex es de tan solo  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . 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.<sup>134</sup>

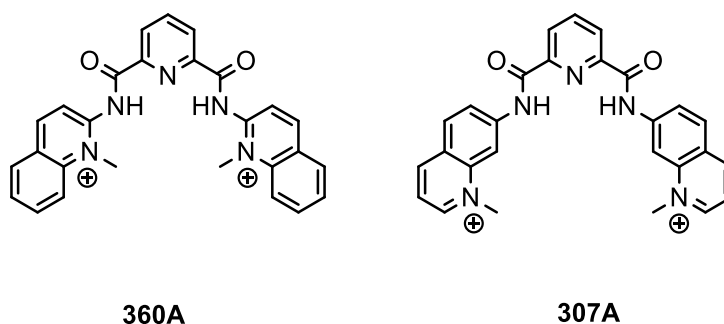
Para finalizar con la descripción de los ligandos de cuádruple más relevantes, se describirán los derivados de la 2,6-piridina. Los compuestos **360A** y **307A** son derivados de 2,6-piridin-dicarboxamida con metilquinolinios como sustituyentes. Estos ligandos son capaces de estabilizar cuádruples de las regiones teloméricas y de la región del promotor c-myc.<sup>135</sup> Ambos compuestos producen apoptosis en las células de glioblastomas, lo que se cree que está inducido por un mecanismo en el que están involucrados los telómeros<sup>136,137</sup> (Figura 46).

<sup>134</sup> Ralph, S. F. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 572-590.

<sup>135</sup> Lemarteleur, T.; Gomez, D.; Paterski, R.; Mandine, E.; Mailliet, P.; Riou, J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *323*, 802-808.

<sup>136</sup> Granotier, C.; Pennarun, G.; Riou, L.; Hoffschir, F.; Gauthier, L. R.; De Cian, A.; Gomez, D.; Mandine, E.; Riou, J.; Mergny, J. L.; Mailliet, P.; Dutrillaux, B.; Boussin, F. D. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 4182-4190.

<sup>137</sup> Pennarun, G.; Granotier, C.; Gauthier, L. R.; Gomez, D.; Hoffschir, F.; Mandine, E.; Riou, J.; Mergny, J.; Mailliet, P.; Boussin, F. D. *Oncogene* **2005**, *24*, 2917-2928.



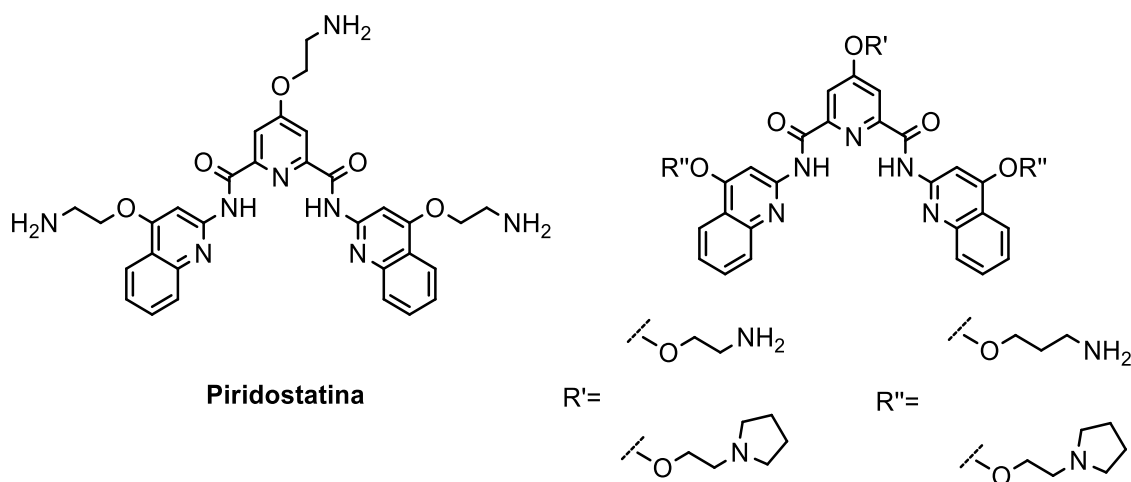
**Figura 46.** Derivados 360A y 307A

Posteriormente, en 2008, fue sintetizada la molécula de piridostatina (Figura 47) conocida por su habilidad de inducir disfunción en los telómeros compitiendo por la unión con las proteínas específicas de los telómeros como la POT1.<sup>138</sup> Este compuesto estabiliza muy notablemente la estructura del cuádruple-G ( $\Delta T_m = 35\text{ }^\circ\text{C}$ ) mientras que la estabilización que ejerce sobre el ADN dúplex es nula.

Del estudio de una quimioteca de 26 compuestos derivados de piridostatina, se observó que la naturaleza de la amina (Figura 47, R'') influye poco en la capacidad de estabilización de los ligandos y que la longitud de cadena de tres carbonos incrementa ligeramente los valores de estabilización. Por otro lado, se observó que son compuestos muy selectivos, tal y como se deduce tras la realización de ensayos competitivos de desnaturalización térmica de ADN observado por FRET.<sup>139</sup>

<sup>138</sup> Rodríguez, R.; Müller, S.; Yeoman, J. A.; Trentesaux C.; Riou, J.-F. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15758-15759.

<sup>139</sup> Mueller, S.; Sanders, D. A.; Di Antonio, M.; Matsis, S.; Riou, J.; Rodríguez, R.; Balasubramanian, S. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6537-6546.



**Figura 47.** Piridostatina y derivados

### 2.4.3.2 Derivados de la 1,10-fenantrolina

La 1,10-fenantrolina es un sistema heterocíclico, plano, rígido, hidrofóbico, y deficiente en electrones. La disposición de sus nitrógenos es la adecuada para actuar como ligando de tipo quelato. Sus derivados se caracterizan por ser bases débiles en disolución acuosa en comparación con las diaminas alifáticas. Del hecho de que este sistema heterocíclico sea pobre en electrones, deriva el bajo carácter  $\sigma$ -dador de sus nitrógenos. A pesar de ello, estos sistemas pueden formar complejos metálicos muy estables debido al fuerte carácter  $\pi$ -aceptor del sistema aromático que es capaz de estabilizar iones metálicos con bajos estados de oxidación.<sup>140</sup>

Gracias a sus características estructurales los derivados de la 1,10-fenantrolina funcionalizados y sus correspondientes complejos metálicos han sido objeto de estudio como sistemas capaces de unirse o interactuar con ADN o ARN.

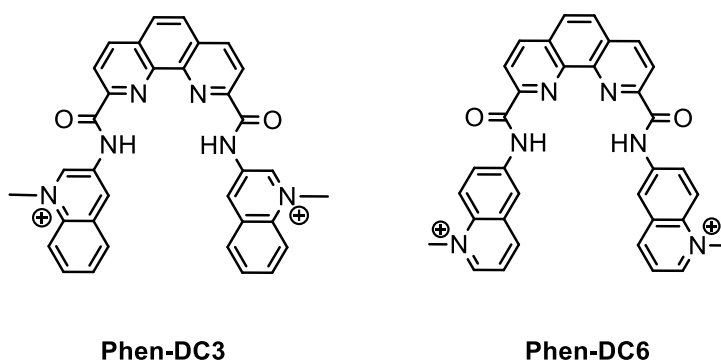
A continuación, se describirán los ligandos de ADN cuádruple derivados de la 1,10-fenantrolina más relevantes, así como de sus respectivos complejos metálicos.

<sup>140</sup> Bencini, A.; Lippolis, V. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2096-2180.



- **Derivados de la 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 2 y 9**

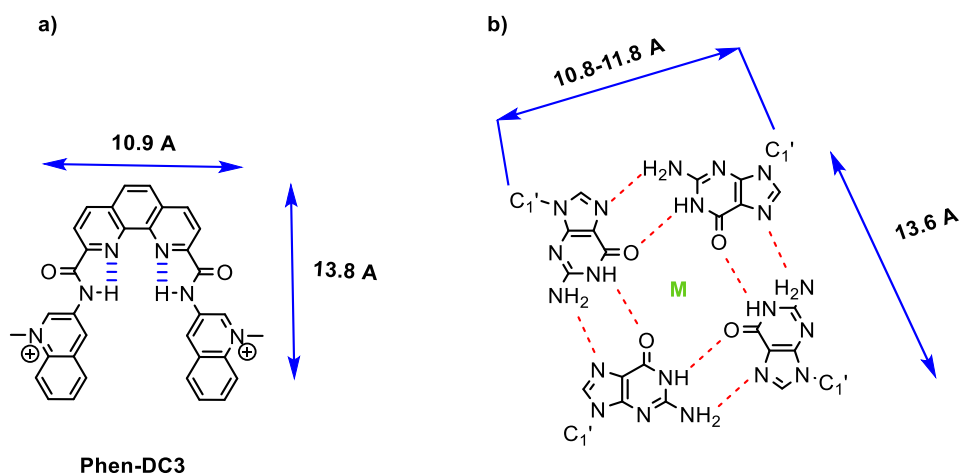
Con el fin de incrementar la superficie de los ligandos basados en la 1,10-fenantrolina e incrementar su afinidad hacia el ADN cuádruple-G, Cian y colaboradores, diseñaron derivados disustituidos en las posiciones 2 y 9 incorporando dos unidades de metilquinolinio unidas a la 1,10-fenantrolina mediante el grupo amido.<sup>92</sup> La elección del grupo metilquinolinio como sustituyente (Figura 48) se fundamenta en resultados previos que pusieron de manifiesto que los derivados de bisquinolinio presentan muy buena selectividad y afinidad hacia el cuádruple.<sup>136, 137</sup>



**Figura 48.** Derivados de la 1,10-fenantrolina sustituidos en las posiciones 2 y 9 con N-metilquinolinios

Ambos ligandos presentan muy buena capacidad estabilizadora del cuádruple ( $\Delta T_m \approx 29^\circ\text{C}$ ) y una excelente selectividad medida con la técnica de FRET competitivo en presencia de ADN dúplex a una concentración de  $10\ \mu\text{M}$  ( $S = 0.93$ ).

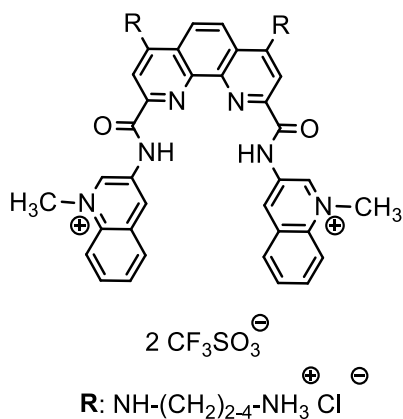
Al estudiar las dimensiones de la tétrada con respecto a las dimensiones de Phen-DC3 se observó que la estructura encaja perfectamente con la superficie del cuádruple. Además, los enlaces de hidrógeno intramoleculares (Figura 49) impiden el giro de las cadenas fijando la estructura de media luna que es la que favorece la interacción con el cuádruple. Por este motivo, son más selectivos que los correspondientes análogos de 2,6-piridina.<sup>92</sup>



**Figura 49. (a)** Dimensiones del ligando Phen-DC3 **(b)** Dimensiones de la tétrada

Por sus excelentes características, Phen-DC3 se ha convertido, junto con BRACO-19, en uno de los ligandos de cuádruple-G de referencia.

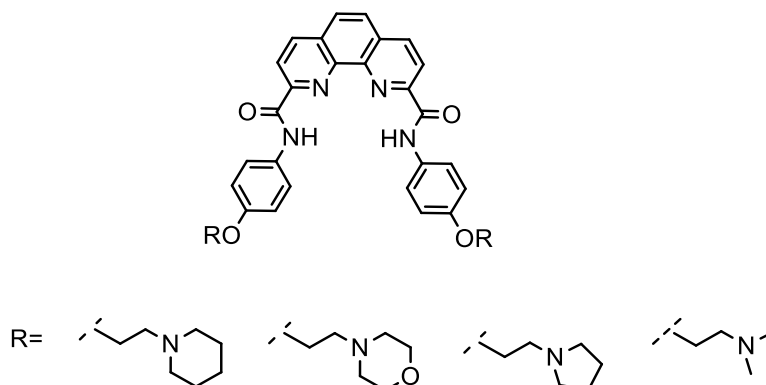
A la vista de los buenos datos obtenidos con los derivados anteriores, otros autores decidieron mejorar estas características incorporando cadenas de poliamina adicionales en las posiciones 4 y 7.



**Figura 50.** 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 y 9

Sorprendentemente esta modificación (Figura 50) no mejoró la capacidad estabilizadora con respecto a Phe-DC3, sino que se mantuvo en el mismo rango ( $\Delta T_m \approx 23\text{ °C}$ ) mientras que la selectividad obtenida fue ligeramente inferior ( $S \approx 0.8$ ).<sup>141</sup>

Wang y colaboradores propusieron la sustitución de los quinolinios por anillos de benceno sustituidos con éteres y en cuyo extremo incorporan aminas heterocíclicas (Figura 51).<sup>142</sup>



**Figura 51.** 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

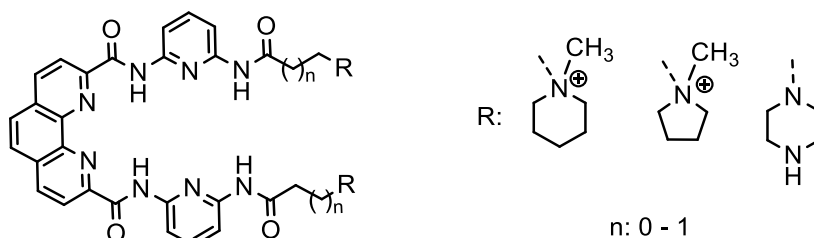
Todos los ligandos, menos el derivado que contiene la morfolina como grupo terminal, presentan valores de  $\Delta T_m \approx 30\text{ °C}$  y buena selectividad determinadas por FRET. Además, tienen la capacidad de inhibir la telomerasa ( $^{tel}IC_{50}$  de los tres ligandos son aproximadamente de  $2\text{ }\mu\text{M}$ ) determinada por el ensayo TRAP-LIG.<sup>141</sup>

Otra alternativa fue el empleo de un anillo de piridina, incorporando un grupo amido adicional entre la piridina y el grupo terminal (Figura 52).<sup>143</sup>

<sup>141</sup> Larsen, A. F.; Nielsen, M. C.; Ulven, T. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10892-10902.

<sup>142</sup> Wang, L.; Wen, Y.; Liu, J.; Zhou, J.; Li, C.; Wei, C. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2648-2653.

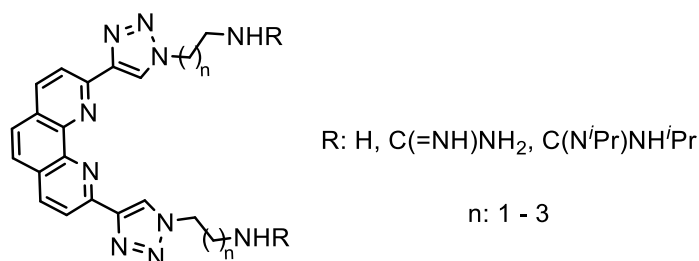
<sup>143</sup> Wei, C.; Wang, Y.; Zhang, M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2355-2364.



**Figura 52.** 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

En este caso, el cambio realizado en la estructura de la molécula apenas ejerció efecto en la actividad inhibidora de la telomerasa.<sup>143</sup> Sin embargo, la capacidad estabilizadora disminuyó aproximadamente 10°C con respecto a los derivados anteriores.

La siguiente propuesta consistió en la incorporación de anillos de 1,2,3-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, guanidinio o *N,N'*-bisisopropilguanidino terminal (Figura 53).<sup>144</sup>



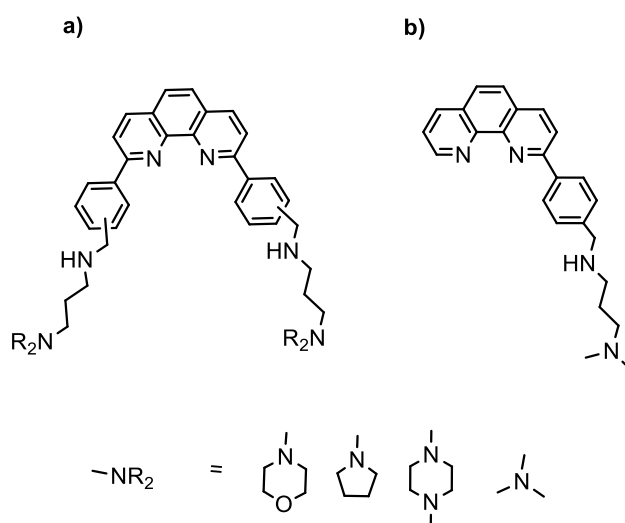
**Figura 53.** Derivados de la 1,10-fenantrolina sustituidos con triazoles y cadenas laterales alifáticas con un grupo amino, guanidinio o *N,N'*-bisisopropilguanidino terminal

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 guanidinio han demostrado mejor comportamiento como ligandos de ADN cuádruple-G. La constante de asociación del

<sup>144</sup> Nielsen, M. C.; Larsen, A. F.; Abdikadir, F. H.; Ulven, T. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *72*, 119-126.

mejor compuesto de la serie hacia el ADN cuádruple-G es elevada ( $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) y la selectividad del mismo ligando hacia el ADN-cuádruple telomérico en relación al ADN dúplex es de 19.<sup>144</sup>

En este año (2017), Mergny y colaboradores han sintetizado dos tipos de 1,10-fenantrolinas sustituidas en las posiciones 2 y 9. La primera de ellas se basa en derivados sustituidos con grupos diaminobencilo similares a los descritos previamente (Figura 54), con el propósito de incrementar la solubilidad en agua gracias a la incorporación de grupos amino.<sup>145</sup>

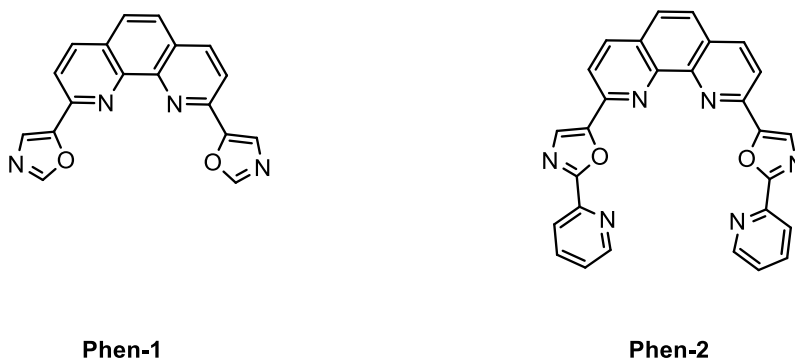


**Figura 54.** Derivados de la 1,10-fenantrolina sustituidas en las posiciones 2 y 9 con diaminobencilos

En términos de estabilización, los mejores resultados fueron obtenidos para los derivados sustituidos en la posición 4 del anillo de benceno ( $\Delta T_m = 10.4\text{-}14.9 \text{ }^\circ\text{C}$ ). También se observó que, dentro de cada serie, el mejor derivado es el que contiene la *N*-metilpiperacina en el extremo de la cadena alquílica. Por otra parte, el estudio del compuesto monosustituido demuestra la importancia de la superficie aromática, ya que la estabilización disminuye, en  $8^\circ\text{C}$ , el valor del  $\Delta T_m$  con respecto al correspondiente compuesto disustituido.

<sup>145</sup> Gueddouda, N. M.; Hurtado, M. R.; Moreau, S.; Ronga, L.; Das, R. N.; Savrimoutou, S.; Rubio, S.; Marchand, A.; Mendoza, O.; Marchivie, M.; Elmi, L.; Chansavang, A.; Desplat, V.; Gabelica, V.; Bourdoncle, A.; Mergny, J.; Guillon, J. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 146-160.

En la siguiente aproximación (Figura 55), los sustituyentes de la 1,10-fenantrolina fueron bisoxazoles. Se describieron dos derivados, uno más sencillo únicamente con el oxazol como sustituyente (Phen-1) y otro, más complejo, que contiene una 2-piridina en la posición 2 del anillo de oxazol (Phen-2).<sup>146</sup>



**Figura 55.** Derivados de la 1,10-fenantrolina sustituidos con oxazoles en las posiciones 2 y 9

Los estudios realizados (desnaturalización térmica observada por dicroísmo circular o por FRET y ensayos FID) mostraron una gran afinidad y selectividad hacia el cuádruple con respecto al dúplex e incluso se pudo observar selectividad entre distintas secuencias de ADN cuádruple.

- **Derivados de la 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 4 y 7**

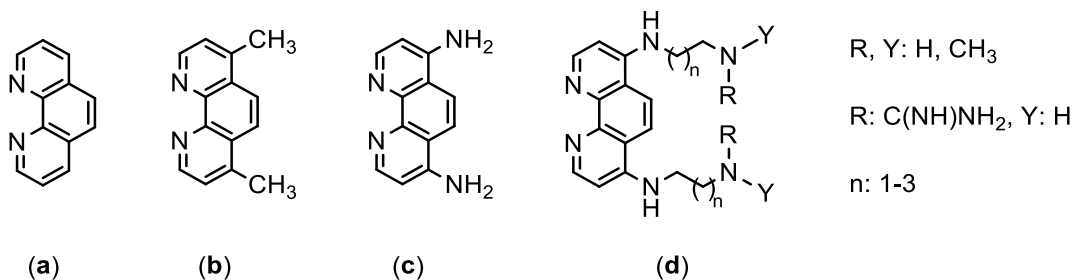
En la bibliografía únicamente se ha encontrado un artículo que hace referencia a ligandos de ADN cuádruple-G derivados de la 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 4 y 7.<sup>147</sup> Ni el sistema de 1,10-fenantrolina sin sustituir (Figura 56a) ni la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (Figura 56b) tienen afinidad apreciable hacia el ADN. Por otra parte, la presencia de grupos amino en la molécula (Figura 56c) con cadenas laterales y con aminas alifáticas en el extremo de la misma (Figura 56d), aumenta considerablemente la interacción entre dichos ligandos y el ADN cuádruple-G.<sup>89,147</sup>

Las constantes de asociación, determinadas por SPR, de los derivados **56d** se encuentran en el rango  $1.2-1.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ . Desafortunadamente, los autores no

<sup>146</sup> Medeiros-Silva, J.; Guedin, A.; Salgado, G. F.; Mergny, J.; Queiroz, J. A.; Cabrita, E. J.; Cruz, C. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2017**, *1861*, 1281-1292.

<sup>147</sup> Nielsen, M.C.; Borch, J.; Ulven, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 8241-8246.

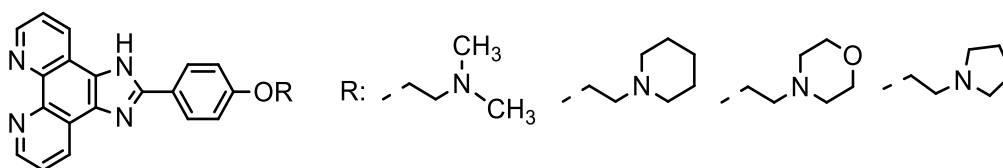
mencionan la interacción de estos compuestos con el ADN dúplex. Probablemente estos compuestos no mostrarían mucha selectividad hacia el ADN cuádruple-G telomérico en relación al ADN dúplex, por su superficie relativamente poco extensa y las dos cadenas laterales no selectivas.<sup>147</sup>



**Figura 56.** Derivados de la 1,10-fenantrolina (a) sustituidos en las posiciones 4 y 7 (b-d)

• **Otros derivados de la 1,10-fenantrolina**

Otro grupo de derivados de la 1,10-fenantrolina con una superficie aromática extendida se representa en la figura 57. Se trata de derivados de la 1,10-fenantrolina con un sistema aromático de fenilimidazol fusionado.<sup>148,149</sup>



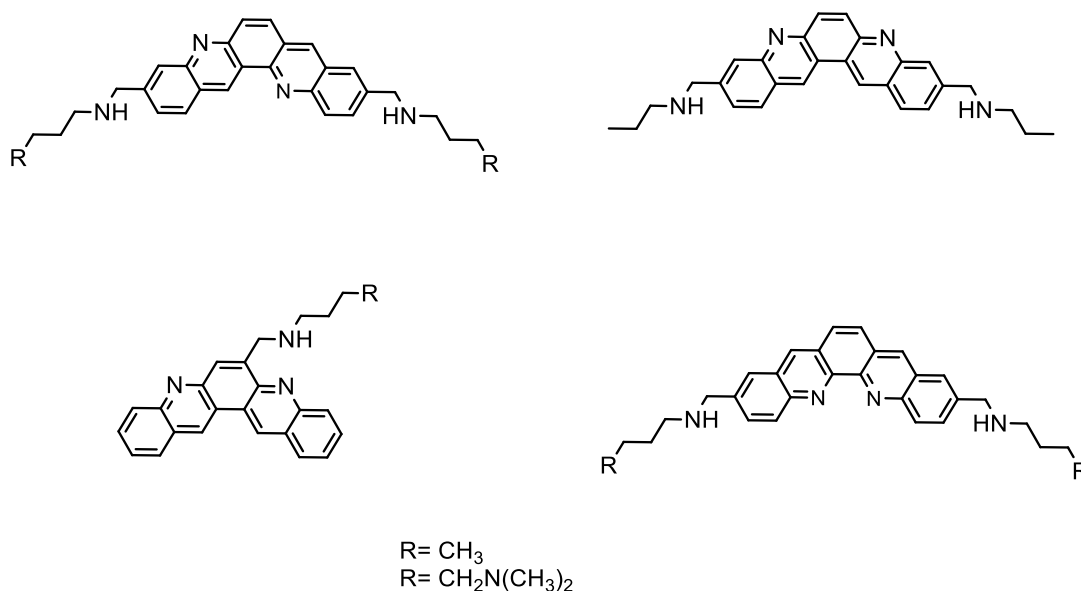
**Figura 57.** Derivados 4-(1H-imidazo[4,5-f]-1,10-fenantrolina-2-il)-4'-feniloxi con grupos de dimetilamino, piperidino, morfolino o pirrolidino en la cadena lateral

Las constantes de asociación de todos los compuestos anteriores son del orden de magnitud  $\approx 10^6 \text{ M}^{-1}$  (constantes de asociación obtenidas por diálisis de equilibrio) y el valor  $^{tel}IC_{50}$  del mejor compuesto de la serie (el dimetilderivado) es inferior a  $7.5 \mu\text{M}$ .<sup>148</sup>

<sup>148</sup> Wei, C. Y.; Wang, J. H.; Wen, Y.; Liu, J.; Wang, L. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3379- 3387.

<sup>149</sup> Liao, S.; Zhang, Z.; Wu, Q.; Wang, X.; Mei, W. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6503-6508.

Otro ejemplo son los derivados que se recogen en la figura 58, compuestos que resultan de la fusión de la 1,10-fenantrolina con dos anillos bencénicos y de la incorporación de dos cadenas laterales alifáticas poliamínicas.<sup>150</sup>



**Figura 58.** Dibenzofenantrolinas

Estos ligandos presentan muy buena afinidad y selectividad hacia el ADN cuádruple-G. Además, los valores de  $^{tel}IC_{50}$  obtenidos son inferiores a 1  $\mu$ M.<sup>150</sup>

### 2.4.3.3 Complejos metálicos de derivados de la 1,10-fenantrolina

La 1,10-fenantrolina puede actuar como ligando quelato y formar complejos metálicos con metales de bajo estado de oxidación. Es de esperar que la presencia de un catión metálico en la estructura favorecerá las interacciones con el ADN cuádruple simulando el papel estabilizador que ejerce el catión metálico en este tipo de estructuras.

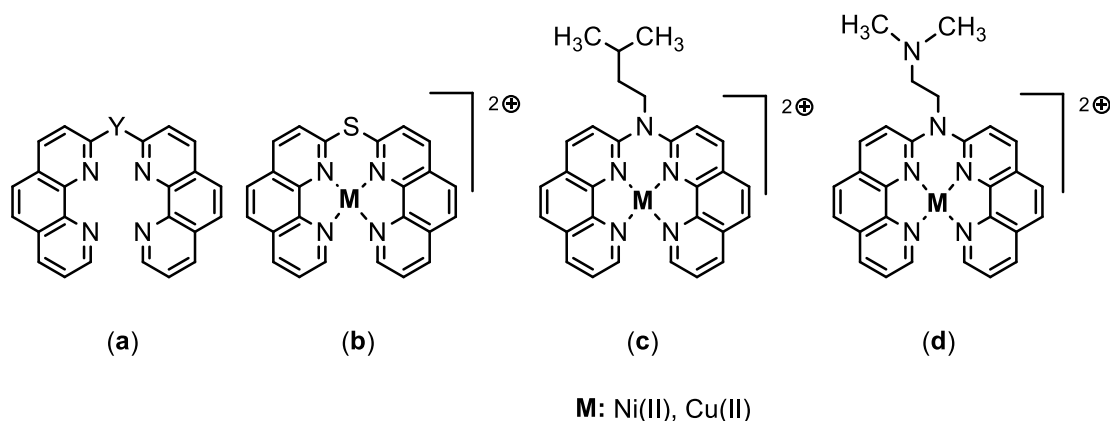
<sup>150</sup> Mergny, J. L.; Lacroix, L.; Teulade-Fichou, M. P.; Hounsou, C.; Guittat, L.; Hoarau, M.; Arimondo, P. B.; Vigneron, J. P.; Lehn, J. M.; Riou, J. F.; Garestier, T.; Helene, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 3062-3067.



A continuación, se describirán, brevemente, algunos ejemplos de complejos metálicos con Ni, Cu y Ru y, finalmente, se describirán de un modo más detallado los complejos de Pt existentes actualmente.

• **Complejos de cobre(II) y níquel(II)**

Artese y colaboradores, describieron una serie de ligandos con estructura de bis-1,10-fenantrolina y los respectivos complejos de cobre(II) y níquel(II) (Figura 59). 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.<sup>151, 152</sup>



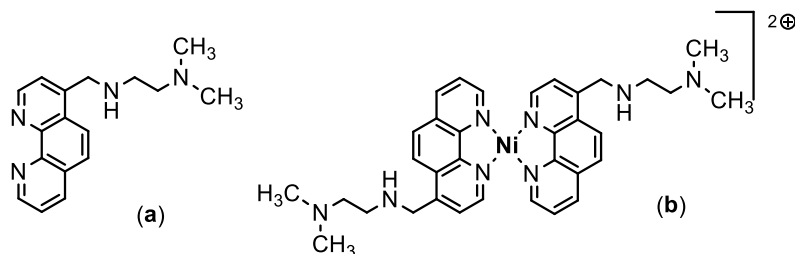
**Figura 59.** Estructura general del ligando de bis-1,10-fenantrolina (a) y sus tres complejos (b-d) con Cu(II) y Ni(II)

Los ligandos por sí solos no interaccionan con el ADN cuádruple. Sin embargo, la formación de los complejos metálicos promueve la interacción entre el ADN cuádruple con dichos complejos. Los complejos de Ni(II) tienen un mejor comportamiento *in vitro* que los complejos de Cu(II), pero sorprendentemente en los ensayos de citotoxicidad en cultivos celulares demuestran más efectividad los complejos de Cu(II).<sup>152</sup>

<sup>151</sup> Artese, A.; Parrotta, L.; Alcaro, S.; Ortuso, F.; Costa, G.; Sissi, C. *Open J. Med. Chem.* **2013**, *3*, 41-49.

<sup>152</sup> Bianco, S.; Musetti, C.; Waldeck, A.; Sparapani, S.; Seitz, J. D.; Krapcho, A. P.; Palumbo, M.; Sissi, C. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 5833-5841.

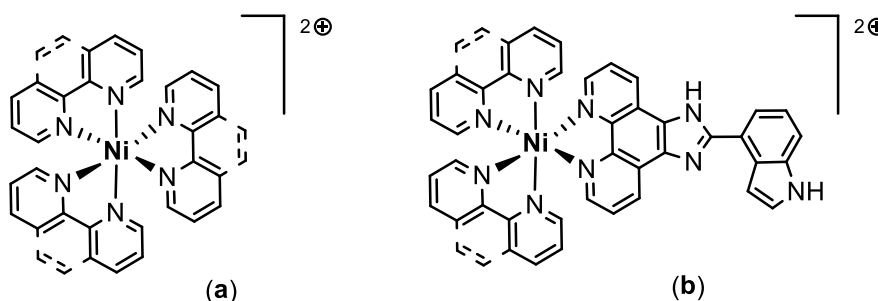
Los mismos autores han descrito ejemplos adicionales de complejos de Ni(II) y de ligandos de la 1,10-fenantrolina monosustituida (Figura 60).<sup>153,154</sup>



**Figura 60.** Ligando (a) y complejo (b) de Ni(II) con 1,10-fenantrolina sustituida en 4

La constante de asociación del complejo (b) hacia el ADN cuádruple-G telomérico es buena ( $3.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ). Desafortunadamente, los autores no describen la posible selectividad hacia el ADN cuádruple frente al ADN dúplex ni la actividad biológica del complejo b.<sup>154</sup>

Otro grupo de investigación ha descrito la preparación de una familia de complejos de Ni(II) de la 2,2'-bipiridina, de 1,10-fenantrolina o de 1,10-fenantrolina con superficie aromática extendida (Figura 61).<sup>155</sup>



**Figura 61.** 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)

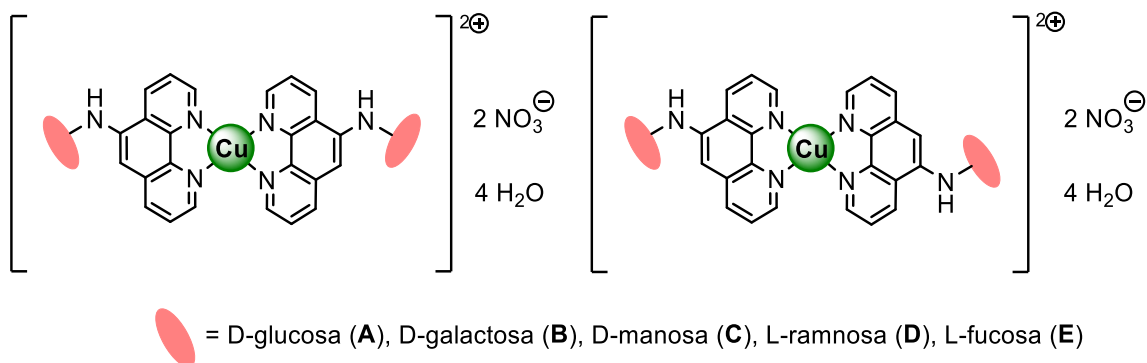
<sup>153</sup> Musetti, C.; Lucatello, L.; Bianco, S.; Krapcho, A. P.; Cadamuro, S. A.; Palumbo, M.; Sissi, C. *Dalton Trans.* **2009**, 19, 3657-3660.

<sup>154</sup> Musetti, C.; Krapcho, A. P.; Palumbo, M.; Sissi, C. *PLoS ONE* **2013**, 8, e58529.

<sup>155</sup> Trajkovski, M.; Morel, E.; Hamon, F.; Bombard, S.; Teulade-Fichou, M. P.; Plavec, J. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 1-11.

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 Ni(II) descritos anteriormente.<sup>155</sup>

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito cinco complejos de Cu(II) derivados del sistema de *N*-(1,10-fenantrolin-5-il)-β-glicopiranosilamina (Figura 62).<sup>156,157</sup>



**Figura 62.** Complejos de Cu(II) de la 1,10-fenantrolina sustituida con glicopiranosilamina

Aunque los resultados obtenidos<sup>157</sup> muestran una interacción y una selectividad moderadas hacia el cuádruple-G, en comparación a los obtenidos con los ligandos de cuádruple-G considerados como referencias en el área, estos derivados presentan propiedades muy interesantes. La incorporación del azúcar en el anillo de 1,10-fenantrolina, junto con la formación del complejo metálico, originan estructuras muy solubles en agua, lo que es conveniente para los estudios de interacción y para las posibles propiedades farmacológicas, como su biodisponibilidad. Además, todos los complejos de la serie se unen con mayor afinidad al cuádruple G-telomérico en condiciones iónicas de potasio, pero en mayor o menor grado en función de la naturaleza del carbohidrato. Finalmente, la naturaleza del carbohidrato es determinante a nivel de actividad biológica, demostrando algún derivado actividad antitumoral en células en cultivo con valores de  $IC_{50} \approx 0.5 \mu M$ .

<sup>156</sup> Duskova, K.; Gude, L.; Arias-Perez, M. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 1071-1076.

<sup>157</sup> Duskova, K.; Sierra, S.; Arias-Perez, M.; Gude, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 33-41.

- **Complejos de rutenio(II)**

Se ha descrito un gran número de complejos mononucleares<sup>158, 159, 160, 161, 162, 163</sup> y dinucleares<sup>164,165,166</sup> de Ru(II) con ligandos de 2,2'-bipiridina, 1,10-fenantrolina o derivados de 1,10-fenantrolina con superficie aromática extendida. Algunos ejemplos se recogen en la figura 63.<sup>159-165</sup>

Las constantes de asociación de los complejos de Ru(II) hacia el ADN códruple-G se encuentran en el rango  $K_a = 10^4$ - $10^6$  M<sup>-1</sup>.<sup>159-164</sup> Cabe destacar que estos compuestos no encajarían en una descripción clásica de ligandos de códruple-G considerando la falta de planaridad del compuesto impuesta por el tipo de coordinación de cada átomo metálico.

---

<sup>158</sup> Yu, H. J.; Yu, L.; Hao, Z. F.; Zhao, Y. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *124*, 187-193.

<sup>159</sup> Shi, S.; Huang, H. L.; Gao, X.; Yao, J. L.; Lv, C. Y.; Zhao, J.; Sun, W. L.; Yao, T. M.; Ji, L. N. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *121*, 19-27.

<sup>160</sup> Yu, Q.; Liu, Y.; Zhang, J.; Yang, F.; Sun, D.; Liu, D.; Zhou, Y.; Liu, J. *Metallomics* **2013**, *5*, 222-231.

<sup>161</sup> Li, Q.; Sun, D.; Zhou, Y.; Liu, D.; Zhang, Q.; Liu, J. *Inorg. Chem. Comm.* **2012**, *20*, 142-146.

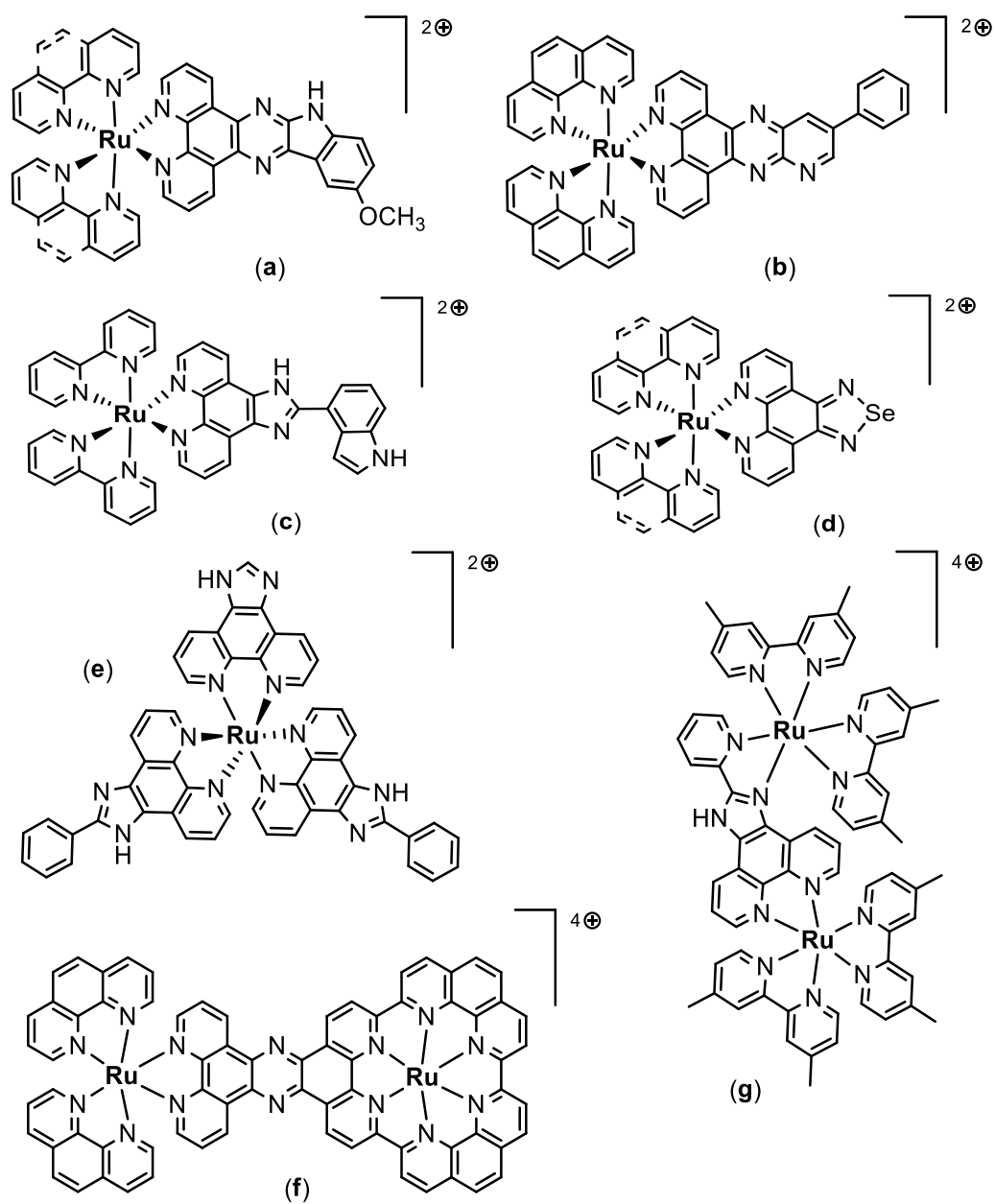
<sup>162</sup> Yuan, F.; Chen, X.; Zhou, Y.; Yang, F.; Zhang, Q.; Liu, J. *J. Coord. Chem.* **2012**, *65*, 1246-1257.

<sup>163</sup> Li, Q.; Zhang, J.; Yang, L.; Yu, Q.; Chen, Q.; Qin, X.; Le, F.; Zhang, Q.; Liu, J. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *130*, 122-129.

<sup>164</sup> Rajput, C.; Rutkaite, R.; Swanson, L.; Haq, I.; Thomas, J. A. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4611-4619.

<sup>165</sup> Gonzalez, V.; Wilson, T.; Kurihara, I.; Imai, A.; Thomas, J. A. *Chem. Commun.* **2008**, *20*, 1868-1870.

<sup>166</sup> Shi, S.; Gao, S.; Cao, T.; Liu, J.; Gao, X.; Hao, J.; Lv, C.; Huang, H.; Xu, J.; Yao, T. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e84419.

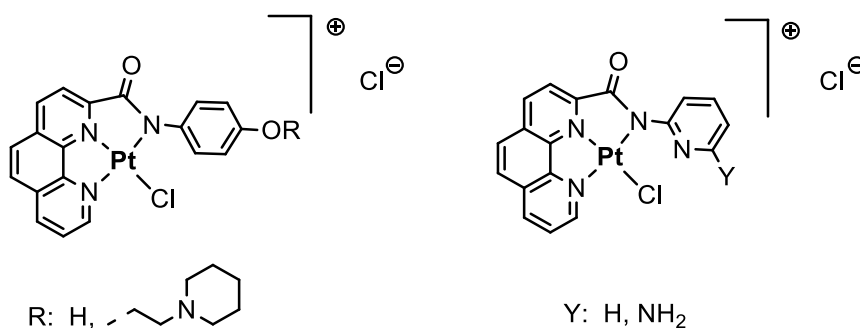


**Figura 63.** Selección de complejos de rutenio(II) que han demostrado interacción con cúadruple-G

### • Complejos de platino(II)

El interés en la preparación de complejos metálicos de Pt(II) con 1,10-fenantrolina se debe a la geometría plano-cuadrada esperada para estos complejos (Figura 64).<sup>167</sup> Esta geometría facilita la interacción por apilamiento  $\pi$  y convierte a los complejos de Pt(II)-1,10-fenantrolina en unos excelentes candidatos para ser buenos ligandos de cuádruple-G.

Los primeros complejos de Pt(II)-1,10-fenantrolina fueron diseñados con el empleo de técnicas de modelado molecular y se recogen en la figura 64.<sup>167</sup>



**Figura 64.** Complejos de platino(II) con ligandos de 1,10-fenantrolina

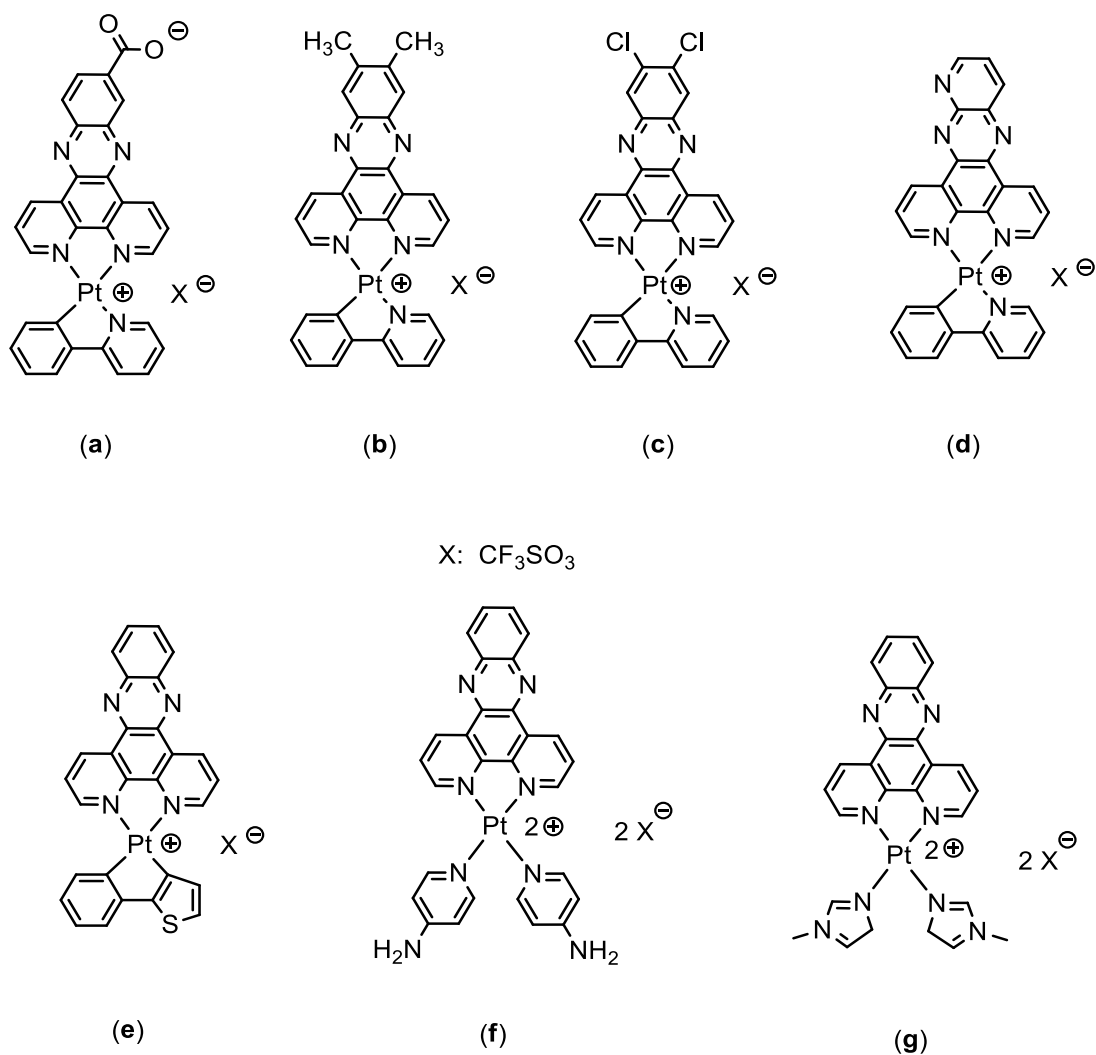
La posición del ion metálico aproximadamente en el centro de la estructura del cuádruple-G, permite establecer interacciones con los oxígenos de los grupos carbonilo de las guaninas y así incrementar la estabilización del cuádruple.

Otra familia de complejos de platino(II), descrita en la literatura, está basada en ligandos tipo 1,10-fenantrolina con dos anillos fusionados al anillo central de la fenantrolina (Figura 65).<sup>169</sup>

<sup>167</sup> Reed, J. E.; Neidle, S.; Vilar, R. *Chem. Commun.* **2007**, 42, 4366-4368.

<sup>168</sup> Reed, J. E.; White, A. J. P.; Neidle, S.; Vilar, R. *Dalton Trans.* **2009**, 14, 2558-2568.

<sup>169</sup> Ma, D. L.; Che, C. M.; Yan, S. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 1835 – 1846.



**Figura 65.** Complejos de platino(II) con el ligando dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenacina con diferentes sustituyentes

El compuesto más activo de toda esta serie ha resultado ser el **a**, con una constante de asociación de aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}$  para el ADN cuádruple y de  $10^4 \text{ M}^{-1}$  para el ADN dúplex. Este compuesto produce asimismo la inhibición de la telomerasa humana, con un valor de  $^{tel}IC_{50}$  de 760 nM.<sup>168</sup>

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. Por ejemplo, en el caso de los complejos de la figura 66, tenemos complejos mixtos en los que uno de los ligandos es el derivado de fenantrolina y el otro etilendiamina. La importancia de la incorporación de ligandos con superficies extendidas se ve reflejada en la afinidad de estos compuestos. Mientras que para el compuesto **a** el valor de la constante de asociación es del orden de  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , para el compuesto **c** es cien veces superior ( $\approx 10^7 \text{ M}^{-1}$ ). La diferencia en la selectividad de unión establecida para el ADN cuádruple y para el ADN dúplex es de, aproximadamente, dos órdenes de magnitud.<sup>170, 171, 172, 173</sup>

<sup>170</sup> Kieltyka, R.; Fakhoury, J.; Moitessier, N.; Sleiman, H. F. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 1145-1154.

<sup>171</sup> Castor, K. J.; Mancini, J.; Fakhoury, J.; Weill, N.; Kieltyka, R.; Englebienne, P.; Avakyan, N.; Mittermaier, A.; Autexier, C.; Moitessier, N.; Sleiman, H. F. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 85-94.

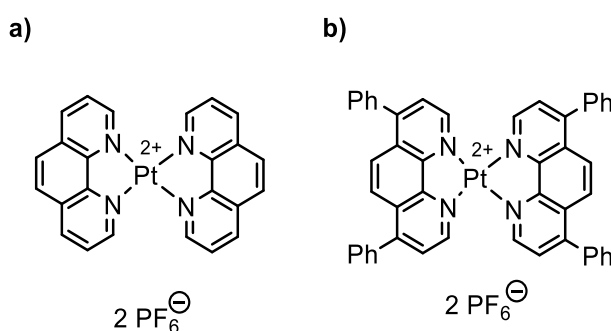
<sup>172</sup> Castor, K. J.; Liu, Z.; Fakhoury, J.; Hancock, M. A.; Mittermaier, A.; Moitessier, N.; Sleiman, H. F. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 17836-17845.

<sup>173</sup> Mancini, J.; Rousseau, P.; Castor, K. J.; Sleiman, H. F.; Autexier, C. *Biochimie* **2016**, *121*, 287-297.





Por último, los complejos 2:1 (ligando:metal) de derivados de 1,10-fenantrolina han sido poco estudiados. Los únicos ejemplos que se han encontrado en la literatura<sup>174</sup> se recogen en la figura 67, lo que en parte se puede explicar debido a la dificultad de obtener estos derivados, especialmente cuando el sistema de fenantrolina se encuentra sustituido. Estos complejos se caracterizan por estar formados por dos moléculas idénticas de 1,10-fenantrolina (Figura 67).



**Figura 67.** Complejos de Pt(II) tipo 2:1 **(a)** fenantrolina **(b)** sustituida con fenilos en las posiciones 4 y 7

Los estudios realizados para establecer la estabilización frente al ADN-cuádruple determinaron que ambos compuestos son buenos estabilizadores del mismo, presentando el compuesto **a** mejores resultados para la secuencia telomérica y **b** para la secuencia de c-myc.

En base a estos precedentes con sistemas de 1,10-fenantrolina se sintetizarán y estudiarán, dentro de los objetivos de esta tesis doctoral, una serie de derivados análogos como potenciales ligandos de ADN cuádruple-G.

<sup>174</sup> **(a)** Wang, J.; Zheng, X.; Xia, Q.; Mao, Z.; Ji, L.; Wang, K. *Dalton Trans.* **2010**, 39, 7214-7216. **(b)** Wang, J.; Lu, K.; Xuan, S.; Toh, Z.; Zhang, D.; Shao, F. *Chem. Commun. (Cambridge, U. K.)* **2013**, 49, 4758-4760.





### **3. Discusión de resultados**

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”*

*Mahatma Gandhi*



### 3.1 SÍNTESIS

#### 3.1.1 Síntesis de derivados de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada

Desde que en la década de los años 50 se descubrieran las propiedades herbicidas del dibromuro de 6,7-dihidropirido[1,2-a:2',1'-c]pirazina-5,8-diinio<sup>175</sup> (Figura 68), las sales cíclicas de 2,2'-bipiridilo y sus derivados han sido estudiadas por dichas propiedades.<sup>176</sup>

Gracias a sus bajos potenciales de reducción y a la estabilidad relativa de sus radicales, estas sales dicuaternizadas y las correspondientes de 1,10-fenantrolina (Figura 68), se han utilizado como aceptores de electrones y en complejos de transferencia de carga de pares de iones.<sup>177</sup>

Otra de las aplicaciones descritas recientemente son sus propiedades como cristales líquidos.<sup>178</sup>

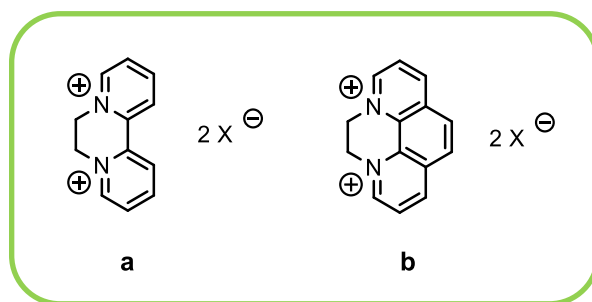


Figura 68

Observando las diferentes propiedades y aplicaciones presentes en estos sistemas, decidimos diseñar derivados dicuaternizados basados en la 1,10-fenantrolina. Se seleccionó este sistema en lugar de la 2,2'-bipiridina ya que presenta un sistema aromático más extenso, lo que podría favorecer la interacción con el ADN cuádruple, como ya se describió previamente en el capítulo de antecedentes.

<sup>175</sup> Brian, R. C.; Homer, R. F.; Stubbs, J.; Jones, R. L. *Nature (London)* **1958**, *181*, 446-447.

<sup>176</sup> Kennedy, D. A.; Summers, L. A. *J. Heterocyclic Chem.* **1981**, *18*, 409-410.

<sup>177</sup> (a) Unamuno, I.; Gutiérrez-Zorrilla, J. M.; Luque, A.; Román, P.; Lezama, L.; Calvo, R.; Rojo, T. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 6452-6460.

(b) Vitoria, P.; Beitia, J. I.; Gutiérrez-Zorrilla, J. M.; Sáiz, E. R.; Luque, A.; Insausti, M.; Blanco, J. J. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 4396-4404.

(c) Xiao, Y.; Chu, L.; Sanakis, Y.; Liu, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9931-9933.

<sup>178</sup> Cardinaels, T.; Lava, K.; Goossens, K.; Eliseeva, S. V.; Binnemans, K. *Langmuir* **2011**, *27*, 2036-2043.

En este apartado se describe la síntesis de una familia de compuestos basados en la estructura de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada y sustituida en las posiciones relativas 4 y 7. Previamente a este trabajo, en el grupo de investigación se preparó un derivado de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada sustituido con *N*-metilpropilaminas con grupos guanidinio en los extremos de la cadena<sup>61</sup> (Figura 69).

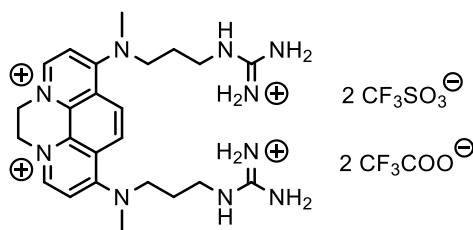


Figura 69

En base a los óptimos resultados obtenidos en los estudios de interacción para ADN con dicho derivado, se procedió a la síntesis de una familia de compuestos análogos.

Como cadenas laterales se utilizaron diferentes *N*-metiletilendiaminas y *N*-metilpropilendiaminas sustituidas con restos aromáticos o con distintas aminas heterocíclicas. De este modo, se ha perseguido la obtención de una familia de compuestos análogos al recogido en la figura 69, con distintos residuos terminales y con dos longitudes de cadena diferentes, para posteriormente estudiar su interacción con el ADN cuádruple y evaluar qué características estructurales son las que mejoran dicha interacción.

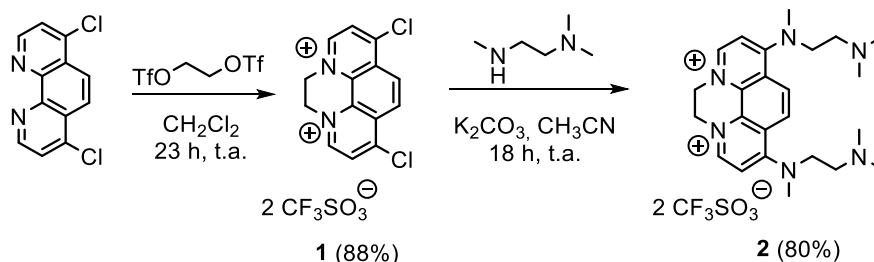
### 3.1.1.1 Síntesis de derivados de etilendiamina

- Síntesis del derivado dicuaternizado 2

En primer lugar, se llevó a cabo la cuaternización del sistema de 1,10-fenantrolina utilizando la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina como reactivo de partida. Para ello, se emplearon condiciones experimentales previamente descritas en la bibliografía.<sup>179</sup> Habitualmente, los productos dicuaternizados se preparan como bromuros y

<sup>179</sup> Coe, B. J.; Curati, N. R. M.; Fitzgerald, E. C. *Synthesis* **2006**, *1*, 146 -150.

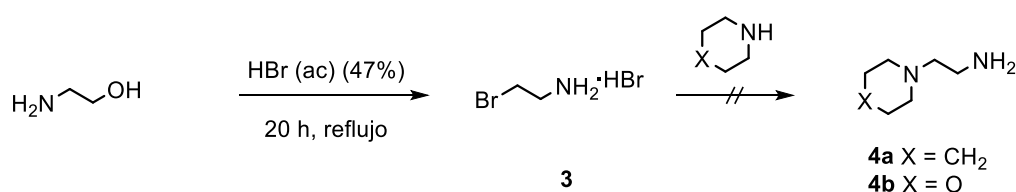
empleando altas temperaturas de reacción.<sup>180</sup> En este caso, la síntesis se realizó utilizando condiciones suaves<sup>179</sup> obteniéndose así el compuesto **1** con muy buen rendimiento (Esquema 1). La segunda etapa de la síntesis consistió en una sustitución nucleófila que dio lugar al compuesto **2** utilizando también condiciones suaves de reacción. Se pone así de manifiesto que la cuaternización del sistema heterocíclico aumenta la electrofilia de los carbonos conjugados con el heteroátomo.



Esquema 1. Síntesis del derivado **2**

- **Síntesis de derivados sustituidos con aminas heterocíclicas (6a-b)**

El siguiente paso fue abordar la síntesis de los correspondientes derivados conteniendo aminas heterocíclicas alifáticas en el extremo de la cadena. Para ello, se utilizó como reactivo inicial el 2-aminoetanol para dar lugar al bromohidrato de la 2-bromoetilamina **3** mediante tratamiento con HBr acuoso al 47%. Posteriormente, para tratar de obtener las aminas **4a** y **4b**, se hizo reaccionar el compuesto **3** con piperidina o morfolina. Sin embargo, en ningún caso se obtuvieron las aminas deseadas (Esquema 2).

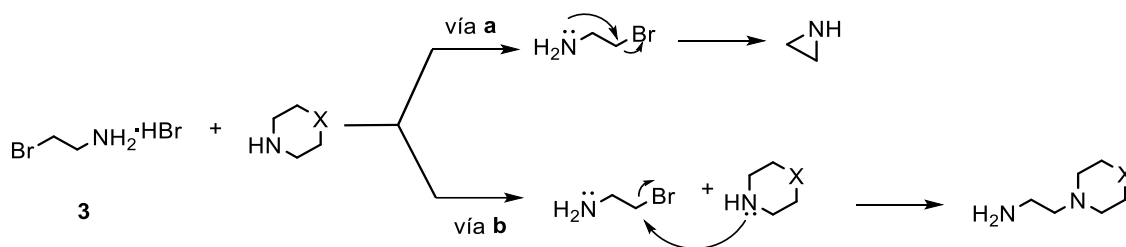


Esquema 2. Ensayo de obtención de las aminas **4a** y **4b**

<sup>180</sup> Homer, R. F.; Tomlinson, T. E. *J. Chem. Soc.* **1960**, 2498-2503.



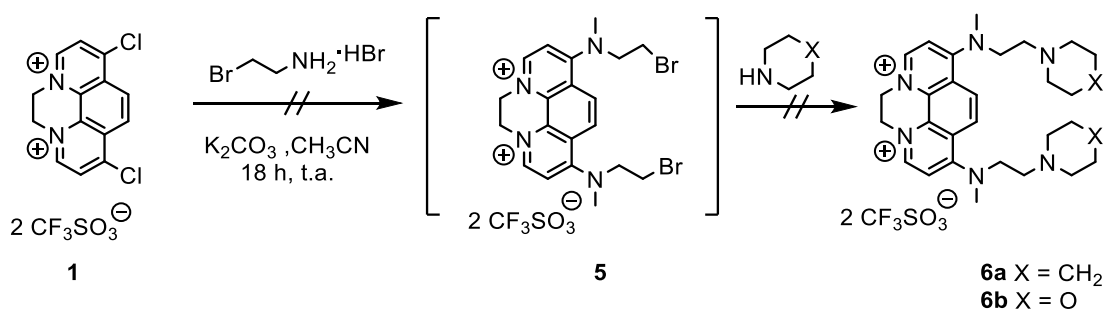
El principal problema fue la rápida formación de la aziridina durante el transcurso de la reacción. En el esquema 3, se representa lo que podría estar ocurriendo en las condiciones experimentales empleadas.



Esquema 3

La vía **a** consiste en la reacción del compuesto **3** con la base presente en el medio y un posterior ataque nucleofilo intramolecular del grupo amino del compuesto **3** sobre el carbono electrófilo, generando así la aziridina. En la vía **b**, se muestra la reacción de alquilación deseada. La estabilidad de las aziridinas, así como la posible mayor velocidad del proceso **a**, pueden explicar que no se formen las aminas deseadas.

A la vista de estos resultados, se ensayó otra ruta sintética para la obtención de los compuestos análogos a **2**. En este caso, se hizo reaccionar el derivado dihalogenado **1** con el compuesto **3**, generándose el intermedio **5** que, posteriormente, se haría reaccionar con las aminas heterocíclicas correspondientes para obtener los ligandos **6a** y **6b** (Esquema 4).



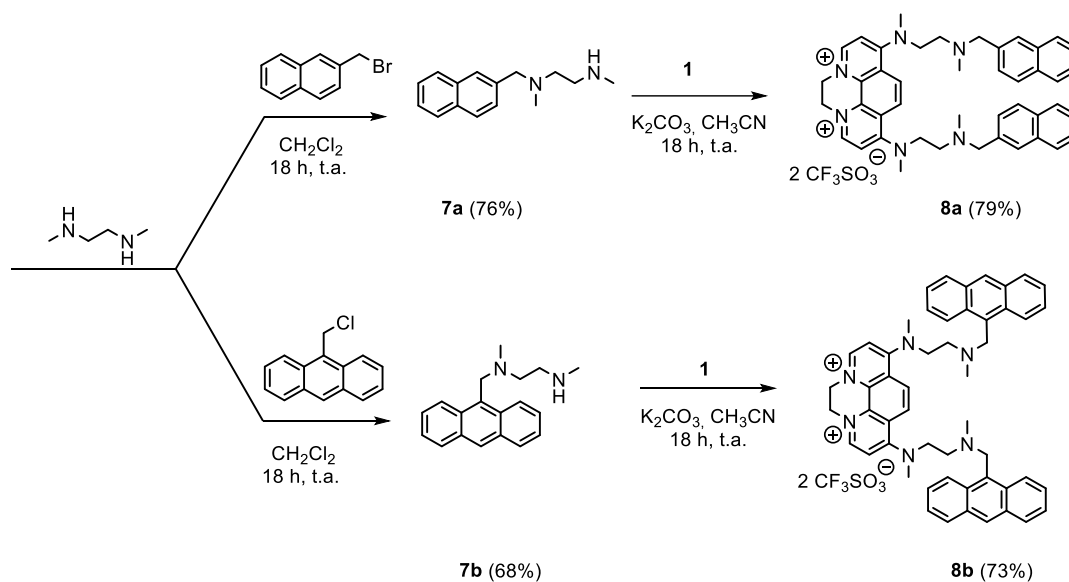
Esquema 4. Ensayo para la obtención de **6a** y **6b**

Al igual que ocurría en la ruta anterior, el compuesto **3**, en presencia de la base adicionada en el medio de reacción, parece conducir a la formación de la aziridina

prioritariamente. En este caso, se obtuvieron mezclas complejas de productos, lo que imposibilitó la obtención de los derivados **6a-b**.

- **Síntesis de los derivados con resto aromático (8a-b).**

La síntesis de los derivados con restos aromáticos se llevó a cabo tal y como se muestra en el esquema 5. En primer lugar, se obtuvieron las aminas **7a** y **7b** con buenos rendimientos y con menos de un 5% del producto de dialquilación. La formación de estos subproductos fue controlada por la adición lenta del derivado halogenado sobre la disolución de la amina, que se encontraba en exceso.



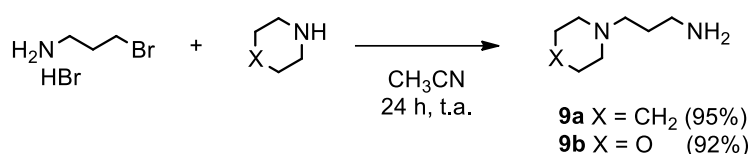
**Esquema 5.** Síntesis de los derivados **8a-b**

La posterior reacción con el compuesto **1** permitió aislar los derivados **8a** y **8b** fácilmente y con buenos rendimientos.

### 3.1.1.2 Síntesis de derivados de propilendiaminas

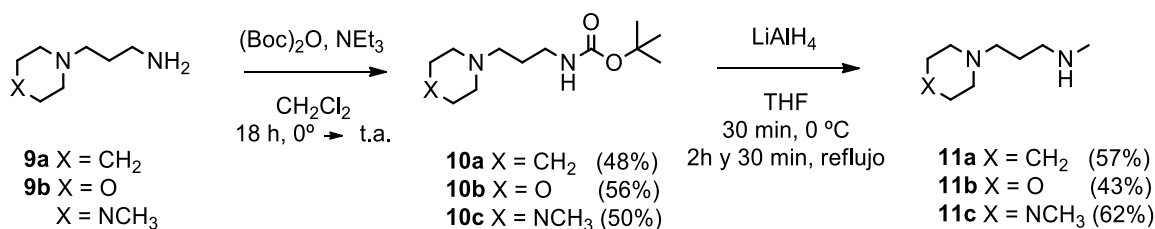
- Síntesis de metilaminas sustituidas con sistemas heterocíclicos alifáticos (11a-c)

La metodología empleada para la obtención de las metilaminas sustituidas con distintos heterociclos consistió en tres etapas. En primer lugar, se hizo reaccionar el correspondiente heterociclo con el bromohidrato de la 3-bromopropilamina, obteniéndose así las aminas primarias **9a** y **9b** (Esquema 6).



**Esquema 6.** Síntesis de las aminas **9a-b**

A partir de estas aminas, y de la *N*-metil-3-(4-metilpiperazin-1-il)propan-1-amina se prepararon los correspondientes carbamatos (**10a**, **10b** y **10c**)<sup>181</sup> para finalmente obtener las *N*-metilaminas (**11a**, **11b** y **11c**) (Esquema 7) por reducción con LiAlH<sub>4</sub>.<sup>182,183</sup>



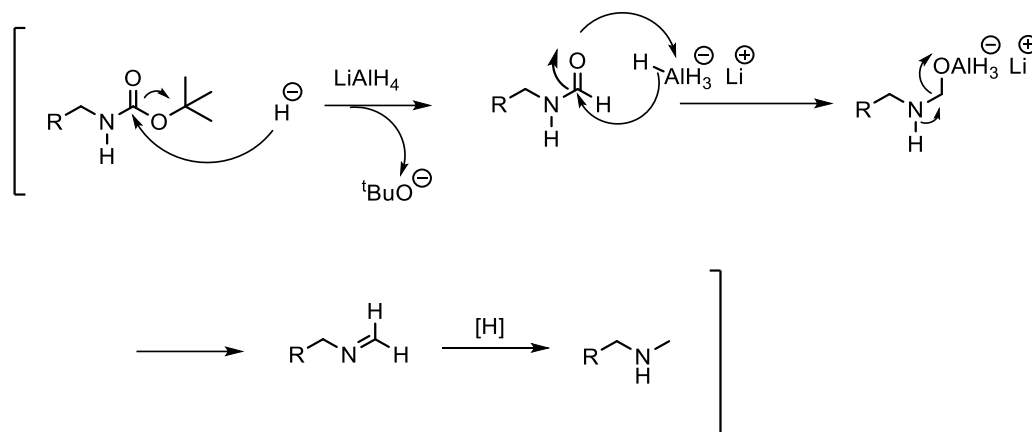
**Esquema 7.** Síntesis de las *N*-metilpropilaminas **11a-c**

<sup>181</sup> Springer, D. M.; Luh, B. Y.; D'Andrea, S. V.; Hudyma, T. W.; Kim, O. K. Patent Application Country: Application: US; US; Priority Application Country: US Patent US20020049191, **2002**.

<sup>182</sup> Lewis, J. G.; Jacobs, J. W.; Reich, N.; Leadbetter, M. R.; Bell, N.; Chang, H.; Chen, T.; Navre, M.; Charmot, D.; Carreras, C.; Labonte, E.; Du, X.; Oslob, J. Patent Application Country: Application: WO; WO; Priority Application Country: US Patent WO2012006475, **2012**.

<sup>183</sup> Coppo, F. T.; Maskell, E. S. L.; Redshaw, S.; Skidmore, J.; Ward, R. W.; Wilson, D. M. Patent Application Country: Application: WO; WO; Priority Application Country: GB Patent WO2007138033, 2007.

Utilizando esta metodología sintética, se ha evitado la obtención de subproductos dimetilados que podrían haberse formado en el caso de haber empleado un reactivo metilante, como el  $\text{CH}_3\text{I}$ , sobre las aminas primarias. La última etapa del proceso se puede explicar a través del siguiente mecanismo:<sup>184</sup>



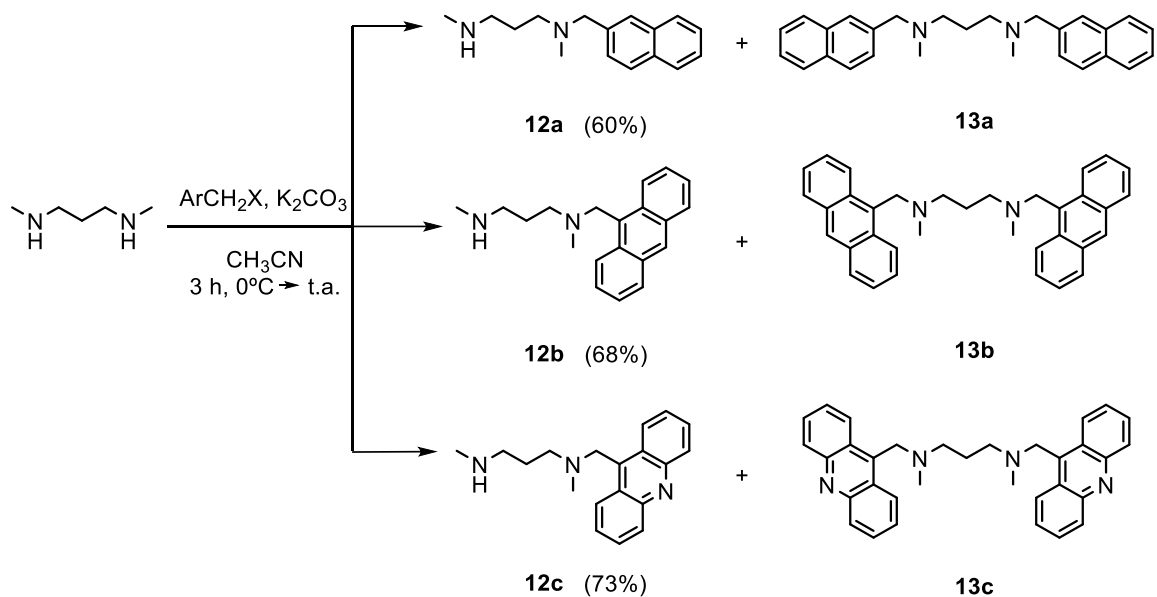
**Figura 70.** Propuesta de mecanismo para la formación de N-metilaminas mediante la reducción de los carbamatos con  $\text{LiAlH}_4$ <sup>184</sup>

En la primera etapa del mecanismo propuesto (Figura 70) se produce la reducción del grupo carbamato a la amida que, posteriormente, es reducida originando un aminoalcoóxido. En la siguiente etapa del mecanismo se produce la deshidratación del aminoalcoóxido generando una imina, que es finalmente reducida al correspondiente N-metil derivado.

#### • Síntesis de las metilaminas con resto aromático (12a-c)

La obtención de las metilaminas con resto aromático se abordó por reacción de la *N,N'*-dimetilpropanodiamina con los correspondientes derivados halogenados (2-bromometilnaftaleno, 9-clorometilantraceno o 9-bromometilacridina) utilizando  $\text{K}_2\text{CO}_3$  como base (Esquema 8).

<sup>184</sup> Redko, B.; Albeck, A.; Gellerman, G. *New J. Chem.* **2012**, *36*, 2188-2191.



**Esquema 8.** Síntesis de las aminas **12a-c**

La preparación de los compuestos **12a-c** se llevó a cabo adicionando durante 2 horas a  $0^\circ\text{C}$  una disolución 0.05 M del correspondiente derivado halogenado a una disolución de *N,N'*-dimetilpropanodiamina en acetonitrilo. De este modo, se pretendía evitar la formación de los derivados disustituídos (**13a**, **13b** y **13c**). Sin embargo, no se pudo evitar la formación de los subproductos, pero si reducirla a proporciones muy inferiores con respecto al producto deseado. En el caso del derivado de naftaleno, solo se observaron trazas del producto disustituído, pero, en el caso de los derivados de antraceno y acridina, las relaciones molares monosustituído/disustituído siempre estuvieron comprendidas entre (85:15) y (90:10). Estos datos fueron calculados a partir de los correspondientes espectros  $^1\text{H}$ -RMN (véase, por ejemplo, la figura 71).

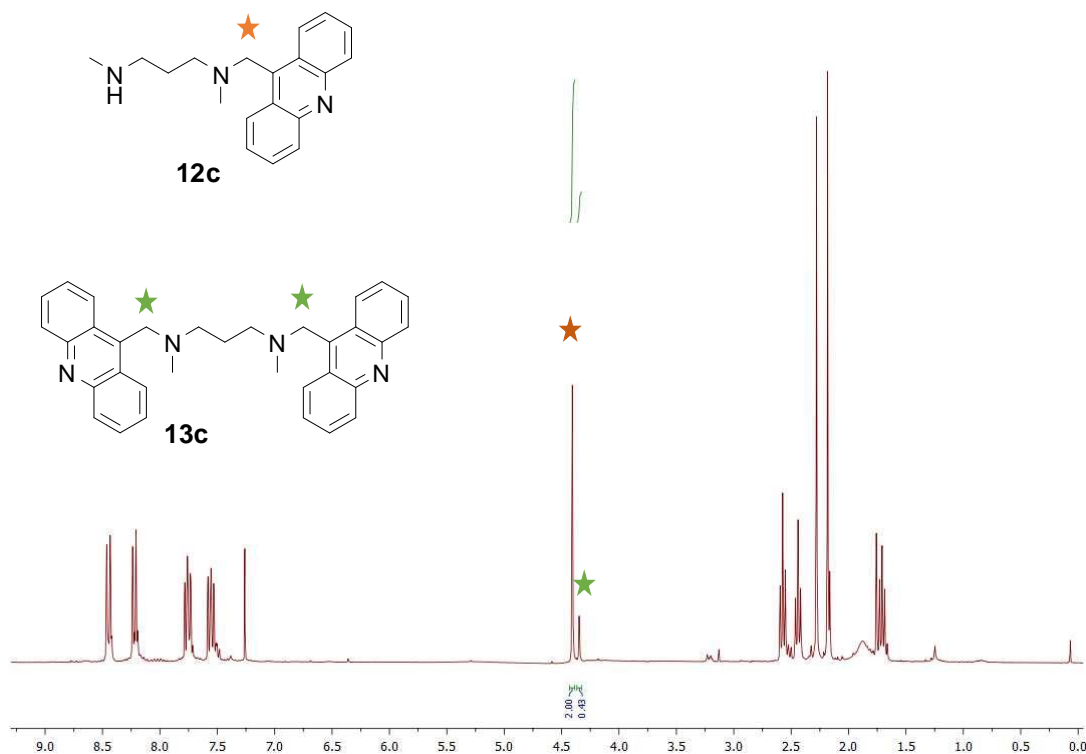
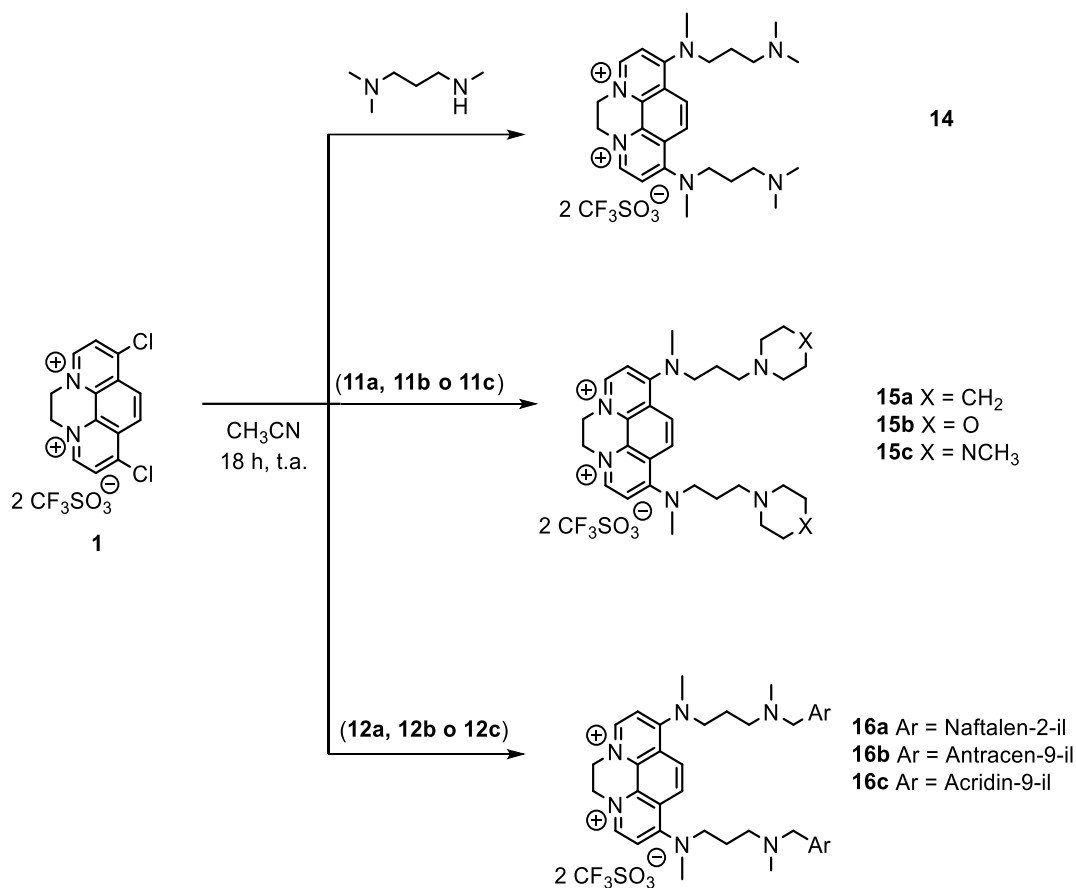


Figura 71. Espectro <sup>1</sup>H-RMN de la mezcla de compuestos **12c** + **13c**

Las mezclas de producto monosustituido y disustituido fueron utilizadas directamente en la siguiente etapa de reacción. Los correspondientes derivados disustituídos (**13a-c**) se eliminaron fácilmente en el proceso de aislamiento de los productos finales.

• **Síntesis de los derivados de 1,10-fenantrolina dicuaternizados (14, 15a-c y 16a-c)**

De modo análogo a la síntesis de los compuestos **8a** y **8b**, se llevó a cabo la preparación de los compuestos **14**, **15a-c** y **16a-c**. Para su obtención se emplearon el derivado dihalogenado **1** y las aminas **11 a-c**, **12 a-c** y la *N,N,N'*-trimetilpropanodiamina, tal y como se recoge en el esquema 9.



Esquema 9. Ruta sintética para los compuestos finales **14**, **15a-c** y **16a-c**

En este caso fue posible la obtención de todos los derivados propuestos con rendimientos moderados. A continuación, en la tabla 1, se presentan los rendimientos obtenidos en esta última etapa sintética, así como los rendimientos globales.

	%Rdto.	%Rdto. Global
<b>14</b>	74	74
<b>15a</b>	83	22
<b>15b</b>	30	7
<b>15c</b>	40	12
<b>16a</b>	53	32
<b>16b</b>	60	41
<b>16c</b>	32	23

Tabla 1. Rendimientos de los ligandos dicuaternizados **14**, **15a-c** y **16a-c**

### 3.1.2 Síntesis de compuestos derivados del sistema de 1,10-fenantrolina sustituido en las posiciones 4 y 7

En este apartado se describe la síntesis de diferentes derivados de 1,10-fenantrolina sustituidos en las posiciones relativas 4 y 7 con el objetivo de obtener ligandos simétricos. Para ello, se utilizaron como fenantrolinas de partida la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina o la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina (DCF) (Figura 72).

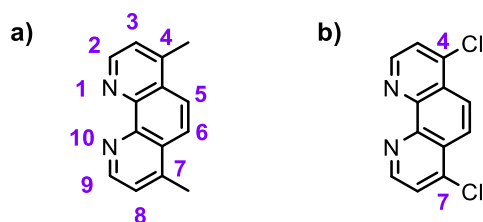
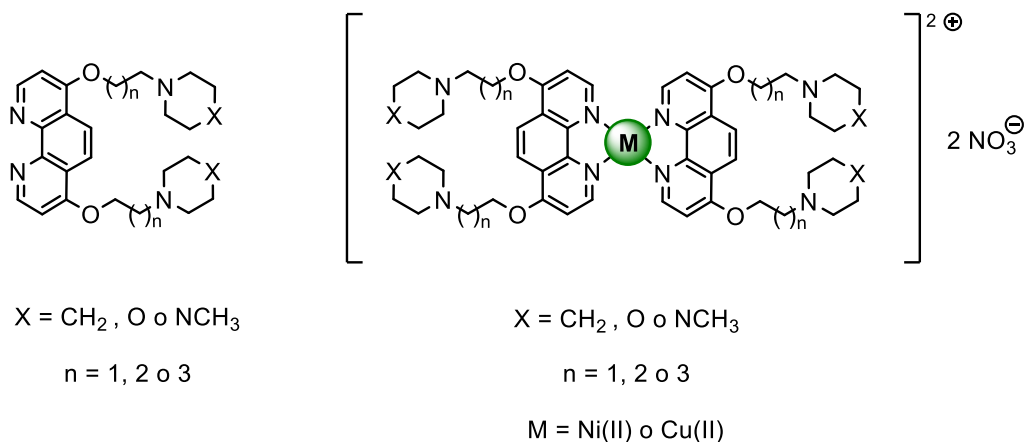


Figura 72. (a) 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (b) 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina (DCF)

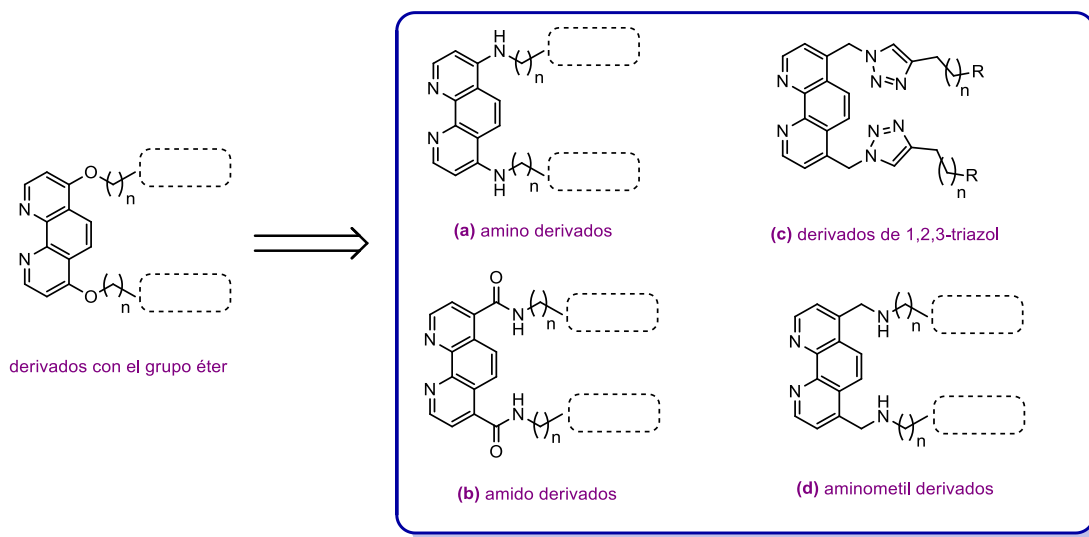
Previamente, en el grupo de investigación, se prepararon derivados de la 1,10-fenantrolina sustituida en las posiciones 4 y 7 conteniendo grupos éter (Figura 73) así como diferentes complejos metálicos.<sup>61</sup> Basándonos en los buenos resultados de afinidad y estabilización hacia el ADN cuádruple-G obtenidos con estos ligandos y con sus correspondientes complejos metálicos de Cu(II) y Ni(II), se decidió sustituir ese grupo funcional por otros que pudieran igualar o mejorar esta interacción frente al ADN cuádruple.





**Figura 73.** Derivados de la 1,10-fenantrolina sintetizados previamente en el grupo<sup>61</sup>

Las estructuras propuestas se muestran en la figura 74. En primer lugar, nos planteamos la síntesis de aminoderivados (Figura 74a) así como de aminometil derivados (Figura 74d) con el objetivo de observar si la existencia de un carbono entre el sistema aromático y el grupo amino cambia el modo de interacción de los ligandos con el ADN. Otra de las propuestas planteadas fue la preparación de ligandos con el grupo amido (Figura 74b) y, finalmente, la síntesis de 1,10-fenantrolinas con 1,2,3-triazol como sustituyente (Figura 74c).



**Figura 74.** Estructuras de los ligandos objetivo

### 3.1.2.1 Síntesis de amino derivados

Uno de los primeros objetivos fue la obtención de amino derivados (Figura 74a) análogos a los derivados dicuaternizados descritos previamente. Se planteó la obtención de estos compuestos para determinar las posibles diferencias de interacción frente al ADN que supondría la dicuaternización o no de la estructura (Figura 75). En la literatura,<sup>147</sup> existe algún ejemplo de este tipo de derivados, obtenidos mediante síntesis por microondas.

En este caso, se ha intentado plantear la preparación de estos derivados empleando otras estrategias sintéticas.

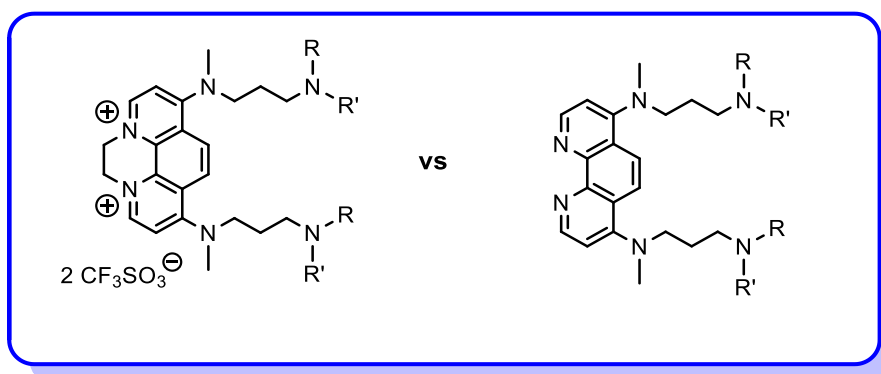
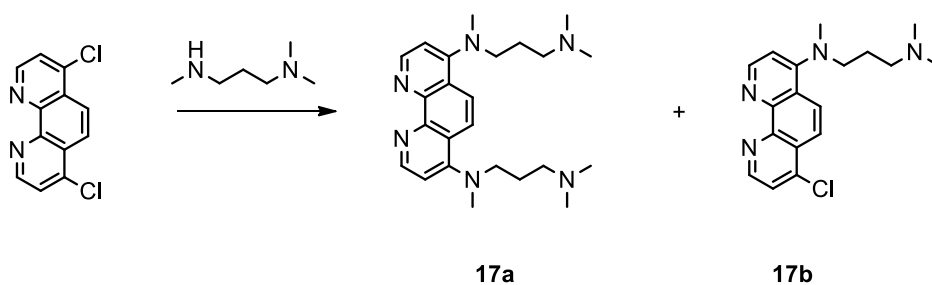


Figura 75. Derivados dicuaternizados vs. derivados sin dicuaternizar

La optimización de las condiciones de reacción se llevó a cabo variando diferentes parámetros recogidos en la tabla 2 y utilizando como amina la *N,N',N'*-trimetilpropanodiamina (Esquema 10).



Esquema 10. Ensayo inicial para la síntesis de amino derivados de la 1,10-fenantrolina

	Disolvente	Tiempo	Aditivos	Temperatura	Resultados
1	CH <sub>3</sub> CN	48 h	--	t.a.	DCF
2	CH <sub>3</sub> CN	48 h	--	reflujo	DCF:17b (1:1)
3	CH <sub>3</sub> CN	5 días	--	150 °C Tubo sellado	17a:17b (1:1)
4	DMF	72 h	AgNO <sub>3</sub>	t.a.	17a:17b (1:1)

**Tabla 2.** Condiciones de reacción ensayadas para la síntesis de amino derivados

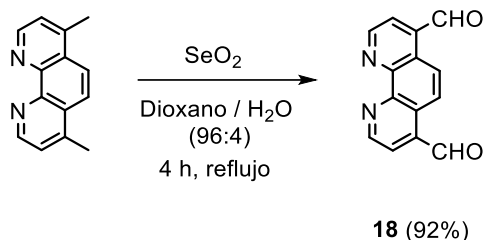
Para la formación del compuesto disustituido **17a** debemos emplear condiciones de reacción más drásticas que en el caso de los compuestos dicuaternizados ya que la cuaternización de los nitrógenos de las fenantrolinas incrementa notablemente su reactividad. Como se muestra en la entrada 2, tras 48 horas de reacción a reflujo solo se obtuvo la conversión al 50% de la DCF al derivado monosustituido **17b**. Aumentando el tiempo a 5 días, la temperatura a 150 °C y utilizando un tubo sellado para incrementar la presión en el sistema (entrada 3), se pudieron obtener **17a** y **17b** con relaciones molares 1:1. Finalmente, se probó la adición de AgNO<sub>3</sub> (entrada 4) para ver si la formación de AgCl podría facilitar la sustitución nucleófila en el anillo de fenantrolina. Sin embargo, se obtuvo el mismo resultado que al emplear las condiciones descritas en la entrada 3.

El empleo de AgNO<sub>3</sub> a temperatura ambiente resultó ser igual de efectivo que aplicar 150 °C de temperatura al sistema en un tubo sellado. Por cuestiones de tiempo no se siguió explorando más alternativas para la obtención de estos derivados. Una posibilidad podría haber sido el empleo de las condiciones de la entrada 4 aplicando más temperatura al sistema y utilizando un tubo sellado.

### 3.1.2.2 Síntesis de derivados a partir de la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina

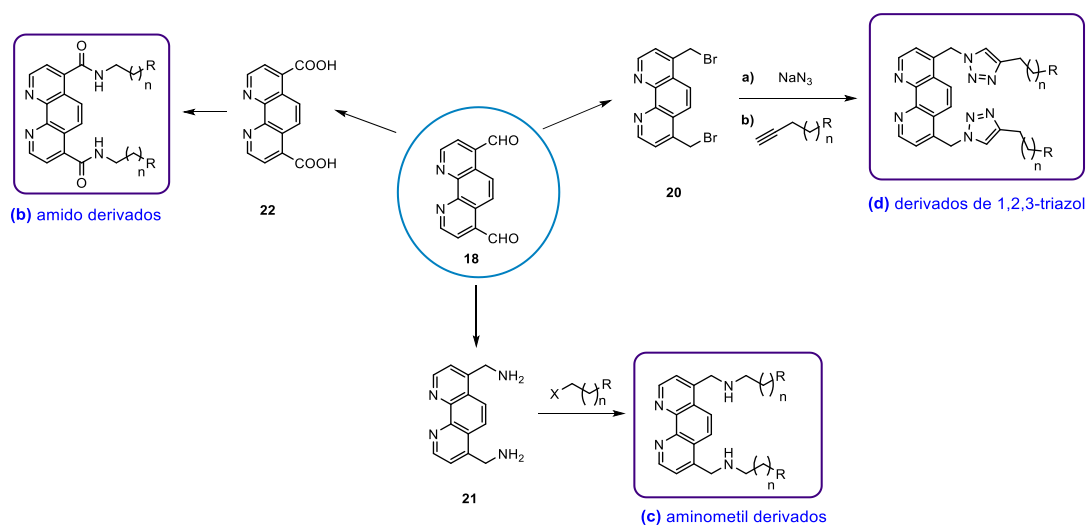
El primero de los objetivos establecidos fue la conversión de la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina en distintos derivados que permitiesen la obtención de compuestos con diferentes grupos funcionales, obteniendo así una pequeña quimioteca de compuestos.

Para ello, fue necesario, en primer lugar, la obtención de la 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldehído mediante la oxidación del reactivo de partida con  $\text{SeO}_2$  en las condiciones que se recogen en el esquema 11.<sup>185</sup>



**Esquema 11.** Síntesis del dialdehído **18**

Como se ha mencionado previamente (Figura 74), inicialmente nos planteamos la obtención de cuatro familias diferentes de compuestos. A excepción de la descrita en el apartado anterior (3.1.2.1), tres de ellas comparten un precursor común, el dialdehído **18**, tal y como se muestra en la figura 76.



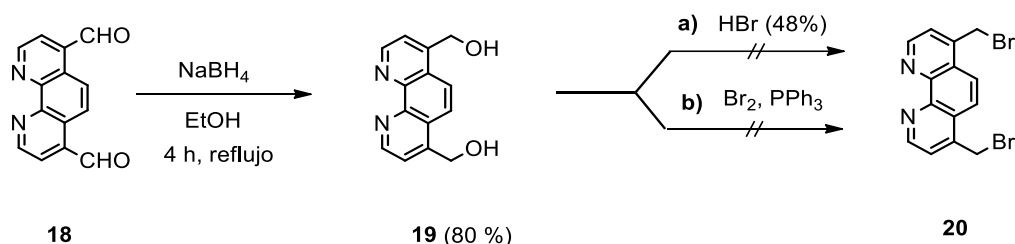
**Figura 76.** Rutas sintéticas propuestas para la obtención de las familias de compuestos objetivo

<sup>185</sup> (a) Kus, P.; Knerr, G.; Czuchajowski, L. *J. Heterocycl. Chem.* **1991**, *28*, 7-11. (b) Yanagida, M.; Singh, L. P.; Sayama, K.; Hara, K.; Katoh, R.; Islam, A.; Sugihara, H.; Arakawa, H.; Nazeeruddin, M. K.; Gratzel, M. *Dalton* **2000**, *16*, 2817-2822. (c) Hara, K.; Sugihara, H.; Singh, L. P.; Islam, A.; Katoh, R.; Yanagida, M.; Sayama, K.; Murata, S.; Arakawa, H. *J. Photochem. Photobiol. A* **2001**, *145*, 117-122.

A continuación, se recogen los resultados obtenidos en la síntesis de los compuestos precursores **20**, **21** y **22**.

- **Síntesis de la 4,7-bis(bromometil)-1,10-fenantrolina (20)**

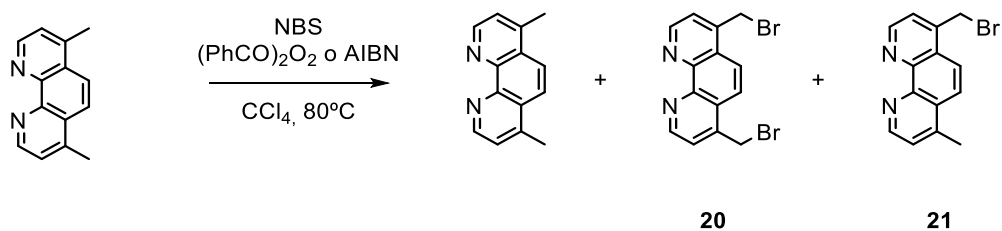
La síntesis de este derivado se abordó mediante varias vías sintéticas. En la primera de ellas se utilizó un protocolo previamente descrito en la bibliografía.<sup>186</sup> Para ello, se preparó la 4,7-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina (**19**) reduciendo con NaBH<sub>4</sub> el dialdehído **18** (Esquema 12). Posteriormente, se utilizó el procedimiento descrito para la obtención de **20** (ruta **a**) pero no fue posible su obtención en esas condiciones ni siquiera modificando parámetros como el tiempo y la temperatura. La siguiente metodología empleada fue la designada como **b** en el esquema 12, en la que se emplea Br<sub>2</sub> como agente de bromación en lugar de HBr. Desafortunadamente, tampoco se obtuvo el compuesto deseado en estas condiciones.



**Esquema 12.** Ensayo para la obtención de **20**

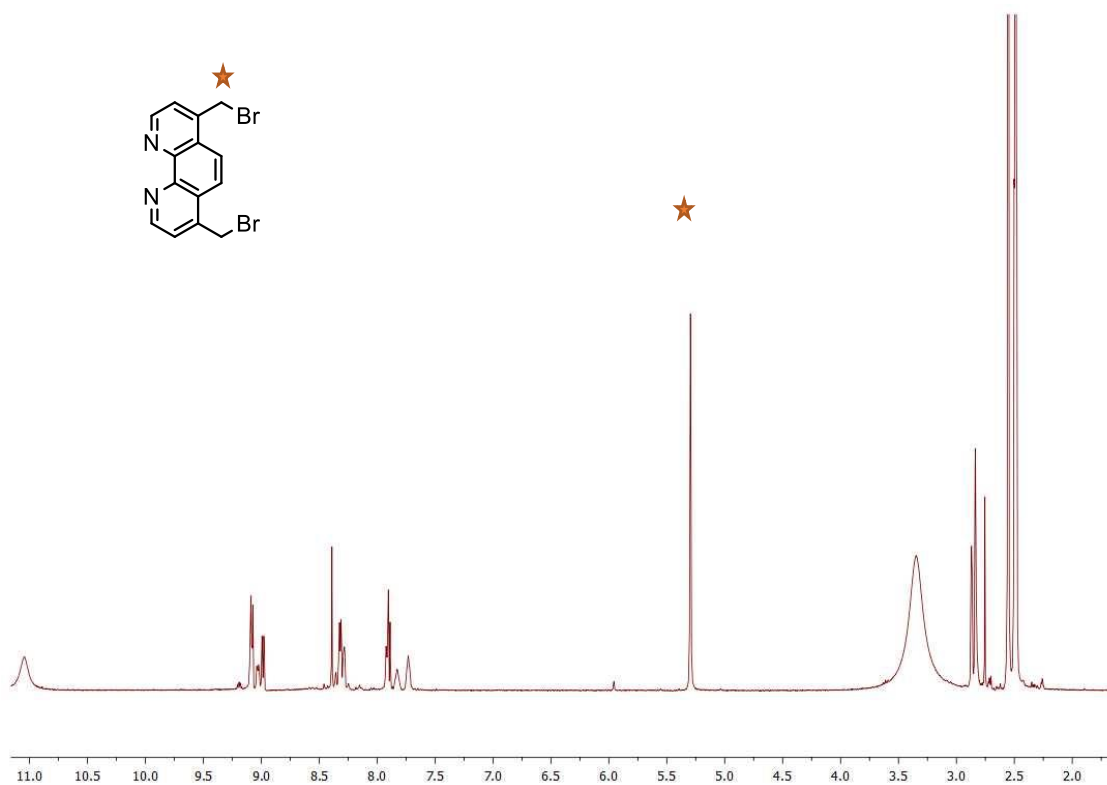
La siguiente ruta sintética empleada fue la bromación radicalica de la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina utilizando NBS y peróxido de benzoílo o AIBN como iniciadores (Esquema 13).

<sup>186</sup> (a) Chandler, C. J.; Deady, L. W.; Reiss, J. A. *J. Heterocycl. Chem.* **1981**, *18*, 599-601. (b) Higashi, T.; Inami, K.; Mochizuki, M. *J. Heterocycl. Chem.* **2008**, *45*, 1889-1892.

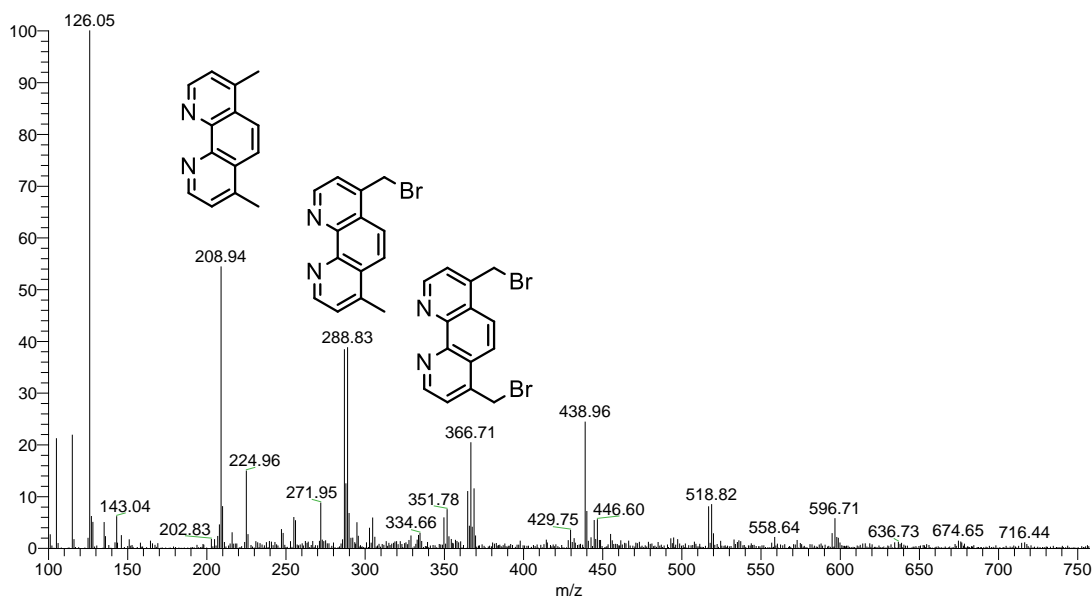


**Esquema 13.** Ensayo para la obtención de **20** por vía radicalica

Inicialmente, a tiempos cortos de reacción (30-45 minutos) se observó, por  $^1\text{H}$ -RMN y espectrometría de masas, que el producto deseado **20** se había formado junto con el derivado monobromado **21** (Figura 77 y Figura 78).



**Figura 77.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del crudo de reacción para la obtención de **20**



**Figura 78.** Espectro de masas del crudo de reacción para la obtención de **20**

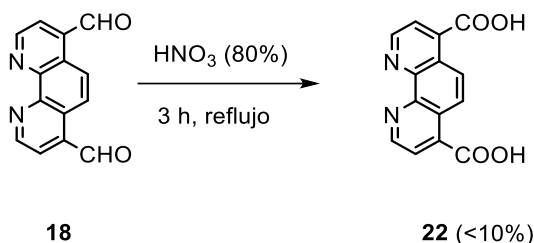
Incrementando el tiempo de reacción a 2 horas y empleando temperaturas superiores a 75 °C, se observó la conversión total del compuesto monobromado **21** en el compuesto deseado **20**. Sin embargo, aparecieron productos de bromación en el anillo aromático imposibles de separar del compuesto **20**. Debido a la inestabilidad de los productos tanto en sílice como en alúmina se intentó optimizar las condiciones de reacción para la obtención de un único producto, de manera infructuosa. Como consecuencia de ello, finalmente no se pudo abordar la obtención de la familia de compuestos derivados de 1,2,3-triazol.

- **Síntesis de derivados de tipo amido**

Para la preparación de este tipo de compuestos, es necesario la obtención previa del ácido 1,10-fenantrolina-4,7-dicarboxílico (**22**). La síntesis de este compuesto se abordó, en primer lugar, empleando las condiciones recogidas en la bibliografía.<sup>185a-b,187</sup> El procedimiento descrito está basado en la oxidación del dialdehído **18** con una

<sup>187</sup> Oh, H.; Kim, J.; Yun, S. H.; Lee, J.; Park, B.; Tak, J.; Kim, B. H. *Synth. Met.* **2014**, *198*, 260-266.

disolución de HNO<sub>3</sub> al 80%. Sin embargo, no fuimos capaces de reproducirla de manera eficaz (Esquema 14).



**Esquema 14.** Síntesis del ácido 1,10-fenantrolina 4,7-dicarboxílico (**22**)

Por otra parte, también se ensayaron diferentes oxidaciones clásicas para la obtención de ácidos carboxílicos, como el empleo de SeO<sub>2</sub> a altas temperaturas o de la mezcla oxidante CrO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,<sup>188</sup> pero no se obtuvieron los resultados deseados.

Posteriormente, se ensayaron dos metodologías más. En la primera de ellas (**a**) el sistema oxidante está formado por la mezcla H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>/CrO<sub>3</sub><sup>189</sup> y, como sustrato de partida, se emplea el alcohol **19**. En la segunda metodología (**b**) se empleó como sistema oxidante la mezcla AgNO<sub>3</sub>/NaOH<sup>190</sup> y como sustrato de partida el dialdehído **18** (Esquema 15).

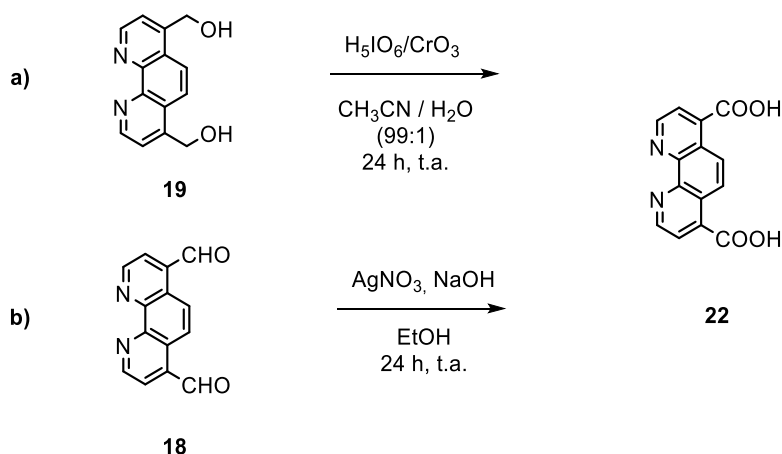
<sup>188</sup> (a) Jhou, Y.; Chiou, C.; Ni, L.; Chen, L.; Chen, Y.; Cheng, C. *J. Chin. Chem. Soc. (Weinheim, Ger.)* **2012**, *59*, 1053-1057.

(b) Banerjee, T.; Biswas, A. K.; Reddy G, U.; Sahu, T. S.; Das, A.; Ganguly, B.; Ghosh, H. N. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 3864-3877.

<sup>189</sup> Zhao, M.; Li, J.; Song, Z.; Desmond, R.; Tschaen, D. M.; Grabowski, E. J. J.; Reider, P. J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5323-5326.

<sup>190</sup> Shigeta, Y.; Kobayashi, A.; Ohba, T.; Yoshida, M.; Matsumoto, T.; Chang, H.; Kato, M. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 2682-2690.

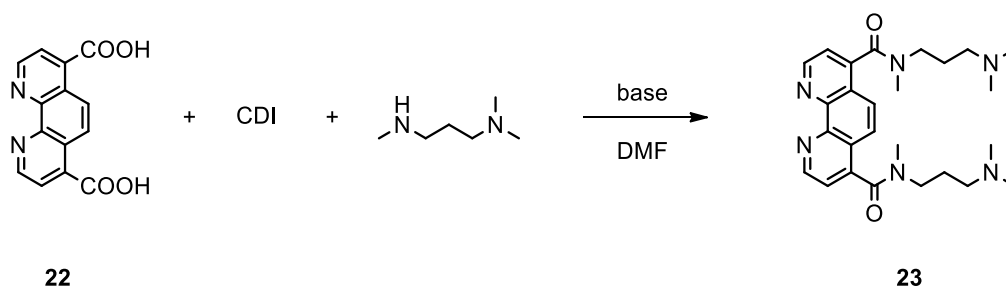




**Esquema 15.** Síntesis del ácido 1,10-fenantrolina 4,7-dicarboxílico (**22**)

Ambas reacciones condujeron a la formación del producto **22**. En el caso de la vía **a**, la conversión fue de un 100%. Sin embargo, se obtuvo el producto junto a una gran cantidad de fosfatos provenientes del proceso de elaboración de la reacción. Por este motivo, no se pudo utilizar el producto para reacciones posteriores. En el caso **b**, se obtuvo el producto deseado, sin ningún tipo de complicaciones y con un 60% de rendimiento.

Una vez preparado el compuesto **22**, se abordó la síntesis de los derivados de amida empleando como amina la *N,N,N'*-trimetilpropilendiamina, previa activación del grupo carboxilo utilizando carbonildiimidazol (CDI) (Esquema 16).



**Esquema 16.** Ensayo para la síntesis de **23**

Este tipo de reacción permitió el acceso a la correspondiente diamida, en un solo paso, sin aislar la imidazolida intermedia, tal y como hemos descrito previamente en el

grupo de investigación para derivados de 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 2 y 9.<sup>191</sup> En este caso se utilizó como base la propia amina, en exceso estequiométrico (Tabla 3). Tal y como sucedía para la familia de análogos sustituidos en las posiciones 2 y 9, los espectros de <sup>1</sup>H-RMN son relativamente complejos, por la presencia de los distintos isómeros geométricos *Z* y *E*.

Base	Eq. Base	Masas	H-RMN
Propia amina	6.25	465 y 233 (M+H <sup>+</sup> , M+2H <sup>+</sup> )	Mezcla de isómeros <i>Z</i> , <i>E</i>

Tabla 3

La obtención de **23** se corroboró por espectrometría de masas donde se obtuvieron las señales 465 y 233 correspondientes al compuesto deseado (Tabla 3).

Una vez comprobada la posibilidad de obtener los derivados de tipo amido por esta vía, quedaría pendiente la optimización de las condiciones para su aplicación a la preparación de otras amidas más complejas, que precisan el uso de aminas sintéticas en proporción molar más ajustada a la estequiométrica.

En esta tesis doctoral no ha sido posible la obtención de una familia de compuestos de tipo amido por cuestiones de tiempo. Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos queda abierta esta vía sintética para la obtención de dichos derivados en trabajos futuros.

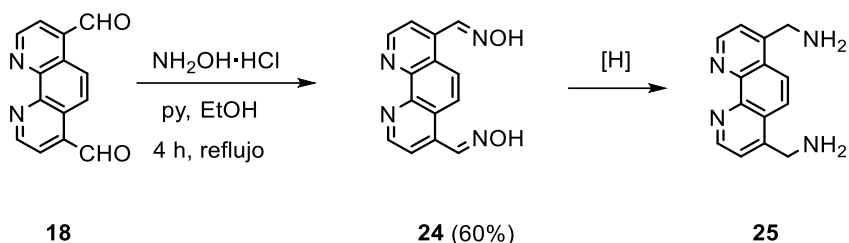
- **Síntesis de la 4,7-bis(aminometil)-1,10-fenantrolina (25)**

La preparación de la 4,7-bis(aminometil)-1,10-fenantrolina se abordó mediante el empleo de diferentes rutas sintéticas. En la primera de ellas, se emplearon los procedimientos sintéticos descritos en la bibliografía para la preparación de derivados de 1,10-fenantrolinas análogos, pero sustituidos en las posiciones 2 y 9.<sup>186a,192</sup> A partir del dialdehído **18**, se preparó la 1,10-fenantrolina 4,7-(dicarbaldoxima) **24**, para posteriormente reducirla a la correspondiente diamina (Esquema 17). La reducción de

<sup>191</sup> Gude, L.; Fernandez, M.; Grant, K. B.; Lorente, A. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1856-1862.

<sup>192</sup> Lewis, F. W.; Harwood, L. M.; Hudson, M. J.; Drew, M. G. B.; Desreux, J. F.; Vidick, G.; Bouslimani, N.; Modolo, G.; Wilden, A.; Sypula, M.; Vu, T.; Simonin, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 13093-13102.

la oxima se abordó adaptando un protocolo descrito previamente, basado en la reducción con Pd/C y HClO<sub>4</sub>, como dador de hidrógeno.<sup>186a</sup>

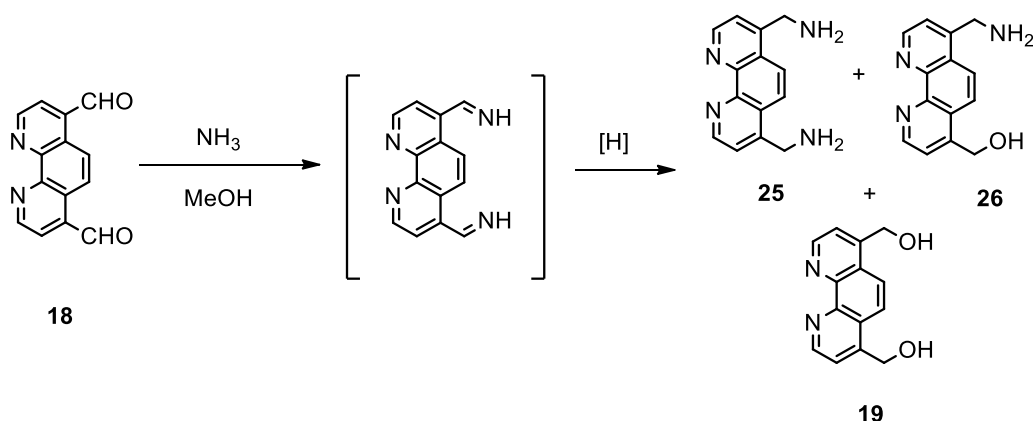


**Esquema 17.** Ensayo para la síntesis del compuesto **25**

Al observar que este sistema no producía el resultado esperado se empleó NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> como sistema generador de H<sub>2</sub>. En este caso, se modificaron la temperatura, tiempo y equivalentes de hidracina utilizados, pero, desafortunadamente, en ninguno de los casos se obtuvo el compuesto **25**.

La reducción de la dioxima **24** se ensayó con otros sistemas reductores como Zn/CH<sub>3</sub>COOH, NiCl<sub>2</sub> o TiCl<sub>4</sub>, pero tampoco se obtuvo el resultado deseado en ninguno de los casos. Una posible hipótesis para los resultados obtenidos con los ensayos en los que se emplea un metal en el sistema reductor podría ser la complejación de la 1,10-fenantrolina con el metal utilizado, siendo esta reacción más rápida que la reacción de reducción en la que debe implicarse el metal.

Otro modo de abordar la obtención de **25** fue a través de una aminación reductora del compuesto **18** con amoníaco en disolución (Esquema 18).



**Esquema 18.** Ensayo de síntesis de **25** por la vía de aminación reductora

Al igual que en los casos anteriores, la reacción se llevó a cabo empleando diferentes condiciones de reacción. En el mejor de los casos, lo que se obtuvo fue la mezcla de productos que se muestran en el esquema 18. Dicha mezcla fue caracterizada por  $^1\text{H}$ -RMN, pero los compuestos no pudieron aislarse.

Al no poder obtenerse el derivado **25**, se abandonó la síntesis de los aminometil derivados mediante la obtención de este compuesto y su posterior alquilación. Sin embargo, los derivados aminometil deseados se pudieron preparar mediante el empleo de una ruta alternativa, que se describe en el siguiente apartado.

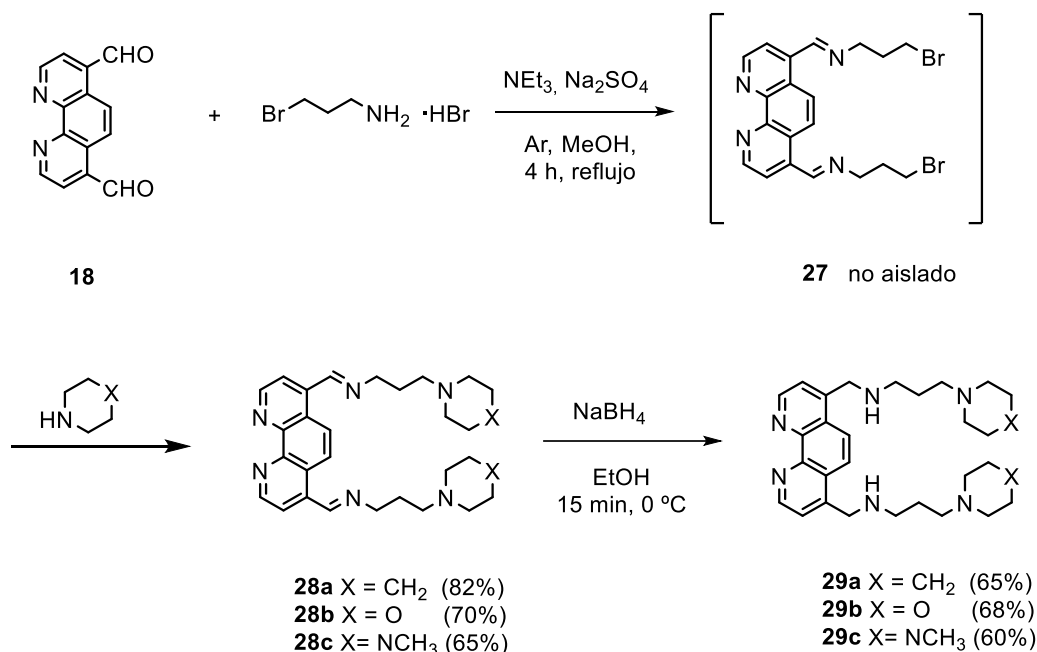
### 3.1.2.3 Síntesis de aminometil derivados

La obtención de los aminometil derivados se planificó de forma análoga a la de los compuestos dicuaternizados descritos en el apartado **3.1.1.2**. Para ello, se propuso la síntesis de derivados conteniendo una amina heterocíclica o un resto aromático en el extremo de la cadena alifática de tres átomos de carbono.

- **Síntesis de derivados de la 1,10-fenantrolina con cadenas nitrogenadas en posiciones 4,7 conteniendo aminas heterocíclicas (29a-d)**

Para la obtención de estos compuestos se ensayaron diferentes alternativas sintéticas, empleando al dialdehído **18** como producto de partida en todas ellas. En la primera opción planteada (ruta **A**), se hizo reaccionar **18** con la 3-bromopropilamina para formar así la imina **27**. Dicha imina no fue aislada y sobre ella se llevó a cabo la

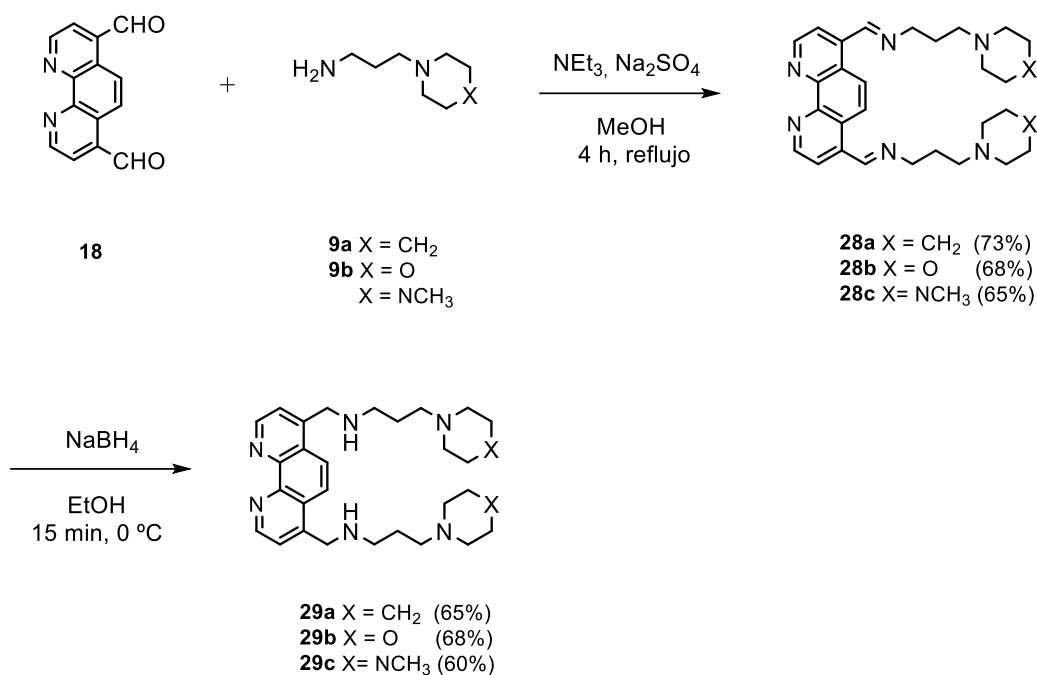
correspondiente reacción de alquilación con las distintas aminas heterocíclicas. Las iminas obtenidas (**28a-c**) fueron aisladas y posteriormente reducidas con  $\text{NaBH}_4$  generando así las correspondientes aminas (**29a-c**) (Esquema 19).



Esquema 19. Síntesis de los aminometil derivados **29a-c**, ruta A

Los rendimientos obtenidos fueron de moderados a altos para los compuestos **28a-c** y moderados para los compuestos **29a-c**.

La segunda vía sintética (ruta B) se fundamentó en el proceso de aminación reductora entre el dialdehído **18** y las distintas propilaminas **9a** y **9b** sintetizadas previamente en este trabajo y con la *N*-metil-3-(4-metilpiperazin-1-il)propan-1-amina. Las iminas **28a-c** fueron obtenidas y aisladas con rendimientos moderados para, finalmente, ser reducidas con  $\text{NaBH}_4$  obteniéndose así los compuestos deseados **29a-c** (Esquema 20).



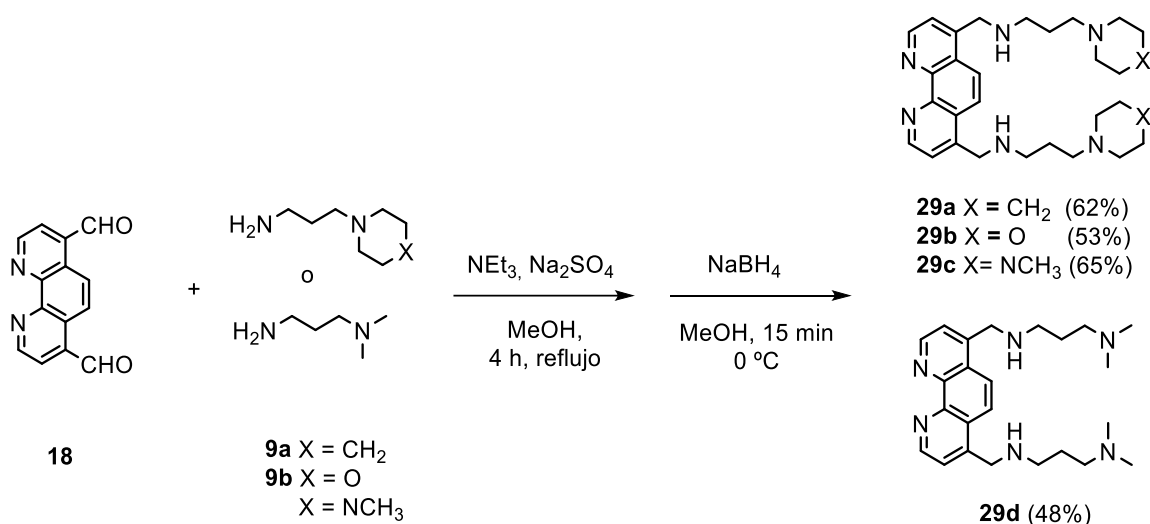
**Esquema 20.** Síntesis de los aminometil derivados **29a-c**, ruta **B**

	%Rdto. global Ruta A	%Rdto. global Ruta B
<b>29a</b>	49	41
<b>29b</b>	43	39
<b>29c</b>	36	36

**Tabla 4.** Rendimientos globales rutas **A** y **B**

Si comparamos los resultados obtenidos empleando ambas rutas sintéticas, se puede observar que los rendimientos globales son moderados y muy similares, siendo ligeramente más altos los de la ruta sintética **A** (Tabla 4). Sin embargo, experimentalmente se ha comprobado que esta ruta es menos reproducible que la ruta **B**. Este hecho puede estar relacionado con la menor estabilidad de la imina intermedia **27** formada en la ruta **A**. Por lo tanto, el proceso de obtención de las iminas **28a-c** posiblemente sea menos consistente en el caso de la ruta **A** que en el caso de la ruta **B**.

Teniendo en cuenta los pequeños inconvenientes encontrados en las rutas **A** y **B**, y con el fin de mejorar los rendimientos para la obtención de los compuestos **29a-c**, se ensayó una nueva estrategia (ruta **C**). En este caso, se siguió la misma metodología empleada en la ruta **B**, ya que fue la que mejor reproducibilidad presentó, pero evitando el aislamiento de las iminas intermedias **28a-c** (Esquema 21). Además, se incluyó en la serie un compuesto más, **29d**, proveniente del empleo de la *N,N*-dimetilpropanodiamina.



**Esquema 21.** Síntesis de los derivados aminometil **29a-d** por la ruta **C**

En este caso, al no aislarse las iminas intermedias, los rendimientos globales son más elevados que en los casos anteriores (Tabla 5). Además, al realizar la reacción de aminación reductora en un solo paso y sin aislamiento previo de las iminas, la reproducibilidad del proceso es mayor que en los casos anteriores.

	%Rdto. Global
<b>29a</b>	54
<b>29b</b>	45
<b>29c</b>	60
<b>29d</b>	44

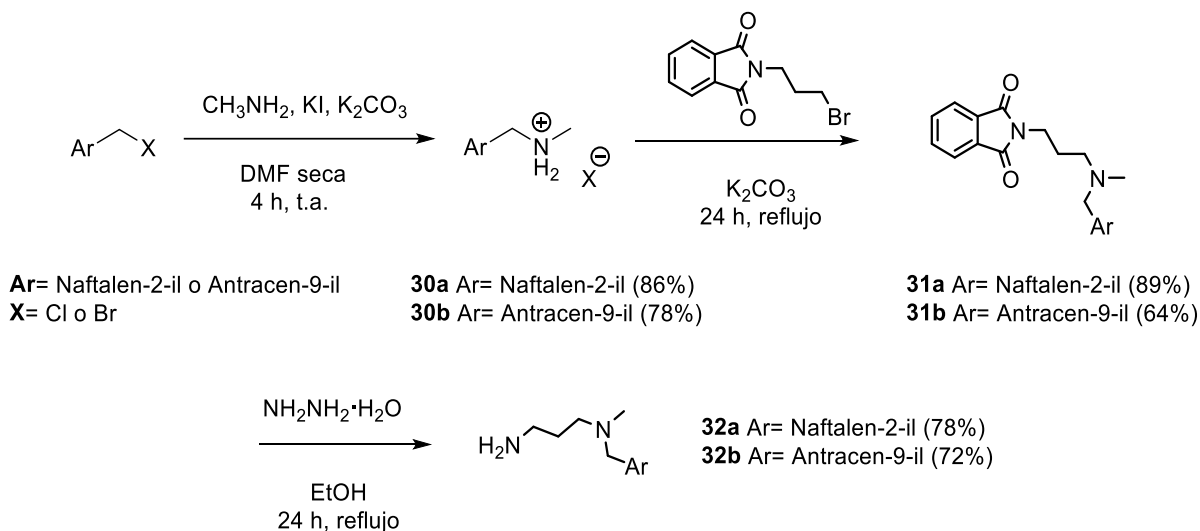
**Tabla 5.** Rendimientos globales ruta **C**

• **Síntesis de derivados de la 1,10-fenantrolina con cadenas nitrogenadas en posiciones 4,7 conteniendo grupos aromáticos (33a-b)**

La preparación de los derivados **33a** y **33b** se llevó a cabo empleando la metodología **C** optimizada para la síntesis de los compuestos **29a-29d**. Por lo tanto, el primer paso a seguir fue la preparación de las correspondientes propanodiaminas: la *N*<sup>1</sup>-metil-*N*<sup>1</sup>-(naftaleno-2-metil)propano-1,3-diamina y la *N*<sup>1</sup>-(antraceno-9-metil)-*N*<sup>1</sup>-metilpropano-1,3-diamina.

La obtención de estas aminas se realizó mediante una ruta sintética de tres etapas (Esquema 22). En primer lugar, se hizo reaccionar el 2-bromometilnaftaleno o el 9-clorometilantraceno con metilamina, en presencia de KI y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, para obtener las correspondientes metilaminas **30a** y **30b**, respectivamente.<sup>193</sup> En la segunda etapa de la ruta sintética, se hizo reaccionar la *N*-(3-bromopropil)ftalimida con el producto **30a** o **30b**, utilizando K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como base y consiguiendo obtener así la correspondiente propilamina protegida con el resto aromático deseado (**31a-b**).

Por último, se eliminó el grupo ftalimido de los productos **31a** y **31b** mediante una desprotección clásica con monohidrato de hidracina obteniéndose así las aminas **32a-b**.



**Esquema 22.** Síntesis de las aminas con resto aromático **32a-b**

<sup>193</sup> Oshikawa, Y.; Ojida, A. *Chem. Commun. (Cambridge, U.K.)* **2013**, 49, 11373-11375.



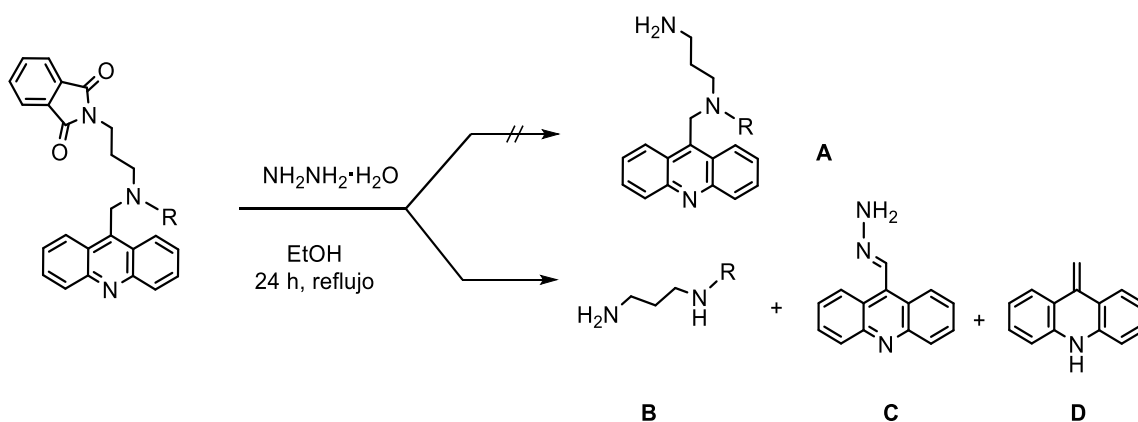
A continuación, se recogen los rendimientos globales obtenidos en la síntesis de las aminas **32a** y **32b** (Tabla 6).

Producto	% Rdto. Global
<b>32a</b>	60
<b>32b</b>	36

**Tabla 6.** Rendimientos globales para la obtención de los compuestos **32a-b**

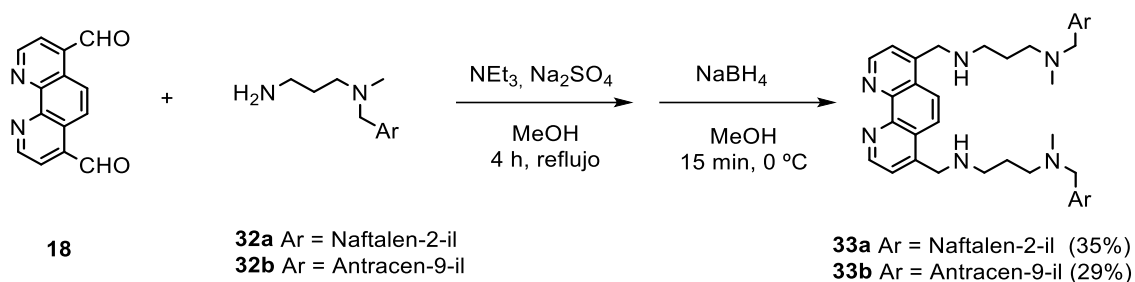
El rendimiento global obtenido para **32b** es prácticamente la mitad que el de **32a**. Esta diferencia viene determinada por el rendimiento obtenido en el paso de formación de **31b**. Es probable que este hecho esté relacionado con el impedimento estérico producido entre el sistema aromático del antraceno y el grupo ftalimido.

Habría sido interesante obtener una tercera metilpropano-1,3-diamina con la acridina como resto aromático al igual que se obtuvo en el caso de los compuestos dicuaternizados. Sin embargo, no se pudo abordar su preparación debido a que la desprotección con hidracina utilizada en el último paso sintético conduce a una mezcla de productos como consecuencia de la reactividad de la acridina (Figura 79).



**Figura 79.** Productos de reacción de los derivados de acridina con hidracina

Una vez obtenidas las metilpropano-1,3-diaminas con resto aromático (**32a-b**), se procedió a la aminación reductora utilizando las condiciones optimizadas previamente para los compuestos **29a-d** (Esquema 23).



**Esquema 23.** Síntesis de los ligandos **33a-b**

Los compuestos **33a** y **33b** se obtuvieron con rendimientos más bajos que en el caso de los derivados **29a-29d**. De nuevo, el volumen de los restos aromáticos con respecto al de las aminas heterocíclicas podría ser el causante de los bajos rendimientos para la última etapa y, por consiguiente, de los rendimientos globales (Tabla 7).

Producto	%Rdto. Global
<b>33a</b>	19
<b>33b</b>	9

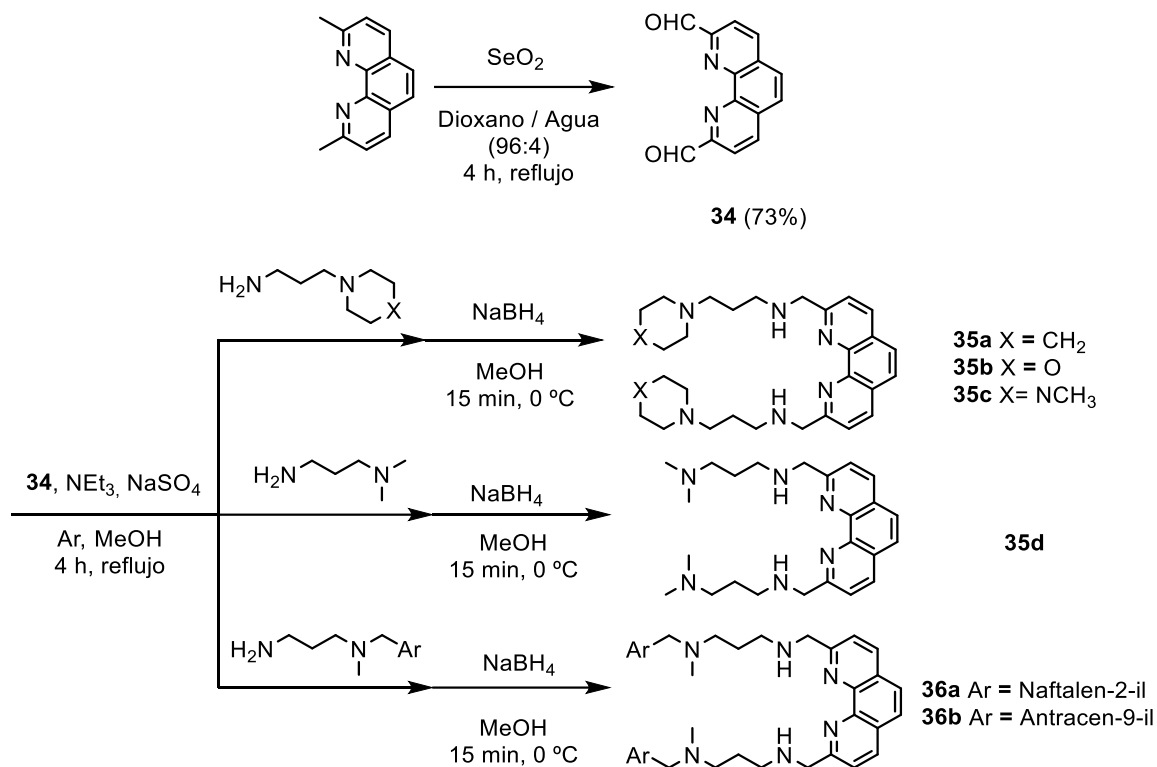
**Tabla 7.** Rendimientos globales para los compuestos **33a-b**

### 3.1.3 Síntesis de compuestos derivados del sistema 1,10-fenantrolina sustituido en las posiciones 2 y 9

Como ya se ha mencionado previamente en el capítulo de antecedentes, los derivados de la 1,10-fenantrolina, sustituidos en las posiciones relativas 2 y 9, son compuestos que presentan una buena interacción con estructuras de ADN cuádruple-G debido a su forma de media luna. Por este motivo, se decidió sintetizar una familia análoga a la familia de los 4,7-aminometilderivados de la 1,10-fenantrolina descritos en el apartado **3.1.2.3**.

La preparación de estos compuestos se llevó a cabo con éxito utilizando la misma metodología sintética empleada para los derivados **29a-d** y **33a-b** (ruta **C**). Para ello, en primer lugar, fue necesario obtener al dialdehído **34**, que se obtuvo con buen rendimiento a partir de la neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) mediante su

oxidación con SeO<sub>2</sub>. De este modo, se pudo preparar una nueva familia de ligandos compuesta por seis compuestos finales (Esquema 24, derivados **35a-d** y **36a-b**).



Esquema 24. Obtención de los compuestos **34**, **35a-d** y **36a-b**

A continuación, en la tabla 8, se muestran los rendimientos para la última etapa del proceso sintético, así como los rendimientos globales obtenidos.

Producto	%Rdto.	%Rdto. Global
<b>35a</b>	56	39
<b>35b</b>	43	29
<b>35c</b>	55	40
<b>35d</b>	58	42
<b>36a</b>	70	31
<b>36b</b>	87	23

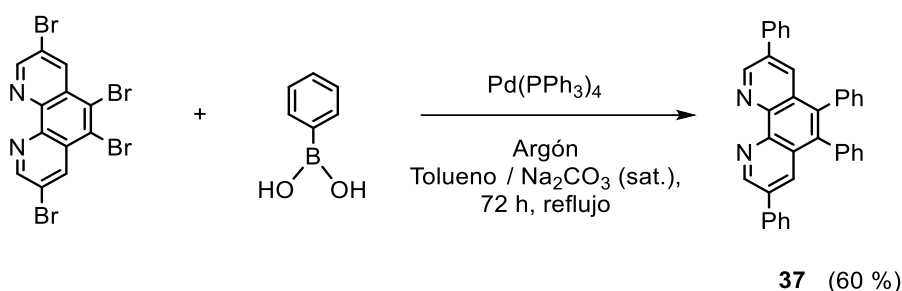
Tabla 8. Rendimientos globales para los compuestos **35a-d** y **36a-b**

Los rendimientos globales para la mayoría de los compuestos son moderados exceptuando el de los compuestos **36b** (derivado de morfolina) y **36b** (derivado de antraceno) que presentan rendimientos bajos.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos para los compuestos análogos sustituidos en las posiciones 4 y 7, observaremos que en ambos casos los rendimientos son moderados, pero ligeramente superiores para los derivados disustituidos en las posiciones 4 y 7.

### 3.1.4 Síntesis de la 3,5,6,8-tetrafenil-1,10-fenantrolina

Por otra parte, y con el objetivo de disponer de un derivado de la 1,10-fenantrolina con un patrón de sustitución diferente a los previamente empleados, se llevó a cabo la obtención del compuesto 3,5,6,8-tetrafenil-1,10-fenantrolina (Esquema 25).



**Esquema 25.** Síntesis del compuesto **37**

El derivado **37** se obtuvo a partir de la 3,5,6,8 tetrabromo-1,10-fenantrolina y utilizando las condiciones clásicas empleadas para la reacción de Suzuki.<sup>194</sup>

Este compuesto ya está descrito en bibliografía y se ha obtenido de acuerdo a las condiciones descritas previamente.<sup>194</sup> El objetivo que tiene la preparación del compuesto **37** en el contexto de esta tesis doctoral es emplearlo como otro ligando más en la formación de distintos complejos de Pt(II) y posteriormente evaluar su interacción frente al ADN cuádruple.

<sup>194</sup> Schaefer, B.; Goerls, H.; Meyer, S.; Henry, W.; Vos, J. G.; Rau, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 4056-4063.

### 3.1.5 Síntesis de complejos de platino(II)

Tras el descubrimiento de las propiedades del cis-platino en los años 60 como agente antitumoral,<sup>195,196</sup> los compuestos basados en Pt(II) han sido muy estudiados en el área de la quimioterapia del cáncer. Uno de los grandes inconvenientes del cis-platino y sus derivados (Figura 80) es su elevada toxicidad. Por lo tanto, hoy en día, la obtención de compuestos de Pt(II) con propiedades farmacológicas mejoradas o equivalentes a las del cis-platino, pero con un perfil de baja toxicidad, representa un reto y a la vez un área de investigación muy activa.

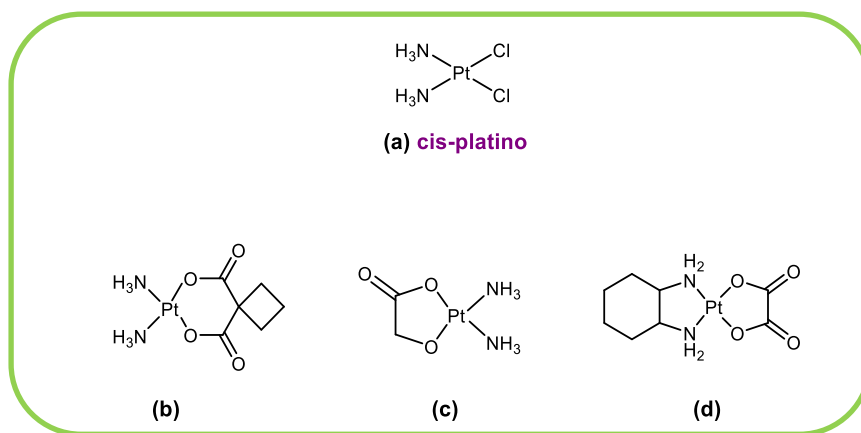


Figura 80. Cis-platino (a) y derivados: carboplatino (b), nedaplatino (c), oxalilplatino (d)

En este apartado se discute la síntesis de distintos complejos de Pt(II) con los 4,7-aminometil derivados de 1,10-fenantrolina descritos en el apartado anterior, así como con derivados comerciales de 1,10-fenantrolina de estructura más sencilla. Los principales objetivos fueron la preparación de complejos mixtos 1:1:1 (ligando:Pt(II):etilendiamina) y complejos del tipo 2:1 (ligando:Pt(II)) como los que se recogen en la figura 81.

<sup>195</sup> Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature* **1965**, *205*, 698-689.

<sup>196</sup> Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Trosko, J. E. *Nature* **1969**, *222*, 385-386.

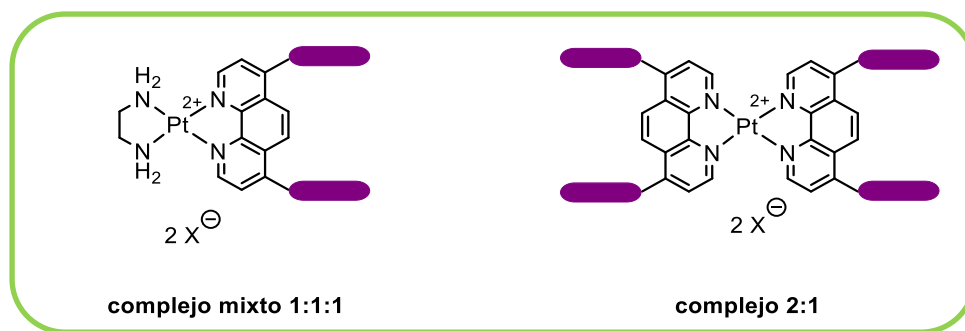
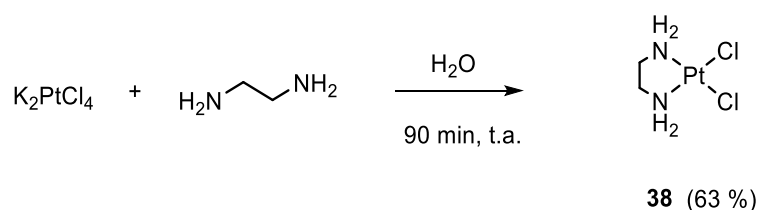


Figura 81. Complejos Pt(II) objetivo

Inicialmente, se planteó abordar la preparación de ambos tipos de compuestos empleando determinados complejos precursores de fácil accesibilidad sintética. En el caso de los complejos mixtos se preparó el compuesto precursor **38** siguiendo el procedimiento descrito en bibliografía.<sup>197</sup> El esquema de preparación de este compuesto se muestra a continuación:

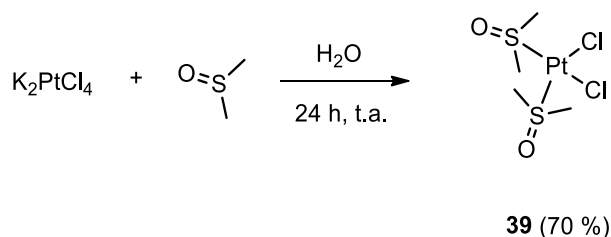


Esquema 26. Preparación del complejo precursor **38**

Por otra parte, para la síntesis de los complejos de tipo 2:1 se preparó el complejo precursor cis-bis(dimetilsulfóxido)dicloroplatino(II) **39**. El dimetilsulfóxido es un ligando más lábil que el cloruro, por lo tanto, facilita la coordinación del primer ligando bidentado al centro metálico. Como en el caso anterior, el compuesto **39** se obtuvo siguiendo el procedimiento descrito en bibliografía<sup>198</sup> y el esquema de preparación es el que se presenta a continuación.

<sup>197</sup> Kemp, S.; Wheate, N. J.; Buck, D. P.; Nikac, M.; Collins, J. G.; Aldrich-Wright, J. R. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 1049-1058.

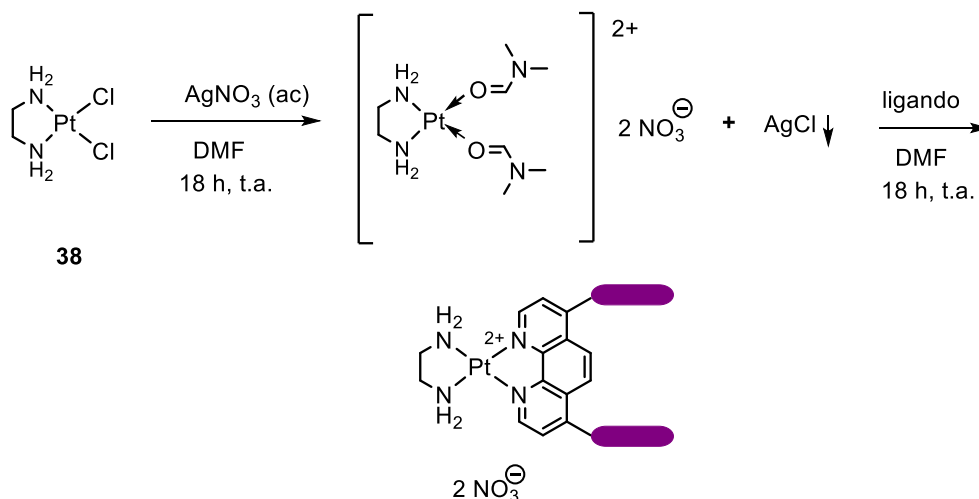
<sup>198</sup> Shahabadi, N.; Heidari, L. *Spectrochim. Acta, Part A* **2014**, *128*, 377-385.



Esquema 27. Preparación del complejo precursor 39

### 3.1.5.1 Síntesis de complejos de Pt(II) mixtos tipo 1:1:1

La síntesis de esta familia de compuestos se llevó a cabo modificando ligeramente las condiciones previamente descritas en la bibliografía.<sup>197</sup> Así, se empleó  $\text{AgNO}_3$  en disolución acuosa, en las condiciones que se muestran en el esquema 28.



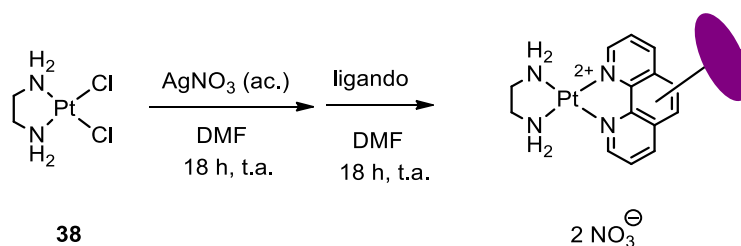
Esquema 28. Síntesis general para los complejos de Pt(II) mixtos 1:1:1

El empleo de  $\text{AgNO}_3$  facilita el proceso de coordinación de los ligandos al centro metálico generando  $\text{AgCl}$  en el medio de reacción y dejando libres las posiciones de coordinación previamente ocupadas por los ligandos cloruro. Estas posiciones de coordinación fueron ocupadas por moléculas de DMF. La DMF, al igual que el DMSO, es un ligando relativamente lábil y fácilmente desplazable por lo que favorece la coordinación de los ligandos de 1,10-fenantrolina.

• **Síntesis de complejos mixtos 1:1:1 con ligandos de 1,10-fenantrolina comerciales**

Esta metodología se aplicó, en primer lugar, a la preparación de complejos metálicos con diferentes ligandos comerciales derivados de la 1,10-fenantrolina, mucho más sencillos estructuralmente que los ligandos descritos en el apartado 3.1.2.3.

Tanto el esquema sintético como la tabla con los rendimientos y estructuras de los ligandos se muestran a continuación (Esquema 29, Tabla 9):



**Esquema 29.** Síntesis general para los complejos de Pt(II) mixtos 1:1:1 **40**, **41a-d**, **42a-b**, **43**, **44** y **45**

Producto	Ligando	%Rdto.	Producto	Ligando	%Rdto.
<b>40</b> <sup>199</sup>	phen	55	<b>42a</b>	2,9-dmphen	35
<b>41a</b> <sup>200</sup>	4,7-dmphen	53	<b>42b</b>	2,9-dCHOphen	--
<b>41b</b>	4,7-dCHOphen	42	<b>43</b> <sup>199, 200</sup>	5,6-dmphen	60
<b>41c</b>	DCF	47	<b>44</b> <sup>200</sup>	5-mphen	58
<b>41d</b>	4,7-dmamphe	61	<b>45</b>	3,5,6,8-tphphen	65

**Tabla 9.** Rendimientos para los complejos mixtos 1:1:1 **40**, **41a-d**, **42a-b**, **43**, **44** y **45**

<sup>199</sup> Ng, N. S.; Leverett, P.; Hibbs, D. E.; Yang, Q.; Bulanadi, J. C.; Wu, M. J.; Aldrich-Wright, J. R. *Dalton Trans.* **2013**, 42, 3196-3209.

<sup>200</sup> Brodie, C. R.; Collins, J. G.; Aldrich-Wright, J. R. *Dalton Trans.* **2004**, 1145-1152.

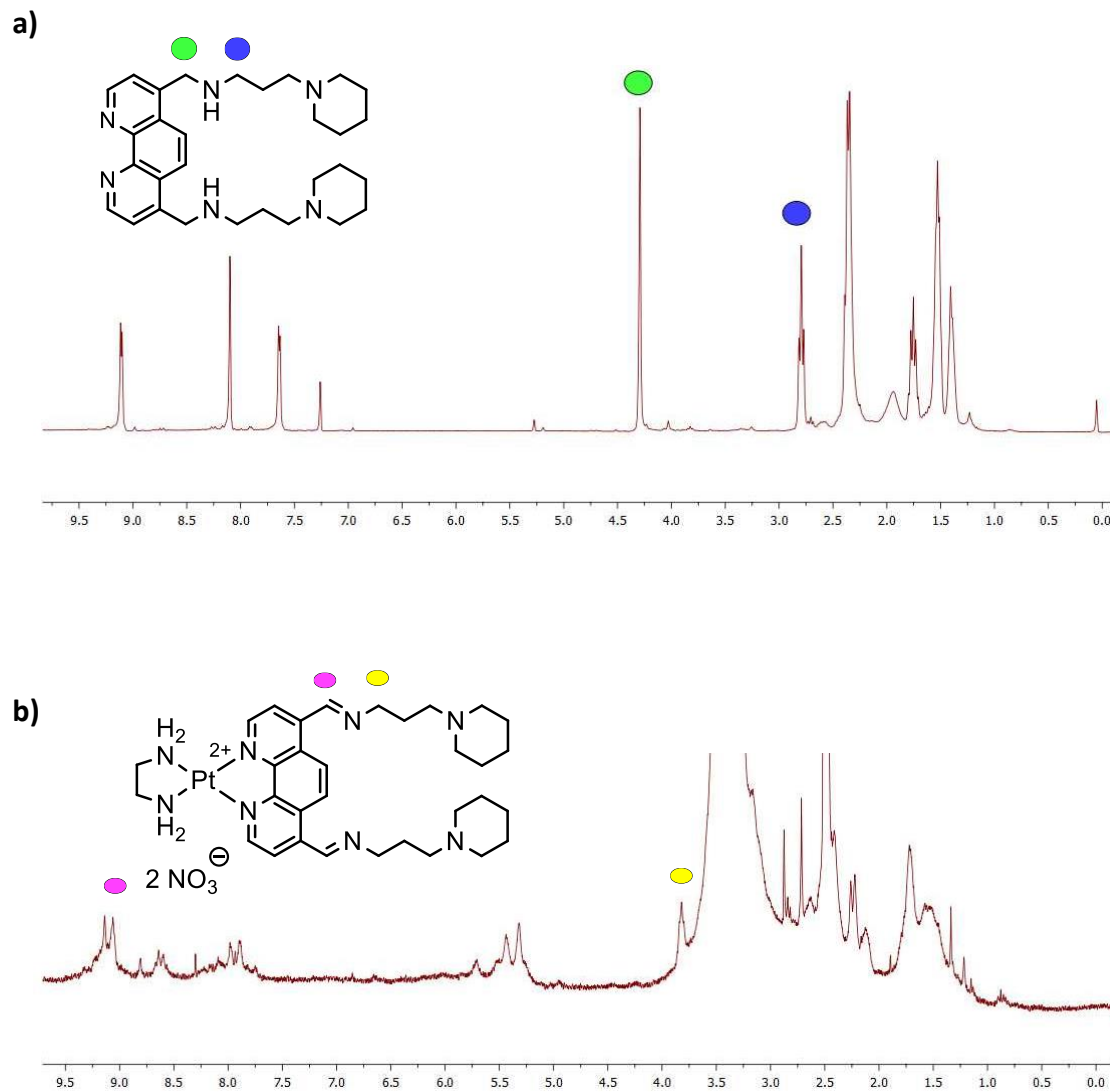


A excepción del complejo **42b** que no pudo ser sintetizado, los complejos restantes fueron obtenidos con rendimientos moderados. Se pudo obtener así una familia de nueve complejos de Pt(II) de los cuales **40**, **41a**, **43** y **44** han sido descritos previamente en la bibliografía.<sup>199,200</sup>

- **Síntesis de complejos mixtos 1:1:1 con ligandos de 1,10-fenantrolina con cadenas laterales en las posiciones 4 y 7**

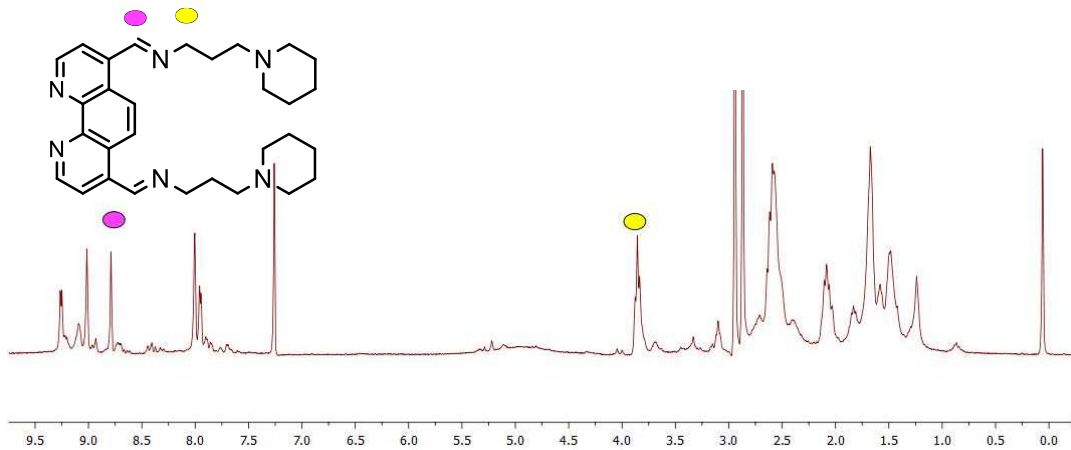
Para abordar la síntesis de estos derivados se empleó la misma metodología que en el caso anterior utilizando como complejo precursor **38** y como ligando, para optimizar las condiciones de reacción, el compuesto **29a**. Al realizar el espectro de <sup>1</sup>H-RMN de los productos aislados en los primeros ensayos, se obtuvieron espectros con señales anchas y poco definidas, lo que indicaba que algún proceso no deseado había tenido lugar durante la reacción.

Al analizar detenidamente los espectros obtenidos se observó que la señal a 4.29 ppm correspondiente al grupo metileno (Figura 82a círculo verde) desaparecía en el complejo y aparecían dos nuevas a 3.86 ppm y 9.00 ppm (Figura 82b círculos amarillo y rosa). Estos datos concordaban con los espectros de las iminas **28a-d** (Figura 83a). Además, en el espectro de masas del complejo **47a** la masa observada fue cuatro unidades menor a la de los complejos deseados (Figura 83b). Este hecho confirma que, durante la síntesis de los complejos, se produce la oxidación del grupo amino del ligando a imina.



**Figura 82. (a)** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de **29a**, **(b)** Complejo mixto con el ligando **27a**

a)



b)

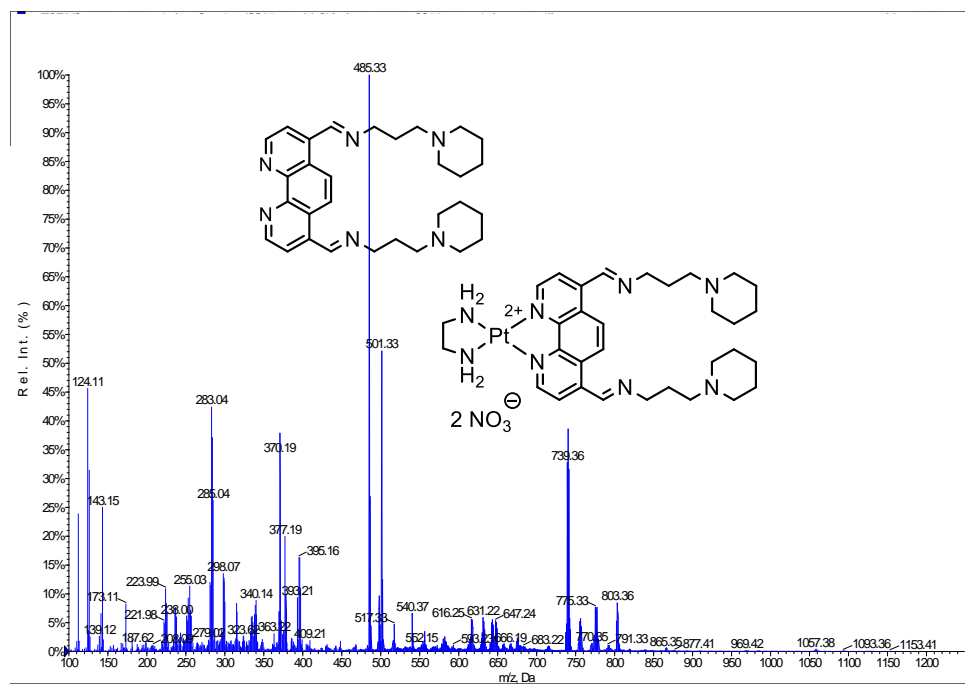
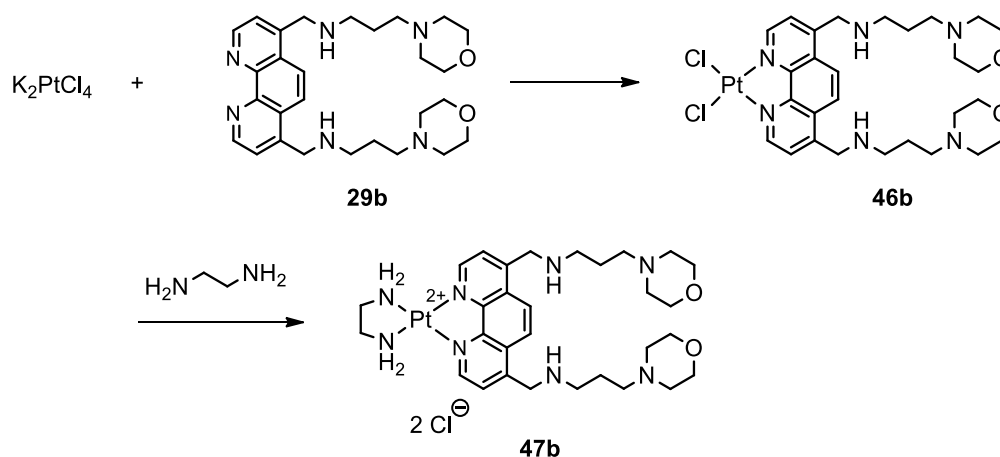


Figura 83.(a) Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la imina **27a** (b) Espectro de masas complejo mixto **47a**

A la vista de los resultados, hubo que plantearse alternativas sintéticas para la obtención de estos complejos mixtos. Las hipótesis barajadas como causantes de la oxidación del ligando fueron los siguientes:

- 1) El reactivo causante de la oxidación podría ser el  $\text{AgNO}_3$ <sup>201</sup>
- 2) El ligando se descompone durante el transcurso de reacción de formación del complejo.
- 3) El Pt(II) es el causante del proceso de oxidación. En este caso, no sería viable la obtención de estos complejos.

Por ello, en primer lugar, nos planteamos una síntesis alternativa que evita el uso de  $\text{AgNO}_3$  (esquema 30) y en la que se utilizó como ligando el derivado **29b**.



**Esquema 30.** Ruta de síntesis genérica de los complejos mixtos (sin emplear  $\text{AgNO}_3$ )

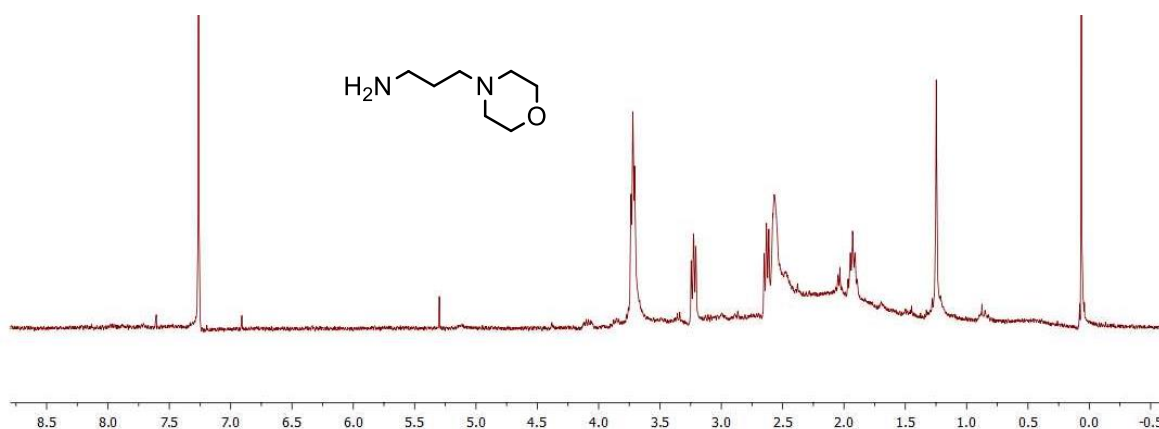
Para la preparación de los complejos mixtos a través de esta ruta sintética debemos obtener los complejos dicloro (**46a-d**) que se muestran en el esquema 30. Las condiciones empleadas en el proceso de optimización son las que se recogen en la siguiente tabla:

<sup>201</sup> Iqbal, M. Z.; Hayat, I. J. *Chem. Soc. Pak.* **1983**, *5*, 159-161.

	Aditivo	Tiempo	Temperatura	Disolvente	Resultados
1	--	4 h	t.a.	H <sub>2</sub> O	<b>29b</b>
2	--	2 h	60 °C	H <sub>2</sub> O	<b>46b:29b</b> (1:9)
3	--	18 h	75 °C	EtOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	Descomposición
4	HCl (1%)*	4 h	60 °C	EtOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	<b>46b:29b</b> (3:7)
5	HCl (1%)*	18 h	70 °C	EtOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	<b>46b</b>

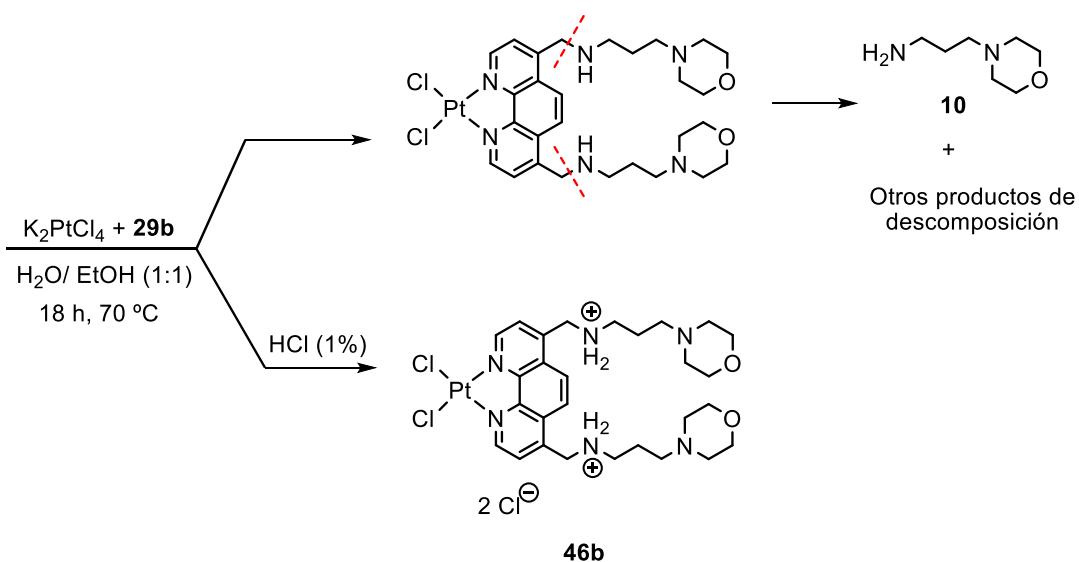
**Tabla 10.** Optimización de las condiciones de reacción para la formación del complejo **46b**.  
\*Porcentaje en volumen.

De los distintos ensayos llevados a cabo, se puede concluir que el empleo de temperaturas comprendidas entre 60 °C y 75 °C, medio ácido, y tiempos superiores a 4 horas han sido factores determinantes en la obtención de este tipo de complejos. La ausencia de medio ácido a temperaturas superiores a la temperatura ambiente conduce a la descomposición del ligando de partida (entrada 3). Esto se pudo concluir ya que en el proceso de elaboración de la mezcla de reacción se obtuvieron dos fracciones que fueron analizadas por <sup>1</sup>H-RMN. La primera de estas fracciones, correspondiente al posible producto deseado, presentó un espectro de resonancia característico de un producto en descomposición. Sin embargo, el análisis del espectro de <sup>1</sup>H-RMN de la otra fracción determinó que el compuesto presente en esa fracción era la 3-(4-morfolino)propilamina (**10b**) (Figura 84).



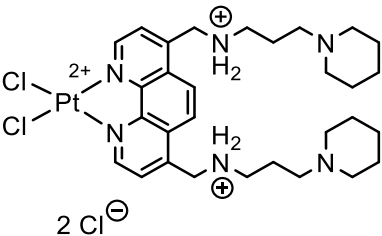
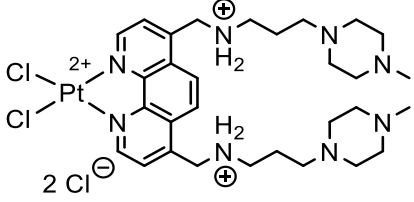
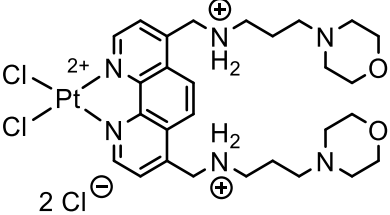
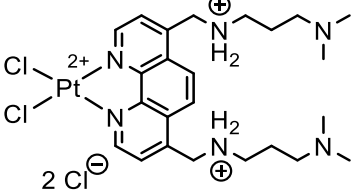
**Figura 84.** <sup>1</sup>H-RMN del lavado orgánico

Las condiciones recogidas en la entrada 5 fueron la que condujeron con éxito al producto deseado **46b** (Esquema 31).



**Esquema 31.** Condiciones de reacción para la obtención de **46b**

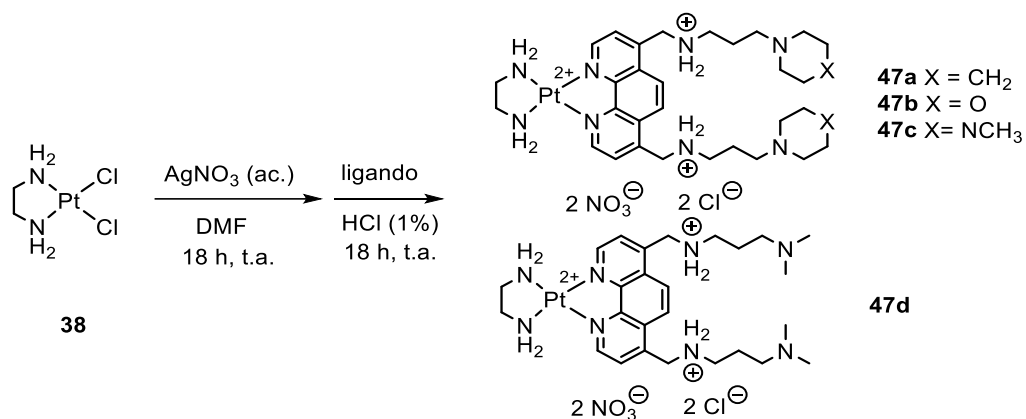
De modo análogo, se llevó a cabo la síntesis de los complejos de Pt(II) intermedios dicloro (**46a-d**), en presencia de medio ácido. A continuación, en la tabla 11, se recogen los rendimientos obtenidos para esta serie de complejos.

Producto	%Rdto.	Producto	%Rdto.
 <p><b>46a</b></p>	42	 <p><b>46c</b></p>	35
 <p><b>46b</b></p>	43	 <p><b>46d</b></p>	77

**Tabla 11.** Rendimientos para la obtención de los complejos dicloro **46a-d**

El último paso para la obtención de los complejos mixtos 1:1:1 a través de esta ruta sintética es la sustitución de los ligandos dicloro por la etilendiamina. Desafortunadamente, no se pudo continuar por esta ruta sintética alternativa ya que, la adición de etilendiamina sobre una disolución de cualquiera de los productos dicloro, provocaría la neutralización del medio y como consecuencia de ello, la degradación del ligando deseado produciéndose el proceso descrito previamente en el esquema 31. Por el contrario, un incremento de los moles de HCl protonaría la etilendiamina y no sería posible su coordinación al centro metálico.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, la preparación de los complejos mixtos se llevó a cabo con éxito mediante la ruta sintética inicialmente planteada, pero adicionando el ligando disuelto en una disolución acuosa de HCl (1%), tal y como se muestra en el esquema 32. Estas condiciones nos permitieron evitar tanto la descomposición del complejo deseado como la formación de la imina en el medio de reacción.



**Esquema 32.** Preparación de los complejos mixtos **47a-d**

En la tabla 12, se recogen los rendimientos de reacción obtenidos para los distintos complejos de Pt(II) empleando las condiciones que se muestran en el esquema 32.



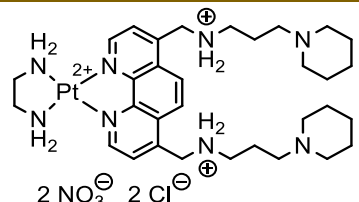
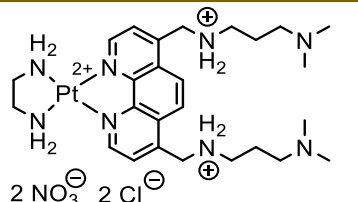
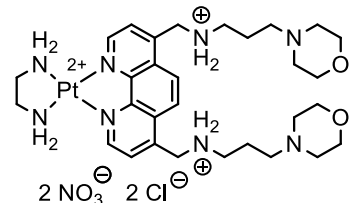
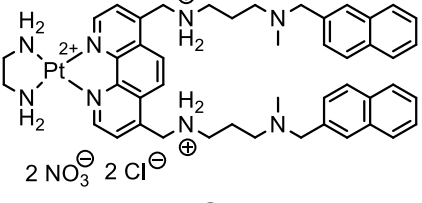
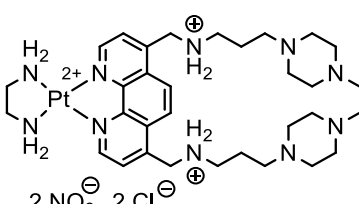
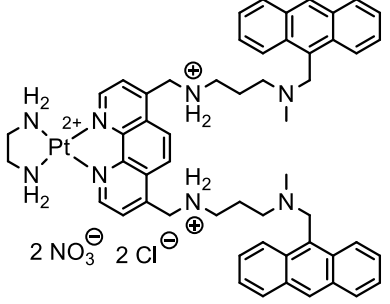
Producto	%Rdto	Producto	%Rdto
 <p><b>47a</b></p>	48	 <p><b>47d</b></p>	62
 <p><b>47b</b></p>	41	 <p><b>48a</b></p>	45
 <p><b>47c</b></p>	38	 <p><b>48b</b></p>	34

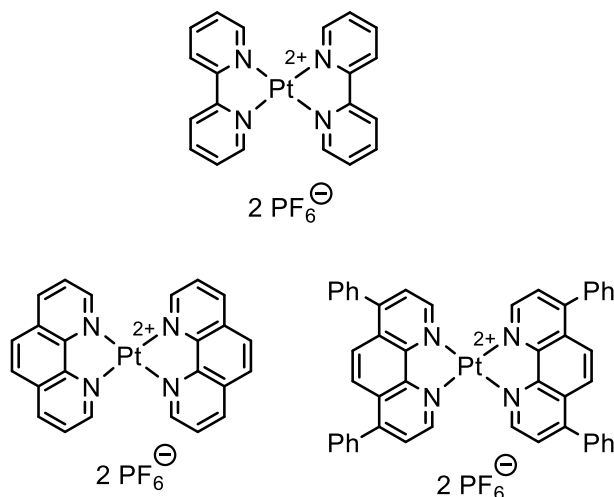
Tabla 12. Rendimientos para los compuestos **47a-d** y **48a-b**

Se obtuvieron con éxito los complejos mixtos **47a-d** y **48a-b** en un único paso de reacción a partir del complejo **38** y del correspondiente ligando siendo necesaria la eliminación previa del AgCl formado. Los rendimientos obtenidos fueron moderados tanto para los complejos **47a-d** como para los complejos **48a-b**.

### 3.1.5.2 Síntesis de los complejos de Pt(II) de tipo 2:1

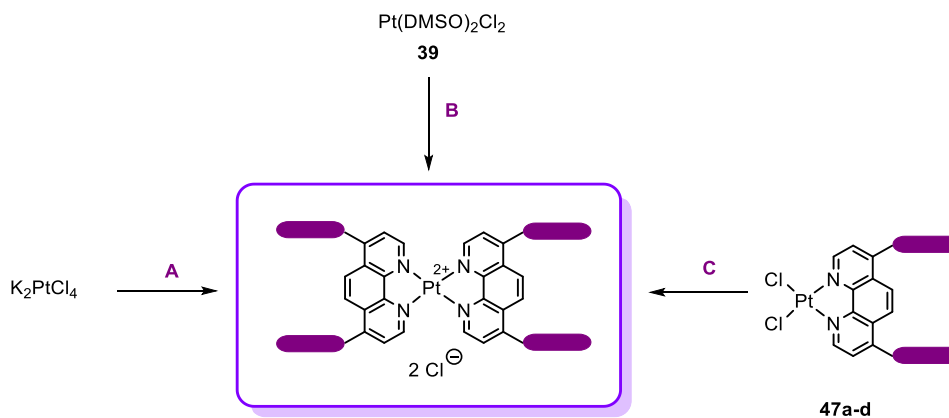
Otro grupo de complejos de Pt(II) de gran interés lo constituyen los complejos de estequiometría 2:1 (ligando:metal), debido a que la presencia de dos sistemas aromáticos en disposición prácticamente coplanar hace que estos derivados presenten una mayor superficie para un óptimo apilamiento con las tétradas terminales del ADN

cuádruple. Además, cabe destacar que en la bibliografía se han descrito muy pocos ejemplos de esta tipología,<sup>174a,174b</sup> especialmente de complejos de 1,10-fenantrolina sustituidos, siendo los ejemplos más representativos los que se muestran en la figura 85.



**Figura 85.** Complejos de Pt(II) con estequiometría 2:1 descritos en la bibliografía

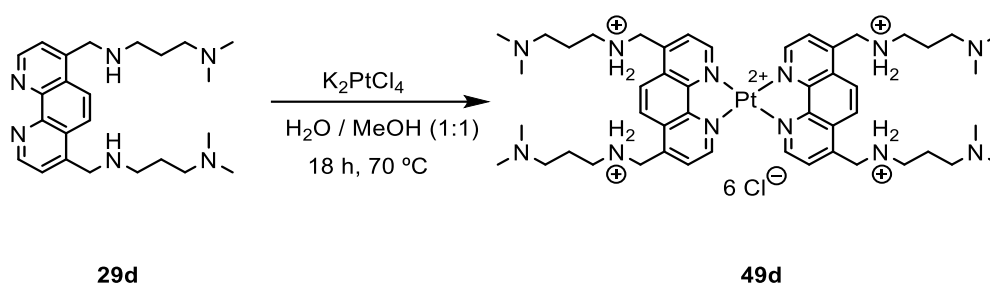
En este apartado se describe la síntesis de complejos de Pt(II) tipo 2:1. Para la obtención de esta familia de complejos de Pt(II) se emplearon varias aproximaciones sintéticas que se diferencian entre sí de acuerdo a la naturaleza de los reactivos de partida empleados y que se recogen, de manera esquemática, en la figura 86.



**Figura 86.** Rutas sintéticas propuestas para la obtención de los complejos de Pt(II) con estequiometría 2:1

- **Síntesis de complejos tipo (2:1) con ligandos de 1,10-fenantrolina con cadenas laterales en las posiciones 4 y 7**

En la primera de las aproximaciones (Esquema 33), se utilizó como precursor para la síntesis de los complejos tipo 2:1 el tetracloroplatinato(II) de potasio ( $K_2PtCl_4$ ) (método **A**). En la tabla 13 se resumen los diferentes ensayos realizados buscando la optimización del procedimiento siendo en todos los casos EtOH/HCl ac. (1%) (1:1) el disolvente de la reacción.



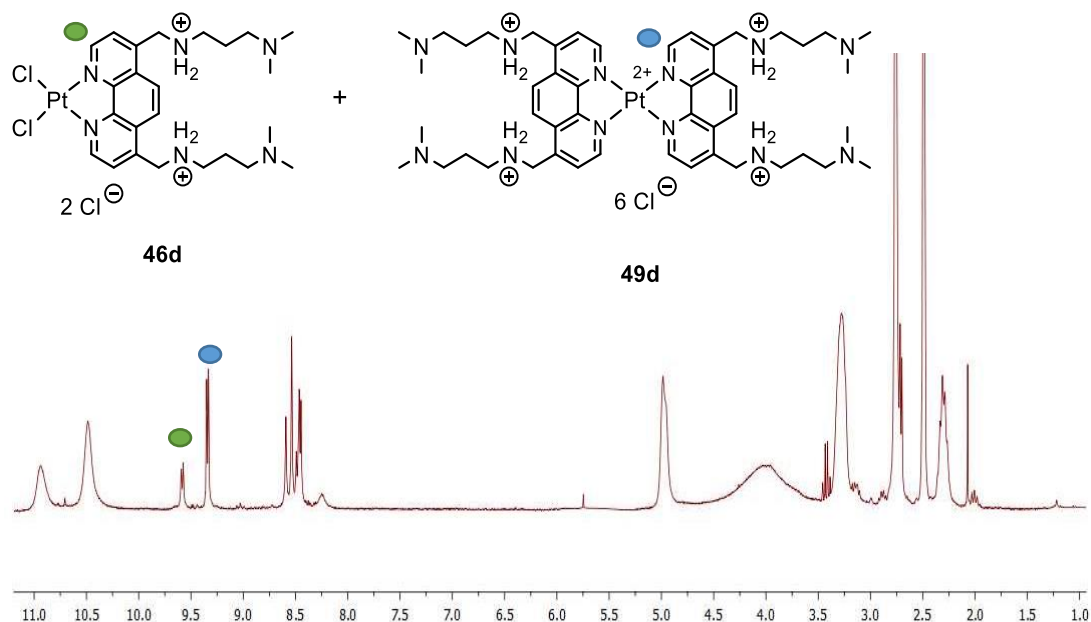
**Esquema 33.** Preparación de los complejos **49a-d** por la ruta **A**

	T (°C)	Tiempo	Aditivo	Eq. 29d	Resultados
<b>1</b>	70	18 h	--	2	--
<b>2</b>	70	18 h	KI	2	--
<b>3</b>	70	18 h	--	2.5	<b>29d+ 46d</b>
<b>4</b>	70	18 h	--	3	<b>29d + 46d</b>
<b>5</b>	75	72 h	--	3	<b>46d + 49d</b>

**Tabla 13.** Ensayos para la optimización en la preparación de los complejos 2:1 por la ruta **A**

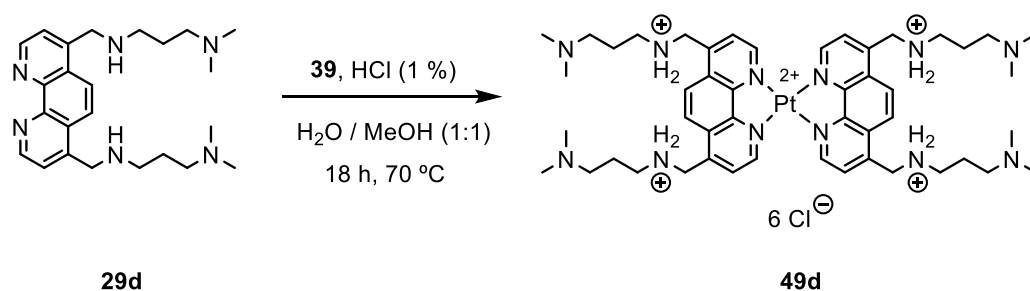
Las mejores condiciones ensayadas son las que se muestran en la entrada 5 de la tabla 13. Aumentando ligeramente la temperatura e incrementando hasta 72 horas el tiempo de reacción se consiguió obtener una mezcla de los dos complejos: el complejo deseado 2:1 (**49d**) y el complejo dicloro (**46d**). Esta mezcla se caracterizó por  $^1H$ -RMN y espectrometría de masas (Figura 87). Dichas condiciones fueron empleadas también

para los ligandos **29a**, **29b** y **29c**, obteniendo los mismos resultados. Aunque se intentó forzar la reacción incrementando los equivalentes de ligando y el tiempo de reacción, no se logró la conversión total al complejo deseado.



**Figura 87.** Espectro correspondiente a la mezcla de productos **46d** y **49d**

Basándonos en los resultados obtenidos con el método **A**, decidimos explorar la ruta sintética **B**, empleando como reactivo de partida el complejo  $\text{Pt}(\text{DMSO})_2\text{Cl}_2$  (**39**) (Esquema 34). De este modo se preveía facilitar la coordinación de los ligandos al centro metálico al ser el DMSO un ligando más lábil.



**Esquema 34.** Preparación de los complejos **49a-d** por la ruta **B**

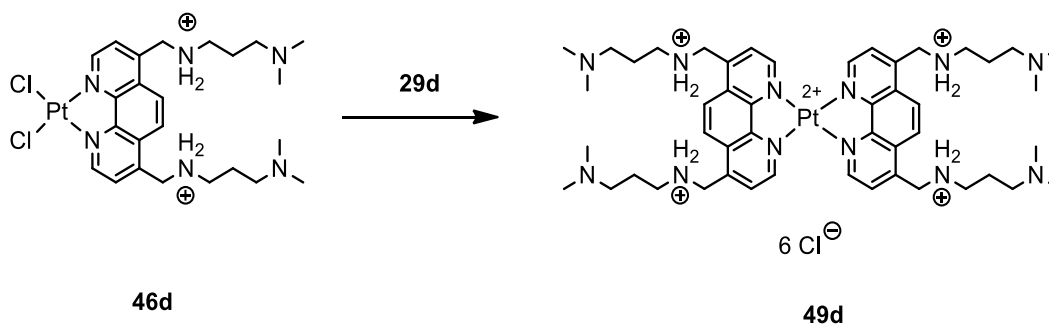
En la tabla 14 se recogen las distintas condiciones experimentales empleadas, así como los resultados obtenidos para el compuesto **49d**.

	Disolvente	Aditivos	Temperatura	Eq. ligando	Resultados
<b>1</b>	EtOH/H <sub>2</sub> O (2%HCl)	--	80	3	Descomposición
<b>2</b>	EtOH/H <sub>2</sub> O (2%HCl)	--	70	4	<b>46d + 49d</b>
<b>3</b>	DMF/H <sub>2</sub> O	AgNO <sub>3</sub>	t.a.	5	<b>46d + 49d</b>
<b>4</b>	DMSO/H <sub>2</sub> O	--	Reflujo	3	Descomposición

**Tabla 14.** Ensayos para la optimización en la preparación de los complejos 2:1 por el método **B**

En todos los ensayos se emplearon tiempos de reacción de 48 horas y un aumento de temperatura por encima de 70 °C produjo la descomposición de los productos en la mezcla de reacción, en la cual se observaron residuos negros. Esto parece indicar que se produce la reducción del Pt(II) a Pt(0) (entradas 1 y 4). Al igual que en el método anterior, para los mejores resultados (entradas 2 y 3), se obtiene una mezcla de complejo final (**49d**) y complejo dicloro (**46d**).

En vista de estos resultados, decidimos emplear el procedimiento **C**, que consistió en aislar el complejo dicloro (**46d**) para posteriormente obtener, tras una etapa de síntesis adicional, el complejo 2:1 (Esquema 35).



**Esquema 35.** Preparación del complejo **49d** por el método **C**

A continuación, en la tabla 15 se recogen las distintas condiciones experimentales empleadas, así como los resultados obtenidos para el compuesto **49d**.

	Disolvente	Tiempo	Aditivos	Temperatura	Eq. Ligando	Resultados
<b>1</b>	EtOH/H <sub>2</sub> O (2%HCl)	24 h	--	80	1.5	<b>46d</b>
<b>2</b>	EtOH/H <sub>2</sub> O (2%HCl)	48 h	--	70	3.5	<b>49d</b>
<b>3</b>	DMF/H <sub>2</sub> O	48 h	AgNO <sub>3</sub>	t.a.	5	<b>49d</b>
<b>4</b>	DMF/H <sub>2</sub> O	48 h	AgNO <sub>3</sub>	t.a.	2.5	<b>49d</b>

**Tabla 15.** Ensayos para la optimización en la preparación de los complejos 2:1 por el método C

Las condiciones experimentales mostradas en las entradas 2-4 de la tabla 15 conducen con éxito al producto deseado. De las tres opciones ensayadas, se eligió la número 4, por ser la que menos equivalentes de ligando consume y por transcurrir a temperatura ambiente.

Para esta familia de complejos solo fue posible la obtención de tres compuestos (**49a**, **49b** y **49c**) correspondientes a los derivados de piperidina, *N*-metilpiperacina y dimetilamino. En la tabla 16, se recogen los rendimientos de reacción obtenidos para los distintos complejos de Pt(II) empleando la metodología C en las condiciones que se muestran en la entrada 4 de la tabla 15.

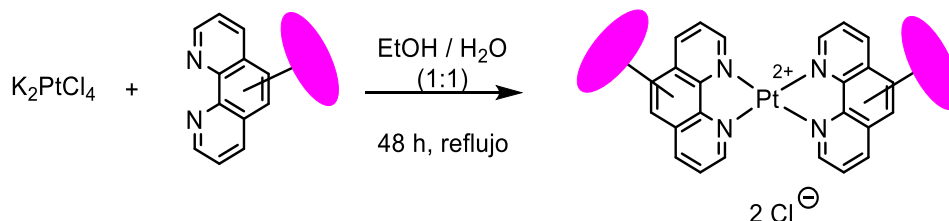
Producto	%Rdto
<b>49a</b>	24
<b>49c</b>	29
<b>49d</b>	42

**Tabla 16.** Rendimientos para los compuestos **49a-c**

- **Síntesis de complejos de tipo (2:1) con ligandos de 1,10-fenantrolina comerciales**

Finalmente, y con el objetivo de estudiar la aplicabilidad de las distintas condiciones optimizadas a la síntesis general de complejos de Pt(II) 2:1 (ligando:metal), se prepararon otros complejos de estequiometría 2:1 empleando ligandos comerciales y aplicando el método A (Esquema 36).

A partir del tetracloroplatinato de potasio (II) y el correspondiente derivado de 1,10-fenantrolina, fue posible la obtención de los complejos de tipo 2:1 sin necesidad de emplear medio ácido. En estos casos, se obtuvieron los complejos deseados de manera sencilla, en un único paso sintético y con rendimientos elevados en la mayoría de los compuestos (Tabla 17).



**Esquema 36.** Preparación de los complejos 2:1 a partir de ligandos de 1,10-fenantrolina sin cadenas laterales

Producto	Ligando	%Rdto.	Producto	Ligando	%Rdto.
<b>50</b> <sup>174a</sup>	phen	79	<b>52a</b>	2,9-dmphen	35
<b>51a</b>	4,7-dmphen	62	<b>52b</b>	2,9-dCHOphen	39
<b>51b</b>	4,7-dCHOphen	65	<b>53</b>	5,6-dmphen	73
<b>51c</b>	DCF	42	<b>54</b>	5-phen	70
<b>51d</b>	4,7-dmamphen	--	<b>55</b>	3,5,6,8-tphphen	75

**Tabla 17.** Rendimientos para la obtención de los complejos 2:1 **50**, **51a-d**, **52a-b**, **53**, **54**, **55**

De este modo, se pudo obtener una familia de nueve complejos de Pt (II) de tipo 2:1 de los cuales solo el complejo **50** se encuentra descrito en la bibliografía.<sup>174a</sup>

Estos resultados ponen de manifiesto que la estructura del ligando de 1,10-fenantrolina, y en particular la presencia o no de cadenas laterales nitrogenadas en las posiciones 4 y 7, es un factor determinante que condiciona el resultado obtenido por los distintos métodos sintéticos ensayados. La dificultad para obtener este tipo de complejos 2:1 (ligando:metal), cuando el ligando es el sistema de 1,10-fenantrolina

sustituido con cadenas laterales, se hace evidente tras los esfuerzos realizados en el trabajo de esta tesis doctoral, y podría, en parte, explicar la ausencia de ejemplos de este tipo de complejos en la bibliografía.



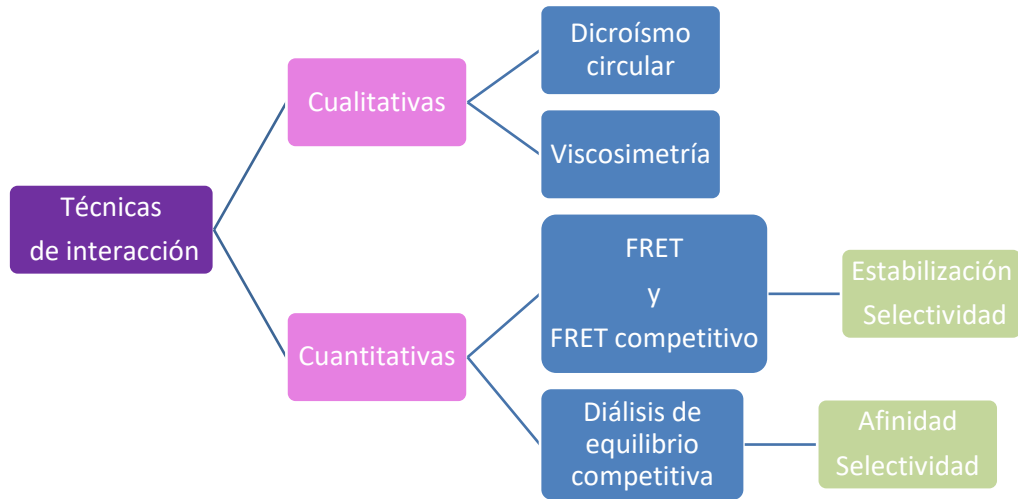
### **3.2. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN**

Existen numerosas técnicas para el estudio de las interacciones entre ligandos y el ADN cuádruple-G y un amplio número de ellas se encuentran descritas en el anexo A de esta tesis doctoral. Las técnicas que se han empleado en este trabajo se enumeran a continuación: diálisis de equilibrio competitiva, dicroísmo circular (DC) y desnaturalización térmica del ADN observada por FRET, en ausencia y en presencia (FRET competitivo) de una secuencia de ADN dúplex competidora. Además, se utilizó como técnica complementaria la viscosimetría, con el objetivo de establecer el modo de unión de aquellos ligandos que también se unen al ADN de doble hebra. De este modo, se ha podido determinar si dichos ligandos actúan como intercalantes, interaccionan con los surcos o con el esqueleto fosfato, o bien presentan una combinación de ambos modos de unión.

Los diferentes ensayos nos proporcionan datos cuantitativos o cualitativos acerca del fenómeno de unión del ligando hacia el ADN. Las técnicas cuantitativas proporcionan datos de afinidad, selectividad y/o capacidad de estabilización térmica del ADN. De manera sencilla, se pueden definir estos términos del siguiente modo:

- **Afinidad:** Capacidad de unión de un ligando hacia el ADN, expresada como la magnitud de la constante de equilibrio de la formación del complejo ADN-ligando.
- **Estabilización:** Efecto favorable en la estabilidad termodinámica de un tipo de estructura secundaria de ADN producido por la unión de un ligando.
- **Selectividad:** Capacidad de un ligando de reconocer y unirse preferencialmente a un tipo concreto de estructura secundaria de ADN.

En la figura 88 se representa esquemáticamente la información que se puede obtener de cada una de las técnicas empleadas en este trabajo.



**Figura 88.** Representación esquemática sobre los datos que se pueden extraer de cada una de las técnicas empleadas en esta tesis doctoral.

Como se ha explicado previamente en los antecedentes, en el genoma humano existen numerosas secuencias ricas en guaninas capaces de formar estructuras de cuádruple-G y que presentan relevancia biológica. El estudio de todas ellas supone un trabajo que se escapa del objetivo de esta tesis doctoral. Por este motivo, se ha elegido como secuencia de estudio para este trabajo la secuencia telomérica humana:  $(TTAGGG)_n$ .

Como complemento a los estudios de interacción, el trabajo se completa con estudios de citotoxicidad de los diferentes compuestos sintetizados, empleando el ensayo MTT. La actividad biológica de los compuestos ha sido evaluada preliminarmente en varias líneas celulares tumorales, que serán especificadas en esta discusión de resultados.

A continuación, se hará una breve descripción de las técnicas empleadas en este trabajo explicando, en cada una de ellas, sus aspectos básicos, así como el tipo de información que se puede obtener de las mismas.

Los procedimientos experimentales utilizados constituyen protocolos estándar, descritos previamente en la bibliografía, que en algún caso han podido ser mejorados o modificados ligeramente en nuestro laboratorio para adaptarlos a los productos sintetizados y a los medios disponibles. En la validación de los protocolos empleados para el uso de las diferentes técnicas de interacción, se han empleado como referencia interna ligandos de ADN conocidos. En los experimentos de interacción con cuádruple-G se utilizó el ligando **360A**<sup>135,137</sup> y en los experimentos de viscosimetría con ADN dúplex, el compuesto intercalante **bromuro de etidio**.<sup>202</sup> Los resultados de interacción obtenidos con estos ligandos empleando nuestras condiciones experimentales coinciden con los recogidos previamente en la literatura. Dichas condiciones se describen en detalle en la Parte Experimental.

En el siguiente apartado se discuten los resultados de interacción ADN-ligando obtenidos en el desarrollo de esta tesis doctoral, agrupados conforme a las distintas familias estructurales de los compuestos sintetizados.

### **3.2.1 Técnicas empleadas para evaluar la interacción entre los distintos ligandos y el ADN**

#### **3.2.1.1 Diálisis de Equilibrio Competitiva**

La diálisis de equilibrio competitiva se basa en la distribución diferencial de un ligando entre distintos compartimentos que contienen diferentes tipos de ADN, en función de la afinidad de ese ligando hacia cada ácido nucleico. Al alcanzarse el equilibrio, si el ligando se une a un tipo de ADN concreto, la concentración del mismo en el interior de la membrana que lo contiene aumenta ( $c_u = c_b - c_l$ ) (Fórmula 1). La cuantificación de la concentración total y la determinación de la concentración de ligando unido a las moléculas de ADN se determina por espectroscopia de UV-visible, empleando para ello los coeficientes de extinción determinados para cada compuesto. Una vez obtenidas las concentraciones en el interior y exterior de los compartimentos, es posible determinar las constantes de asociación aparentes ( $K_a$ ) para cada tipo de ADN. (Fórmula 2). Además, si calculamos el cociente entre los valores de  $K_a$  determinados para

---

<sup>202</sup> Ren, J.; Chaires, J. B. *Biochemistry* **1999**, *38*, 16067-16075.

las diferentes estructuras de ADN, se puede determinar la selectividad del compuesto en su unión con las diferentes estructuras de ADN estudiadas, tal y como se muestra en la fórmula 3.<sup>203</sup>

El protocolo empleado para la realización de estos experimentos se basa en el descrito por Chaires y colaboradores, adaptado al estudio de ligandos de ADN cuádruple-G. Consiste en plegar los ADN cuádruples y dúplex en condiciones iónicas de K<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup>, a pH=7.2. Las concentraciones de ligando empleadas fueron de 1-2 μM y la concentración de ADN cuádruple o dúplex fue de 75 μM en unidades monoméricas (tétradas o pares de bases).<sup>203</sup>

Con estos dos tipos de ADN se determinan las constantes de asociación para cada compuesto según las fórmulas 1 y 2. Por último, se calcula la selectividad (**S**) hacia el ADN cuádruple-G con el cociente de las constantes de asociación obtenidas previamente (Fórmula 3).

$$c_u = c_b - c_l \text{ (Fórmula 1)}$$

$$K_a = \frac{c_u}{c_l \{ (c_{ADN}) - c_u \}} \text{ (Fórmula 2)}$$

$$S = K_a \text{ (ADN cuádruple-G)} / K_a \text{ (ADN dúplex)} \text{ (Fórmula 3)}$$

**Fórmulas 1-3.** *K<sub>a</sub>*: constante de asociación (M<sup>-1</sup>); *c<sub>b</sub>*: concentración de ligando en la bolsa de diálisis; *c<sub>l</sub>*: concentración del ligando libre; *c<sub>u</sub>*: concentración del ligando unido al ADN; *c<sub>ADN</sub>*: concentración del ADN en unidades monoméricas

---

<sup>203</sup> Ragazzon, P.; Chaires, J.B. *Methods* **2007**, *43*, 313-323.

### 3.2.1.2 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.<sup>204,205</sup>

Esta técnica puede utilizarse para observar, de forma cualitativa, los cambios producidos en la estructura del cuádruple en presencia de un ligando no quiral. En ocasiones, la unión del ligando no quiral, induce una señal de DC en la longitud de onda correspondiente a la absorbancia del compuesto. 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.

Para llevar a cabo todos los estudios de dicroísmo circular se empleó un oligonucleótido denominado Tel-22 (5'-AGG GTT AGG GTT AGG GTT AGG G-3') en condiciones iónicas de potasio o de sodio, 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 89. Las formas de las curvas de DC obtenidas y sus máximos a longitudes de onda características coinciden con los datos previamente descritos en bibliografía.<sup>206,207</sup>

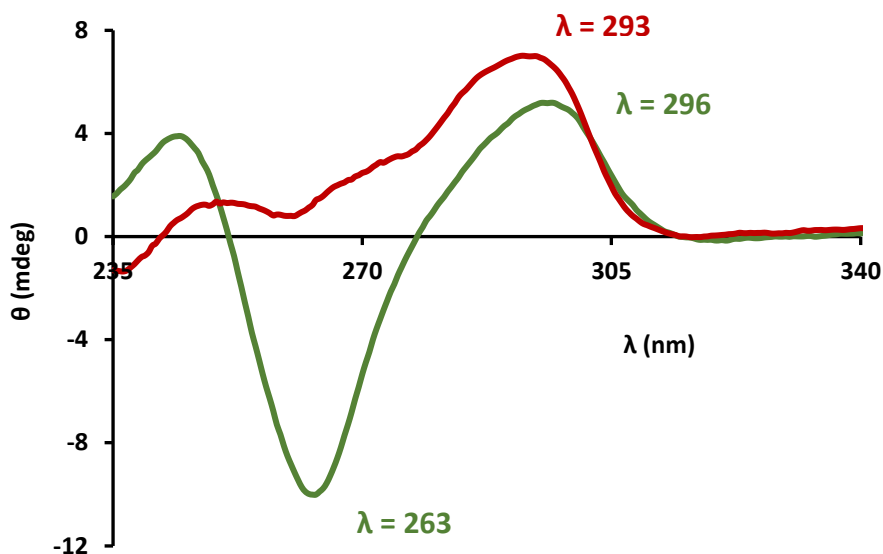
---

<sup>204</sup> Paramasivan, S.; Rujan, I.; Bolton, P. H. *Methods* **2007**, 43, 324-331.

<sup>205</sup> Karsisiotis, A. I.; Hessari, N. M.; Novellino, E.; Spada, G. P.; Randazzo, A.; Webba da Silva, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, 50, 10645-10648.

<sup>206</sup> Bessi, I.; Bazzicalupi, C.; Richter, C.; Jonker, H. R. A.; Saxena, K.; Sissi, C.; Chioccioli, M.; Bilia, R. A.; Schwalbe, H.; Gratteri, P. *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 1109-1119.

<sup>207</sup> Randazzo, A.; Spada, G. P.; da Silva, M. W. *Top. Curr. Chem.*, **2013**, 330, 67-86.



**Figura 89.** Espectros de DC del oligonucleótido Tel-22 5'-AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>-3': topología antiparalela (tampón de sodio, color verde) y mezcla de estructuras híbridas (tampón de potasio, color rojo)

### 3.2.1.3 Desnaturalización térmica del ADN por FRET

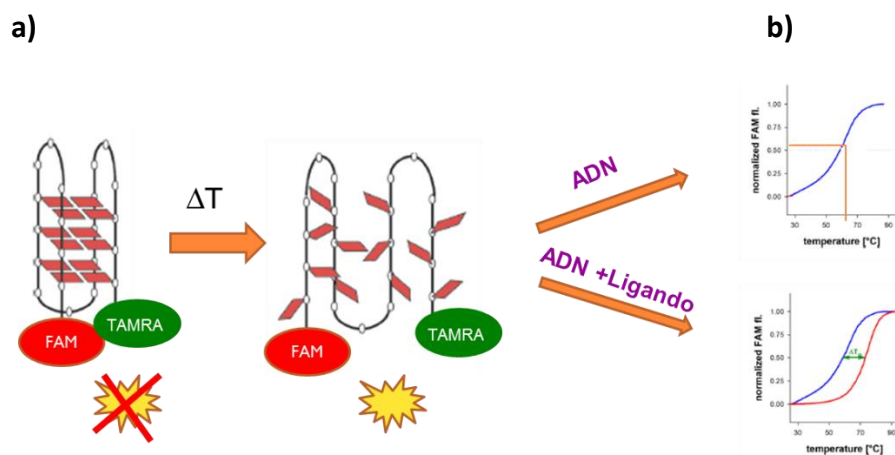
El ensayo de desnaturalización térmica observada por FRET se empleó para analizar la capacidad de los compuestos sintetizados para estabilizar la estructura de ADN cuádruple-G y ADN dúplex. Para este experimento se emplearon oligonucleótidos etiquetados con distintos fluoróforos en cada uno de sus extremos 5' y 3'. La secuencia del oligonucleótido utilizada para el ADN cuádruple-G es F21T (FAM - GGG(TTAGGG)<sub>3</sub> - TAMRA - 3'), mientras que la secuencia utilizada en el caso del ADN dúplex, F10T (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 del extremo 3' que actúa como fluoróforo aceptor, es TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).<sup>208,209</sup>

Cuando el ADN se encuentra en su conformación plegada, los fluoróforos están próximos en el espacio y, por lo tanto, la emisión de fluorescencia está inactivada por el

<sup>208</sup> Mergny, J. L.; Maurizot, J. C. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 124-132.

<sup>209</sup> Guedin, A.; Lacroix, L.; Mergny, J. L. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *613*, 25-35.

fluoróforo aceptor (*quencher*). El incremento de la temperatura durante el transcurso del experimento produce la desnaturalización de la estructura secundaria del ADN cuádruple y, como consecuencia de ello, los fluoróforos se alejan produciendo la máxima fluorescencia de emisión del fluoróforo (Figura 90).



**Figura 90.** (a) Representación del proceso de desnaturalización por FRET (b) Curva de desnaturalización del ADN cuádruple en ausencia (curva azul) y presencia de ligando (curva roja)

Los experimentos se llevaron a cabo con la secuencia del ADN dúplex F10T<sup>210</sup> en condiciones iónicas de sodio y con el oligonucleótido F21T plegado en dos condiciones iónicas (sodio o potasio),<sup>211</sup> siempre manteniendo la concentración iónica total igual a 110 mM. La concentración de ADN se mantuvo constante (0.2  $\mu$ M), mientras que el rango de concentraciones para el ligando fue 0-10  $\mu$ M o de 0-5  $\mu$ M. Una vez preparadas las disoluciones se procedió a incrementar la temperatura, de 25 °C a 95 °C, registrando el valor de fluorescencia a cada grado de temperatura.<sup>59</sup>

La representación de la fluorescencia del oligonucleótido con respecto a la temperatura da lugar a una curva sigmoidea, típica en el análisis de desnaturalización térmica de los ácidos nucleicos. El punto medio entre la desnaturalización completa y el plegamiento completo se denomina temperatura media de desnaturalización: ( $T_m$ ).

<sup>210</sup> Granzhan, A.; Monchaud, D.; Saettel, N.; Guedin, A.; Megny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P. *J. Nucleic Acids* **2010**, ID 460561, 1-11.

<sup>211</sup> Gomez, D.; Guedin, A.; Mergny, J. L.; Salles, B.; Riou, J. F.; Teulade-Fichou, M. P.; Calsou, P. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 7187-7198.

El grado de estabilización de la estructura se calcula por la diferencia de temperatura entre el valor de  $T_m$  del ADN en presencia de ligando y el valor de  $T_m$  en ausencia del mismo (Fórmula 4).

$$\Delta T_m = T_m (\text{ADN+Ligando}) - T_m (\text{ADN})$$

**Fórmula 4.** Cálculo del valor de  $\Delta T_m$

### **3.2.1.4 Desnaturalización térmica del ADN por FRET competitivo**

Una variante del experimento anterior consiste en la adición, además de las secuencias de ADN etiquetadas con un fluoróforo, de una secuencia oligonucleotídica no marcada, en exceso estequiométrico, y que pueda actuar como secuencia competidora. Las concentraciones del competidor empleadas fueron 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , lo que supone excesos estequiométricos de 15 y 50 veces en relación a la concentración de ADN cuádruple empleada en el ensayo. 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 ( $T_m$ ) obtenidos en presencia y ausencia del ADN competidor. En nuestro caso empleamos como secuencia competidora el oligonucleótido ds26<sup>212</sup> (5'-CAA TCG GAT CGA ATT CGA TCC GAT TG - 3').

Este ensayo nos permite realizar una estimación de la selectividad de los compuestos estudiados hacia el ADN cuádruple-G. La selectividad se calcula mediante el cociente entre los valores de  $\Delta T_m$  en presencia de la secuencia de ADN competidora y en ausencia de ella.

---

<sup>212</sup> De Cian, A.; Guittat, L.; Shin-ya, K.; Riou, J. F.; Mergny, J. L. *Nucleic Acids Symposium Series* **2005**, *49*, 235-236.



### 3.2.1.5 Viscosimetría

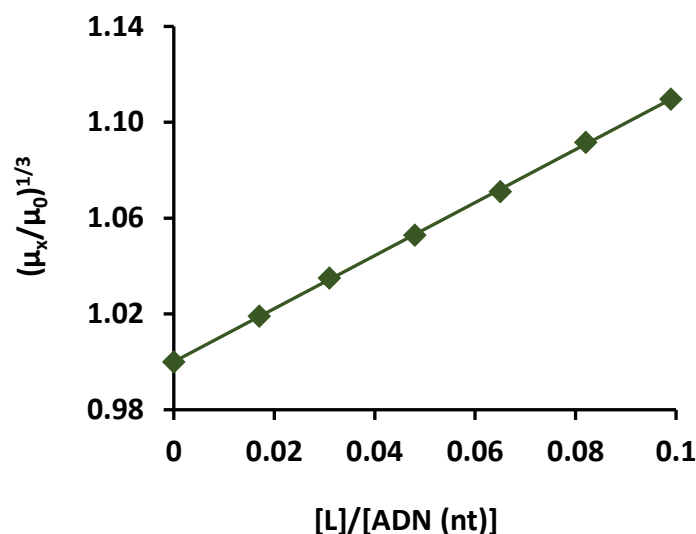
La viscosimetría es una técnica que se puede emplear para determinar el modo de unión entre un ligando y el ADN dúplex.<sup>213</sup> Una manera de diferenciar entre ligandos intercalantes de aquellos que se unen al surco o al esqueleto fosfato del ADN es analizar la variación de la viscosidad de una disolución de ADN con la adición de alícuotas sucesivas de ligando.<sup>214</sup> Los valores de la viscosidad de la disolución de ADN con ligando a concentración  $x$ , después de cada adición, se representan 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 (Figura 91). El valor de la pendiente obtenida del ajuste lineal de los datos nos indica el tipo de unión del ligando al ADN dúplex. De este modo, aquellos compuestos que se comportan como monointercalantes clásicos dan lugar a un valor de pendiente próximo a 1, mientras que aquellos compuestos que se unen a los surcos originan una pendiente de la recta prácticamente igual a cero. Experimentalmente se ha demostrado que el rango del valor de la pendiente puede variar. En el caso de los monointercalantes clásicos, el rango de valores de pendientes se encuentra 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.<sup>215</sup>

---

<sup>213</sup> Suh, D.; Chaires, J. B. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 723–728.

<sup>214</sup> Cohen, G.; Eisenberg, H. *Biopolymers* **1969**, *8*, 45-55.

<sup>215</sup> Drummond, D. S.; Pritchard, N. J.; Simpson-Gildemeister, V. F. W.; Peacocke, A. R. *Biopolymers* **1966**, *4*, 971-987.

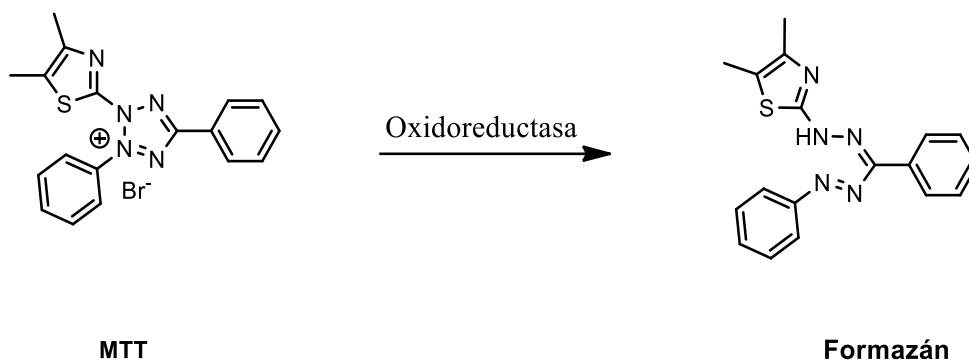


**Figura 91.** Viscosidad relativa  $(\mu_x/\mu_0)^{1/3}$  de la disolución de ligando (L) frente a la relación  $[L]/[ADN (nt)]$ ,  $\mu_x$ : viscosidad absoluta de la disolución ADN-ligando;  $\mu_0$ : viscosidad absoluta de la disolución de ADN en ausencia de compuesto

### 3.2.1.6 Ensayo de viabilidad celular con MTT

El ensayo de viabilidad celular MTT es una técnica habitualmente utilizada para determinar el valor de  $IC_{50}$  de un compuesto citotóxico en células en cultivo. Es un experimento relativamente simple, por lo que es ampliamente utilizado como método inicial para evaluar la actividad anticancerosa de compuestos de síntesis.

El ensayo con MTT es un ensayo colorimétrico basado en la reducción del colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán, llevada a cabo por oxidorreductasas dependientes de NADPH presentes en las células vivas (Figura 92). Cuando esta reacción se produce, se observa una intensa coloración púrpura en el medio de cultivo, debida al producto en su forma reducida (formazán). Por lo tanto, la aparición de esta coloración se puede emplear para cuantificar el número relativo de células que permanecen vivas tras un periodo de incubación con el compuesto citotóxico. Esta cuantificación se realiza por medidas de absorbancia en el rango  $\lambda = 500-600$  nm.



**Figura 92.** Reducción del MTT a formazán

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron con varias líneas tumorales: **HeLa** (carcinoma de cérvix uterino), **PC3** (carcinoma de próstata), **MCF7** (carcinoma de mama) y **HT29** (adenocarcinoma de colon). En algún caso se empleó, además, una línea celular sana de próstata (**RPWE**).

### 3.2.2. Estudio de los derivados de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada

Los estudios de interacción se llevaron a cabo con los derivados dicuaternizados con propilendiaminas como sustituyentes en las posiciones 4 y 7, descritos en el 3.1.1.2 (Figura 93). A continuación, se discuten los resultados de interacción obtenidos mediante el empleo de las técnicas de diálisis de equilibrio competitiva, dicroísmo circular, desnaturalización térmica por FRET y viscosimetría. Dichos resultados se compararán con los obtenidos para el compuesto de referencia (Figura 93) previamente sintetizado y estudiado en el grupo de investigación.<sup>61</sup>

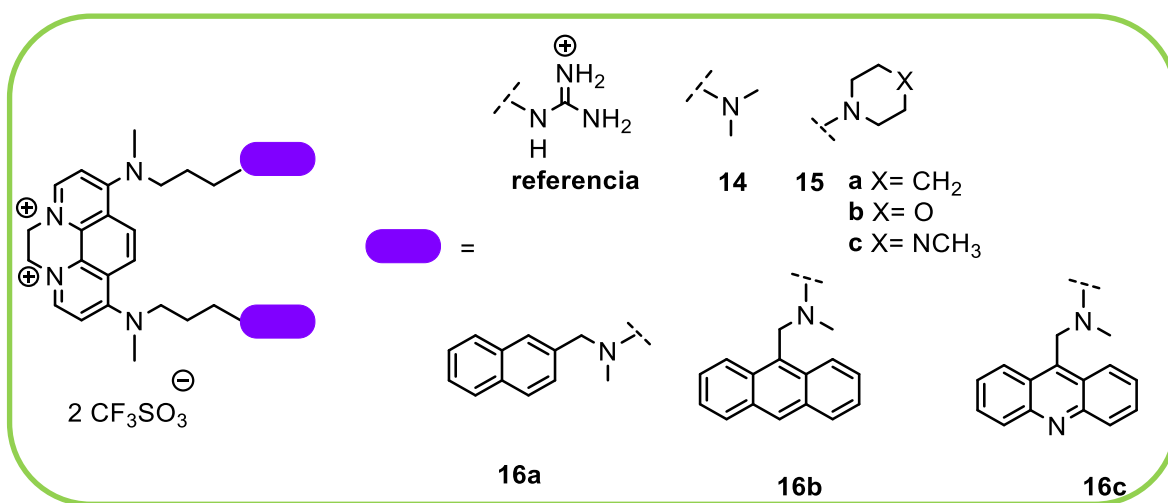


Figura 93. Derivados de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada

- **Resultados obtenidos por diálisis de equilibrio competitiva**

Los experimentos de diálisis de equilibrio competitiva se llevaron a cabo utilizando concentraciones iniciales de 1  $\mu\text{M}$  o 2  $\mu\text{M}$ , dependiendo del compuesto a estudiar. Para cada uno de los compuestos se determinó previamente su coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) a una determinada  $\lambda_{\text{máx.}}$ , superior a 300 nm, para evitar así el solapamiento con el espectro de absorción del ADN ( $\lambda_{\text{máx.}} = 260 \text{ nm}$ ).

Las tablas que se muestran a continuación recogen los valores de las constantes de afinidad de estos compuestos hacia el ADN (cuádruple y dúplex), en condiciones

iónicas de potasio (Tabla 18) y en condiciones iónicas sodio (Tabla 19), así como la selectividad (**S**) de cada uno de los ligandos.

	Tel-22 (K <sup>+</sup> ) K <sub>a</sub> x10 <sup>-4</sup> (M <sup>-1</sup> )	ds 17 (K <sup>+</sup> ) K <sub>a</sub> x10 <sup>-4</sup> (M <sup>-1</sup> )	S
Referencia	18.50 ± 0.11	2.36 ± 0.07	8
<b>14</b>	3.79 ± 0.01	0.31 ± 0.00	12
<b>15a</b>	5.61 ± 0.08	0.58 ± 0.07	10
<b>15b</b>	2.83 ± 0.08	0.89 ± 0.21	3
<b>15c</b>	6.06 ± 0.20	1.22 ± 0.09	5
<b>16a</b>	12.60 ± 0.67	0.02 ± 0.00	630*
<b>16b</b>	48.8 ± 0.31	7.97 ± 0.25	6
<b>16c</b>	21.5 ± 0.47	0.48 ± 0.07	45

**Tabla 18.** Valores de las constantes de asociación obtenidas para el ADN cuádruple-G (Tel22), ADN dúplex (ds17) y los valores de selectividad (S) en condiciones iónicas de potasio. \*=determinación sujeta a error por afinidad prácticamente nula hacia el dúplex

En condiciones iónicas de potasio (Tabla 18), el compuesto con mayor afinidad hacia el ADN cuádruple es el compuesto **16b** (derivado de antraceno) seguido de los compuestos **16c**, **referencia** y **16a** (derivados de acridina, guanidinio y naftaleno, respectivamente) con valores de K<sub>a</sub> comprendidos entre 13x10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> y 49x10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>. Estos ligandos presentan una buena afinidad, en el orden de 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>, mientras que el resto de compuestos de la serie presentan una afinidad moderada, con valores de constantes aparentes de afinidad inferiores a 7x10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>.

En cuestión de selectividad cabe destacar el compuesto **16a** con un valor para la selectividad muy elevado (≈ 630, aun admitiendo un margen de error en esta determinación), seguido del compuesto **16c**, que presenta un valor de selectividad muy bueno (**S** = 45). La selectividad del resto de ligandos es moderada con valores comprendidos entre 3 y 12.

	Tel-22 (Na <sup>+</sup> ) K <sub>a</sub> x10 <sup>-4</sup> (M <sup>-1</sup> )	ds 17 (Na <sup>+</sup> ) K <sub>a</sub> x10 <sup>-4</sup> (M <sup>-1</sup> )	S
Referencia	13.00 ± 0.05	4.11 ± 0.09	3
<b>14</b>	1.29 ± 0.02	0.22 ± 0.03	6
<b>15a</b>	1.71 ± 0.03	0.36 ± 0.05	5
<b>15b</b>	1.15 ± 0.03	0.84 ± 0.24	1.5
<b>15c</b>	1.43 ± 0.11	0.81 ± 0.03	2
<b>16a</b>	4.52 ± 0.06	N.D.	N.D.
<b>16b</b>	7.68 ± 0.41	5.31 ± 0.16	1.5
<b>16c</b>	N.D.	N.D.	N.D.

**Tabla 19.** Valores de las constantes de asociación obtenidas para el ADN cuádruple-G (Tel22), ADN dúplex (ds17) y los valores de selectividad (S) en condiciones iónicas de sodio

Con respecto a los ensayos realizados en condiciones iónicas de sodio (Tabla 19), podemos observar que todos los compuestos estudiados para esta familia presentan constantes de afinidad moderadas del orden de 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> y muy inferiores al compuesto de referencia. Solamente el compuesto **16b** presenta un valor de la constante aparente comparable al compuesto referencia.

La selectividad en estas condiciones iónicas no es muy elevada, ya que el ligando que mayor selectividad presenta es **14** (S = 6).

En términos generales, se observa que esta familia de ligandos posee una buena capacidad de reconocimiento hacia la estructura del ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de potasio. Además, también actúan como ligandos de cuádruple-G en condiciones iónicas de sodio, aunque con una menor afinidad. Otro aspecto a resaltar son los mejores resultados obtenidos, tanto para afinidad como para selectividad, con los ligandos con restos aromáticos (**16a**, **16b** y **16c**). Por último, cabe destacar que los ligandos **14** y **15a**, a pesar de tener constantes de afinidad bajas, poseen selectividades moderadas, pero superiores a la mostrada por el compuesto de referencia.

- **Resultados obtenidos por dicroísmo circular**

Otra de las técnicas empleadas para la evaluación de la interacción ADN-ligando fue el dicroísmo circular. En este caso se registraron los espectros de las dos conformaciones del cuádruple en presencia de los distintos ligandos sintetizados para así observar 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. Por lo general, 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, en las figuras 94, 95 y 96 se recogen los espectros de dicroísmo circular en condiciones iónicas de  $K^+$  y  $Na^+$  del compuesto de **referencia**, así como de los compuestos **15c**, **16a**, **16b** y **16c**. Se han seleccionado estos derivados porque son aquellos que presentan los cambios más significativos en sus espectros de dicroísmo circular. El compuesto **15a** también presenta cambios en sus espectros de DC, pero al ser muy similares a los de **15c**, no se ha incluido en una figura.

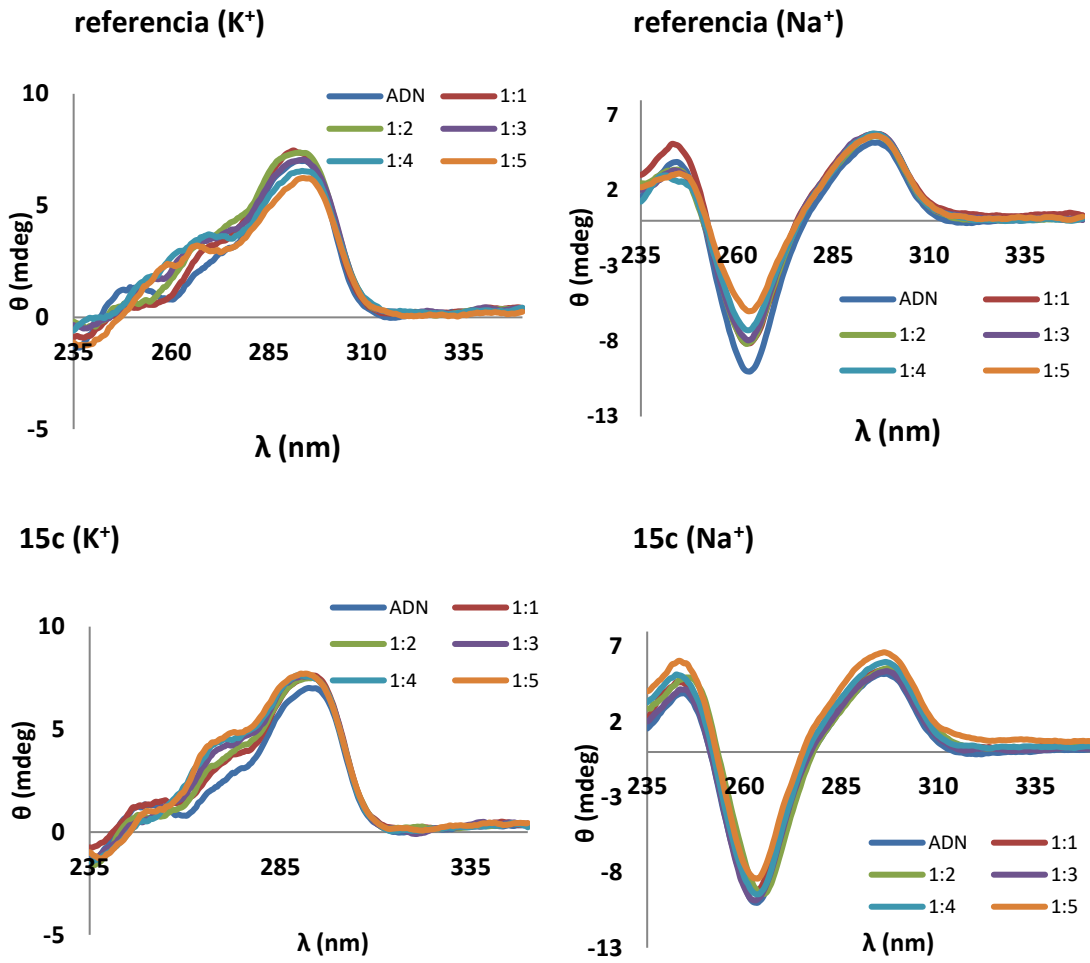


Figura 94. Espectros de DC para los compuestos *referencia* y *15c* en condiciones iónicas de potasio (izquierda) y en condiciones iónicas de sodio (derecha)



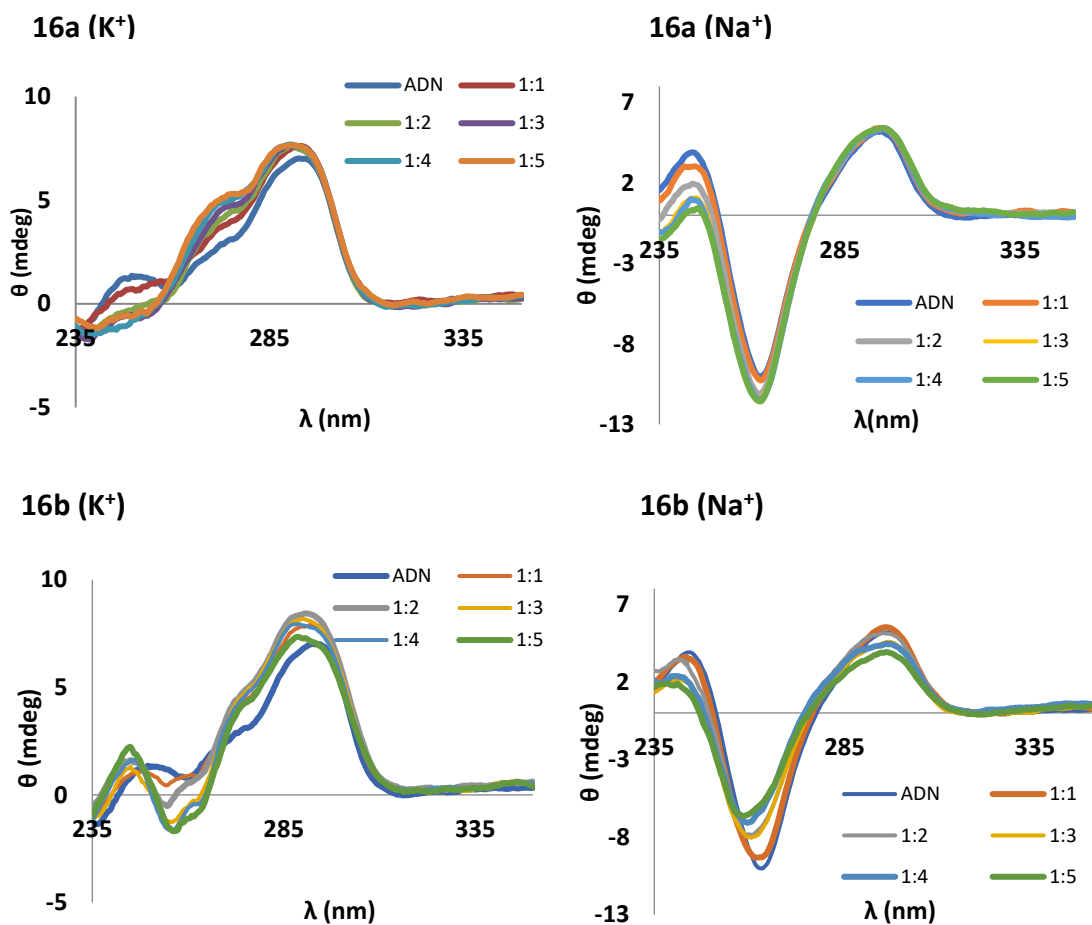
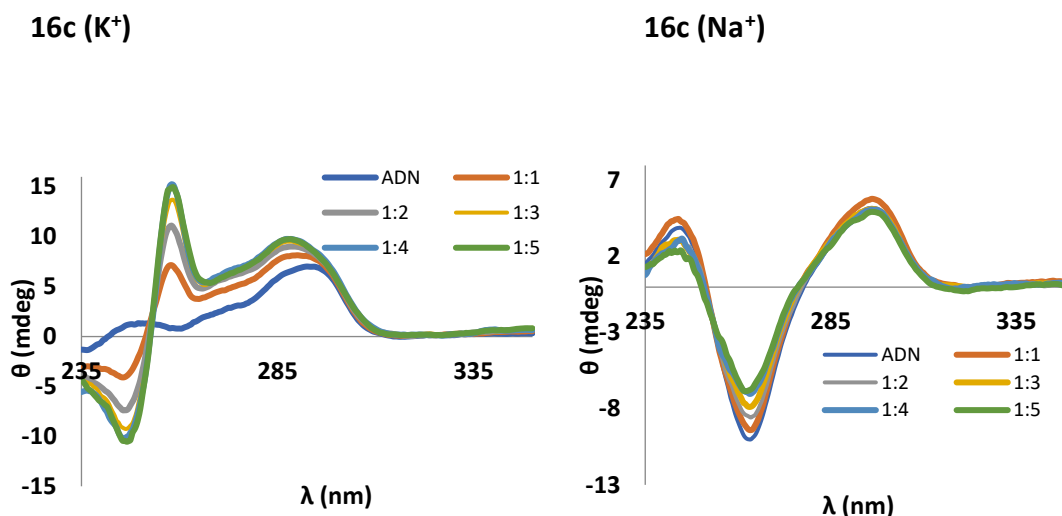


Figura 95. Espectros de DC para los compuestos 16a y 16b en condiciones iónicas de potasio (izquierda) y en condiciones iónicas de sodio (derecha)



**Figura 96.** Espectros de DC para el compuesto **16c** en condiciones iónicas de potasio (izquierda) y en condiciones iónicas de sodio (derecha)

Con respecto a los espectros para la conformación en sodio podemos observar que la adición de todos los compuestos produce alteraciones muy leves en los mismos, con una ligera disminución de los máximos a 263 nm y 296 nm cuando se incrementa la concentración de ligando, para el caso de los compuestos **16b** y **16c**. Estos descensos en la intensidad de estos máximos indican una ligera interacción de tipo desestabilizante de la conformación del cuádruple en estas condiciones iónicas.

En el caso de los espectros registrados en condiciones iónicas de potasio, cabe destacar que los efectos producidos por la unión de los compuestos son más significativos, y se pueden identificar dos tendencias. La primera de ellas es la que siguen el compuesto de **referencia** y el compuesto **16b** en la que los cambios producidos en los espectros indican una estabilización de la estructura con la adición inicial de producto y una desestabilización de la misma a altas concentraciones de ligando. La segunda es la producida por los compuestos **15c**, **16a** y **16c**, en los que se produce estabilización de la estructura del cuádruple, tal y como muestra el aumento de la elipticidad a 296 nm. Además, para los compuestos **15c** y **16a**, la aparición del hombro a 270 nm es indicativa de un efecto estabilizador de la topología paralela. Especial consideración merece el compuesto **16c**, que además de la estabilización de la estructura observada por el

incremento de la señal a 296 nm, produce la aparición de un máximo distintivo a 258 nm. El origen de la aparición de esta banda es incierto, si bien podría deberse a algún fenómeno relacionado con un efecto de dicroísmo circular inducido.

Estos resultados muestran cierta coherencia con los obtenidos previamente en los experimentos de diálisis de equilibrio. Esta familia de compuestos muestra una mayor afinidad y selectividad para el cuádruple-G plegado en condiciones iónicas de potasio, que a su vez se traduce en un mayor efecto estabilizador de su estructura, en comparación a la situación que estudia el cuádruple plegado en condiciones iónicas de sodio.

- **Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET**

Por otra parte, el estudio de la estabilización ejercida por los ligandos sobre el ADN se llevó a cabo con la técnica de desnaturalización térmica por FRET.

Se considera que un ligando es buen estabilizador del ADN cuádruple cuando los valores de  $\Delta T_m$  son superiores a 10 °C a concentración de ligando 1  $\mu$ M. En el caso de la familia de compuestos de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada, se realizó el estudio de desnaturalización térmica en un rango de concentraciones de 0-10  $\mu$ M. Ninguno de los compuestos estudiados presenta un valor de  $\Delta T_m$  igual o superior a 10 °C a concentración de 1  $\mu$ M. El único que se aproxima es el compuesto de **referencia** con un valor de  $\Delta T_m = 9.3$  °C.

En la tabla 20 se recogen los valores de  $\Delta T_m$  a las concentraciones de ligando 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M tanto para ADN cuádruple-G, en condiciones iónicas de K<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup>, como para ADN dúplex.

	$\Delta T_m$ F21T(K <sup>+</sup> )		$\Delta T_m$ F21T(Na <sup>+</sup> )		$\Delta T_m$ F10T	
	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M
<b>Referencia</b>	18.3 $\pm$ 0.4	24.0 $\pm$ 0.0	18.3 $\pm$ 0.7	25.3 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.3	11.3 $\pm$ 0.3
<b>14</b>	5.0 $\pm$ 0.7	8.3 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 1.4	3.0 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.0
<b>15a</b>	8.3 $\pm$ 0.3	11.3 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.0	-0.3 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.3
<b>15b</b>	2.5 $\pm$ 0.0	5.3 $\pm$ 1.0	-1.0 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 1.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0
<b>15c</b>	10.0 $\pm$ 0.0	12.5 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.3	-0.8 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0
<b>16a</b>	7.5 $\pm$ 0.0	12.0 $\pm$ 0.0	6.0 $\pm$ 0.3	10.0 $\pm$ 0.3	-0.5 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.0
<b>16b</b>	18.3 $\pm$ 0.0	28.5 $\pm$ 0.0	18.5 $\pm$ 0.3	25.0 $\pm$ 0.3	4.0 $\pm$ 0.0	7.3 $\pm$ 0.3
<b>16c</b>	19.0 $\pm$ 0.3	24.0 $\pm$ 1.4	9.0 $\pm$ 1.0	13.0 $\pm$ 1.0	0.0 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.0

**Tabla 20.** Valores de  $\Delta T_m$  de los compuestos dicuaternizados para ADN cuádruple-G (F21T) y ADN dúplex (F10T)

Al aumentar la concentración de ligando a 5  $\mu$ M podemos observar que los compuestos **16b** y **16c** (derivados de antraceno y acridina, respectivamente) son capaces de estabilizar la estructura del cuádruple-G en K<sup>+</sup> en igual medida o ligeramente superior que el ligando de **referencia**. Este comportamiento se reproduce cuando aumentamos la concentración de ligando a 10  $\mu$ M. Por lo tanto, la incorporación de restos aromáticos a la estructura, potencian la capacidad estabilizadora de esta familia de ligandos a concentraciones iguales o superiores a 5  $\mu$ M.

Otro comportamiento observado es que todos los compuestos, independientemente de la concentración estudiada, presentan valores de  $\Delta T_m$  para la estructura de ADN dúplex (F10T) inferior a la del compuesto de **referencia**. A pesar de que todos ellos (a excepción de **16b** y **16c** a concentraciones de 5 y 10  $\mu$ M) son ligandos estabilizadores débiles, podemos observar cierta selectividad hacia el ADN cuádruple, ya que la estabilización es baja o nula en la mayoría de los casos para el ADN de doble hebra. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en los experimentos de diálisis de equilibrio, sin embargo, han de ser interpretados con cautela, ya que con este ensayo no podemos determinar la selectividad de los ligandos de manera precisa. De los compuestos con resto aromático, los derivados **16b** y **16c** fueron los que demostraron

una mayor afinidad y selectividad hacia el cuádruple, lo que también se tradujo en una mayor estabilización de esta estructura secundaria y un efecto prácticamente nulo en el caso del ADN de doble hebra.

El grado de selectividad hacia las dos estructuras cuádruples o entre los cuádruples y dúplex puede observarse mejor en los gráficos de barras que se representan a continuación (Figura 97).

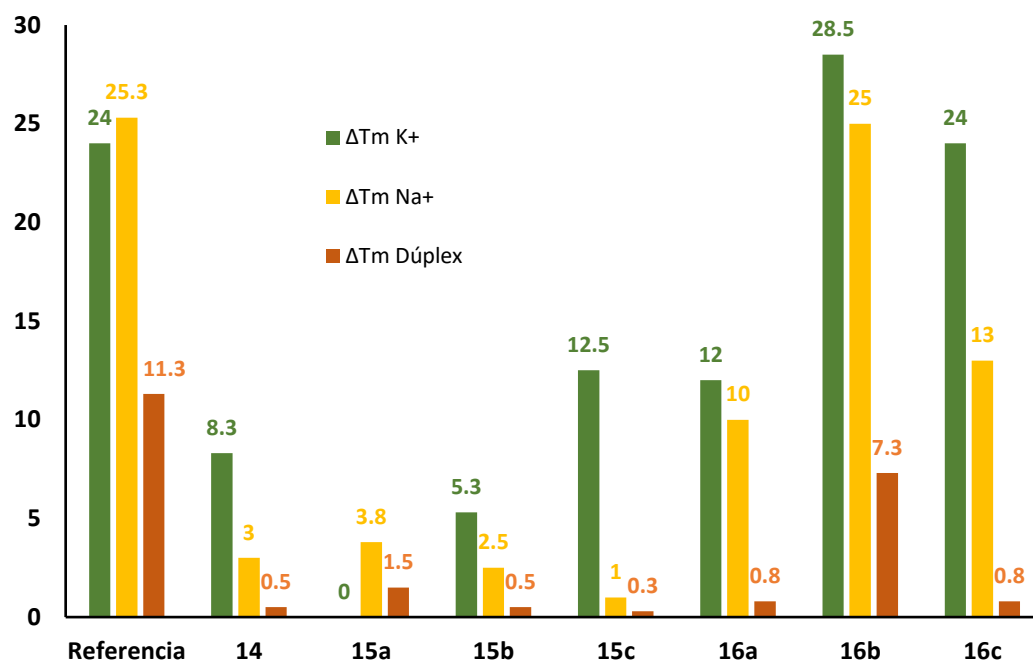


Figura 97. Diagrama de barras con los valores de  $\Delta T_m$  de los ligandos cuaternizados para las tres conformaciones de ADN estudiadas a una concentración 10  $\mu$ M de ligando

Como se aprecia en la figura 97, los compuestos que muestran una mayor estabilización del cuádruple son el compuesto **16b**, compuesto de **referencia** y **16c**, seguidos de **16a** y **15c**. Entre estos compuestos, el compuesto de **referencia**, **16b** y **16a** producen un efecto similar en los dos tipos de cuádruple, mientras que **16c** y, sobre todo, **15c**, produce un efecto bastante más acusado en el ADN cuádruple en condiciones iónicas de K<sup>+</sup>. Además, **15c**, **16a** y **16c** no estabilizan el ADN dúplex.

- **Resultados obtenidos por viscosimetría**

Por último, como técnica complementaria se ha empleado la viscosimetría, ya que los compuestos sintetizados también se unen, en cierto grado, al ADN dúplex. Los valores de las pendientes obtenidas experimentalmente por esta técnica, así como la clasificación del modo de unión de los compuestos dicuaternizados se recogen en la tabla 21.

	Valor de la pte.	Clasificación
<b>Referencia</b>	0.99 (Baja conc.) 0.39 (Alta conc.)	Unión mixta dependiente de la concentración
<b>14</b>	0.07	Unión al surco/unión externa
<b>15a</b>	0.14	Unión al surco/unión externa
<b>15b</b>	-0.05	Unión al surco/unión externa
<b>15c</b>	0.11	Unión al surco/unión externa
<b>16a</b>	0.34	Unión al surco/Intercalante parcial
<b>16b</b>	0.97	Intercalante
<b>16c</b>	0.87	Intercalante

**Tabla 21.** Valores de las pendientes y clasificación por el modo de unión al ADN dúplex para los compuestos **14**, **15a-c** y **16a-c**

A excepción del compuesto de **referencia**, los datos obtenidos en el ensayo de viscosimetría se ajustaron a una regresión lineal en todo el rango de concentraciones estudiado. En el caso del compuesto de referencia se observaron dos tendencias lineales en el conjunto de datos experimentales obtenidos. A concentraciones bajas, el compuesto se comporta como un intercalante (pendiente  $\approx 1$ ), mientras que a concentraciones altas se une a los surcos.

En los ligandos que no contienen restos aromáticos (**14**, **15a**, **15b**, **15c**) se observa claramente un comportamiento de unión al surco o unión externa de tipo electrostático, con valores de la pendiente  $\leq 0.14$ . Dentro de los ligandos con resto aromático, se observaron dos comportamientos. El primero de ellos para el compuesto **16a**, que presenta un comportamiento mixto entre la unión al surco e intercalación parcial. Y, por otro lado, los derivados **16b** y **16c** que se pueden clasificar como intercalantes (pendientes  $\geq 0.85$ ). Probablemente, en el caso de los dos últimos derivados, la unidad

de antraceno o acridina, con una superficie aromática mayor que en el caso del naftaleno, sea la responsable del fenómeno de intercalación.

- **Resultados obtenidos por el ensayo de citotoxicidad MTT**

En cuanto a la actividad antitumoral de los derivados cuaternizados, se llevaron a cabo estudios preliminares empleando el ensayo MTT con la línea celular HeLa, y a dos tiempos de incubación diferentes, 24 h y a 72 h, en un rango de concentraciones comprendido entre 0.1 nM y 100  $\mu$ M. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 22.

	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) 24 h	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) 72 h
<b>Referencia</b>	> 100	> 100
<b>14</b>	> 100	> 100
<b>15a</b>	> 100	> 100
<b>15b</b>	> 100	> 100
<b>15c</b>	> 100	> 100
<b>16a</b>	90 $\pm$ 4	29 $\pm$ 6
<b>16b</b>	33 $\pm$ 4	42 $\pm$ 4
<b>16c</b>	> 100	86 $\pm$ 16

**Tabla 22.** Valores de IC<sub>50</sub> a 24 h y 72 h para los compuestos **14**, **15a-c** y **16a-c**

Los resultados obtenidos mostraron una actividad antitumoral muy baja o nula para los compuestos **referencia**, **14** y **15a-c**. Sin embargo, para los compuestos **16a-c** se observó actividad, con valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 100  $\mu$ M, a 72h. Cabe destacar el derivado **16a** (derivado de naftaleno) con un valor de IC<sub>50</sub> = 29  $\pm$  6  $\mu$ M y cuya actividad muestra una clara dependencia con el periodo de incubación.

Posteriormente, se realizaron los ensayos con dos líneas tumorales más (PC3 y HT-29) y una línea celular sana (RWPE) empleando un periodo de incubación de 72 horas. A continuación, en la tabla 23, se muestran los valores de IC<sub>50</sub> resultados obtenidos.

	IC <sub>50</sub> (μM) PC3	IC <sub>50</sub> (μM) HT-29	IC <sub>50</sub> (μM) RWPE
Referencia	> 100	> 100	N.D.
<b>14</b>	> 100	> 100	N.D.
<b>15a</b>	> 100	> 100	N.D.
<b>15b</b>	> 100	> 100	N.D.
<b>15c</b>	> 100	> 100	N.D.
<b>16a</b>	21 ± 2	26 ± 5	54 ± 4
<b>16b</b>	12 ± 2	13 ± 2	12 ± 2
<b>16c</b>	32 ± 5	68 ± 14	49 ± 7

**Tabla 23.** Valores de IC<sub>50</sub> a 72 h para tres líneas celulares

La tendencia observada en las líneas tumorales es la misma que en el caso anterior. No se observa actividad antitumoral por debajo de 100 μM para los compuestos **14** y **15a-c**. Por otro lado, la actividad para los derivados **16a-c** es ligeramente superior con respecto a la línea celular anterior, destacando el compuesto **16a** y, especialmente, el **16b**. Desafortunadamente, los derivados que muestran actividad en líneas tumorales también resultaron citotóxicos para la línea celular sana, con valores de IC<sub>50</sub> comprendidos entre 12 μM y 54 μM.



### 3.2.3. Estudio de los derivados de 1,10-fenantrolina disustituídos en las posiciones 4 y 7

En este apartado se discuten los resultados de interacción obtenidos para los ligandos de 1,10-fenantrolina disustituídos en las posiciones 4 y 7 (Figura 98) descritos en el apartado 3.1.2.3. En este caso se han realizado ensayos de desnaturalización térmica de ADN por FRET (para determinar la estabilización de la estructura secundaria del ADN) y por FRET competitivo (para determinar la selectividad de los compuestos hacia el cuádruple-G, en relación al ADN dúplex). Además, se incluyen datos de actividad antitumoral *in vitro* para algunos de los compuestos de la serie.

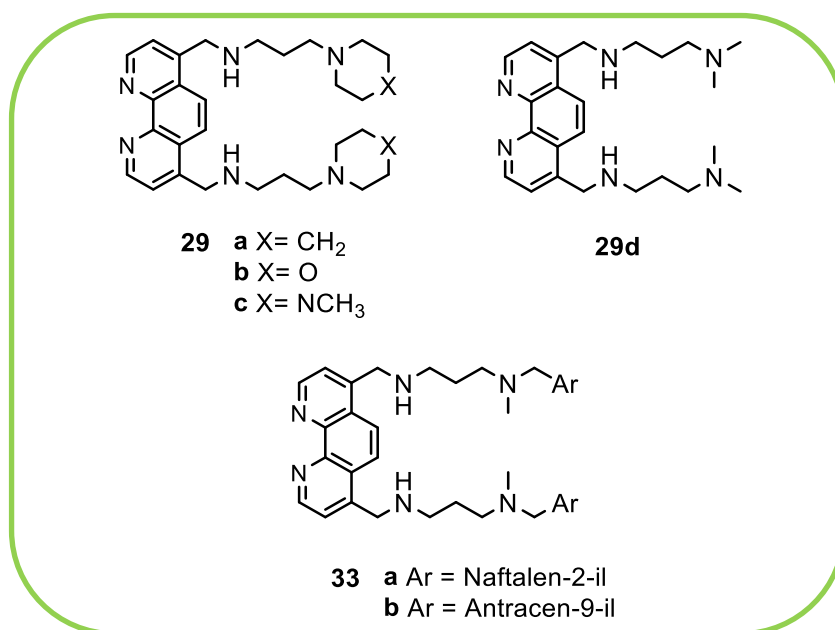


Figura 98. Familia de derivados de 1,10-fenantrolina disustituídos en las posiciones 4 y 7

- **Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET**

Para esta familia de ligandos, se realizó el estudio de desnaturalización térmica por FRET en el rango de concentraciones 0-5  $\mu\text{M}$ . En la tabla 24 se recogen los valores de  $\Delta T_m$  obtenidos a las concentraciones de ligando 1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ , para ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , así como para ADN dúplex.

	$\Delta T_m$ F21T(K <sup>+</sup> )		$\Delta T_m$ F21T(Na <sup>+</sup> )		$\Delta T_m$ F10T	
	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M
<b>29a</b>	8.5 $\pm$ 0.7	24.8 $\pm$ 0.4	0 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 0.4	9.5 $\pm$ 0.0
<b>29b</b>	1.0 $\pm$ 0.0	7.3 $\pm$ 1.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.0	-0.8 $\pm$ 0.4	0.0 $\pm$ 0.4
<b>29c</b>	6.3 $\pm$ 0.4	17.0 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.4	3.3 $\pm$ 0.4	0.0 $\pm$ 0.0	3.5 $\pm$ 0.0
<b>29d</b>	7.5 $\pm$ 0.7	17.0 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.7	2.3 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.4	6.0 $\pm$ 0.4
<b>33a</b>	3.8 $\pm$ 0.4	18.0 $\pm$ 2.1	2.0 $\pm$ 1.0	8.0 $\pm$ 2.8	0.5 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 0.4
<b>33b</b>	1.5 $\pm$ 0.0	11.5 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.7	6.3 $\pm$ 1.1	0.5 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0

**Tabla 24.** Valores de  $\Delta T_m$  de los ligandos **29a-d** y **33a-b** para ADN cuádruple-G (F21T) y ADN dúplex (F10T)

El valor de  $\Delta T_m$  más elevado en condiciones iónicas de K<sup>+</sup> lo presenta el compuesto **29a** (derivado de piperidina) con  $\Delta T_m = 8.5$  °C a 1  $\mu$ M y  $\Delta T_m = 24.8$  °C a 5  $\mu$ M. El resto de compuestos presentan valores de  $\Delta T_m$  inferiores a 8 °C a la concentración de 1  $\mu$ M, y entre 10-20 °C a 5  $\mu$ M.

Los valores de  $\Delta T_m$  obtenidos para la conformación en Na<sup>+</sup> son bajos, exceptuando el de **33a** a concentración 5  $\mu$ M con un valor de  $\Delta T_m$  de 8 °C. Estos resultados revelan la preferencia de esta familia de ligandos a reconocer y estabilizar la conformación del cuádruple-G en condiciones iónicas de K<sup>+</sup>. En este sentido, destacan especialmente los compuestos **29a** y **29d**, con diferencias de valores de  $\Delta T_m$  de más de 20 °C y 10 °C, respectivamente, con respecto a la conformación en condiciones iónicas de potasio.

En el caso del ADN dúplex, el compuesto **29a** es capaz de estabilizar su estructura 9.5 °C, mientras que el resto de compuestos no presentan datos de estabilización significativos. Por lo tanto, a pesar de ser el mejor compuesto de la serie en condiciones iónicas de K<sup>+</sup>, **29a** no será el compuesto más selectivo. Por el contrario, los compuestos **29c**, **33a** y **33b** parecen ser compuestos más selectivos. Muestran valores de  $\Delta T_m$  para el ADN de doble hebra inferiores a 4 °C y con diferencias de  $\Delta T_m$ , con respecto al cuádruple en condiciones iónicas de K<sup>+</sup>, superiores a 10 °C. Es previsible que la realización del experimento en condiciones competitivas nos permita confirmar estas conclusiones relativas a la selectividad de los compuestos.

En la figura 99 se representa en un diagrama de barras los valores de  $\Delta T_m$  a la concentración de ligando  $5 \mu\text{M}$ , para las tres conformaciones de ADN estudiadas.

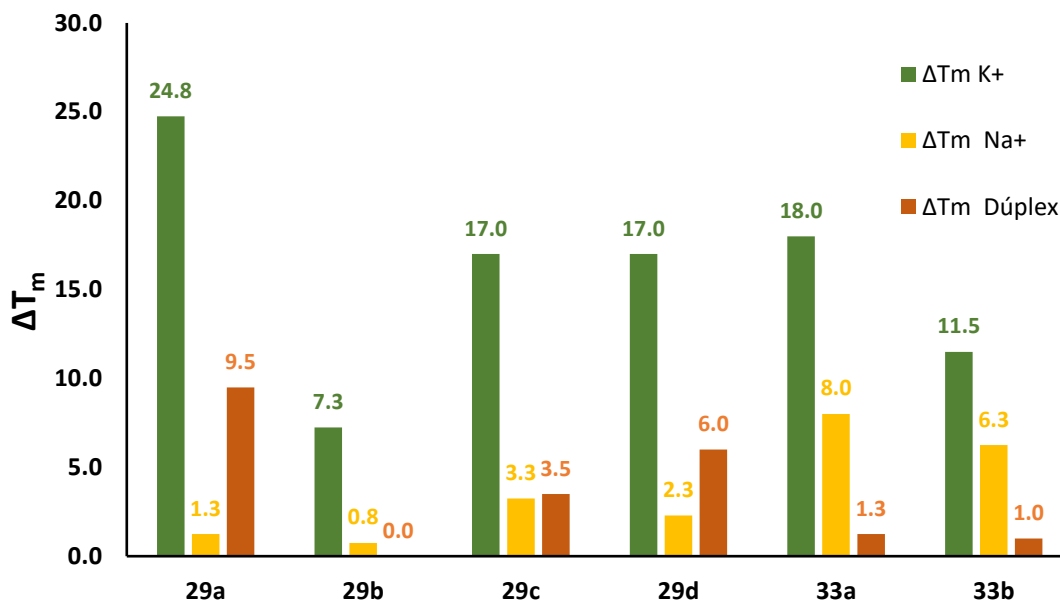


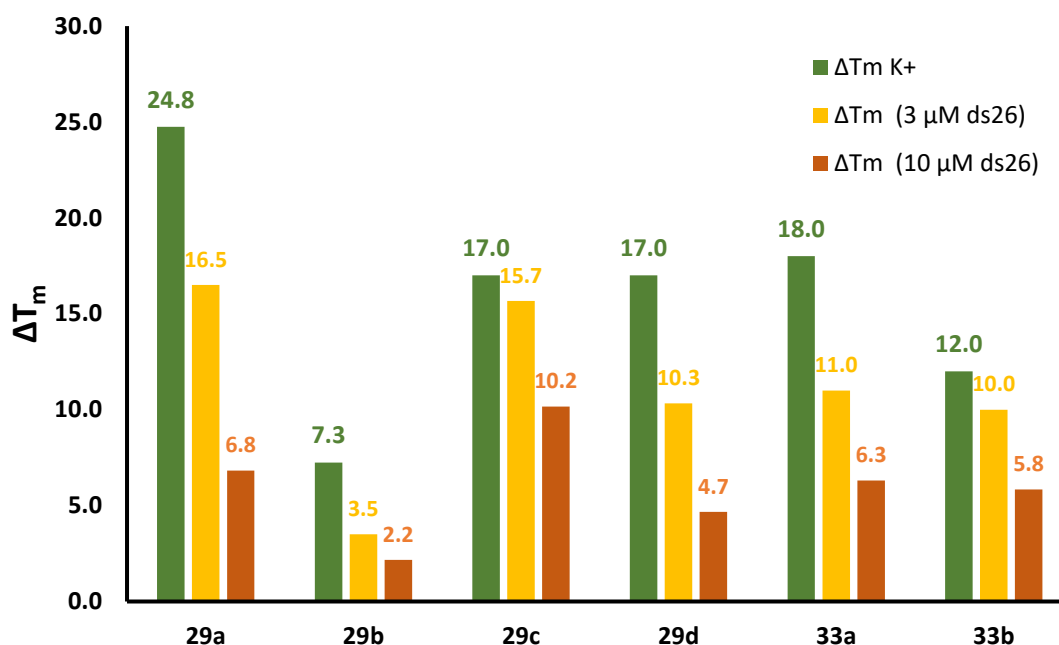
Figura 99. Diagrama de barras con los valores de  $\Delta T_m$  de los ligandos **29a-d** y **33a-b** para las tres conformaciones de ADN, a concentración  $5 \mu\text{M}$  de ligando

- **Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET competitivo**

Para determinar la selectividad de los ligandos, se ha utilizado el ensayo de desnaturalización térmica, pero en presencia de una secuencia de ADN de doble hebra competidora en exceso (ds26). Los valores de  $\Delta T_m$  en ausencia de la secuencia competidora y en presencia de ella ( $[\text{ds26}] = 3 \mu\text{M}$  y  $10 \mu\text{M}$ ) se recogen tanto en la tabla 25 como en la figura 100.

	$\Delta T_m$ F21T (K <sup>+</sup> )	$\Delta T_m$ F21T(K <sup>+</sup> ) (3 $\mu$ M ds26)	$\Delta T_m$ F21T(K <sup>+</sup> ) (10 $\mu$ M ds26)
<b>29a</b>	24.8 $\pm$ 0.4	16.5 $\pm$ 0.5	6.8 $\pm$ 0.3
<b>29b</b>	7.3 $\pm$ 1.1	3.5 $\pm$ 0.0	2.2 $\pm$ 0.3
<b>29c</b>	17.0 $\pm$ 0.0	15.7 $\pm$ 0.3	10.2 $\pm$ 0.4
<b>29d</b>	17.0 $\pm$ 0.7	10.3 $\pm$ 0.8	4.7 $\pm$ 0.3
<b>33a</b>	18.0 $\pm$ 2.1	11.0 $\pm$ 0.4	6.3 $\pm$ 0.4
<b>33b</b>	11.5 $\pm$ 0.7	10.0 $\pm$ 2.6	5.8 $\pm$ 1.6

**Tabla 25.** Valores de  $\Delta T_m$  para los ligandos **29a-d** y **33a-b** en ausencia y presencia de la secuencia competidora de ADN dúplex



**Figura 100.** Diagrama de barras con los valores de  $\Delta T_m$  para los ligandos **29a-d** y **33a-b**, en ausencia y presencia de la secuencia competidora de ADN dúplex

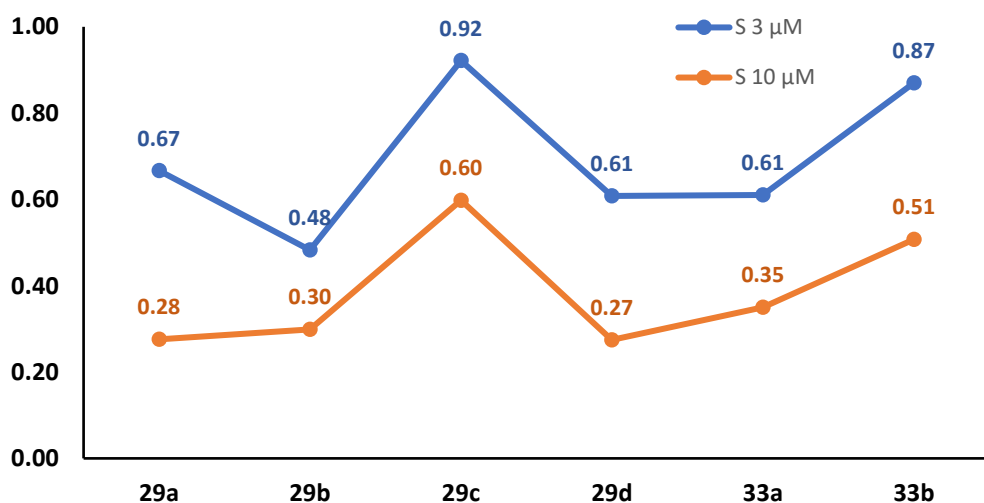
Como se había predicho, el compuesto **29a**, a pesar de mostrar el valor de  $\Delta T_m$  más elevado, no es uno de los derivados más selectivos de la serie, ya que presenta un descenso del valor de  $\Delta T_m$  de 18 °C al adicionar ADN dúplex a concentración de 10  $\mu$ M. Por otra parte, el compuesto que presentó una mejor selectividad fue, claramente, **29c**, seguido de **33b**, en concordancia con los resultados previos. Estos derivados son los que

presentaron una menor variación de  $\Delta T_m$ , de aproximadamente 7 °C, cuando se adicionó ADN de doble hebra en gran exceso (10  $\mu\text{M}$ ).

A continuación, en la tabla 26, se muestran los datos de selectividad calculados a partir de los valores de  $\Delta T_m$  obtenidos en presencia de la secuencia ds26 a las concentraciones 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ . Además, a efecto de visualizar la selectividad de los compuestos de esta serie, se incluye un gráfico que refleja la tendencia que siguen los datos experimentales (Figura 101).

	29a	29b	29c	29d	33a	33b
$S_{3\ \mu\text{M}}$	0.67	0.48	0.92	0.61	0.61	0.87
$S_{10\ \mu\text{M}}$	0.28	0.30	0.60	0.27	0.35	0.51

**Tabla 26.** Datos de selectividad a concentraciones 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de ADN competidor ( $S_{3\ \mu\text{M}}$  y  $S_{10\ \mu\text{M}}$ ) para los compuestos **29a-d** y **33a-b**



**Figura 101.** Líneas de tendencia de selectividad para los compuestos **29a-d** y **33a-b**

Claramente, en términos de selectividad, destaca el compuesto **29c** (derivado de *N*-metilpiperacina) con valores de *S* calculados iguales a 0.92 y a 0.60, seguido del compuesto **33b** (derivado de antraceno) con selectividades ligeramente inferiores, pero

notables. El resto de los compuestos de esta familia presentan una selectividad baja a concentraciones altas de ADN de doble hebra, con valores de S inferiores a 0.35.

- **Resultados obtenidos por el ensayo de citotoxicidad MTT**

Para esta familia de compuestos solo se dispone, hasta la fecha, de resultados de actividad antitumoral *in vitro* para los derivados **33a** y **33b** (Tabla 27). Se ha comenzado el estudio por estos compuestos que incorporan en su estructura naftaleno y antraceno ya que en la familia de derivados de fenantrolina dicuaternizados, descritos en el apartado anterior, sus análogos han sido los únicos que han demostrado una actividad biológica relevante. Evidentemente, tras analizar la selectividad de los compuestos de esta familia, resultaría interesante asimismo realizar un estudio de actividad sobre el compuesto **29c**.

	IC <sub>50</sub> (μM) PC3	IC <sub>50</sub> (μM) HT-29	IC <sub>50</sub> (μM) MCF-7
<b>33a</b>	>100	N.D.	N.D.
<b>33b</b>	100	3.3 ± 0.4	6.6 ± 0.2

Tabla 27. Valores de IC<sub>50</sub> a 72 h

A falta de completar este estudio con el derivado **33a**, los datos preliminares parecen indicar que el derivado **33b** (derivado de antraceno) posee una citotoxicidad relevante en dos de las tres líneas celulares empleadas (HT-29 y MCF-7).

### 3.2.4. Estudio de los derivados de 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 2 y 9

En lo que respecta a la familia de derivados de 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 2 y 9 (Figura 102), descritos en el apartado 3.1.3 y análogos a la familia anterior, se han realizado dos tipos de experimentos de interacción: desnaturalización térmica del ADN por FRET (para determinar el efecto estabilizador de los ligandos) y desnaturalización térmica del ADN por FRET, en su versión competitiva (para determinar la selectividad). Los resultados de interacción más relevantes se discuten a continuación.

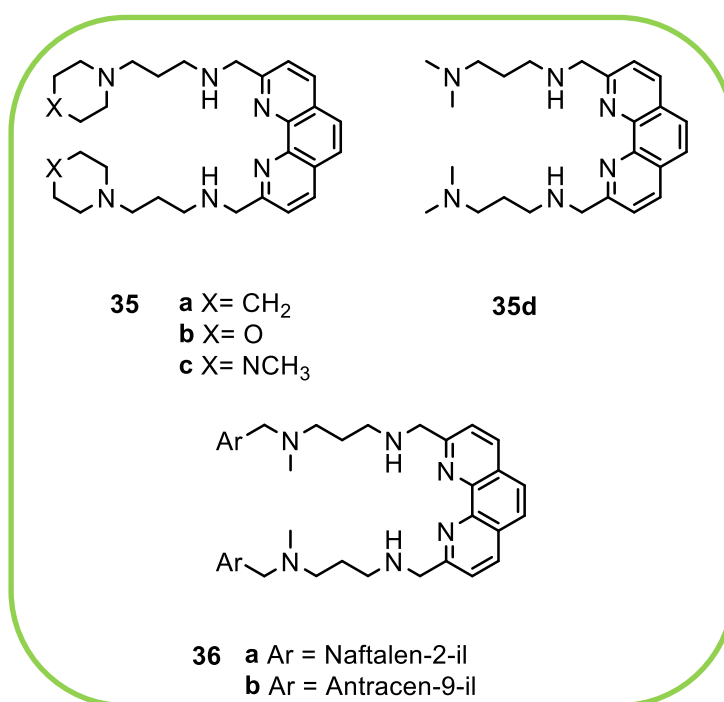


Figura 102. Familia de los derivados de 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 2 y 9

#### • Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET

Para estos seis derivados, se realizó el estudio de desnaturalización térmica por FRET en el rango de concentraciones de ligando 0-5  $\mu$ M. En la tabla 28 se muestran los

valores de  $\Delta T_m$  a las concentraciones de ligando 1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ , tanto para ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , como para ADN dúplex.

	$\Delta T_m$ F21T( $\text{K}^+$ )		$\Delta T_m$ F21T( $\text{Na}^+$ )		$\Delta T_m$ F10T	
	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$
<b>35a</b>	7.0 $\pm$ 0.8	13.0 $\pm$ 1.8	0 $\pm$ 0.4	7.5 $\pm$ 2.1	1.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0
<b>35b</b>	3.3 $\pm$ 0.4	7.0 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.0	2.3 $\pm$ 0.7	0.3 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.4
<b>35c</b>	6.0 $\pm$ 0.0	16.0 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.4	11.3 $\pm$ 1.1	1.5 $\pm$ 0.0	3.5 $\pm$ 0.0
<b>35d</b>	6.3 $\pm$ 1.1	9.8 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	4.5 $\pm$ 1.5	0.8 $\pm$ 0.4	4.0 $\pm$ 0.0
<b>36a</b>	0.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 1.4	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
<b>36b</b>	1.3 $\pm$ 1.1	7.0 $\pm$ 1.1	1.5 $\pm$ 0.7	4.8 $\pm$ 1.1	0.5 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0

**Tabla 28.** Valores de  $\Delta T_m$  de los ligandos **35a-d** y **36a-b** para ADN cuádruple-G (F21T) y ADN dúplex (F10T)

Los compuestos con mayor capacidad estabilizadora del ADN cuádruple en condiciones iónicas de  $\text{K}^+$  son **35a** y **35c** (derivados de piperidina y *N*-metilpiperacina, respectivamente). Estos compuestos presentan valores de  $\Delta T_m$  moderados (13  $^\circ\text{C}$  y 16  $^\circ\text{C}$ ) a la concentración de 5  $\mu\text{M}$ . Por otra parte, todos los compuestos de esta familia presentan una relativa baja capacidad de estabilización del cuádruple en condiciones iónicas de  $\text{K}^+$  a la concentración de 1  $\mu\text{M}$ , con valores de  $\Delta T_m$  inferiores a 10  $^\circ\text{C}$ .

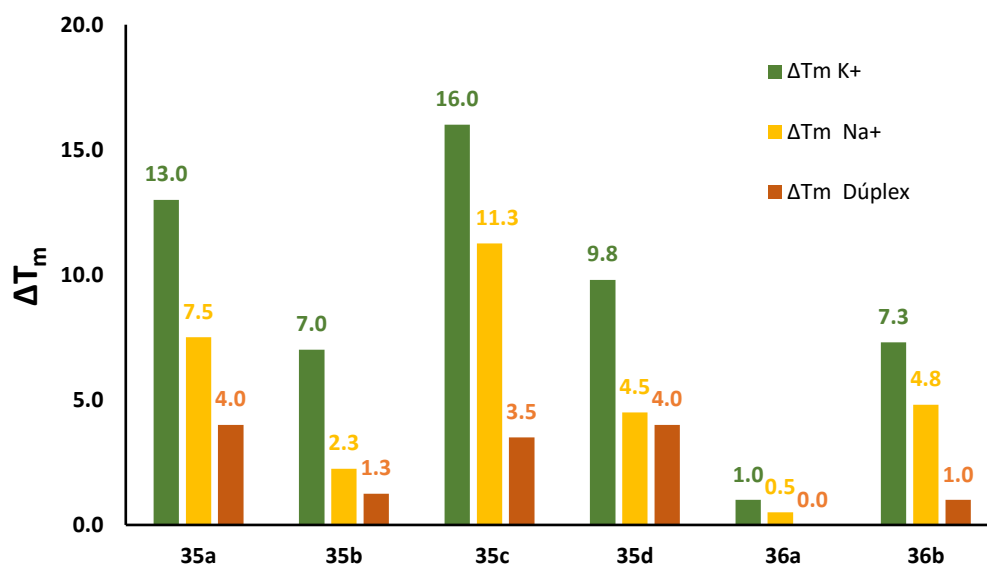
Los valores de  $\Delta T_m$  obtenidos para la conformación de ADN cuádruple en condiciones iónicas de  $\text{Na}^+$  son bajos, exceptuando el caso del compuesto **35c**, a 5  $\mu\text{M}$ , cuyo valor de  $\Delta T_m$  es 11.3  $^\circ\text{C}$ . Al igual que en la familia de compuestos analizados previamente, todos ellos parecen presentar selectividad de unión hacia la estructura secundaria del cuádruple-G en condiciones iónicas de  $\text{K}^+$ .

Por otra parte, en el caso del ADN dúplex, ninguno de los compuestos de esta familia presenta una capacidad estabilizadora relevante, a ninguna de las concentraciones empleadas. Por lo tanto, estos resultados sugieren la posibilidad de la existencia de una selectividad significativa de los compuestos de esta familia hacia la conformación del ADN cuádruple (especialmente en condiciones iónicas de  $\text{K}^+$ ). No



obstante, dicha selectividad deberá ser determinada mediante el ensayo competitivo de desnaturalización térmica por FRET.

En el diagrama de barras que se muestra a continuación (Figura 103) se muestran los valores de  $\Delta T_m$  a concentración de ligando igual a 5  $\mu\text{M}$ , para las tres conformaciones de ADN estudiadas.



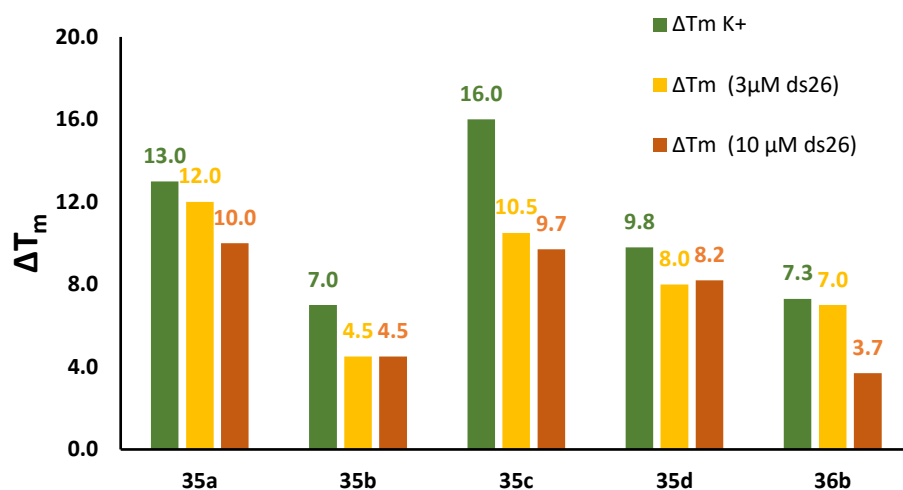
**Figura 103.** Diagrama de barras con los valores de  $\Delta T_m$  de los compuestos **35a-d** y **36a-b** para las tres conformaciones de ADN estudiadas, a concentración 5  $\mu\text{M}$  de ligando

- **Resultados obtenidos por determinación de la selectividad por FRET competitivo**

En el ensayo de desnaturalización térmica en presencia de la secuencia competidora de doble hebra ds26 no se incluyó el compuesto **36a**, debido al bajo valor de  $\Delta T_m$  de este derivado, que imposibilita la obtención de datos significativos de selectividad. Los valores de  $\Delta T_m$  observados, tanto en ausencia como en presencia de la secuencia ds26, a concentración 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , se recogen en la tabla 29 y en la figura 104.

	$\Delta T_m$ F21T (K <sup>+</sup> )	$\Delta T_m$ F21T (K <sup>+</sup> ) (3 $\mu$ M ds26)	$\Delta T_m$ F21T (K <sup>+</sup> ) (10 $\mu$ M ds26)
<b>35a</b>	13.0 $\pm$ 0.7	12.0 $\pm$ 1.3	10.0 $\pm$ 1.0
<b>35b</b>	7.0 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.0	4.5 $\pm$ 0.0
<b>35c</b>	16.0 $\pm$ 0.4	10.5 $\pm$ 0.0	9.7 $\pm$ 0.6
<b>35d</b>	9.8 $\pm$ 0.0	9.0 $\pm$ 0.5	8.2 $\pm$ 0.3
<b>36b</b>	7.0 $\pm$ 1.1	7.0 $\pm$ 2.6	3.7 $\pm$ 0.8

**Tabla 29.** Valores  $\Delta T_m$  para los ligandos **35a-d** y **36b** en ausencia y presencia de la secuencia competidora de ADN dúplex



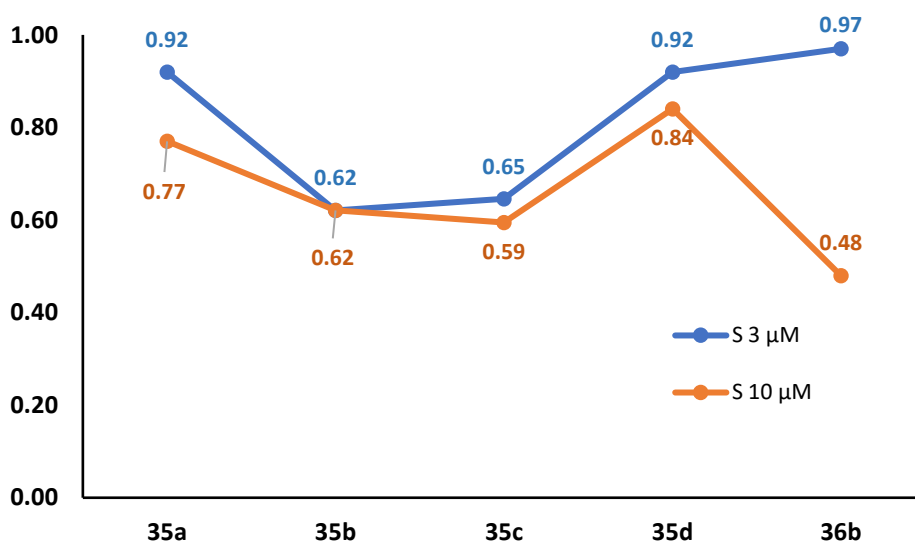
**Figura 104.** Diagrama de barras con los valores de  $\Delta T_m$  para los ligandos **35a-d** y **36b**, en ausencia y presencia de la secuencia competidora de ADN dúplex

A primera vista, la mayoría de los compuestos de esta familia presentan descensos muy bajos de los  $\Delta T_m$  en presencia de la secuencia de ADN dúplex competidora, lo que significa que estos derivados son compuestos muy selectivos. Los compuestos **35a** y **35d** destacan por ser los más selectivos de esta serie, ya que presentan descensos de los valores de  $\Delta T_m$  a concentración 10  $\mu$ M del competidor de solamente 3  $^{\circ}$ C y 1.5  $^{\circ}$ C, respectivamente.

Los datos de selectividad obtenidos en el ensayo se recogen a continuación en la tabla 30, junto con un gráfico que refleja la variación de la selectividad a lo largo de la serie (Figura 105).

	35a	35b	35c	35d	36b
S <sub>3 μM</sub>	0.92	0.62	0.65	0.92	0.97
S <sub>10 μM</sub>	0.77	0.62	0.59	0.84	0.48

**Tabla 30.** Datos de selectividad a concentraciones 3 μM y 10 μM de ADN competidor (S<sub>3 μM</sub> y S<sub>10 μM</sub>) para los compuestos **35a-d** y **36b**



**Figura 105.** Líneas de tendencia de selectividad para los compuestos **35a-d** y **36b**

El compuesto que presenta la mejor selectividad a las dos concentraciones de ADN dúplex competidor es **35d** (derivado dimetilamino), seguido de cerca por **35a** (derivado de piperidina). El compuesto **36b** (derivado de antraceno) también muestra selectividad significativa, pero únicamente a concentración 3 μM de ADN dúplex. Por otra parte, cabe destacar que los derivados **35b** y **35c**, a pesar de no presentar datos de selectividad tan elevados como los de los compuestos mencionados previamente, prácticamente no ven alterada su selectividad al incrementar la concentración de ADN

competidor de 3  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ . Por lo tanto, es previsible que, a concentraciones muy elevadas de competidor, como puede ocurrir en el entorno celular, estos derivados podrían mostrar una selectividad muy interesante.

Por último, indicar que la selectividad observada por los compuestos pertenecientes a esta familia, como se ha postulado con otros derivados similares de descritos en la bibliografía, podría deberse a la forma de media luna que poseen este tipo de ligandos. Tanto la disposición de los sustituyentes como su tamaño mejoran la interacción con el ADN cuádruple, desfavoreciendo la posible intercalación o interacción en los surcos con el ADN de doble hebra.

### 3.2.5 Estudio de los complejos mixtos de Pt(II)-1,10-fenantrolina-etilendiamina

La obtención de diferentes complejos metálicos de Pt(II) a partir de distintos derivados de 1,10-fenantrolina, junto con la evaluación de su capacidad para reconocer el ADN cuádruple-G, han sido asimismo objeto de estudio en esta tesis doctoral.

En este apartado se discuten los resultados obtenidos con los complejos de Pt(II) mixtos 1,10-fenantrolina-etilendiamina descritos en el apartado 3.1.5.1 (Figura 106). En este caso los ligandos de 1,10-fenantrolina de partida son derivados sin cadenas laterales, sustituidos en distintas posiciones, de procedencia comercial o bien obtenidos por funcionalización directa. Hasta la fecha, se dispone de los resultados de interacción obtenidos por la técnica de desnaturalización térmica de ADN por FRET y por FRET competitivo, así como de algún dato de actividad antitumoral *in vitro*.

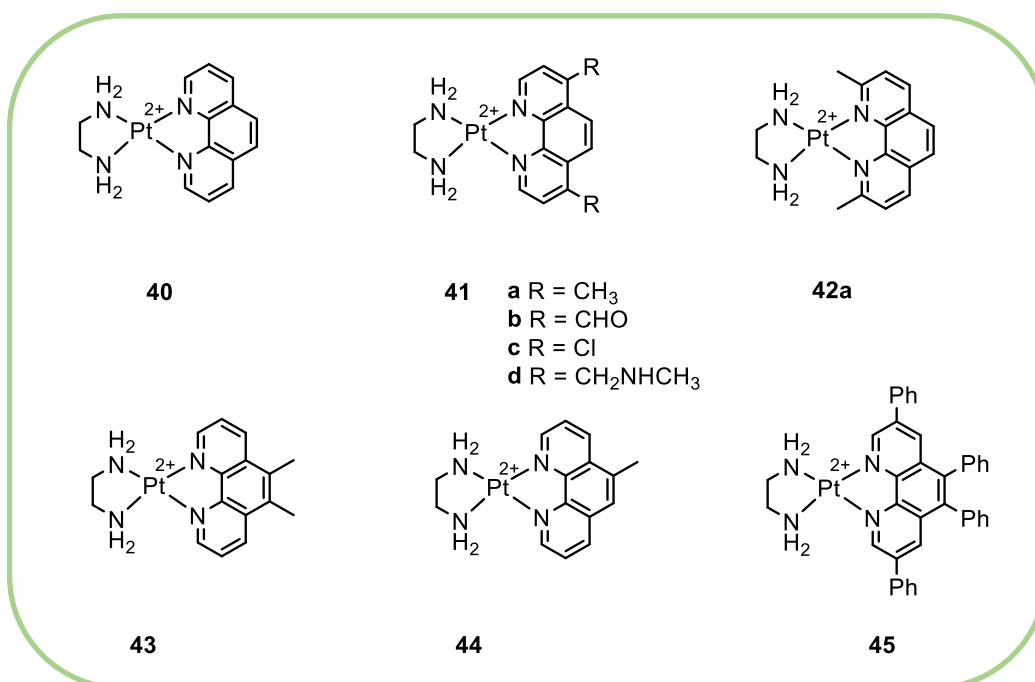


Figura 106. Familia de complejos mixtos Pt(II) 1,10-fenantrolina-etilendiamina

• **Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET**

Esta familia de complejos de Pt(II) está formada por nueve compuestos (Figura 106) en los que uno de los ligandos es un derivado de 1,10-fenantrolina sin sustituir, o bien mono-, di- o tetrasustituido en distintas posiciones (4 y 7 para **41a-d**; 2 y 9 para **42a**; 5 y 6 para **43**; 5 para **44** y 3,5,6 y 8 para **45**). El ensayo de desnaturalización térmica por FRET se llevó a cabo empleando un rango de concentraciones de complejo metálico 0-5  $\mu\text{M}$ . En la tabla 31 se recogen los valores de  $\Delta T_m$  obtenidos a las concentraciones 1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ , para ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , así como para ADN dúplex.

	$\Delta T_m$ F21T( $\text{K}^+$ )		$\Delta T_m$ F21T ( $\text{Na}^+$ )		$\Delta T_m$ F10T	
	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	1 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$
<b>40</b>	$-2.0 \pm 0.7$	$4.3 \pm 1.1$	$-1.5 \pm 0.7$	$-0.2 \pm 0.4$	$0.8 \pm 0.4$	$1.0 \pm 0.4$
<b>41a</b>	$3.8 \pm 0.4$	$6.8 \pm 0.4$	$0.0 \pm 0.0$	$1.5 \pm 2.1$	$1.8 \pm 0.4$	$5.3 \pm 0.4$
<b>41b</b>	$0.8 \pm 1.1$	$3.8 \pm 0.4$	$-0.5 \pm 1.4$	$0.5 \pm 1.4$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$
<b>41c</b>	$0.5 \pm 0.7$	$4.8 \pm 0.4$	$3.5 \pm 0.7$	$2.3 \pm 0.4$	$1.0 \pm 0.0$	$3.5 \pm 0.0$
<b>41d</b>	$0.5 \pm 0.0$	$4.3 \pm 0.4$	$-1.0 \pm 0.7$	$1.5 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$
<b>42a</b>	$1.0 \pm 0.0$	$4.0 \pm 0.0$	$1.0 \pm 1.4$	$2.3 \pm 0.4$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$
<b>43</b>	$2.8 \pm 0.4$	$8.8 \pm 0.4$	$5.3 \pm 1.1$	$4.8 \pm 0.4$	$2.3 \pm 0.4$	$5.8 \pm 0.4$
<b>44</b>	$0.8 \pm 0.4$	$4.3 \pm 1.1$	$0.0 \pm 0.7$	$2.0 \pm 0.7$	$1.0 \pm 0.0$	$3.3 \pm 0.4$
<b>45</b>	$5.8 \pm 0.4$	$20.8 \pm 1.1$	$-0.3 \pm 0.4$	$7.0 \pm 1.4$	$0.0 \pm 0.0$	$0.0 \pm 0.0$

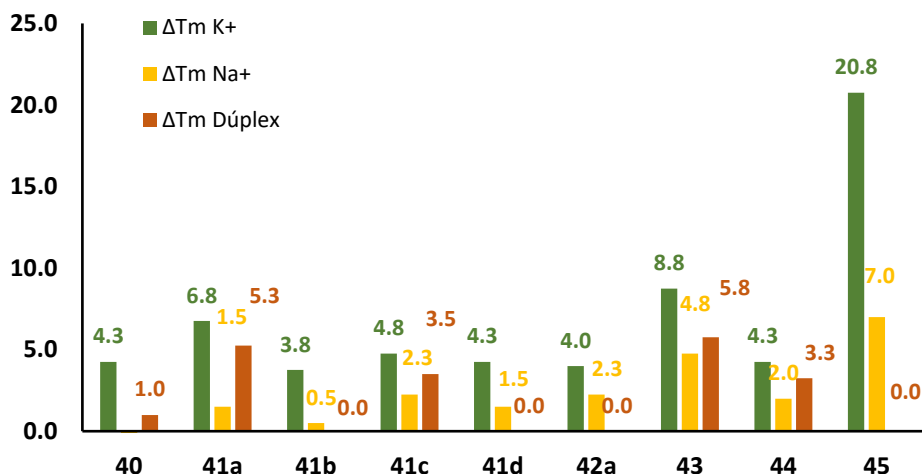
**Tabla 31.** Valores de  $\Delta T_m$  de los complejos **40**, **41a-d**, **42a**, **43**, **44** y **45** para ADN cuádruple-G (F21T) y ADN dúplex (F10T)

Los datos de estabilización del ADN cuádruple-G obtenidos para estos compuestos (valores de  $\Delta T_m$ ), en condiciones iónicas de potasio y de sodio son bajos, a excepción del compuesto **45**. Este compuesto presenta un excelente valor de  $\Delta T_m$  a 5  $\mu\text{M}$  (20.8 °C), una capacidad estabilizadora moderada para las condiciones iónicas de  $\text{Na}^+$  (7.0 °C) e, igualmente importante, no estabiliza en modo alguno la estructura del ADN dúplex en las condiciones experimentales empleadas.

Este último comportamiento en relación al ADN dúplex es característico de este tipo de complejos de Pt(II) mixtos, puesto que ninguno de los compuestos de esta familia

presenta una capacidad estabilizadora significativa hacia esta estructura secundaria en el rango de concentraciones empleado.

En la figura 107, se muestran gráficamente los valores de  $\Delta T_m$  a la concentración de complejo metálico igual a 5  $\mu\text{M}$ , para las tres conformaciones de ADN estudiadas.



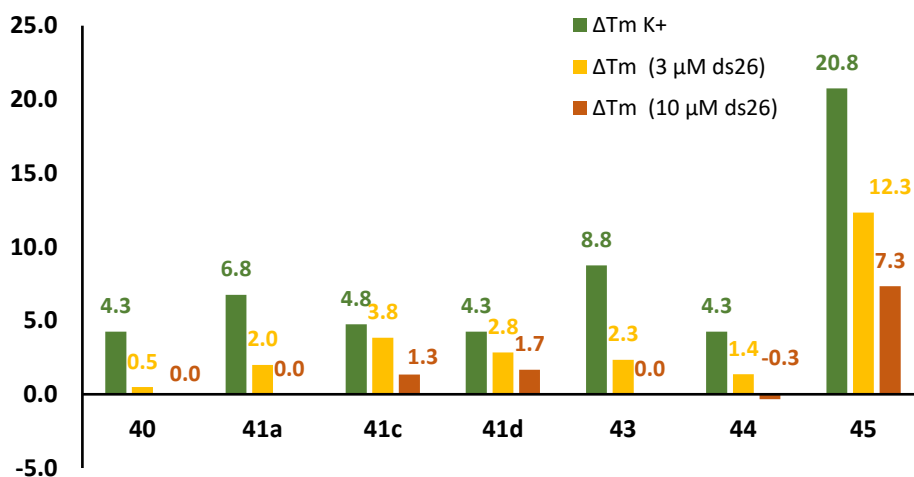
**Figura 107.** Diagrama de barras con los valores de  $\Delta T_m$  de los complejos **40**, **41a-d**, **42a**, **43**, **44** y **45** para las tres estructuras de ADN estudiadas, a concentración 5  $\mu\text{M}$  de compuesto

- **Resultados obtenidos por determinación de la selectividad por FRET competitivo**

En el ensayo de desnaturalización térmica en condiciones competitivas (en presencia de la secuencia competidora ds26) se excluyeron los compuestos **41b** y **42a**, por presentar los valores de  $\Delta T_m$  inferiores de la serie. Los valores de  $\Delta T_m$  observados, tanto en ausencia como en presencia de la secuencia ds26, a concentración 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , se recogen en la tabla 32 y en figura 108.

	$\Delta T_m$ F21T (K <sup>+</sup> )	$\Delta T_m$ F21T (3 $\mu$ M ds26)	$\Delta T_m$ F21T (10 $\mu$ M ds26)
<b>40</b>	4.3 $\pm$ 1.1	0.5 $\pm$ 1.0	-0.8 $\pm$ 0.6
<b>41a</b>	6.8 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.5	-1.0 $\pm$ 0.0
<b>41c</b>	4.8 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 0.6	1.3 $\pm$ 0.3
<b>41d</b>	4.3 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.8
<b>43</b>	8.8 $\pm$ 0.4	2.3 $\pm$ 0.6	0.0 $\pm$ 0.0
<b>44</b>	4.3 $\pm$ 1.1	1.4 $\pm$ 0.3	-0.3 $\pm$ 0.8
<b>45</b>	20.8 $\pm$ 1.1	12.3 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 1.6

**Tabla 32.** Valores de  $\Delta T_m$  para los complejos de Pt(II) mixtos en ausencia y en presencia de la secuencia competidora de ADN dúplex para los compuestos **40**, **41a-d**, **43**, **44** y **45**



**Figura 108.** Diagrama de barras con los valores de  $\Delta T_m$  para los complejos **40**, **41-a,c,d**, **43**, **44** y **45** en ausencia y en presencia de la secuencia competidora de ADN dúplex

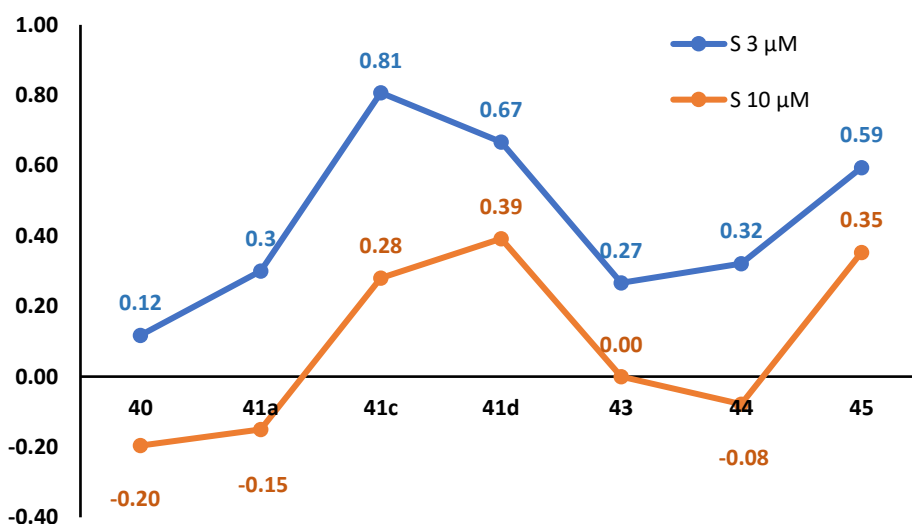
Al ser, en general, una familia de compuestos poco estabilizadores, los datos obtenidos para el ensayo competitivo tienen, relativamente, poca relevancia. El compuesto **45** es la excepción ya que al presentar un elevado valor de  $\Delta T_m$  (20.8 °C) destaca dentro de esta familia de compuestos. Como consecuencia de ello, los descensos de  $\Delta T_m$  causados por la adición de la secuencia de ADN competidora se ven menos afectados por el posible error experimental.



Los datos de selectividad obtenidos en este experimento se recogen en tabla 33 y en la figura 109, que muestra gráficamente la variación de selectividades para los compuestos de esta familia.

	40	41a	41c	41d	43	44	45
$S_{3\ \mu\text{M}}$	0.12	0.3	0.81	0.67	0.27	0.32	0.59
$S_{10\ \mu\text{M}}$	-0.20	-0.15	0.28	0.39	0.00	-0.08	0.35

**Tabla 33.** Datos de selectividad a concentraciones 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de ADN competidor ( $S_{3\ \mu\text{M}}$  y  $S_{10\ \mu\text{M}}$ ) para los compuestos **40**, **41a,c,d**, **43**, **44** y **45**



**Figura 109.** Líneas de tendencia de selectividad para los compuestos **40**, **41a,c,d**, **43**, **44** y **45**

Este experimento revela que el compuesto **45**, a pesar de estabilizar notablemente la estructura de ADN cuádruple-G, presenta una selectividad moderada a 3  $\mu\text{M}$ , que disminuye al incrementar la concentración de ADN dúplex hasta 10  $\mu\text{M}$ . Asimismo, también resulta interesante el hecho de que los compuestos **41c** y **41d** muestren una selectividad importante a concentración 3  $\mu\text{M}$  de ADN competidor.

En general, la baja selectividad que presentan los compuestos de esta serie podría atribuirse a que, en la mayoría de los casos, la superficie aromática es insuficiente para una óptima interacción de estos complejos metálicos con las tétradas externas del cuádruple que, sin embargo, sí permite la interacción con ADN de doble hebra. Otro factor que podría contribuir es la ausencia de cadenas laterales para establecer interacciones favorables en con los surcos y/o bucles del ADN cuádruple.

- **Resultados obtenidos por el ensayo de citotoxicidad MTT**

La evaluación de la actividad biológica antitumoral de esta familia de complejos se llevó a cabo, en primer lugar, mediante el análisis de su citotoxicidad en la línea celular PC3, determinando los valores de IC<sub>50</sub>. Posteriormente, para alguno de los compuestos de esta serie, se ha evaluado su actividad biológica en la línea celular MCF-7. Los resultados de actividad obtenidos hasta la fecha se recogen en la siguiente tabla.

	IC <sub>50</sub> (μM) PC3	IC <sub>50</sub> (μM) MCF-7
<b>40</b>	31.3 ± 2.9	N.D.
<b>41a</b>	1.6 ± 0.5	9.7 ± 0.8
<b>41b</b>	10.5 ± 0.8	N.D.
<b>41c</b>	20 ± 1	N.D.
<b>42a</b>	3.1 ± 0.8	N.D.
<b>43</b>	5.6 ± 1.6	2.7 ± 0.2
<b>44</b>	3.0 ± 0.3	N.D.
<b>45</b>	6.1 ± 0.5	2.1 ± 0.1

**Tabla 34.** Valores de IC<sub>50</sub> a 72 h para los compuestos **40**, **41a-d**, **42a**, **43**, **44** y **45**

Como se puede apreciar en la tabla 34, todos los compuestos analizados presentan una actividad antitumoral relevante en ambas líneas celulares. Estos complejos de Pt(II) son activos a concentración micromolar, con valores de IC<sub>50</sub> comprendidos, en la mayoría de los casos, entre 1 μM y 10 μM.

Los compuestos con mayor actividad en las dos líneas celulares son los derivados **43**, **44** y **45**, en los que el heterociclo de 1,10-fenantrolina se encuentra sustituido en las

posiciones 5, 5 y 6, o 3,5,6 y 8, con grupos metilo o anillos bencénicos. Esto sugiere que la sustitución con grupos hidrocarbonados en dichas posiciones del sistema aromático es favorable en términos de actividad. La sustitución en 4 y 7 también conduce a compuestos con actividad notable, como se muestra, especialmente, en el compuesto dimetilado **41a**.

Como se discutió en el apartado anterior, estos complejos no son buenos estabilizadores del cuádruple-G en las condiciones experimentales ensayadas y, sin embargo, son compuestos dotados de actividad antitumoral, al menos en *in vitro* en ensayos con células en cultivo. Este hecho no es inusual en el campo de investigación de ligandos de ADN cuádruple-G diseñados con fines terapéuticos, donde no siempre se observa una clara correlación entre estabilización de ADN cuádruple y actividad biológica. En cualquier caso, y aun admitiendo que la comparación entre las condiciones de los ensayos bioquímicos y el entorno celular es difícil y en ningún caso directa, una explicación admisible para los resultados obtenidos podría ser la existencia de mecanismos de acción de estos compuestos en las células cancerosas independientes a aquellos asociados a la estabilización del ADN cuádruple-G telomérico, como sucede en el caso de otros complejos de Pt(II) descritos en la bibliografía.

### **3.2.6 Estudio de los complejos de Pt(II) con derivados de 1,10-fenantrolina conteniendo cadenas laterales**

En este apartado se discuten los resultados de interacción con ADN de dos tipos de complejos de Pt(II). Por un lado, se estudia la familia de complejos de Pt(II) mixtos con etilendiamina y los ligandos de 1,10-fenantrolina sustituidos en las posiciones 4 y 7 descritos en el apartado **3.1.5.1** (figura 110). Por otra parte, se analizan los resultados de interacción obtenidos con los complejos de tipo 2:1 (ligando:metal) formados a partir de dichos ligandos (**49a**, **49c** y **49d**) que se encuentran descritos en el apartado **3.1.5.2**. Las técnicas utilizadas han sido el ensayo de desnaturalización térmica de ADN por FRET (para determinar la posible estabilización del ADN cuádruple por unión de estos complejos metálicos), desnaturalización térmica por FRET competitivo (para determinar la selectividad hacia el cuádruple-G) así como el ensayo MTT para determinar la actividad antitumoral *in vitro*.

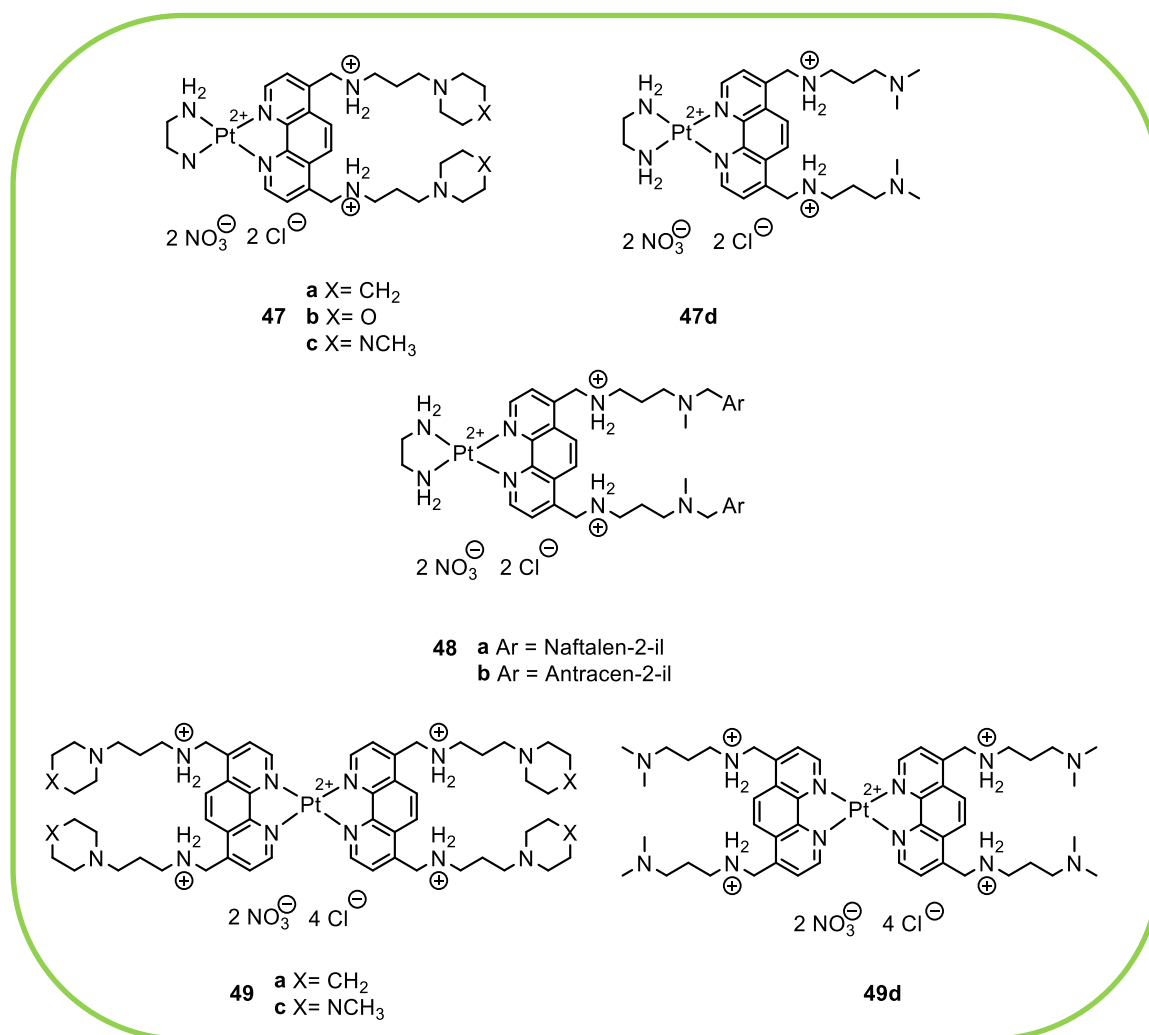


Figura 110. Complejos de Pt(II) mixtos 47a-d, 48a-b y de tipo (2:1) 49a,c,d

- **Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET**

El estudio de desnaturalización térmica por FRET se llevó a cabo empleando un rango de concentraciones de complejo de Pt(II) 0-5  $\mu\text{M}$ . En la tabla 35 se recogen los valores de  $\Delta T_m$  obtenidos para los compuestos seleccionados, a las concentraciones 1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ , para ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , así como para ADN dúplex.

	$\Delta T_m$ F21T (K <sup>+</sup> )		$\Delta T_m$ F21T (Na <sup>+</sup> )		$\Delta T_m$ F10T	
	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M
<b>47a</b>	12.3 $\pm$ 0.4	27.8 $\pm$ 1.1	1.5 $\pm$ 0.0	11.8 $\pm$ 1.1	3.5 $\pm$ 0.7	12.8 $\pm$ 0.4
<b>47b</b>	2.8 $\pm$ 0.4	13.0 $\pm$ 0.7	2.5 $\pm$ 0.4	10.0 $\pm$ 1.4	-0.3 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.0
<b>47c</b>	2.8 $\pm$ 0.4	14.8 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.7	0.0 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0
<b>47d</b>	8.0 $\pm$ 0.7	23.8 $\pm$ 1.1	0.8 $\pm$ 1.1	7.5 $\pm$ 2.1	1.3 $\pm$ 0.4	7.5 $\pm$ 0.0
<b>48a</b>	4.3 $\pm$ 0.4	14.5 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	10.5 $\pm$ 0.7	0.0 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.0
<b>48b</b>	5.3 $\pm$ 0.4	15.0 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 2.1	7.0 $\pm$ 0.0	-0.3 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.7
<b>49a</b>	0.5 $\pm$ 0.7	8.5 $\pm$ 0.7 <sup>(*)</sup>	2.3 $\pm$ 0.4	3.3 $\pm$ 1.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
<b>49c</b>	1.0 $\pm$ 1.4	12.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.4	4.5 $\pm$ 0.0
<b>49d</b>	4.3 $\pm$ 0.4	11.0 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.7	0.3 $\pm$ 0.4	5.8 $\pm$ 0.4

**Tabla 35.** Valores de  $\Delta T_m$  de los ligandos **47a-d**, **48a-b**, **49a,c,d** para ADN cuádruple-G (F21T) y ADN dúplex (F10T). <sup>(\*)</sup> Valor determinado a concentración 4  $\mu$ M de compuesto

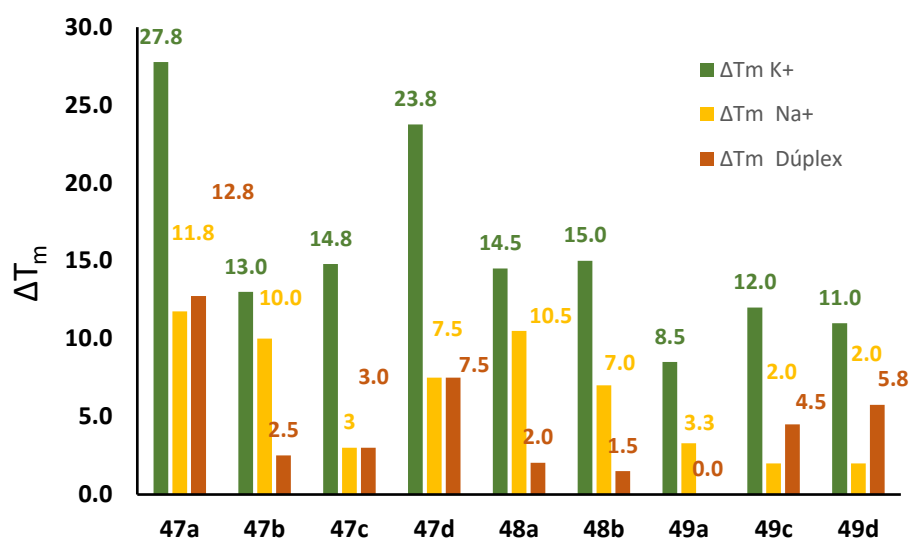
Los complejos mixtos de Pt(II) y etilendiamina descritos en este apartado presentan unos valores de  $\Delta T_m$  por encima de 10 °C, a la concentración de 5  $\mu$ M, en condiciones iónicas de K<sup>+</sup>. Destacan, especialmente, los compuestos **47a** y **47d** (derivados de piperidina y dimetilamino), con valores de  $\Delta T_m$  de 27.8 °C y 23.8 °C, respectivamente, a concentración 5  $\mu$ M y de 12.3 °C y 8.0 °C, para 1  $\mu$ M.

En condiciones iónicas de Na<sup>+</sup>, los compuestos **47a**, **47b** y **48a** presentan valores de  $\Delta T_m$  moderados, de aproximadamente 10 °C. Además, los derivados **47b** y **48a** dan lugar a valores de  $\Delta T_m$  similares para las dos conformaciones de cuádruple-G, lo que sugiere que son poco selectivos en su unión a las diferentes estructuras cuádruples. El resto de compuestos presentan grandes diferencias en los valores de  $\Delta T_m$  entre las dos estructuras de cuádruple siendo, en todos los casos, más estabilizadores de la estructura en condiciones iónicas de K<sup>+</sup>.

En lo que respecta a la unión con el ADN dúplex, el compuesto **47a**, además de ser el compuesto más estabilizador del cuádruple-G en condiciones iónicas de K<sup>+</sup>, también presenta un valor elevado de  $\Delta T_m$  para el ADN de doble cadena (12.8 °C). Esto podría ser indicativo de una baja selectividad de este compuesto hacia el ADN cuádruple. Por otra parte, cabe destacar que en el caso de los complejos como **47b-c**, **48a-b** y los derivados

**49a-d**, si bien no mostraban los mejores datos en cuanto a la estabilización del cuádruple, es previsible que puedan presentar selectividades interesantes. En todo caso, las selectividades se determinarán a continuación, con el ensayo de desnaturalización térmica por FRET competitivo.

En la figura 111, se muestran gráficamente los valores de  $\Delta T_m$  a la concentración de complejo metálico igual a 5  $\mu\text{M}$ , para las tres conformaciones de ADN estudiadas.



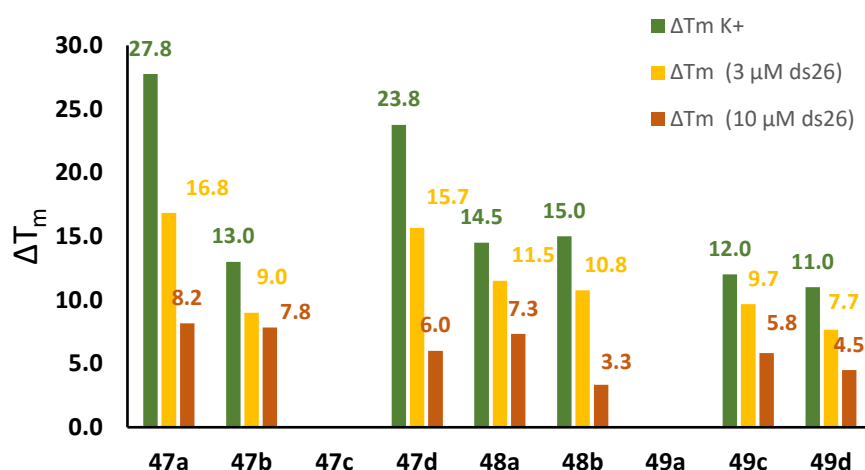
**Figura 111.** Diagrama de barras con los valores  $\Delta T_m$  de los complejos **47a-d**, **48a-b** y **49a,c,d** para las tres conformaciones de ADN estudiadas a concentración 5  $\mu\text{M}$  de compuesto

- **Resultados obtenidos por determinación de la selectividad por FRET competitivo**

El ensayo de desnaturalización térmica en presencia de ADN dúplex competidor (secuencia ds26) se realizó para la mayoría de los compuestos descritos en el epígrafe anterior. A continuación, en la tabla 36 y la figura 112, se muestran los resultados obtenidos en este ensayo.

	$\Delta T_m$ F21T (K <sup>+</sup> )	$\Delta T_m$ F21T (K <sup>+</sup> ) (3 $\mu$ M ds26)	$\Delta T_m$ F21T (K <sup>+</sup> ) (10 $\mu$ M ds26)
<b>47a</b>	27.8 $\pm$ 1.1	16.8 $\pm$ 0.6	8.2 $\pm$ 0.6
<b>47b</b>	13.0 $\pm$ 0.7	9.0 $\pm$ 1.0	7.8 $\pm$ 0.8
<b>47d</b>	23.8 $\pm$ 1.1	15.7 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 0.0
<b>48a</b>	14.5 $\pm$ 0.0	11.5 $\pm$ 1.0	7.3 $\pm$ 0.8
<b>48b</b>	15.0 $\pm$ 0.7	10.8 $\pm$ 1.1	3.3 $\pm$ 0.3
<b>49c</b>	12.0 $\pm$ 0.0	9.7 $\pm$ 1.5	5.8 $\pm$ 0.8
<b>49d</b>	11.0 $\pm$ 0.0	7.7 $\pm$ 0.3	4.5 $\pm$ 0.0

**Tabla 36.** Valores de  $\Delta T_m$  para los ligandos **47a,b,d**, **48a-b** y **49c-d** en ausencia y en presencia de la secuencia competidora de ADN dúplex



**Figura 112.** Diagrama de barras con los valores de  $\Delta T_m$  para los complejos **47a-d**, **48a-b** y **49c-d** en ausencia y en presencia de la secuencia competidora de ADN dúplex

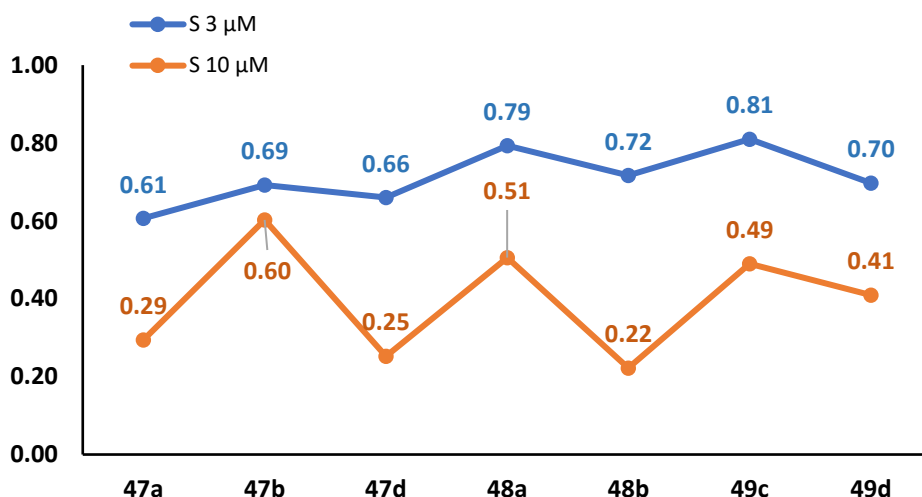
En estas condiciones, y a excepción del compuesto **47b**, se observó un descenso significativo de los valores de  $\Delta T_m$ . Los compuestos con mayor capacidad de estabilización del ADN cuádruple (**47a** y **47d**) son los que mayores descensos de los valores de  $\Delta T_m$  presentan en presencia de ADN dúplex a concentración de 10  $\mu$ M. Sin embargo, los compuestos **47b**, **48a**, **48b**, **49c** y **49d** (estabilizadores moderados de cuádruple-G) presentan descensos de los valores de  $\Delta T_m$  menos acusados que los

complejos mencionados anteriormente. Es decir, estos compuestos serán más selectivos que los anteriores.

A continuación, se recogen los datos de selectividad para esta familia de complejos (Tabla 37 y figura 113).

	47a	47b	47d	48a	48b	49c	49d
S <sub>3 μM</sub>	0.61	0.69	0.66	0.79	0.72	0.81	0.70
S <sub>10 μM</sub>	0.29	0.60	0.25	0.51	0.22	0.49	0.41

**Tabla 37.** Datos de selectividad a concentraciones 3 μM y 10 μM de ADN competidor (S<sub>3 μM</sub> y S<sub>10 μM</sub>) para los compuestos 47a,b,d, 48a-b, 49c-d



**Figura 113.** Líneas de tendencia de selectividad para los compuestos 47a,b,d, 48a-b y 49c-d

En la figura 113 se observa un fenómeno interesante en lo que a la selectividad se refiere. Al contrario de casos anteriores, en los que las líneas de tendencia de selectividad siguen un patrón similar para las dos concentraciones de la secuencia de ADN dúplex competidora, los compuestos de esta familia muestran un comportamiento distinto a lo largo de la serie, dependiente de la concentración del competidor. Así, a la concentración de 3 μM, todos los compuestos muestran una selectividad similar, de



moderada a elevada, destacando los compuestos **48a** y **49c**. Por otra parte, la tendencia observada a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  permite clasificar a los compuestos de esta familia en dos grupos: aquellos que mantienen una selectividad significativa (**47b**, **48a**, **49c** y **49d**) y aquellos que la ven reducida considerablemente (**47a**, **47d** y **48b**).

De especial interés resulta el compuesto **47b**, puesto que su selectividad disminuye solo ligeramente al incrementar la concentración de ADN dúplex de 3  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$  (de 0.69 a 0.60). Previamente, ya se había observado este fenómeno en el correspondiente derivado de morfolina para los ligandos de 1,10-fenantrolina disustituidos en las posiciones 2 y 9.

Por otra parte, si relacionamos el tipo de estructura del compuesto con la selectividad podemos observar que, con los datos disponibles hasta la fecha, los complejos tipo (2:1) podrían ser más selectivos que los complejos mixtos análogos. Por ejemplo, en la pareja de complejos **47d** y **49d**, ambos con el mismo derivado de 1,10-fenantrolina como ligando, se obtienen selectividades similares a bajas concentraciones de competidor (0.66 y 0.70, respectivamente). Sin embargo, cuando se aumenta la concentración de ADN dúplex en el ensayo, la selectividad del compuesto **47d** es la mitad que en el caso del complejo de tipo (2:1) **49d**. Estas conclusiones preliminares tendrán que ser confirmadas con el resto de complejos de esta familia, así como con otros complejos de Pt(II) sintetizados en este trabajo.

- **Resultados obtenidos por el ensayo de citotoxicidad MTT**

Por último, se ha estudiado la citotoxicidad de los distintos complejos metálicos empleando el ensayo MTT, para determinar los valores de  $\text{IC}_{50}$  en la línea celular PC3 y, posteriormente, para algunos casos, en la línea celular MCF-7 y/o la línea celular HT-29. Los resultados de actividad obtenidos frente a las distintas líneas tumorales se recogen en la siguiente tabla.

	IC <sub>50</sub> (μM) PC3	IC <sub>50</sub> (μM) MCF-7	IC <sub>50</sub> (μM) HT-29
<b>47a</b>	1.6 ± 0.5	3.6 ± 0.4	12.0 ± 0.7
<b>47b</b>	3.2 ± 0.3	N.D.	N.D.
<b>47d</b>	1.7 ± 0.4	7.7 ± 1.23	N.D.
<b>48a</b>	4.8 ± 0.3	N.D.	N.D.
<b>48b</b>	3.8 ± 0.7	4.9 ± 0.5	N.D.
<b>49c</b>	5.1 ± 0.8	6.3 ± 0.7	N.D.
<b>49d</b>	32 ± 7	9.2 ± 0.5	12.1 ± 0.4

**Tabla 38.** Valores de IC<sub>50</sub> para los complejos **47a,b,d**, **48a-b** y **49c-d** en distintas líneas celulares.

Los compuestos estudiados muestran, en general, una buena actividad antitumoral *in vitro* en las distintas líneas celulares estudiadas (Tabla 38). Los valores de IC<sub>50</sub>, en la mayoría de los casos, son iguales o inferiores a 5 μM, exceptuando el caso del complejo **49d**, que presenta valores de IC<sub>50</sub> superiores.

Como se ha discutido en el apartado anterior estos complejos son buenos estabilizadores del cuádruple-G. Por lo tanto, y aunque que sea complicado de comprobar, los resultados obtenidos serían coherentes con la hipótesis de que, entre los posibles mecanismos de acción de estos compuestos frente a las células cancerosas, podría encontrarse la estabilización del ADN cuádruple-G telomérico.

### **3.2.7 Estudio de los complejos de Pt(II) con estequiometría 2:1 (ligando:metal) obtenidos a partir de derivados comerciales de 1,10-fenantrolina**

En este apartado se discuten, por último, los resultados de interacción obtenidos con los complejos de Pt(II) de tipo 2:1 (ligando:metal) obtenidos a partir de derivados comerciales de 1,10-fenantrolina o bien obtenidos por funcionalización directa (Figura 114). Como se mencionó con anterioridad, los objetivos de la preparación de esta familia han sido el comprobar la aplicabilidad de las condiciones sintéticas optimizadas previamente para conseguir acceso sencillo a complejos de Pt(II) que incluyan dos sistemas de 1,10-fenantrolina y el establecer, en la medida de los posible, relaciones estructura-actividad.

Para el estudio preliminar de interacción de estos complejos de Pt(II) con ADN se ha empleado la técnica de desnaturalización térmica de ADN por FRET, tanto en condiciones no competitivas como competitivas. Asimismo, se ha iniciado un estudio de su actividad antitumoral, empleando el ensayo MTT y distintas líneas celulares tumorales.

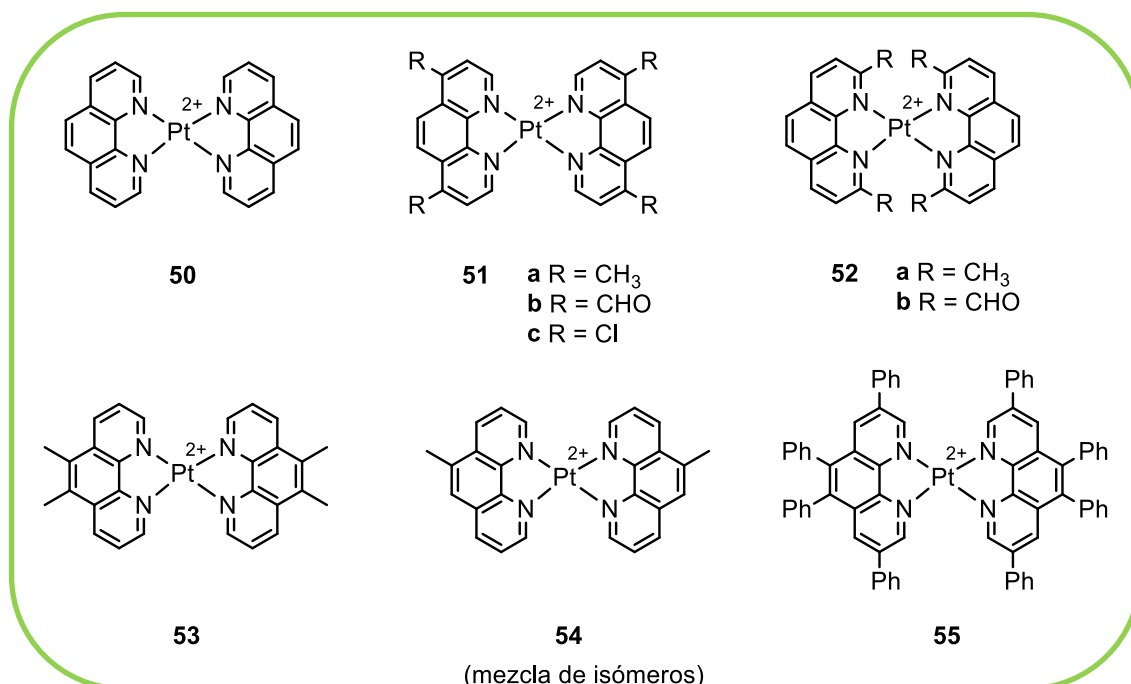


Figura 114. Complejos de Pt(II) tipo 2:1 (ligando:metal)

- **Resultados obtenidos por desnaturalización térmica por FRET**

Esta familia de complejos de Pt(II) está compuesta por nueve derivados que contienen dos anillos de 1,10-fenantrolina sin sustituir, o bien mono-, di- o tetra-sustituidos en diversas posiciones (4 y 7 para **51a-d**; 2 y 9 para **52**; 5 y 6 para **53**; 5 para **54** y 3,5,6 y 8 para **55**). El experimento de desnaturalización térmica por FRET se llevó a cabo empleando un rango de concentraciones de complejo metálico 0-5  $\mu\text{M}$ . En la tabla 39 se recogen los valores de  $\Delta T_m$  obtenidos a las concentraciones 1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ , para ADN cuádruple-G en condiciones iónicas de  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , así como para ADN dúplex.

	$\Delta T_m$ F21T(K <sup>+</sup> )		$\Delta T_m$ F21T(Na <sup>+</sup> )		$\Delta T_m$ F10T	
	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M
<b>50</b>	0.5 $\pm$ 0.7	7.0 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.7	7.0 $\pm$ 0.7	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
<b>51a</b>	1.0 $\pm$ 1.4	17.0 $\pm$ 2.1	2.8 $\pm$ 0.4	13.0 $\pm$ 1.4	0.3 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0
<b>51b</b>	1.0 $\pm$ 0.0	10.5 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 0.0	4.3 $\pm$ 1.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.4
<b>51c</b>	0.5 $\pm$ 0.7	4.8 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 0.7	2.3 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.7	4.8 $\pm$ 0.4
<b>52a</b>	1.3 $\pm$ 1.1	9.8 $\pm$ 1.1	3.5 $\pm$ 0.7	12.5 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
<b>52b</b>	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	2.8 $\pm$ 0.4	5.0 $\pm$ 2.8	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
<b>53</b>	3.8 $\pm$ 1.1	13.3 $\pm$ 1.1	7.3 $\pm$ 1.1	7.5 $\pm$ 0.7	0.3 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.0
<b>54</b>	0.3 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 0.7	0.3 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.0
<b>55</b>	0.5 $\pm$ 0.0	3.3 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0

**Tabla 39.** Valores de  $\Delta T_m$  para los ligandos **50**, **51a-c**, **52a-b**, **53**, **54** y **55** para ADN cúadruple-G (F21T) y ADN dúplex (F10T)

En esta familia de complejos de Pt(II) destacan cuatro de ellos con valores de  $\Delta T_m$  mayores o iguales a 10 °C. Estos compuestos son: **51a**, **51b**, **52a** y **53**.

Los derivados con mejores valores de  $\Delta T_m$  son **51a** y **53**, ambos conteniendo dos grupos metilo como sustituyentes en el sistema aromático, pero en distintas posiciones relativas (4 y 7 para **51a** y 5 y 6 para **53**). Por otra parte, el compuesto **51b**, también sustituido en las posiciones relativas 4 y 7, pero con grupos aldehído, presenta un valor significativo de  $\Delta T_m$  de 10.5 °C. Por último, también es relevante el grado de estabilización que produce **52a**, un compuesto que contiene la 1,10-fenatrolina dimetilada, aunque en este caso en las posiciones 2 y 9.

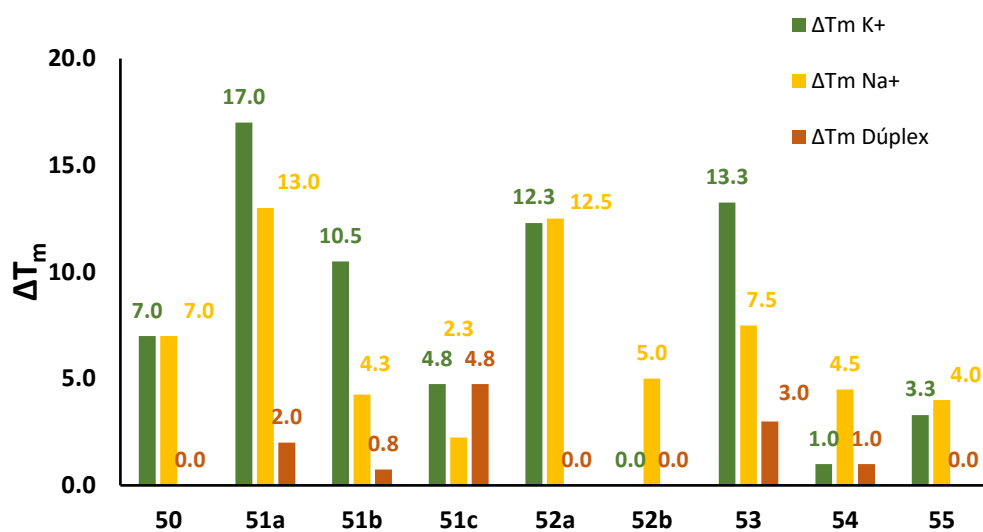
Estos resultados parecen sugerir que la dimetilación del anillo de 1,10-fenatrolina en distintas posiciones, especialmente para la sustitución 4 y 7, puede resultar beneficiosa para conseguir la estabilización del ADN cúadruple por este tipo de complejos metálicos. La naturaleza del sustituyente ejerce un importante efecto ya que, si observamos los datos obtenidos para grupos de derivados sustituidos en la misma posición (como **51a-c** o **52a-b**), se obtienen variaciones considerables en el valor de  $\Delta T_m$  en función del tipo de sustituyente presente en el anillo.

En cuanto a los resultados obtenidos para la conformación de ADN cuádruple en  $\text{Na}^+$ , los valores de  $\Delta T_m$  son moderados para la mayoría de los compuestos, pero destacando los complejos **51a** y **52a**, con valores de  $\Delta T_m$  de 13.0 °C y 12.5 °C, respectivamente, a la concentración 5  $\mu\text{M}$ .

En general, podemos observar tres tendencias en esta familia de compuestos con respecto a la selectividad aparente hacia las dos conformaciones del cuádruple-G estudiadas. Los compuestos **51a**, **51b**, **51c** y **53** son compuestos que parecen mostrar preferencia por la conformación en  $\text{K}^+$ . En el caso de los compuestos **50**, **52a** y **55**, los valores de  $\Delta T_m$  son iguales o similares para ambas conformaciones, lo que significa que estos complejos no presentan selectividad hacia una conformación concreta de cuádruple-G. Y, por último, se encontrarían los compuestos **52b** y **54**, que presentan selectividad aparente hacia la conformación de cuádruple en  $\text{Na}^+$ . Aunque los valores de estabilización obtenidos en estas últimas condiciones son bajos ( $\approx 5$  °C), es importante resaltar esta circunstancia, ya que se ha encontrado habitualmente que los ligandos estabilizadores del cuádruple-G, tanto los obtenidos en esta tesis doctoral como muchos de los recogidos en la bibliografía, estabilizan en mayor medida la conformación de ADN cuádruple en potasio.

En el caso del ADN dúplex, se han obtenido valores de  $\Delta T_m$  muy bajos o nulos, lo que indica que este tipo de compuestos no producen una estabilización significativa de dicha estructura. Esto era previsible, puesto que el tamaño de estos complejos es demasiado grande para intercalarse entre los pares de bases del ADN de doble cadena, si bien no es descartable una posible unión en los surcos del mismo.

En la figura 115, se recogen los valores de  $\Delta T_m$  obtenidos a la concentración 5  $\mu\text{M}$  de complejo metálico, para las tres conformaciones de ADN estudiadas.



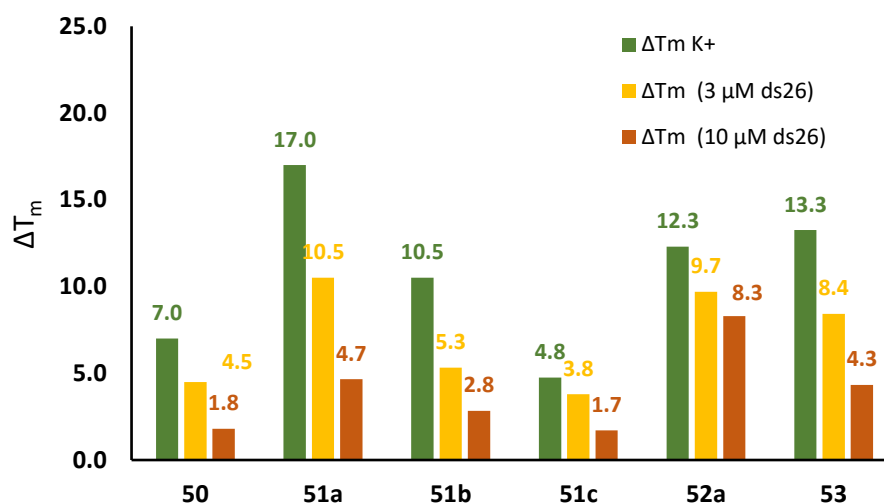
**Figura 115.** Diagrama de barras con los valores de  $\Delta T_m$  de los compuestos **50**, **51a-c**, **52a-b**, **53**, **54** y **55** para las tres conformaciones de ADN estudiadas, a concentración 5  $\mu$ M de compuesto

- **Resultados obtenidos por determinación de la selectividad por FRET competitivo**

Para determinar la selectividad de los estos complejos de Pt(II), se ha utilizado el ensayo de desnaturalización térmica, en presencia de la secuencia de ADN dúplex competidora ds26. En este caso, no se incluyeron en el ensayo los compuestos **52b**, **54** y **55** ya que al presentar valores de  $\Delta T_m$  muy bajos o nulos, en condiciones iónicas de potasio, no sería posible extraer datos significativos de selectividad.

	$\Delta T_m$ F21T (K <sup>+</sup> )	$\Delta T_m$ F21T (K <sup>+</sup> ) (3 $\mu$ M ds26)	$\Delta T_m$ F21T (K <sup>+</sup> ) (10 $\mu$ M ds26)
<b>50</b>	7.0 $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.3
<b>51a</b>	17.0 $\pm$ 2.1	10.5 $\pm$ 0.0	4.7 $\pm$ 0.3
<b>51b</b>	10.5 $\pm$ 0.7	5.3 $\pm$ 0.3	2.8 $\pm$ 0.3
<b>51c</b>	4.8 $\pm$ 0.4	3.8 $\pm$ 3.1	1.7 $\pm$ 0.8
<b>52a</b>	12.3 $\pm$ 1.1	9.7 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 2.1
<b>53</b>	13.3 $\pm$ 1.1	8.4 $\pm$ 1.7	4.3 $\pm$ 1.4

**Tabla 40.** Valores de  $\Delta T_m$  para los ligandos **50**, **51a-c**, **52a** y **53** en ausencia y en presencia de la secuencia competidora de ADN dúplex



**Figura 116.** Diagrama de barras con los valores de  $\Delta T_m$  para los ligandos **50**, **51a-c**, **52a** y **53** en ausencia y en presencia de la secuencia competidora de ADN dúplex

Tal y como se puede observar en la tabla 40 y figura 116, la mayoría de los compuestos de esta familia presentan descensos significativos de los valores de  $\Delta T_m$  en presencia de la secuencia competidora de ADN dúplex a concentración 10  $\mu$ M. Este hecho indica que son compuestos relativamente poco selectivos a grandes concentraciones de ADN de doble hélice. La excepción en esta familia es el compuesto

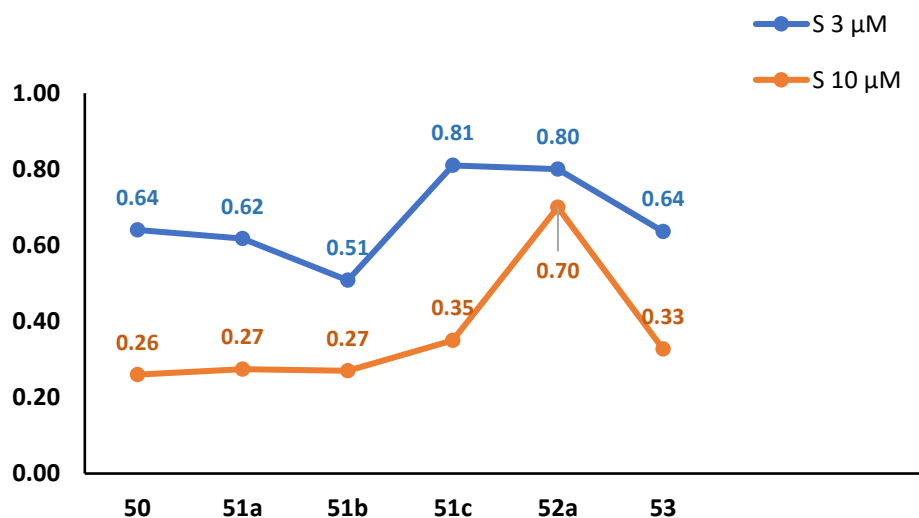
**52a**, que parece tener buena selectividad, ya que a concentración 10  $\mu\text{M}$  del competidor solo se observa un descenso del valor del  $\Delta T_m$  de 4°C.

También resulta interesante el compuesto **51c** que, a pesar de no ser un compuesto muy estabilizador, muestra buena selectividad en presencia de la secuencia competidora a concentración 3  $\mu\text{M}$ , tal y como se discutió en el apartado anterior.

Los valores de selectividad determinados en este ensayo se recogen en la tabla 41. En la figura 117 se muestra, además, la tendencia que siguen los valores de selectividad a lo largo de la serie.

	50	51a	51b	51c	52a	53
$S_{3 \mu\text{M}}$	0.64	0.62	0.51	0.81	0.80	0.64
$S_{10 \mu\text{M}}$	0.26	0.27	0.27	0.35	0.70	0.33

**Tabla 41.** Datos de selectividad a concentraciones 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de ADN competidor ( $S_{3 \mu\text{M}}$  y  $S_{10 \mu\text{M}}$ ) para los compuestos **50**, **51a-c**, **52a** y **53**



**Figura 117.** Líneas de tendencia de selectividad para los compuestos **50**, **51a-c**, **52a** y **53**



Como se puede observar en la figura 117, y a pesar de los valores de  $\Delta T_m$  para obtenidos previamente para ADN dúplex, estos compuestos, en general, muestran selectividades significativas únicamente en presencia de la secuencia competidora a concentración 3  $\mu\text{M}$ . Cuando la concentración de competidor se incrementa hasta 10  $\mu\text{M}$ , las selectividades son moderadas ( $S < 0.4$ ), a excepción del complejo **52a**.

Una posible explicación para justificar la buena selectividad del complejo **52a** hacia el ADN cuádruple, incluso en presencia de un gran exceso de ADN, podría ser la geometría particular de este complejo. Se prevé que dicha geometría se desvíe de la planaridad, como consecuencia del impedimento estérico que producen los metilos en las posiciones 2 y 9. En estas condiciones, aunque no se produzca la máxima interacción de apilamiento entre el complejo metálico y las bases externas del ADN cuádruple, todavía existe la posibilidad de reconocimiento efectivo (canal interno, bucles o los surcos) entre ambos mientras que en el caso del ADN de doble hebra, la interacción por intercalación se ve dificultada, y sólo sería posible una interacción poco estabilizante en los surcos o de tipo electrostático.

- **Resultados obtenidos por el ensayo de citotoxicidad MTT**

Para el estudio de la citotoxicidad preliminar *in vitro* se seleccionaron los compuestos **50**, **51a**, **53**, **54** y **55**, como ejemplos representativos de los diferentes tipos de sustitución en el anillo de 1,10-fenantrolina. Estos estudios deberán completarse con la incorporación del resto de complejos de Pt(II) de esta familia, en especial del compuesto **52a**, el más selectivo de la serie.

	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) PC3	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) HT-29	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ) MCF-7
<b>50</b>	6.6 $\pm$ 1.2	N.D.	33 $\pm$ 14
<b>51a</b>	2.3 $\pm$ 0.5	0.15 $\pm$ 0.03	4.8 $\pm$ 1.5
<b>53</b>	0.5 $\pm$ 0.1	N.D.	2.4 $\pm$ 0.2
<b>54</b>	3.0 $\pm$ 0.3	N.D.	N.D.
<b>55</b>	1.8 $\pm$ 0.3	15.9 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2

**Tabla 42.** Valores de IC<sub>50</sub> a 72 h para tres líneas tumorales para los compuestos **50**, **51a**, **53**, **54** y **55**

Los datos que se recogen en la tabla 42 muestran que los complejos de Pt(II) estudiados en esta familia presentan muy buena actividad antitumoral, con valores inferiores a 5  $\mu\text{M}$  en la mayoría de los casos estudiados. El complejo que presenta una menor actividad es el derivado que contiene los anillos de fenantrolina sin sustituir (**50**). Por otra parte, cabe destacar que, por primera vez, se han obtenido valores de  $\text{IC}_{50}$  en el rango submicromolar (entre 150-500 nM), en el caso de los compuestos **51a** y **53**.

Los compuestos **51a** y **53** tienen como sustituyentes en el anillo de fenantrolina dos grupos metilo, en las posiciones 4,7 y 5,6, respectivamente, lo que podría indicar la importancia de este sustituyente como efecto determinante en la actividad biológica del complejo, hecho que está en concordancia con los resultados obtenidos previamente para los complejos mixtos de 1,10-fenantrolina y etilendiamina análogos.

### **3.2.8. Estudio comparativo de los diferentes compuestos analizados en el trabajo**

En este último apartado de la discusión de resultados de interacción se va a realizar un análisis comparativo de aquellas familias de compuestos que presentan aspectos estructurales en común. El objetivo será comparar los compuestos de las distintas familias y ordenarlos en función de su capacidad de actuar como ligandos de ADN cuádruple. Este análisis se realizará, fundamentalmente, a partir de los datos de estabilización obtenidos (valores de  $\Delta T_m$ ) para el ADN cuádruple en condiciones iónicas de potasio, la más relevante desde un punto de vista fisiológico, y a concentración 5  $\mu\text{M}$  del ligando objeto de estudio.

- **Estudio comparativo de los complejos de Pt(II) mixtos y tipo (2:1) con ligandos de 1,10-fenantrolina comerciales**

El primer análisis se va a realizar para los complejos de Pt(II) mixtos (ligando-etilendiamina) y los complejos de Pt(II) de tipo (2:1) (ligando:metal) que contienen como ligandos derivados de 1,10-fenantrolina comerciales. A continuación, se recogen los valores de  $\Delta T_m$  (Tabla 43), así como un diagrama de barras comparativo (Figura 118).

	Complejos mixtos	Complejos tipo 2:1
phen	-2.0	7.0
4,7-dmphen	3.8	17.0
4,7-dCHOphen	0.8	10.5
4,7-DCF	0.5	4.8
2,9-dmphen	1.0	12.3
5,6-dmphen	2.8	13.3
5-mphen	0.8	1.0
3,5,6,8-tmphen	20.8	3.3

Tabla 43. Valores de  $\Delta T_m$  para ADN cuádruple (F21T en K<sup>+</sup>) en presencia de distintos complejos de Pt(II)

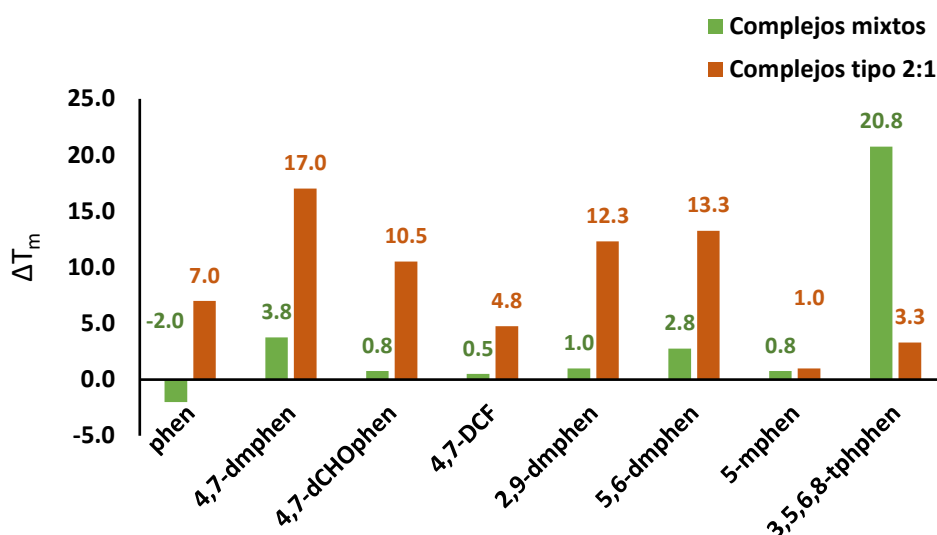


Figura 118. Diagrama de barras con los valores de  $\Delta T_m$  para ADN cuádruple (F21T en K<sup>+</sup>) en presencia de distintos complejos de Pt(II)

En todos los casos, a excepción de uno, los complejos de tipo (2:1) son mejores estabilizadores que los complejos mixtos análogos, con diferencias muy significativas en los valores de  $\Delta T_m$ . Al contener dos unidades del sistema de 1,10-fenantrolina, la superficie aromática es mayor, por lo que se incrementan las interacciones  $\pi$  con los sistemas aromáticos de las guaninas que forman la tetrada del ADN cuádruple.

Los complejos de Pt(II) que contienen como ligando la 3,5,6,8-tetrafenil-1,10-fenantrolina ejercen efectos estabilizadores muy diferentes en el cuádruple-G (20.8 °C y 3.3 °C). En este caso, además, se observa un comportamiento inverso al resto de compuestos de la serie, ya que el complejo mixto resulta más estabilizador que el complejo de estequiometría 2:1 (ligando:metal). Esto podría deberse al gran volumen de los cuatro fenilos presentes en la 1,10-fenantrolina como sustituyentes, afectando especialmente al complejo de tipo 2:1. El libre giro del enlace C-C entre los grupos fenilo y la fenantrolina, permite situar a los grupos fenilos de manera que se minimice el impedimento estérico entre los mismos, con lo cual no se consigue una planaridad de la estructura global, viéndose así afectada la estabilización del cuádruple-G por interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$ . Sin embargo, ha de existir algún factor adicional que explique el comportamiento distintivo de este compuesto, ya que es el complejo mixto con el valor de  $\Delta T_m$  más elevado de su serie, y muy superior a los valores obtenidos para los otros casos.

- **Estudio comparativo de los diferentes compuestos formados por derivados de la 1,10-fenantrolina que contienen cadenas laterales polinitrogenadas**

El siguiente análisis comparativo se va a realizar para aquellos compuestos derivados de 1,10-fenantrolina que contienen cadenas laterales polinitrogenadas enlazadas a heterociclos alifáticos o a sistemas aromáticos, así como los correspondientes complejos de Pt(II). Para ello, los compuestos se agruparán en función del resto que incorporan en su cadena lateral.

Las familias de compuestos objeto del análisis son: derivados dicuaternizados sustituidos en las posiciones 4 y 7, derivados disustituidos en las posiciones 4 y 7, derivados disustituidos en las posiciones 2 y 9, complejos de Pt(II) mixtos (etilendiamina-derivados disustituidos en 4 y 7) y complejos de Pt(II) de tipo 2:1 (derivados disustituidos en 4 y 7).

A continuación, se presentan los valores de  $\Delta T_m$  obtenidos (Tabla 44), así como un diagrama de barras comparativo (Figura 119).

	Dicuaternizados 4,7	Ligandos 4,7	Ligandos 2,9	Complejos mixtos 4,7	Complejos (2:1) 4,7
Piperidina	8.3	24.8	13.0	27.8	8.5
Morfolina	2.5	7.3	7.0	13.0	N.D.
N-metil Piperacina	10	17.0	16.0	14.8	12
N(Me) <sub>2</sub>	5	17.0	9.8	23.8	11
Naftaleno	7.5	18.0	1.0	14.5	N.D.
Antraceno	18.3	11.5	7.0	15.0	N.D.

Tabla 44. Valores de  $\Delta T_m$  para ADN cúadruple (F21T en  $K^+$ ) en presencia de distintos tipos de compuestos

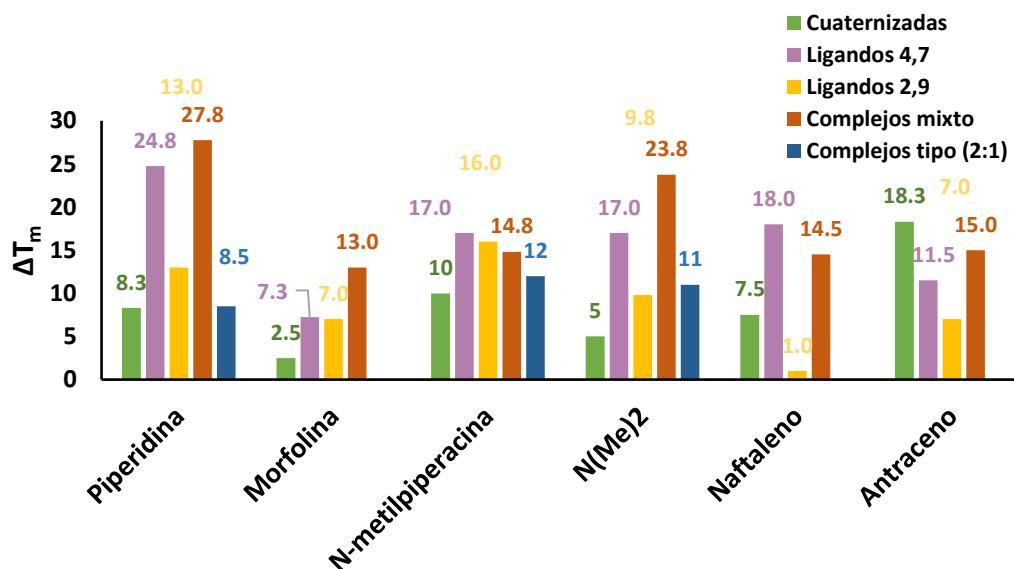


Figura 119. Diagrama de barras con los valores de  $\Delta T_m$  para ADN cúadruple (F21T en  $K^+$ ) en presencia de distintos tipos de compuestos a concentración  $5 \mu M$

Evaluando la capacidad estabilizadora de cada tipo de compuestos, los derivados dicuaternizados son los compuestos que presentan los valores de  $\Delta T_m$  más modestos, exceptuando el caso del derivado de antraceno, cuyo valor de  $\Delta T_m$  es muy superior al del resto de la serie.

Por otra parte, los ligandos sustituidos en las posiciones 4 y 7 son los que mejor estabilizan el cuádruple-G, destacando el derivado de piperidina. En el caso de los ligandos sustituidos en las posiciones 2 y 9, los valores de  $\Delta T_m$  corresponden a ligandos estabilizadores moderados y, como ya se ha explicado previamente, son la serie de ligandos más selectivos.

En cuanto a los complejos de Pt(II) mixtos se refiere, estos compuestos tienen capacidades estabilizadoras análogas a los correspondientes ligandos de partida disustituidos en las posiciones 4 y 7. La formación del complejo, en general, mantiene o aumenta ligeramente el efecto estabilizador. El aumento más significativo observado es para el derivado dimetilamino, que produce modificación del valor de  $\Delta T_m = 17\text{ °C}$  a  $\Delta T_m = 24\text{ °C}$ . Los derivados de morfolina en todas las series de compuestos estudiados presentan bajos valores de  $\Delta T_m$ . Sin embargo, en el caso del complejo mixto, el valor de  $\Delta T_m$  incrementa considerablemente ( $7\text{ °C}$ ) lo que pone de manifiesto la importancia de la incorporación de un catión metálico en la estructura para la estabilización del ADN cuádruple.

Por último, para los complejos tipo (2:1) estudiados, y con los datos disponibles hasta la fecha, observamos que los valores de  $\Delta T_m$  disminuyen significativamente para los derivados de piperidina y dimetilamino, y sólo ligeramente para el derivado de *N*-metilpiperacina. Aunque lo esperado habría sido un incremento con respecto a los correspondientes ligandos de los valores de  $\Delta T_m$  al aumentar la superficie aromática, experimentalmente no se ha podido observar una relación directa entre el tamaño de la superficie aromática y el grado de estabilización del cuádruple-G.

Por otra parte, y en cuanto al tipo de cadena lateral enlazada al sistema de 1,10-fenantrolina se refiere, podemos clasificar los sistemas en tres grupos: grandes estabilizadores (el heterociclo de piperidina seguido del derivado dimetilamino), estabilizadores moderados (*N*-metilpiperacina y los derivados aromáticos, estos últimos buenos estabilizadores en los productos dicuaternizados) y estabilizadores débiles (morfolina). El sistema de *N*-metilpiperacina es interesante porque los compuestos que contienen este heterociclo alifático muestran valores de estabilización significativos, y muy similares, independientemente del tipo de sus estructuras y del patrón de sustitución sobre la 1,10-fenantrolina.

Por último, cabe destacar que la mayoría de los compuestos estudiados han demostrado, en ensayos preliminares *in vitro* en células en cultivo, estar dotados de cierta actividad antitumoral, en el rango de concentración micromolar. En este sentido, los compuestos más activos, son siempre los correspondientes complejos de Pt(II), bien en su versión mixta (ligandos de 1,10-fenantrolina y etilendiamina) como de tipo 2:1, incluyendo dos ligandos derivados de este sistema heterocíclico.

Si esta actividad antitumoral se encuentra o no relacionada con la habilidad de estos derivados de reconocer y estabilizar el ADN cuádruple-G es algo que merecería la realización de ensayos biológicos adicionales más específicos.



## **4. Parte experimental**

*“La ciencia y la vida cotidiana no deben ni pueden estar separadas”*

*Rosalind Franklin*





## **4.1. PARTE EXPERIMENTAL: 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, Acros y Alfa Aesar, y se emplearon sin ningún tipo de manipulación.

Tras los procesos de purificación correspondientes, los productos se secaron convenientemente a vacío, en presencia de un agente desecante adecuado.

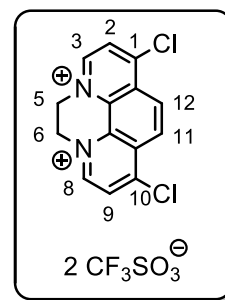
Los productos obtenidos se analizaron por y distintas técnicas espectroscópicas, con objeto de comprobar su pureza y asignar su estructura. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- 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 de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  han sido registrados en los siguientes aparatos: Varian UNITY 300, Varian-Mercury-VX-300 y Varian UNITY<sup>Plus</sup>-500. Los diferentes espectros y experimentos de RMN unidimensionales (1D) 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  $\delta$  (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hz.

### 4.1.2 Síntesis de derivados de la 1,10-fenantrolina dicuaternizada

#### **Bistriflato del 1,10-dicloro-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-l,m,n] [1,10]fenantrolinio (1)<sup>179</sup>**

A una suspensión de 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina (245 mg, 0.95 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL), bajo atmósfera de argón, se adicionó una disolución de bis(trifluorometanosulfonato) de etano-1,2-diílo (332 mg, 1.02 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 23 horas. Posteriormente, la mezcla se enfrió a 4 °C durante 30 minutos y el precipitado formado se filtró y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> frío (2 x 10 mL). Se obtuvieron así 483 mg del compuesto **1** como un sólido amarillo pálido.



**Rdto.:** 88%

**P.f.** (°C): 230 (descompone)

**IR** (KBr),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3107, 3052, 2978, 2935, 1584, 1470, 1275, 1142, 1031, 876, 850, 834, 825, 754, 731, 707.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 9.94 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-3,8), 9.12 (s, 2H, H-11,12), 9.04 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, H-2,9), 5.98 (s, 4H, H-5,6).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 206.1, 155.3, 150.7, 131.8, 131.3, 129.3, 127.8, 53.8.

**<sup>19</sup>F-RMN** (282 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): -79.1.

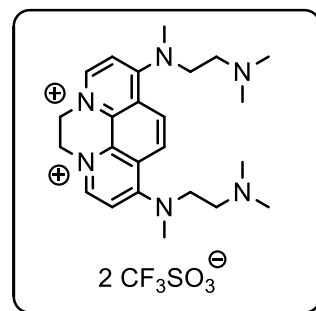
**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub> [M-2CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>:

Calculado: 277.03

Encontrado: 277.02

**Bis trifluorometanosulfonato de 1,10-bis ((1-metil-3-dimetilamino)etilamino)-5,6 dihidropirazino [1,2,3,4-lmn] 1,10-fenantrolina 4,7-diinio (2)**

A una disolución del compuesto **1** (23.8 mg, 0.041 mmol) en CH<sub>3</sub>CN anhidro (5 mL), se adicionaron *N,N,N'*-trimetiletilendiamina (13.4 μL, 0.103 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (16.2 mg, 0.117 mmol) y se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado obtenido se concentró a sequedad. Por último, se lavó el crudo de reacción con una mezcla de acetona/Et<sub>2</sub>O (2:8). De este modo se obtuvieron 23 mg del producto deseado como un aceite anaranjado que solidifica con el paso del tiempo.



**Rdto.:** 80%

**P.f.** (°C): 128-129

**IR** (KBr),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 2955, 1629, 1594, 1264, 1156, 1029.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.74 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-3,8), 8.57 (s, 2H, H-11,12), 7.54 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H-2,9), 5.17 (s, 4H, H-5,6), 4.14 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H, H<sub>a</sub>), 3.73 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-N), 2.83 (t, *J* = 6.1 Hz, 4H, H<sub>b</sub>), 2.22 (s, 12H, N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 159.7, 143.7, 131.0, 122.5, 119.7, 106.6, 56.1, 54.0, 49.8, 44.9, 42.2.

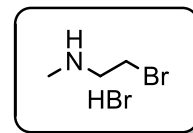
**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>N<sub>6</sub> [M-2CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>:

Calculado: 204.15

Encontrado: 204.18

### Hidrobromuro de la 2-bromo-*N*-metiletanoamina (3)

A una disolución de ácido bromhídrico al 47% (800  $\mu$ L, 7.07 mmol) a 4 °C, se adicionó, lentamente, 2-(metilamino)etanol (270  $\mu$ L, 3.36 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 20 horas y posteriormente se concentró a sequedad. De este modo se obtuvieron 291 mg de un aceite naranja.



**Rdto.:** 88%

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm): 3.55 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-Br}$ ), 3.36 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 2.61 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-NH}$ ).

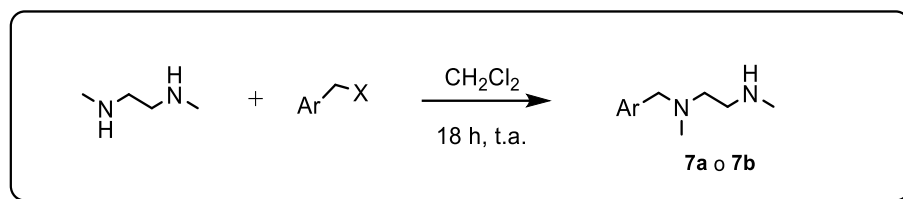
**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  (ppm): 49.84, 32.56, 26.03.

**EM** (ESI,  $m/z$ ) para  $\text{C}_3\text{H}_{10}\text{BrN}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :

Calculado: 137.98

Encontrado: 138.06

### ◆ Procedimiento general A para la preparación de las aminas 7a-b

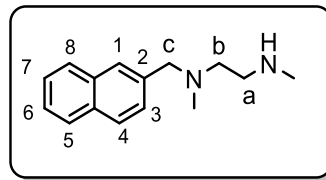


**Figura 120.** Esquema para la preparación de las aminas 7a-b

A una disolución de la *N,N'*-dimetiletilendiamina en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se adicionó una disolución del correspondiente derivado halogenado en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La adición se llevó a cabo durante 90 minutos a 0 °C y posteriormente se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. Por último, se lavó la mezcla de reacción con  $\text{H}_2\text{O}$  (5 x 50 mL) y se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

***N,N'*-dimetil-*N*-(naftalenil-2-metil)etilen-1,2-diamina (7a)**

Siguiendo el procedimiento general **A**, se preparó el compuesto **7a** a partir de una disolución de *N,N'*-dimetiletilendiamina (799  $\mu$ L, 7.50 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) y de una disolución de 2-bromometilnaftaleno (165 mg, 0.75 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL). De este modo se obtuvieron 131 mg de *N,N'*-dimetil-*N*-(naftalenil-2-metil)etilen-1,2-diamina como un aceite amarillo.



**Rdto.:** 77%

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 7.80-7.77 (m, 4H, H-3,4,5,8 Naft), 7.70 (s, 1H, H-1 Naft), 7.48-7.41 (m, 2H, H-6,7 Naft), 3.64 (s, 2H, H<sub>c</sub>), 2.69 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H, H<sub>a</sub>), 2.57 (t,  $J = 6.2$  Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 2.40 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{NH}$ ), 2.21 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ), 1.67 (sa, NH).

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 136.7, 133.2, 132.7, 127.9, 127.6, 127.4, 127.2, 125.9, 125.5, 62.8, 56.6, 49.2, 42.2, 36.3.

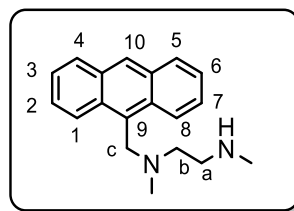
**EM** (ESI,  $m/z$ ) para  $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :

Calculado: 229.16

Encontrado: 229.17

***N*-(antraceni-9-metil)-*N,N'*-dimetiletilendiamina (7b)**

Siguiendo el procedimiento general **A**, se preparó el compuesto **7b** a partir de una disolución de *N,N'*-dimetiletilendiamina (540  $\mu$ L, 5.07 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) y una disolución de 9-clorometilantraceno (112 mg, 0.51 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL). De este modo se obtuvieron 79 mg de *N*-(antraceni-9-metil)-*N,N'*-dimetiletilendiamina como un aceite amarillo.



**Rdto.:** 68%

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 8.46 (d,  $J = 9.0$  Hz, 2H, H-1,8 Antr), 8.42 (s, 1H, H-10 Antr), 8.00 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, H-4,5 Antr), 7.55-7.44 (m, 4H, H-2,3,6,7 Antr), 4.48 (s, 2H,  $\text{H}_c$ ), 2.72 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $\text{H}_a$ ), 2.62 (t,  $J = 6.1$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 2.28 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{NH}$ ), 2.13 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{N}$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 131.2, 129.1, 127.5, 125.7, 124.8, 124.8, 56.2, 54.2, 49.0, 41.8, 35.7.

EM (ESI,  $m/z$ ) para  $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :

Calculado: 279.18

Encontrado: 279.17

♦ **Procedimiento general B para la preparación de los derivados dicuaternizados 8a-b**

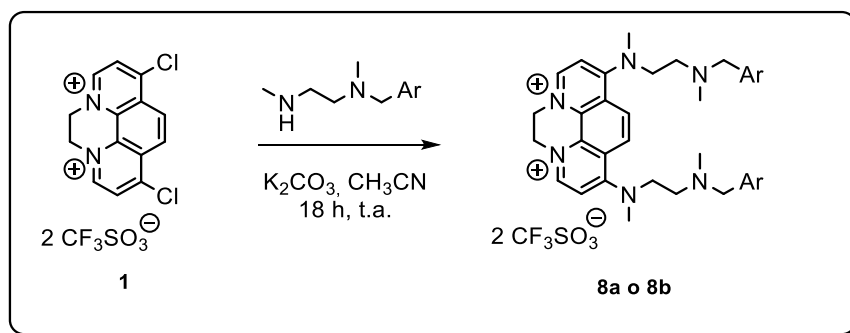
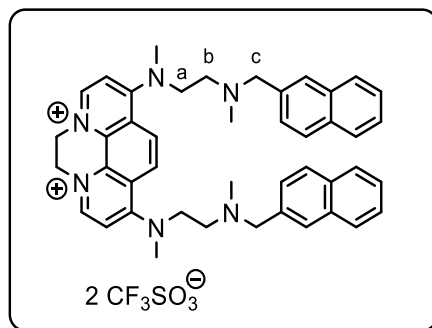


Figura 121. Esquema para la preparación de **8a-b**

A una disolución del compuesto **1** en  $\text{CH}_3\text{CN}$  se adicionó la correspondiente amina (**7a** o **7b**) y  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente se filtró y concentró a sequedad. El aceite obtenido se disolvió en la mínima cantidad de  $\text{MeOH}$  y se adicionó  $\text{Et}_2\text{O}$  frío. El sólido resultante se filtró y se lavó varias veces con  $\text{Et}_2\text{O}$  frío.

**Bis trifluorometanosulfonato de 1,10-bis(1-metil-3((2-naftalenometil)metil)amino)etilamino-5,6-dihidropirazino [1,2,3,4-lmn] 1,10-fenantrolina 4,7-diinio (8a)**

Siguiendo el procedimiento general **B**, se preparó el compuesto **8a** a partir de una disolución del compuesto **1** (28 mg, 0.05 mmol), de *N,N'*-dimetil-*N*-(naftalenil-2-metil)etilen-1,2-diamina (**7a**) (28 mg, 0.12 mmol) y  $K_2CO_3$  (21 mg, 0.15 mmol) obteniéndose 39 mg del producto deseado como un sólido amarillo.



**Rdto.:** 79%

**$^1H$ -RMN** (300 MHz, acetona- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 8.51 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H-3,8), 8.39 (s, 2H, H11,12), 7.71-7.64 (m, 8H, H-1,4,5,8 Naft), 7.38-7.32 (m, 8H, H-2,9 + H-3,6,7 Naft), 4.89 (s, 4H, H-5,6), 4.18 (t,  $J = 5.8$  Hz, 4H,  $H_a$ ), 3.68 (s, 4H,  $H_c$ ), 3.67 (s, 6H,  $CH_3$ ), 2.99 (t,  $J = 5.8$  Hz, 4H,  $H_b$ ), 2.37 (s, 6H,  $CH_3$ ).

**$^{13}C$ -RMN** (75 MHz, acetona- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 159.6, 144.0, 137.8, 134.0, 133.4, 131.1, 128.6, 128.3, 128.2, 126.7, 126.4, 123.2, 120.2, 107.3, 67.5, 63.1, 54.8, 54.2, 50.2, 43.41.

**EM** (ESI, m/z) para  $C_{44}H_{48}N_6$   $[M-2CF_3SO_3]^{2+}$ :

Calculado: 330.20

Encontrado: 330.17



**Bis trifluorometanosulfonato de 1,10-bis((1-metil-3((9-antracenometil)metil)amino)etilamino-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-Imn]1,10-fenantrolina 4,7-diinio (8b)**

Siguiendo el procedimiento general **B**, se preparó el compuesto **8b** a partir de una disolución del compuesto **1** (44 mg, 0.077 mmol), de la *N*-(antraceni-9-metil)-*N,N*-dimetiletilendiamina (**7b**) (52 mg, 0.19 mmol) y  $K_2CO_3$  (32 mg, 0.23 mmol) obteniéndose de este modo 60 mg del producto deseado como un sólido amarillo.

**Rdto.:** 73%

**Pf** (°C): 115 (descompone)

**IR** (KBr),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 2852, 1624, 1594, 1262, 1156, 1030.

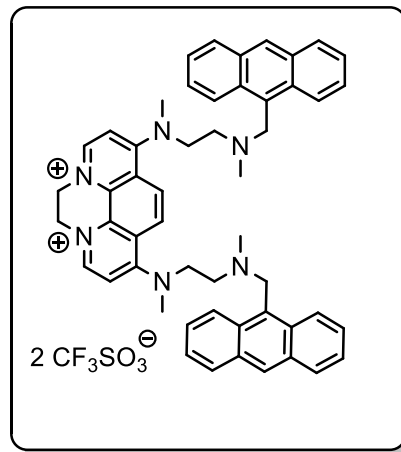
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.40 (d, 8.4 Hz, 4H, H-1,8 Antr), 8.37 (s, 2H, H-10 Antr), 8.13 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-3,8), 7.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H, H-4,5 Antr), 7.66 (s, 2H, H-11,12), 7.42 (t<sub>ap</sub>, 4H, H-2,7 Antr), 7.30 (t<sub>ap</sub>, 4H, H-3,6 Antr), 6.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2,9), 5.06 (s, 4H, H-5,6), 4.53 (s, 4H, H<sub>c</sub>), 3.59 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H, H<sub>a</sub>), 3.20 (s, 6H, NCH<sub>3</sub>), 3.00 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H, H<sub>b</sub>), 2.67 (s, 6H, CH<sub>3</sub>N).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 157.5, 142.5, 131.2, 131.0, 130.0, 129.7, 128.7, 127.2, 126.0, 124.9, 121.7, 118.4, 105.7, 53.8, 53.3, 52.2, 49.4, 42.6.

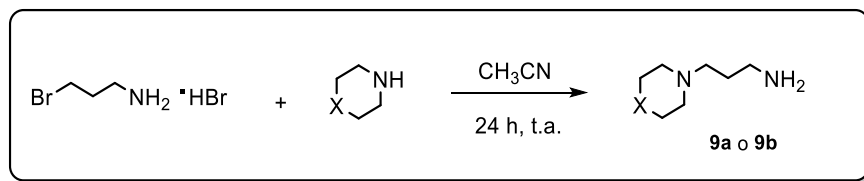
**EM** (ESI, m/z) para C<sub>52</sub>H<sub>52</sub>N<sub>6</sub> [M-2CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>:

Calculado: 380.21

Encontrado: 380.13



♦ **Procedimiento general C para la preparación de las aminas primarias 9a-b**

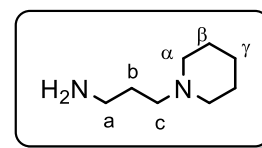


**Figura 122.** Esquema para la preparación de las aminas **9a-b**

A una suspensión del hidrobromuro de la 3-bromopropilamina en  $\text{CH}_3\text{CN}$  se adicionó la correspondiente amina heterocíclica. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 18 horas y posteriormente se evaporó el disolvente. Al crudo de reacción se adicionó THF frío y el precipitado obtenido se eliminó por filtración. El filtrado se concentró a sequedad obteniéndose así la correspondiente amina.

**3-(1-Piperidinil)propilamina (9a)**

Siguiendo el procedimiento general **C**, se preparó el compuesto **9a** a partir del hidrobromuro de 3-bromopropilamina (1.31 g, 6.0 mmol) y de piperidina (1.79 g, 21.0 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (60 mL) obteniéndose 898 mg de 3-(1-piperidinil)propilamina como un aceite amarillo.



**Rdto.:** 95%

**IR** ( $\text{NaCl}$ ) $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3395, 2872, 2364, 1783, 1252.

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3.11 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H,  $\text{H}_a$ ), 2.57 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H,  $\text{H}_c$ ), 2.49 (sa, 4H,  $\text{H}_\alpha$ ), 1.85 (q,  $J = 6.1$  Hz, 4H,  $\text{H}_\beta$ ), 1.59 (q,  $J = 5.9$  Hz, 2H,  $\text{H}_b$ ), 1.43 (m, 2H,  $\text{H}_\gamma$ ).

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 58.5, 54.1, 41.4, 25.5, 23.7, 23.1.

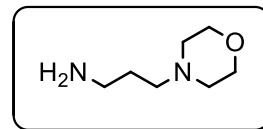
**EM** (ESI,  $m/z$ )  $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :

Calculado: 143.15

Encontrado: 143.31

### 3-(4-Morfolino)propilamina (9b)

Siguiendo el procedimiento general **C**, se preparó el compuesto **9b** a partir del hidrobromuro de la 3-bromopropilamina (1.31 g, 6.0 mmol) y de morfolina (1.83 g, 21.0 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (60 mL) obteniéndose 940 mg de 3-(4-morfolino)propilamina como un aceite amarillo.



Rdto.: 92%

IR (NaCl)  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3403, 2850, 2344, 1739, 1273.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 3.54 (t, *J* = 4.7 Hz, 4H, H <sub>$\beta$</sub> ) 3.01 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.40 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, H <sub>$\gamma$</sub> ), 2.35 (sa, 4H, H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.74 (q, *J* = 5.9 Hz, 2H, H <sub>$\beta$</sub> ).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 65.9, 56.9, 52.7, 40.2, 21.9.

EM (ESI, m/z) C<sub>7</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 145.13

Encontrado: 145.20

### ◆ Procedimiento general D<sup>182</sup> para la preparación de los carbamatos 10a-c

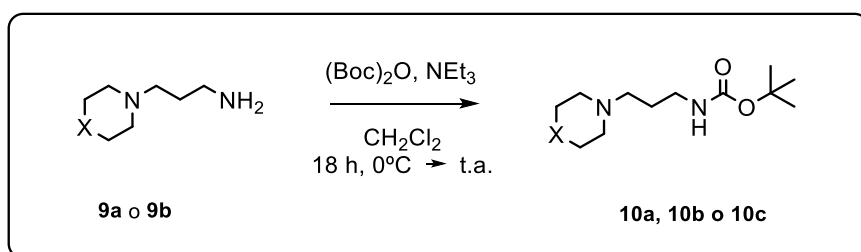


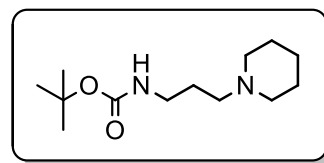
Figura 123. Esquema para la preparación de las aminas 10a-c

A una disolución de trietilamina y de la correspondiente propilamina en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0 °C se adicionó una disolución de dicarbonato de di-*terc*-butilo en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. Posteriormente la mezcla se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó primero con NaHCO<sub>3</sub> 1M y después con salmuera. La fase

orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y posteriormente se concentró a sequedad obteniéndose el correspondiente carbamato.

***N*-(3-piperidinil)propilcarbamato de *terc*-butilo (10a)**

Siguiendo el procedimiento general **D**, se preparó el compuesto **10a** a partir de la 3-(1-piperidinil)propilamina (**9a**) (1.15 g, 8.10 mmol), trietilamina (408 mg, 4.05 mmol) y dicarbonato de di-*terc*-butilo (1.94 g, 8.91 mmol) obteniéndose 934 mg del compuesto **10a** como un aceite amarillo.



**Rdto.:** 48%

**IR** (NaCl)  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3350, 2934, 1710.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 3.17 (ca, 2H, H<sub>a</sub>), 2.34 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H, H<sub>c</sub>+H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.63 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>b</sub>), 1.56 (ta, *J* = 5.4 Hz, 4H, H <sub>$\beta$</sub> ), 1.42 (sa, 11H, CH<sub>3</sub>+ H <sub>$\gamma$</sub> ).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 146.7, 85.2, 67.1, 57.8, 54.6, 28.4, 27.4, 26.0, 24.4.

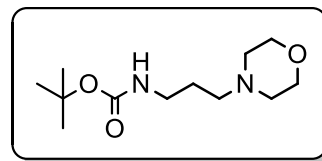
**EM** (ESI, *m/z*) C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 243.36

Encontrado: 243.21

***N*-(3-(4-morfolino)propil)carbamato de *terc*-butilo (10b)**

Siguiendo el procedimiento general **D**, se preparó el compuesto **10b** a partir de la 3-(4-morfolino)propilamina (**9b**) (1.17 g, 8.10 mmol), trietilamina (408 mg, 4.05 mmol) y dicarbonato de di-*terc*-butilo (1.94 g, 8.91 mmol). Se obtuvieron 1.11 g del compuesto **10b** como un aceite amarillo.



**Rdto.:** 56%

**IR** (NaCl)  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3350, 2972, 1699.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 3.70 (t,  $J = 4.7$  Hz, 4H, H <sub>$\beta$</sub> ), 3.20 (ca, 2H, H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.42 (m, 6H, H <sub>$c$</sub>  + H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.65 (q,  $J = 6.5$  Hz, 2H, H <sub>$b$</sub> ), 1.43 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 145.9, 84.3, 67.0, 57.2, 53.6, 39.8, 28.4, 26.0.

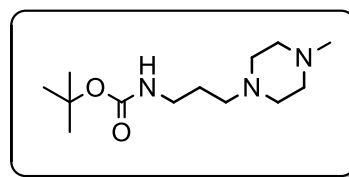
**EM** (ESI, m/z) C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 245.34

Encontrado: 245.19

### ***N*-3-(4-metil-1-piperacínil) carbamato de terc-butilo (10c)**

Siguiendo el procedimiento general **D**, se preparó el compuesto **10c** a partir de la 3-(4-metil-1-piperacínil)propilamina (1.27 g, 8.1 mmol), trietilamina (408 mg, 4.05 mmol) y dicarbonato de di-*terc*-butilo (1.94 g, 8.91 mmol) obteniéndose 1.04 g del compuesto deseado como un aceite amarillo.



**Rdto.:** 50%

**IR** (NaCl)  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3350, 2937, 1712.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 3.17 (ca, 2H, H <sub>$\alpha$</sub> ), 2.50-2.38 (m, 10H, H <sub>$c$</sub>  + H <sub>$\alpha$</sub>  + H <sub>$\beta$</sub> ), 2.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.64 (q,  $J = 6.5$  Hz, 2H, H <sub>$b$</sub> ), 1.43 (s, 9H, CH<sub>3</sub>).

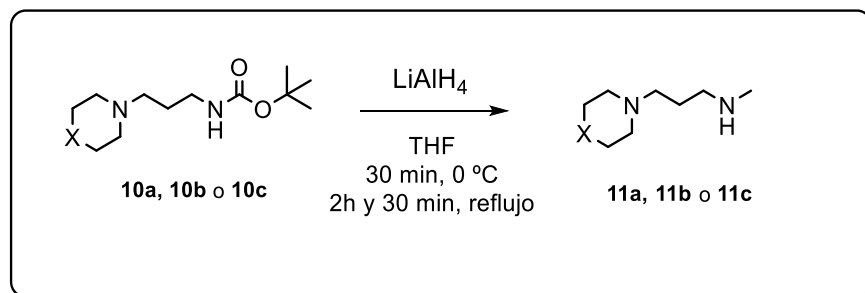
**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 157.3, 80.6, 54.3, 53.9, 52.9, 46.0, 38.8, 28.3, 26.4.

**EM** (ESI, m/z) C<sub>13</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 258.22

Encontrado: 258.23

♦ **Procedimiento general E<sup>182</sup> para la preparación de las metilaminas 11a-c**

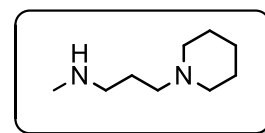


**Figura 124.** Esquema para la preparación de las aminas **11a-c**

A una disolución de  $\text{LiAlH}_4$  en THF se adicionó, gota a gota y a  $0^\circ\text{C}$ , una disolución del correspondiente carbamato **10** en THF anhidro y bajo argón. La mezcla se agitó durante 30 min a  $0^\circ\text{C}$  y, posteriormente, se calentó a reflujo durante 2 horas y 30 minutos. El sólido blanco obtenido se eliminó por filtración y el filtrado se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaOH}$  1M y de nuevo con  $\text{H}_2\text{O}$ . La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró a sequedad. Al residuo obtenido se adicionó  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  para precipitar las sales que no fueron eliminadas previamente. Se filtraron las sales y el filtrado se concentró a sequedad obteniéndose las correspondientes metilaminas.

***N*-metil(3-(1-piperidinil)propilamina (11a)**

Siguiendo el procedimiento general E, se preparó el compuesto **11a** a partir del *N*-(3-piperidinil)propilcarbamato de terc-butilo (**10a**) (751 mg, 3.1 mmol) y de  $\text{LiAlH}_4$  (9.5 mL, 9.5 mmol) obteniéndose 277 mg del producto deseado como un aceite amarillo.



**Rdto.:** 57%

**IR** (NaCl)  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3292, 2934, 2790.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 2.60 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{H}_\alpha$ ), 2.41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.35 (m, 6H,  $\text{H}_\gamma + \text{H}_\delta$ ), 1.67 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{H}_\beta$ ), 1.56 (q,  $J = 5.7$  Hz, 4H,  $\text{H}_\beta$ ), 1.42 (q,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{H}_\gamma$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 57.7, 54.6, 50.8, 36.3, 26.7, 25.9, 24.4.

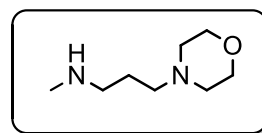
**EM** (ESI, m/z)  $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{N}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :

Calculado: 157.17

Encontrado: 157.12

### ***N*-metil-3-(4-morfolino)propilamina (11b)**

Siguiendo el procedimiento general **E**, se preparó el compuesto **11b** a partir del *N*-3-(4-morfolino)propil carbamato de terc-butilo (**10b**) (760 mg, 3.10 mmol) y de  $\text{LiAlH}_4$  (9.5 mL, 9.5 mmol). De este modo se obtuvieron 230 mg de la amina **11b** como un aceite incoloro.



**Rdto.:** 43%

**IR** (NaCl)  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3306, 2938, 2803.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3.68 (t,  $J = 4.6$  Hz, 4H,  $\text{H}_\beta$ ), 2.60 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{H}_\alpha$ ), 2.60 (m, 9H,  $\text{H}_\text{c} + \text{H}_\alpha + \text{CH}_3$ ), 1.66 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $\text{H}_\text{b}$ ).

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 66.9, 27.3, 53.7, 50.5, 36.4, 26.4.

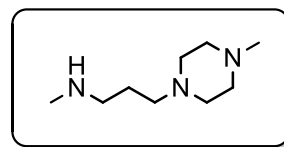
**EM** (ESI, m/z)  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :

Calculado: 159.14

Encontrado: 159.20

### ***N*-metil-3-(4-metil-1-piperacínil)propilamina (11c)**

Siguiendo el procedimiento general **E**, se preparó el compuesto **11c** a partir del *N*-3-(4-metil-1-piperacínil) carbamato de terc-butilo (**10c**) (796 mg, 3.1 mmol) y de  $\text{LiAlH}_4$  (9.5 mL, 9.5 mmol) se obtuvieron así 329 mg de **11c** como un aceite incoloro.



**Rdto.:** 62%

**IR** (NaCl)  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3306, 2940, 2804.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 2.63-2.58 (m, 4H, H<sub>a</sub>+H<sub>c</sub>), 2.41 (s, 3H, CH<sub>3</sub>NH), 2.38-2.27 (m, 8H, H<sub>α</sub>+H<sub>β</sub>), 2.21 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N), 1.89 (q, *J* = 6.8 Hz, H<sub>b</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 54.3, 53.9, 52.9, 50.5, 46.0, 36.5, 27.2.

EM (ESI, m/z) C<sub>9</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 172.17

Encontrado: 172.21

◆ **Procedimiento general F para la preparación de las aminas 12a-c**

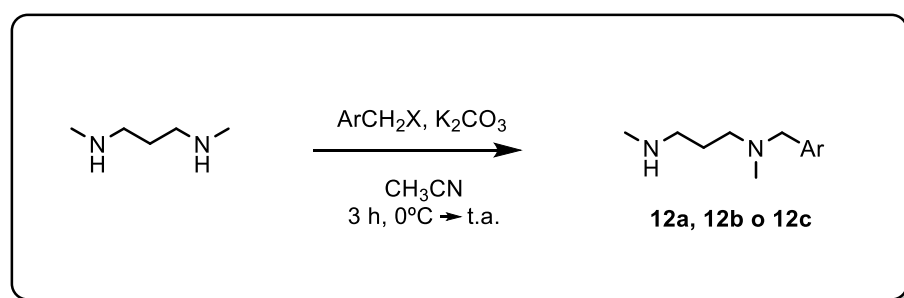
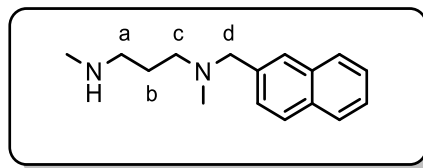


Figura 125. Esquema para la preparación de las aminas 12a-c

A una mezcla de la *N,N'*-dimetil-1,3-propanodiamina y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se adicionó, lentamente a 0°C, una disolución del correspondiente derivado halogenado. Después de la adición la disolución se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, la mezcla de reacción se lavó con H<sub>2</sub>O (3x10 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y, por último, se concentró a sequedad.

***N*-(naftalenil-2-metilen)-*N,N'*-dimetilpropilendiamina (12a)**

Siguiendo el procedimiento general F, se preparó **12a** a partir de la *N,N'*-dimetil-1,3-propanodiamina (169 mg, 1.65 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (228 mg, 1.65 mmol) y del 2-bromometilnaftaleno (111 mg, 0.50 mmol). De este modo se obtuvieron 73 mg de *N*-(naftalenilmetilen)-*N,N'*-dimetilpropilendiamina como un aceite incoloro.



**Rdto.:** 60%



**IR** (NaCl)  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3392, 2941, 2791, 1462.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.84-7.79 (m, 4H, H-3,4,5,8 Naft), 7.72 (s, 1H, H-1 Naft), 7.48-7.44 (m, 2H, H-6,7 Naft), 3.64 (s, 2H, H<sub>d</sub>), 2.63 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H<sub>a</sub>), 2.47 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 2.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>NH), 2.25 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N), 1.74 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H<sub>b</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 127.9, 127.8, 127.6, 127.4, 127.2, 125.9, 125.5, 61.7, 54.7, 49.6, 41.4, 35.4, 26.2.

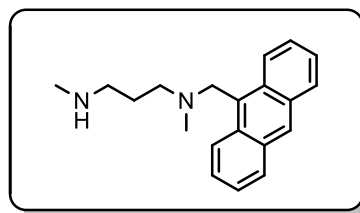
**EM** (ESI, m/z) C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 243.18

Encontrado: 243.05

### ***N*-(antraceni-9-metilen)-*N,N'*-dimetilpropilendiamina (12b)**

Siguiendo el procedimiento general **F**, se preparó **12b** a partir de la *N,N'*-dimetil-1,3-propanodiamina (169 mg, 1.65 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (228 mg, 1.65 mmol) y 9-clorometilantraceno (113 mg, 0.5 mmol). De este modo se obtuvieron 140 mg de la *N*-(antraceni-9-metilen)-*N,N'*-dimetilpropilendiamina como un aceite amarillo.



**Rdto.:** 44%

**IR** (NaCl)  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3300, 3045, 2941, 2843, 2784, 1445.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.57-8.31 (m, 3H, H-1,8,10 Antr), 8.07-7.91 (m, 2H, H-4,5 Antr), 7.62-7.37 (m, 4H, H-2,3,6,7 Antr), 4.41 (s, 2H, H<sub>d</sub>), 2.59 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, H<sub>a</sub>), 2.43 (t,  $J = 6.5$  Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 2.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>NH), 2.13 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N), 1.72 (q,  $J = 6.5$  Hz, 2H, H<sub>b</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 131.3, 129.0, 127.4, 125.6, 125.5, 125.0, 124.7, 55.9, 54.2, 50.8, 41.9, 36.2, 26.8.

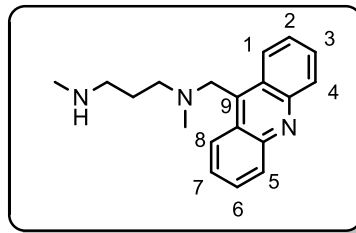
**EM** (ESI, m/z) C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 293.19

Encontrado: 293.05

***N*-(acridinil-9-metilen)-*N,N'*-dimetilpropilendiamina (12c)**

Siguiendo el procedimiento general F, se preparó **12c** a partir de la *N,N'*-dimetil-1,3-propanodiamina (169 mg, 1.65 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (228 mg, 1.65 mmol) y de la 9-bromometilacridina (136 mg, 0.5 mmol). De este modo se obtuvieron 107 mg de la *N*-(acridinil-9-metilen)-*N,N'*-dimetilpropilendiamina como un aceite marrón claro.



**Rdto.:** 73%

**IR** (NaCl)  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3424, 3294, 2941, 1519, 1459.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 8.45 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-1,8 Acr), 8.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-4,5 Acr), 7.76 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3,6 Acr), 7.76 (t, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-2,7 Acr), 4.41 (s, 2H, H<sub>d</sub>), 2.57 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>a</sub>), 2.44 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N), 2.18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>N), 1.71 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H, H<sub>b</sub>).

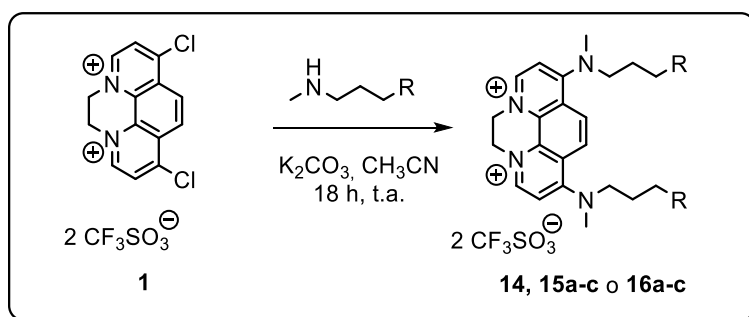
**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 148.5, 141.6, 130.2, 129.7, 126.0, 125.7, 124.8, 56.3, 53.7, 50.6, 41.9, 36.3, 27.1.

**EM** (ESI, *m/z*) C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 294.19

Encontrado: 294.05

♦ **Procedimiento general G para la preparación de los derivados dicuaternizados 14, 15a-c, 16a-c**

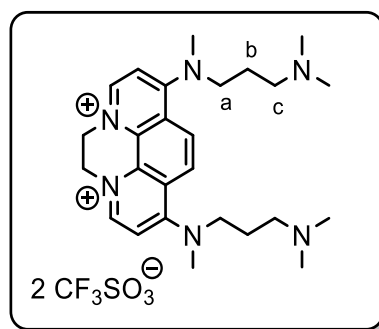


**Figura 126.** Esquema para la preparación de las aminas **14**, **15a-c**, **16a-c**

A una disolución del compuesto **1** en CH<sub>3</sub>CN (10 mL) se adicionó K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y una disolución de la correspondiente propilendiamina en CH<sub>3</sub>CN (5 mL). La reacción se mantuvo con agitación y a temperatura ambiente durante 18 horas. El K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. Por último, el crudo obtenido se disolvió en acetona y el producto se precipitó con Et<sub>2</sub>O frío.

**Bis trifluorometanosulfonato de 1,10-bis ((1-metil-3-dimetilamino)propilamino)-5,6 dihidropirazino [1,2,3,4-lmn] 1,10-fenantrolina 4,7-diinio (14)**

Siguiendo el procedimiento general **G**, a partir de la *N,N,N'*-trimetilpropanodiamina (51 μL, 0.35 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (49 mg, 0.35 mmol) y el compuesto **1** (58 mg, 0.1 mmol), se obtuvieron 54 mg del producto deseado **14** como un aceite marrón.



**Rdto.:** 74 %

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 8.71 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-3,8), 8.50 (s, 2H, H-11,12), 7.56 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-2,9), 5.14 (s, 4H, H-5,6), 4.07 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H, H<sub>a</sub>), 3.74 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.35 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H, H<sub>c</sub>), 2.14 (s, 12H, CH<sub>3</sub>).<sup>216</sup>

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 159.9, 144.3, 131.7, 123.1, 120.4, 107.0, 59.1, 56.6, 54.5, 50.6, 45.5, 43.2, 25.1.

**<sup>15</sup>F-RMN** (282 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): -78.9

**EM** (ESI, *m/z*) C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S [M-CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>:

Calculado: 585.28

Encontrado: 585.15

C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub> [M-2CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>:

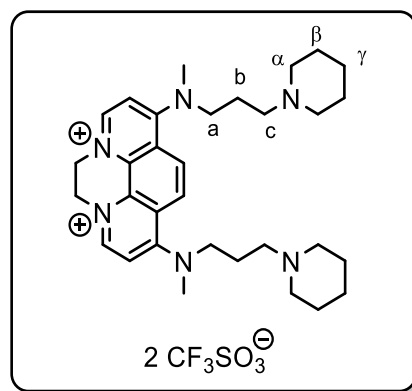
Calculado: 218.16

Encontrado: 218.16

<sup>216</sup> La señal correspondiente a H<sub>b</sub> no se observa ya que se encuentra solapada con el disolvente deuterado.

**Bis trifluorometanosulfonato de 1,10-bis ((metil-(3-piperidin-1-il)propil)amino)-5,6 dihidropirazino [1,2,3,4-lmn] 1,10-fenantrolina 4,7-diinio (15a)**

Siguiendo el procedimiento general **G**, se preparó el producto **15a** a partir de una disolución de la *N*-metil-3-(1-piperidinil)propilamina (**11a**) (55 mg, 0.35 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (49 mg, 0.35 mmol) y 1,10-dicloro-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-l,m,n][1,10]fenantrolinio (**1**) (58 mg, 0.1 mmol). De este modo se obtuvieron 68 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 83%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.73 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-3,8), 8.53 (s, 2H, H-11,12), 7.60 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2,9), 5.15 (s, 4H, H-5,6), 4.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H, H<sub>a</sub>), 3.74 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.38-2.31 (m, 12H, H<sub>c</sub> + H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.46-1.43 (m, 8H, H <sub>$\beta$</sub> ), 1.40-1.35 (m, 4H, H <sub>$\gamma$</sub> ).<sup>216</sup>

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, *d*<sub>6</sub>-acetona),  $\delta$  (ppm): 159.9, 144.3, 132.3, 123.2, 120.0, 107.1, 66.1, 55.8, 55.1, 54.6, 50.6, 26.9, 25.1, 24.5.

**<sup>15</sup>F-RMN** (282 MHz, *d*<sub>6</sub>-acetona),  $\delta$  (ppm): -78.9

**EM** (ESI, *m/z*) C<sub>33</sub>H<sub>48</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S [M-CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>:

Calculado: 665.35

Encontrado: 665.12

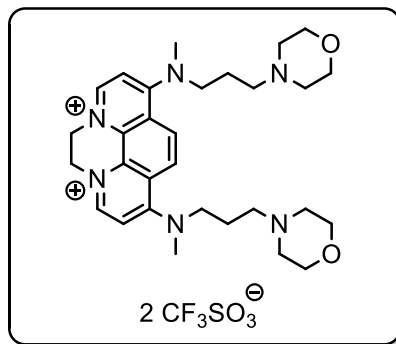
C<sub>32</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub> [M- 2CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>:

Calculado: 258.19

Encontrado: 258.14

**Bis trifluorometanosulfonato de 1,10-bis ((metil-(3-morfolin-1-il)propil)amino)-5,6 dihidropirazino [1,2,3,4-lmn] 1,10-fenantrolina 4,7-diinio (15b)**

Siguiendo el procedimiento general **G**, se preparó el producto **15b** a partir de una disolución de la *N*-metil-3-(4-morfolino)propilamina (**11b**) (55 mg, 0.35 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (49 mg, 0.35 mmol) y 1,10-dicloro-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-l,m,n][1,10]fenantrolinio (**1**) (58 mg, 0.1 mmol). De este modo se obtuvieron 25 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 30%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 8.74 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-3,8), 8.54 (s, 2H, H-11,12), 7.60 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2,9), 5.17 (s, 4H, H-5,6), 4.13 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H, H<sub>α</sub>), 3.79-3.72 (m, 8H, H<sub>β</sub>), 3.69 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.95-2.91 (m, 8H, H<sub>α</sub>), 2.47 (m, 4H, H<sub>c</sub>), 1.67 (m, 4H, H<sub>b</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 160.1, 144.6, 131.7, 123.6, 120.5, 107.4, 65.6, 54.7, 54.4, 53.2, 50.7, 42.5, 23.2.

**<sup>15</sup>F-RMN** (282 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): -78.9

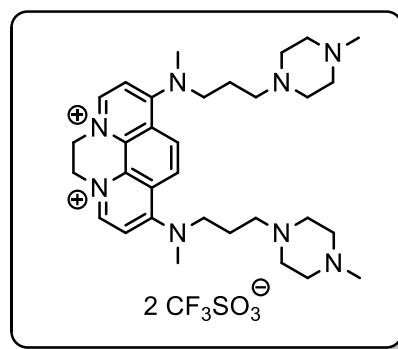
**HRMS** (ESI-TOF, *m/z*) C<sub>31</sub>H<sub>44</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>S [M-CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sup>+</sup>:

Calculado: 669.3041

Encontrado: 669.3044

**Bis trifluorometanosulfonato de 1,10-bis (( 1-metil- (N-metil(3-(4-metil-1 piperacínil))propilamino)-5,6-dihidropirazino [1,2,3,4-lmn] 1,10-fenantrolina 4,7 diinio (15c)**

Siguiendo el procedimiento general **G**, se preparó el producto **15c** a partir de una disolución de la *N*-metil-3-(4-piperacínil)propilamina (**11c**) (55 mg, 0.35 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (49 mg, 0.35 mmol) y 1,10-dicloro-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-l,m,n][1,10]fenantrolinio (**1**) (60 mg, 0.1 mmol). De este modo se obtuvieron 34 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 40%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 8.74 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-3,8), 8.53 (s, 2H, H-11,12), 7.60 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-2,9), 5.16 (s, 4H, H-5,6), 4.13 (t, *J* = 7.2 Hz, 4H, H<sub>α</sub>), 3.75 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 3.29 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.95-2.91 (m, 12H, H<sub>c</sub> + H<sub>α</sub>), 2.47 (m, 8H, H<sub>β</sub>), 1.68 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H, H<sub>b</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, acetona-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 159.9, 144.4, 131.7, 123.3, 120.4, 107.1, 106.3, 56.0, 54.9, 54.4, 53.7, 50.6, 46.2, 24.5, 24.3.

**<sup>15</sup>F-RMN** (282 MHz, *d*<sub>6</sub>-acetona), δ (ppm): -78.9

**EM** (ESI, *m/z*) C<sub>33</sub>H<sub>50</sub>F<sub>3</sub>N<sub>8</sub>O<sub>3</sub>S [M-CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>:

Calculado: 695.37

Encontrado: 695.25

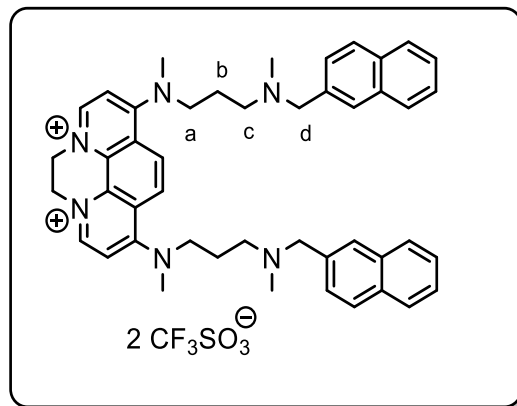
C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>N<sub>8</sub> [M-2CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>:

Calculado: 273.21

Encontrado: 273.18

**1,10-Bis(metil(3-(metilnaftaleno-2-ilmetil)amino)propil)amino)-5,6-dihidropiracino[1,2,3,4-lmn][1,10]fenantrolina 4,7-diinio (16a)**

Siguiendo el procedimiento general **G**, se preparó el producto **16a** a partir de una disolución de la *N*-(naftalenil-2-metilen)-*N,N'*-dimetilpropilendiamina (**12a**) (85 mg, 0.35 mmol),  $K_2CO_3$  (49 mg, 0.35 mmol) y 1,10-dicloro-5,6-dihidropiracino[1,2,3,4-l,m,n][1,10]fenantrolinio (**1**) (60 mg, 0.1 mmol). De este modo se obtuvieron 52 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 53%

**$^1H$ -RMN** (300 MHz, acetona- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 8.63 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, H-3,8), 8.00 (s, 2H, H-11,12), 7.75-7.66 (m, 8H, H-1,4,5,8 Naft), 7.47 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H, H-2,9), 7.41-7.38 (m, 6H, H-3,6,7 Naft), 5.04 (s, 4H, H-5,6), 4.03 (t,  $J = 6.2$  Hz, 4H,  $H_a$ ), 3.61 (s, 4H,  $H_d$ ), 3.56 (s, 6H,  $CH_3$ ), 2.55 (t,  $J = 6.2$  Hz, 4H,  $H_c$ ), 2.27 (s, 6H,  $CH_3$ ), 2.17-2.12 (m, 4H,  $H_b$ ).

**$^{13}C$ -RMN** (75 MHz, acetona- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 159.8, 144.1, 137.7, 133.9, 133.3, 131.1, 128.3, 128.1, 127.8, 127.7, 126.5, 122.7, 120.0, 107.1, 63.1, 54.0, 50.3, 42.5, 24.9.

**$^{15}F$ -RMN** (282 MHz, acetona- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): -78.8

**EM** (ESI, m/z)  $C_{47}H_{52}F_3N_6O_3S$  [ $M-CF_3SO_3$ ] $^+$ :

Calculado: 837.38

Encontrado: 837.04

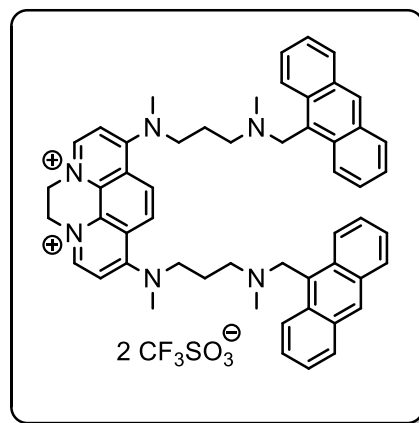
$C_{46}H_{52}N_6$  [ $M-2CF_3SO_3$ ] $^{2+}$ :

Calculado: 344.21

Encontrado: 344.16

**1,10-Bis(metil(3-(metilantraceno-9-ilmetil)amino)propil)amino)-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-lmn][1,10]fenantrolina 4,7-diinio (16b)**

Siguiendo el procedimiento general **G**, se preparó el producto **16b** a partir de una disolución de la *N*-(antraceni-9-metilen)-*N,N'*-dimetilpropilendiamina (**12b**) (102 mg, 0.35 mmol),  $K_2CO_3$  (49 mg, 0.35 mmol) y 1,10-dicloro-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-l,m,n][1,10]fenantrolinio (**1**) (60 mg, 0.1 mmol). De este modo se obtuvieron 65 mg del producto deseado como un sólido amarillo.



**Rdto.:** 60%

**$^1H$ -RMN** (300 MHz, acetona- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 8.49 (d,  $J = 8.1$  Hz, 6H, H-3,8 + H-1,8 Antr), 8.32 (s, 2H, H-10 Antr), 7.90 (d,  $J = 8.1$  Hz, 4H, H-4,5 Antr), 7.49-7.39 (m, 10H, H-2,3,6,7 Antr + H-11,12), 7.12 (d, 2H,  $J = 7.8$  Hz, H-2,9), 5.07 (s, 4H, H-5,6), 4.47 (s, 4H,  $H_d$ ), 3.61 (t,  $J = 6.4$  Hz, 4H,  $H_a$ ), 3.25 (s, 6H,  $CH_3$ ), 2.64 (t,  $J = 6.4$  Hz, 4H,  $H_c$ ), 2.44 (s, 6H,  $CH_3$ ).

**$^{13}C$ -RMN** (75 MHz, acetona- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 159.6, 144.2, 132.2, 132.0, 131.1, 129.6, 128.0, 126.6, 125.9, 125.8, 125.7, 122.4, 119.8, 106.9, 54.9, 53.9, 53.6, 50.5, 42.9, 42.5, 25.0.

**$^{15}F$ -RMN** (282 MHz, acetona- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm) -78.8

**HRMS** (ESI-TOF,  $m/z$ )  $C_{55}H_{56}F_3N_6O_3S$  [ $M-CF_3SO_3$ ] $^+$ :

Calculado: 937.41

Encontrado: 937.41

$C_{54}H_{56}N_6$  [ $M-2CF_3SO_3$ ] $^{2+}$ :

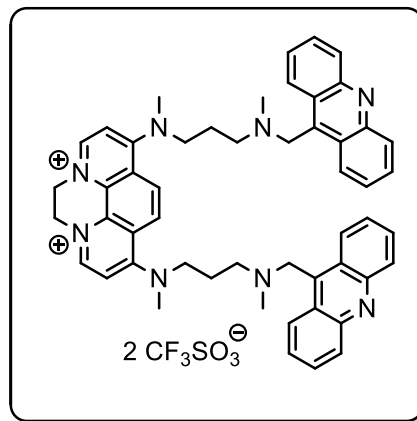
Calculado: 394.23

Encontrado: 394.14



**1,10-Bis(metil(3-(metilacridina-9-ilmetil)amino)propil)amino)-5,6-dihidropirazino[1,2,3,4-lmn][1,10]fenantrolina 4,7-diinio (16c)**

Siguiendo el procedimiento general **G**, se preparó el producto **16c** a partir de una disolución de la amina **12c** (103 mg, 0.35 mmol),  $K_2CO_3$  (49 mg, 0,35 mmol) y del compuesto **1** (60 mg, 0.1 mmol). De este modo se obtuvieron 35 mg del producto deseado como un sólido marrón.



**Rdto.:** 32%

**$^1H$ -RMN** (300 MHz, acetona- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 8.53 (d,  $J = 8.2$  Hz, 6H, H-1,8 Acr, H-3,8 ), 7.89 (d,  $J = 8.2$  Hz, 4H, H-4,5 Acr), 7.65 (t,  $J = 6.5$ Hz, 4H, H-3,6 Acr), 7.53 (t,  $J = 6.5$ , 4H, H-2,7 Acr), 7.35 (s, 2H, H-11,12), 7.14 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H-2,9), 5.21 (s, 4H, H-5,6), 4.51 (s, 4H,  $H_d$ ), 3.69 (t,  $J = 5.6$  Hz, 4H,  $H_a$ ), 3.34 (s, 6H,  $CH_3$ ), 2.66 (t,  $J = 5.6$  Hz, 4H,  $H_c$ ), 2.52 (s, 6H,  $H_3$ ), 1.65 (q,  $J = 5.6$  Hz, 4H,  $H_b$ ).

**$^{13}C$ -RMN** (75 MHz, acetona- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 159.6, 149.0, 144.0, 142.2, 130.8, 130.4, 130.3, 126.6, 126.5, 125.9, 122.2, 119.7, 107.0, 54.1, 53.4, 50.4, 42.9, 42.5, 24.7.

**$^{15}F$ -RMN** (282 MHz, acetona- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm):-78.8

**EM** (ESI, m/z)  $C_{53}H_{54}F_3N_8O_3S$  [M- $CF_3SO_3$ ] $^+$ :

Calculado: 939.40

Encontrado: 939.09

$C_{52}H_{54}N_8$  [M- $2CF_3SO_3$ ] $^{2+}$ :

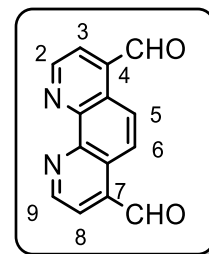
Calculado: 395.22

Encontrado: 395.13

### 4.1.3 Síntesis de derivados de la 1,10-fenantrolina sustituidos en las posiciones 4 y 7

#### 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldéhidó (**18**)<sup>217</sup>

Se disolvió la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (1 g, 4.8 mmol) en una mezcla de dioxano/agua (96:4, v/v) (65 mL). A continuación, se adicionó SeO<sub>2</sub> (2.51 g, 21.6 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas. Pasado este tiempo, el crudo de reacción obtenido se filtró en caliente sobre celita y a vacío. El filtrado obtenido se dejó enfriando durante una noche. El sólido precipitado se filtró a vacío y se lavó con dioxano obteniéndose así 1.07 g de 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldéhidó (**18**) como un sólido beige.



**Rdto.:** 95%

**P.f.** = 160 °C (descompone)

**IR** (KBr),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3059, 2859, 2356, 1698, 1504, 1383.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (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).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 193.7, 150.7, 145.6, 136.3, 125.7, 124.0, 123.9.

**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

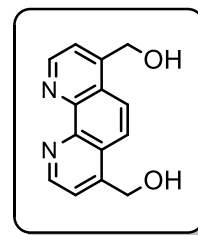
Calculado: 237.07

Encontrado: 237.10

<sup>217</sup> Khatua, S.; Samanta, D.; Bats, J. W.; Schmittel M. *Inorg. Chem.* **2012**, 51 (13), 7075–7086.

### 4,7-Bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina (**19**)<sup>186a</sup>

A una disolución de la 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldéhído (**18**) (236 mg, 1 mmol) en EtOH (25 mL), se adicionó NaBH<sub>4</sub> (150 mg, 4 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas. Posteriormente, se concentró a sequedad, se disolvió en la mínima cantidad de MeOH y se añadió Et<sub>2</sub>O frío. Las sales formadas se filtraron y el filtrado se concentró a sequedad obteniéndose así 192 mg de la 4,7-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina como un sólido amarillo.



**Rdto.:** 80%

**P.f.** (°C) > 300

**IR** (KBr)  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3290, 2898, 1618, 1423.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD),  $\delta$  (ppm): 9.10 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-2,9), 8.18 (s, 2H, H-5,6), 7.90 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-3,8), 5.27 (s, 4H, CH<sub>2</sub>-OH).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD),  $\delta$  (ppm): 151.0, 149.6, 146.4, 127.1, 122.9, 121.7, 61.6.

**EM** (ESI, m/z) para C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M + H]<sup>+</sup>:

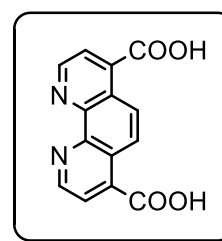
Calculado: 241.09

Encontrado: 241.08

### Preparación del ácido 1,10-fenantrolina 4,7-dicarboxílico (**22**)

#### Método A<sup>189</sup>

En primer lugar, se preparó la disolución de la mezcla oxidante a partir de H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub> (11.4 g, 50 mmol) y CrO<sub>3</sub> (23 mg, 0.6 mmol) en 114 mL de CH<sub>3</sub>CN (0.75% de H<sub>2</sub>O). A continuación, a una disolución de la 4,7-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina (**19**) (107 mg, 0.45 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (30 mL) se le adicionaron 7.3 mL de la disolución de H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>/CrO<sub>3</sub>. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación a 0 °C durante 4 horas. Transcurrido ese tiempo, se adicionó sobre la mezcla una disolución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.06 g/mL) hasta llegar a pH = 6. La mezcla se concentró a



sequedad y se añadió MeOH frío para precipitar las sales formadas. El filtrado obtenido se concentró a sequedad obteniéndose así **22**.

**Método B**<sup>218</sup>

A una suspensión de la 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldehído (**18**) en EtOH 95% (4 mL) se adicionó una disolución de AgNO<sub>3</sub> (1.01 mmol) en H<sub>2</sub>O (1.7 mL). Posteriormente se adicionó, lentamente y durante 30 minutos, una disolución de NaOH 1 M (4.2 mL). La mezcla se mantuvo con agitación y a temperatura ambiente durante 18 horas y luego se filtró sobre celita a vacío. El filtrado se concentró a sequedad y se disolvió en 5 mL de H<sub>2</sub>O para posteriormente lavarlo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x 10 mL). La fase acuosa se acidificó con HCl 1M formándose un sólido amarillo que se dejó precipitando una noche. De este modo se obtuvieron 262 mg de ácido 1,10-fenantrolina 4,7-dicarboxílico como un sólido amarillo.

**Rdto.:** 86%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 8.86 (d,  $J = 4.6$  Hz, 2H, H-2,9), 7.96 (s, 2H, H-5,6), 7.55 (d,  $J = 4.6$  Hz, 2H, H-3,8).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 149.3, 145.7, 145.5, 136.4, 124.3, 122.9, 120.2.

**EM** (ESI, m/z) para C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 267.08

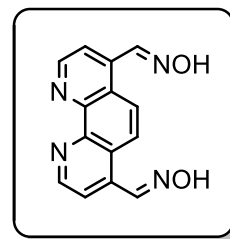
Encontrado: 267.09

---

<sup>218</sup> McCafferty, D. G.; Bishop, B. M.; Wall, C. G.; Hughes, S. G.; Mecklenberg, S.L.; Meyer, T. J.; Erickson, B. W. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 1093-1106.

### 1,10-fenantrolina 4,7-dicarboxima (**24**)<sup>186a</sup>

A una disolución de la 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldehído (**18**) (236 mg, 1 mmol) en EtOH (15 mL) se adicionó piridina (885  $\mu$ L, 3.3 mmol) y clorohidrato de hidroxilamina (400 mg, 6.7 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas y posteriormente, se concentró a sequedad, se disolvió en la mínima cantidad de MeOH y se añadió Et<sub>2</sub>O frío. El precipitado obtenido se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a sequedad obteniéndose así 160 mg del compuesto **24** como un sólido verde-grisáceo.



Rdto.: 60%

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 12.11 (s, 2H, NOH), 9.12 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, H-2,9), 8.98 (s, 2H, H-5,6), 8.63 (s, 2H, CH-NOH), 7.99 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, H-3,8).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 149.3, 145.7, 145.5, 136.4, 124.3, 122.9, 120.2.

EM (ESI, *m/z*) para C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 267.08

Encontrado: 267.09

#### 4.1.3.1 Preparación de aminometil derivados

##### ◆ Procedimiento general H para la preparación de las iminas **28a-c**

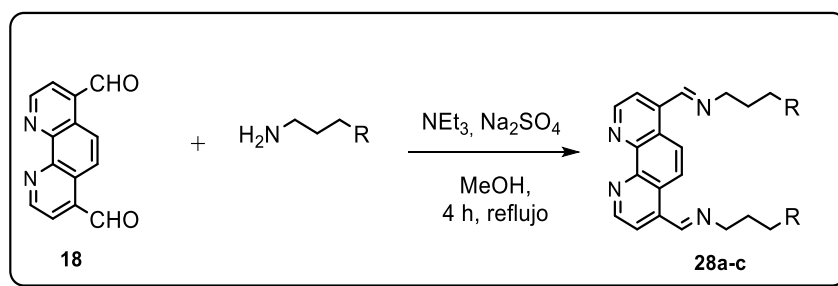


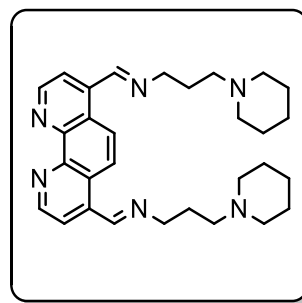
Figura 127. Esquema para la preparación de las iminas **28a-c**

Se disolvió el dialdehído **18** (150 mg, 0.63 mmol) en MeOH anhidro (10 mL) en atmósfera de argón. Posteriormente, se adicionaron NEt<sub>3</sub> (528  $\mu$ L, 3.78 mmol), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

anhidro (312 mg, 2.2 mmol) y la propilamina correspondiente (1.6 mmol). La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante 4 horas y a continuación se concentró a sequedad obteniéndose la correspondiente iminas **28a-c**.

#### **4,7-Bis[3-(piperidin-1-il)-N-metilenpropilimino] 1,10-fenantrolina (28a)**

Siguiendo el procedimiento general **H**, se preparó el producto **28a** a partir de la 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldéido (**18**),  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y 3-(1-piperidinil)propilamina (**9a**) (227 mg, 1.6 mmol) obteniéndose así 251 mg del producto deseado como un aceite marrón.

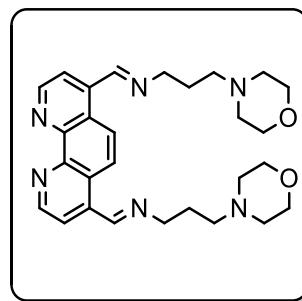


**Rdto.:** 82%

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 9.27 (d,  $J = 4.6$  Hz, 2H, H-2,9), 9.04 (s, 2H,  $\text{H}_a$ ), 8.81 (s, 2H, H-5,6), 7.96 (d,  $J = 4.6$  Hz, 2H, H-3,8), 3.87 (t,  $J = 6.7$  Hz, 4H,  $\text{H}_b$ ), 3.14-3.04 (m, 4H,  $\text{H}_d$ ), 2.61 (m, 8H,  $\text{H}_\alpha$ ), 2.15-2.03 (m, 4H,  $\text{H}_c$ ), 1.96-1.81 (m, 8H,  $\text{H}_\beta$ ), 1.70 (m, 4H,  $\text{H}_\gamma$ ).

#### **4,7-Bis[3-(morfolino-4-il)-N-metilenpropilimino] 1,10-fenantrolina (28b)**

Siguiendo el procedimiento general **H**, se preparó el producto **28b** a partir de la 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldéido (**18**),  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y 3-(4-morfolino)propilamina (**9b**) (232 mg, 1.6 mmol) obteniéndose así 216 mg del producto deseado como un aceite marrón.

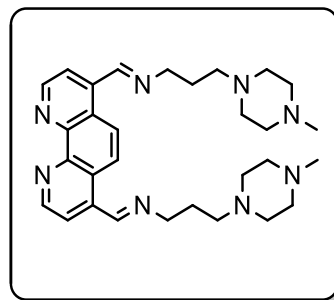


**Rdto.:** 70%

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 9.31 (d,  $J = 4.6$  Hz, 2H, H-2,9), 9.01 (s, 2H,  $\text{H}_a$ ), 8.83 (s, 2H, H-5,6), 7.97 (d,  $J = 4.6$  Hz, 2H, H-3,8), 3.80-3.70 (m, 4H,  $\text{H}_\beta$ ), 3.28-3.16 (m, 4H,  $\text{H}_b$ ), 2.62-2.41 (m, 12H,  $\text{H}_d + \text{H}_\alpha$ ), 2.05 (m, 4H,  $\text{H}_c$ ).

**4,7-Bis{3-[(4-metil)piperazin-il]-N-metilenpropilimino}1,10-fenantrolina (27c)**

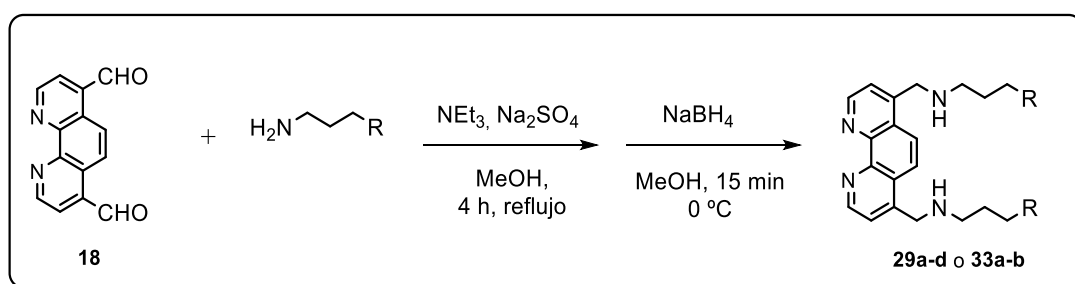
Siguiendo el procedimiento general H, se preparó el producto **28c** a partir de la 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldéido (**18**), NEt<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y 3-(4-metil-1-piperacín)propilamina (274 mg, 1.6 mmol) obteniéndose así 211 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 65%

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) 9.27 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, H-2,9), 9.01 (s, 2H, H<sub>a</sub>), 8.81 (s, 2H, H-5,6), 7.95 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, H-3,8), 3.86 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H, H<sub>b</sub>), 2.64-2.37 (m, 12H, H<sub>d</sub> + H<sub>α</sub>), 2.30 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.04 (m, 4H, H<sub>c</sub>).

♦ **Procedimiento general I para la preparación de los derivados 29a-d y 33a-b**

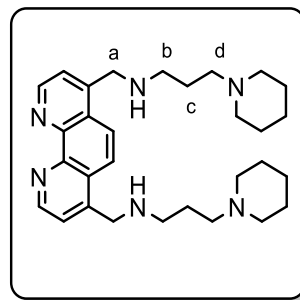


**Figura 128.** Esquema para la preparación de los derivados **29a-d** y **32a-b**

Se disolvió el dialdehído **18** (150 mg, 0.63 mmol) en MeOH anhidro (10 mL) en atmósfera de argón. Posteriormente, se adicionaron NEt<sub>3</sub> (528 μL, 3.78 mmol), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro (312 mg, 2.2 mmol) y la propilamina correspondiente (1.6 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación y a reflujo durante 4 horas. A continuación, se enfrió la mezcla a 0 °C, se adicionó NaBH<sub>4</sub> (94 mg, 2.52 mmol) y se mantuvo con agitación y a 0 °C durante 15 minutos. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el crudo resultante se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó con H<sub>2</sub>O (2x10 mL), salmuera (10 mL) y de nuevo con H<sub>2</sub>O (2x10 mL). La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y concentró a seco obteniéndose así el producto deseado.

**4,7-Bis[3-(piperidin-1-il)-N-metilenpropilamino]1,10-fenantrolina (29a)**

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el producto **29a** a partir del dialdehído **18**, NEt<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y 3-(1-piperidinil)propilamina (**9a**) (227 mg, 1.6 mmol) obteniéndose así 190 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 62%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 9.08 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-2,9), 8.08 (s, 2H, H-5,6), 7.62 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-3,8), 4.27 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 2.77 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H, H<sub>b</sub>), 2.68 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H, H<sub>d</sub>), 2.33 (m, 8H, H<sub>α</sub>), 1.80-1.66 (m, 4H, H<sub>c</sub>), 1.66-1.43 (m, 8H, H<sub>β</sub>), 1.39 (m, 4H, H<sub>γ</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 149.9, 146.3, 145.6, 126.6, 121.8, 57.8, 54.7, 50.5, 49.0, 27.0, 26.0, 24.4.

**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 489.36

Encontrado: 489.33

C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>6</sub> [M + 2H]<sup>2+</sup>:

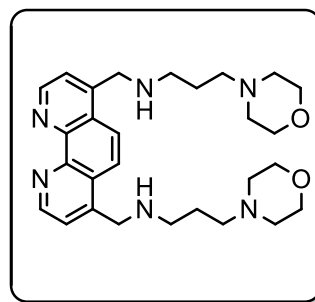
Calculado: 245.18

Encontrado: 245.23



### 4,7-Bis[3-(morfolin-4-il)-N-metilenpropilamino]1,10-fenantrolina (29b)

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el producto **29b** a partir de la 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldéido (**18**),  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y 3-(4-morfolino)propilamina (**9b**) (232 mg, 1.6 mmol) obteniéndose así 164 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 53%

**$^1\text{H-RMN}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 9.07 (d,  $J = 4.5$  Hz, 2H, H-2,9), 8.07 (s, 2H, H-5,6), 7.61 (d,  $J = 4.5$  Hz, 2H, H-3,8), 4.26 (s, 4H,  $\text{H}_a$ ), 3.74-3.57 (m, 8H,  $\text{H}_\beta$ ), 2.81-2.74 (m, 4H,  $\text{H}_b$ ), 2.46-2.29 (m, 12H,  $\text{H}_d + \text{H}_\alpha$ ), 1.72 (q,  $J = 6.8$  Hz, 4H,  $\text{H}_c$ ).

**$^{13}\text{C-RMN}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 149.9, 146.3, 145.5, 126.6, 121.8, 121.8, 66.9, 57.3, 53.8, 50.5, 48.6, 26.7.

**EM** (ESI, m/z) para  $\text{C}_{28}\text{H}_{41}\text{N}_6$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :

Calculado: 493.32

Encontrado: 492.41

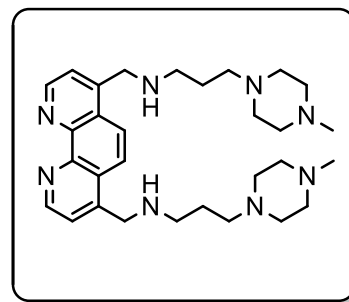
$\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_6$   $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ :

Calculado: 247.16

Encontrado: 247.22

### 4,7-Bis[3-[(4-metil)piperazin-il]-N-metilenpropilamino]1,10-fenantrolina (29c)

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el compuesto **29c** a partir de la 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldéido (**18**),  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y 3-(4-metil-1-piperacínil)propilamina (274 mg, 1.6 mmol) obteniéndose así 209 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 65%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 9.11 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-2,9), 8.10 (s, 2H, H-5,6), 7.65 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-3,8), 4.26 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 2.82 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H, H<sub>b</sub>), 2.66-2.34 (m, 20H, H<sub>α</sub> + H<sub>β</sub> + H<sub>d</sub>), 1.77 (q, *J* = 6.6 Hz, 4H, H<sub>c</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 150.4, 146.7, 146.0, 127.0, 122.3, 57.4, 55.5, 53.6, 51.0, 49.2, 46.4, 27.4.

**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>30</sub>H<sub>47</sub>N<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 519.38

Encontrado: 519.38

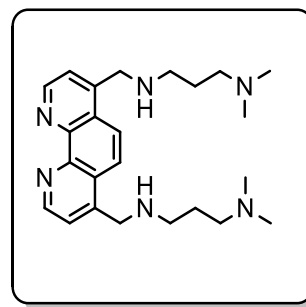
C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>N<sub>8</sub> [M+2H]<sup>2+</sup>:

Calculado: 260.19

Encontrado: 260.30

#### 4,7-Bis{3-[*N,N'*-dimetilamino]-*N*-metilpropilamino}1,10-fenantrolina (29d)

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el compuesto **29d** a partir de la 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldéido (**18**), NEt<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y *N,N'*-dimetilpropanodiamina (232 mg, 1.6 mmol) obteniéndose así 123 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 43%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 9.13 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-2,9), 8.13 (s, 2H, H-5,6), 7.65 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-3,8), 4.32 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 2.82 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H, H<sub>b</sub>), 2.37 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H, H<sub>d</sub>), 2.12 (s, 12H, NCH<sub>3</sub>), 1.75 (q, *J* = 6.8 Hz, 4H, H<sub>c</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 149.9, 146.3, 145.6, 126.6, 121.8, 77.4, 77.0, 76.5, 57.8, 50.4, 48.3, 27.7.

**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 409.30

Encontrado: 409.36

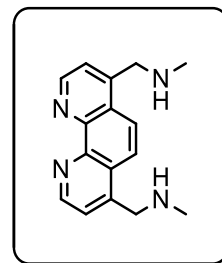
C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub> [M+2H]<sup>2+</sup>:

Calculado: 205.15

Encontrado: 205.20

#### 4,7-Bis-(N-metil)aminometil 1,10-fenantrolina (29e)

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el compuesto **29e** a partir de la 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldéido (**18**) (319 mg, 1.35 mmol), NEt<sub>3</sub> (1.13 mL, 8.10 mmol), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y metilamina (1 mL, 8.10 mmol). De este modo se obtuvieron 104 mg del producto deseado como un aceite amarillo.



Rto.: 29 %

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 9.07 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-2,9), 8.07 (s, 2H, H-5,6), 7.61 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-3,8), 4.27 (s, 2H, H<sub>a</sub>), 2.59 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 148.5, 148.2, 142.1, 127.3, 120.4, 119.8, 51.4, 36.5.

EM (ESI, m/z) para C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 267.15

Encontrado: 267.16

#### ♦ Procedimiento<sup>193</sup> general J para la síntesis de las aminas 30a-b

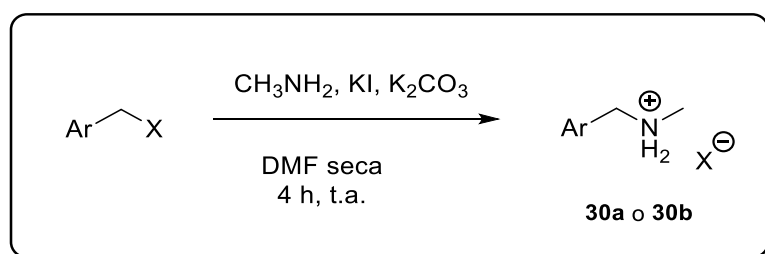


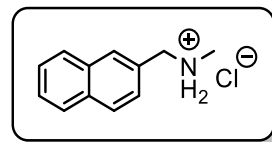
Figura 129. Esquema para la preparación de las aminas 30a-b

Se adicionaron K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> y KI a una disolución del correspondiente derivado halogenado en DMF seca (15 mL). La reacción se mantuvo con agitación, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón, durante 4 horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad para posteriormente disolver el residuo resultante en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y lavarlo con H<sub>2</sub>O (2x10 mL). Por último, se adicionó una disolución de HCl 1M sobre la

fase orgánica hasta alcanzar pH ácido. De este modo se obtuvo el correspondiente hidrocloruro.

### Cloruro de *N*-metil-*N*-(naftaleno-2-metil)amonio (30a)

Siguiendo el procedimiento general **J**, se preparó el producto **30a** a partir del 2-bromometilnaftaleno (484 mg, 2.19 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (669 mg, 4.82 mmol), CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> (2.7 mL, 21.9 mmol) y KI (363 mg, 2.19 mmol). El aceite obtenido en el proceso de elaboración se trató con HCl 1 M hasta pH ácido. Se formaron dos fases que se separaron por decantación. La fase acuosa se concentró a sequedad, obteniendo 390 mg del cloruro de *N*-metil-*N*-(naftaleno-2-metil)amonio como un sólido blanco perla.



**Rto.:** 86 %

**P.f.** (°C): 225-227

**IR** (KBr),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3427, 3052, 2435, 1421, 1127.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 7.77 (m, 4H, H-1,4,5,8 Naft), 7.42 (m, 2H, H-6,7 Naft), 7.32 (dd, *J* = 8.4, 1.3 Hz, 1H, H-3 Naft), 3.93 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.51 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 133.2, 132.8, 129.6, 129.1, 128.1, 127.8, 127.3, 127.0, 126.5, 52.6, 32.3.

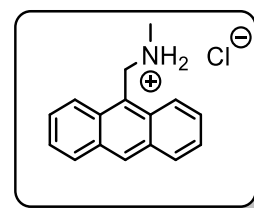
**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N [M-Cl]<sup>+</sup>:

Calculado: 172.10

Encontrado: 172.10

### Cloruro de *N*-(antraceno-9-metil)-*N*-metilamonio (30b)

Siguiendo el procedimiento general **J**, se preparó el producto **30b** a partir del 9-clorometilantraceno (368 mg, 1.62 mmol), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (492 mg, 3.56 mmol), CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> (2 mL, 16.2 mmol) y KI (269 mg, 1.62 mmol). El aceite obtenido en el proceso de elaboración se trató con HCl 1 M hasta pH ácido. El precipitado resultante se filtró a vacío y se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, obteniendo así 325 mg del cloruro de *N*-(antraceno-9-metil)-*N*-metilamonio como un sólido blanco amarillo.



Rto.: 78%

P.f. (°C): 253-255

IR (KBr)  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3689, 3174, 2914, 2441, 1463, 1391.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 8.56 (s, 1H, H-10 Antr), 8.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-1,8 Antr), 8.03 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-4,5 Antr), 7.59 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-2,7 Antr), 7.49 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H-3,6 Antr), 5.11 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.73 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

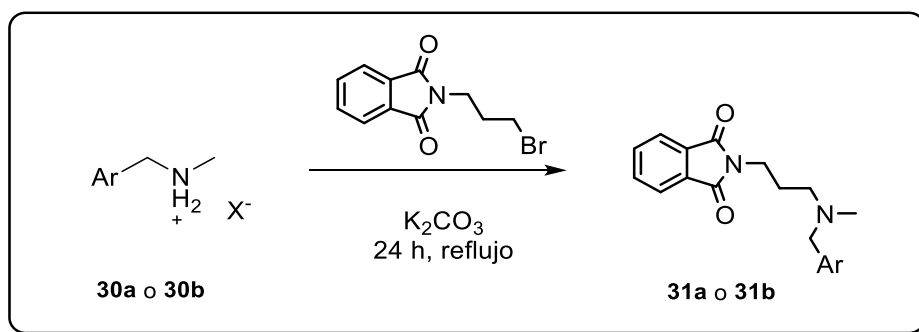
<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, D<sub>2</sub>O),  $\delta$  (ppm): 130.5, 130.2, 129.9, 129.3, 127.6, 125.4, 122.3, 120.2, 43.8, 32.8.

EM (ESI, m/z) para C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N [M-Cl]<sup>+</sup>:

Calculado: 222.12

Encontrado: 222.30

◆ **Procedimiento general K para la obtención de 31a-b**

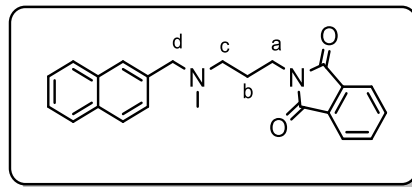


**Figura 130.** Esquema sintético para la preparación de las aminas **31a-b**

A una disolución de la *N*-(3-bromopropil)ftalimida en CH<sub>3</sub>CN (15 mL) se adicionaron K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y una disolución del compuesto **30a** o **30b** en CH<sub>3</sub>CN (5 mL). La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo durante 24 horas y después se concentró a sequedad. El aceite obtenido se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó con H<sub>2</sub>O (3x5 mL) y, por último, la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a sequedad.

**2-(3-Metil(naftaleno-2-metil)aminopropil)isoindolina-1,3-diona (31a)**

Siguiendo el procedimiento general **K**, se preparó el producto **31a** a partir de la *N*-(3-bromopropil)ftalimida (65 mg, 0.24 mmol),  $K_2CO_3$  (84 mg, 0.60 mmol) y de la amina **30a** (42 mg, 0.20 mmol). Se obtuvieron así 64 mg del producto deseado como un aceite anaranjado.



**Rto.:** 89%

**$^1H$ -RMN** (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 7.92-7.61 (m, 4H, H-1,4,5,8 Naft), 7.52-7.35 (m, 7H, H-3,6,7 Naft + 4H ftalimida), 3.78 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H,  $H_a$ ), 3.63 (s, 2H,  $H_d$ ), 2.53 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H,  $H_c$ ), 2.21 (s, 3H,  $CH_3$ ), 1.95 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H,  $H_b$ ).

**$^{13}C$ -RMN** (75 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 168.3, 134.0, 133.8, 133.1, 132.0, 128.0, 127.7, 127.6, 127.3, 126.0, 125.8, 123.3, 123.1, 61.9, 54.4, 41.9, 36.1, 25.8.

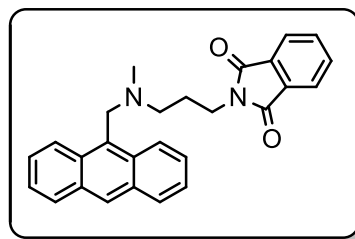
**EM** (ESI, m/z) para  $C_{23}H_{23}N_2O_2$   $[M+H]^+$ :

Calculado: 359.17

Encontrado: 359.37

**2-(3-Metil(antraceno-9-metil)aminopropil)isoindolina-1,3-diona (31b)**

Siguiendo el procedimiento general **K**, se preparó el producto **31b** a partir de *N*-(3-bromopropil)ftalimida (382 mg, 1.43 mmol),  $K_2CO_3$  (1.18 g, 8.56 mmol) y de la amina **30b** (368 mg, 1.43 mmol). Se obtuvieron de este modo 371 mg del producto deseado como un aceite amarillo.



**Rto.:** 64%

**IR** (KBr)  $\bar{\nu}$  ( $cm^{-1}$ ): 3391, 3063, 2923, 1723, 1525, 1156.

**$^1H$ -RMN** (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 8.48 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, H-1,8 Antr), 8.00-7.94 (d+s, 3H, H-10,4,5 Antr), 7.75-7.65 (m, 4H, H-2,3,6,7 Antr), 7.55-7.38 (m, 4H, ftalimida), 4.44

(s, 2H, H<sub>d</sub>), 3.64 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H<sub>a</sub>), 2.67 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.94 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H, H<sub>b</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 168.3, 134.0, 133.8, 131.3, 131.2, 128.9, 127.4, 125.6, 125.0, 124.7, 123.3, 123.1, 55.1, 42.0, 36.3, 31.4, 26.4.

EM (ESI, *m/z*) para C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 409.18

Encontrado: 409.53

#### ◆ Procedimiento general L para la síntesis de 32a-b

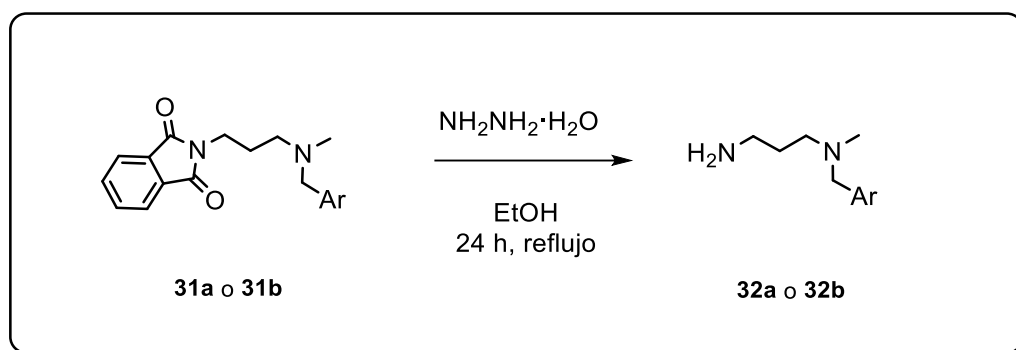
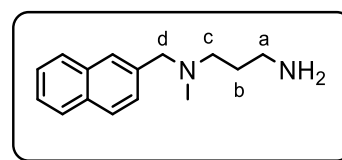


Figura 131. Esquema para la preparación de las aminas 32a-b

Una mezcla de **31a** o **31b** y monohidrato de hidracina en EtOH (30 mL) se calentó a reflujo bajo atmósfera de argón durante 24 horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el crudo obtenido se disolvió en 5 mL de CHCl<sub>3</sub> y se dejó con agitación durante 12 horas. Transcurrido ese tiempo, se eliminó por filtración el sólido formado y el filtrado obtenido se concentró a sequedad obteniéndose el correspondiente producto.

#### *N*<sup>1</sup>-metil-*N*<sup>1</sup>-(naftaleno-2-metil)propan-1,3-diamina (**32a**)

Siguiendo el procedimiento general L, se preparó el producto **32a** a partir de **31a** (312 mg, 0.871 mmol) y de monohidrato de hidracina (423 μL, 8.71 mmol). De este modo se obtuvieron 113 mg de la *N*<sup>1</sup>-metil-*N*<sup>1</sup>-(naftaleno-2-metil)propan-1,3-diamina como un aceite incoloro.



**Rto.:** 72%

**IR** (NaCl)  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3288, 3054, 2852, 1657, 1463, 1122.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 7.86-7.71 (m, 4H, H-1,4,5,8 Naft), 7.51-7.40 (m, 3H, H-3,6,7 Naft), 3.63 (s, 2H, H<sub>d</sub>), 2.75 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H<sub>c</sub>), 2.47 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H, H<sub>a</sub>), 2.24 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.68 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H, H<sub>b</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 137.1, 133.5, 132.9, 128.1, 127.8, 127.6, 127.4, 126.1, 125.7, 63.0, 55.5, 42.7, 40.9, 31.4.

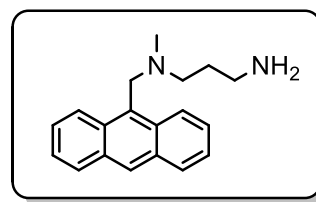
**EM** (ESI, m/z) para C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 229.16

Encontrado: 229.35

***N*<sup>1</sup>-(antraceno-9-metil)-*N*<sup>1</sup>-metilpropan-1,3-diamina (32b)**

Siguiendo el procedimiento general **L**, se preparó el producto **32b** a partir del compuesto **31b** (262 mg, 0.642 mmol) y monohidrato de hidracina (311  $\mu$ L, 6.42 mmol). De este modo se obtuvieron 128 mg de la *N*<sup>1</sup>-(antraceno-9-metil)-*N*<sup>1</sup>-metilpropan-1,3-diamina, como un aceite amarillo.



**Rto:** 72%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.45 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-1,8 Antr), 8.39 (s, 1H, H-10 Antr), 7.98 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-4,5), 7.59-7.35 (m, 4H, H-2,3, 6, 7 Antr), 4.41 (s, 2H, H<sub>d</sub>), 2.61 (m, 4H, H<sub>a</sub> + H<sub>c</sub>), 2.29 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.67 (m, 2H, H<sub>b</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 132.2, 130.6, 129.8, 128.9, 128.7, 125.9, 125.9, 125.3, 59.0, 56.3, 43.0, 40.0, 28.2.

**EM** (ESI, m/z) para C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

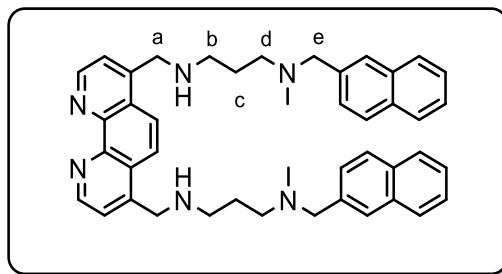
Calculado: 279.18

Encontrado: 279.16



**4,7-Bis-*N,N'*-(*N*-metil-*N*-(naftaleno-2-metil)aminopropil)aminometil-1,10-fenantrolina (33a)**

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el producto **33a** a partir del dialdehído **18** (47 mg, 0.198 mmol), NEt<sub>3</sub> (167 μL, 1.19 mmol), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y de la *N*<sup>1</sup>-metil-*N*<sup>1</sup>-(naftaleno-2-metil)propan-1,3-diamina (**32a**) (113 mg, 0.5 mmol). En este caso, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 18 horas. Posteriormente, se llevó a cabo la reducción en las mismas condiciones descritas en el procedimiento general I. De este modo se obtuvieron 45 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rto.:** 35 %

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 9.05 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H, H-2,9), 7.98 (s, 2H, H-5,6), 7.78-7.55 (m, 8H, H-1,4,5,8 Naft), 7.52 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H, H-3,8), 7.45-7.32 (m, 6H, H-3,6,7 Naft), 4.22 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 3.63 (s, 4H, H<sub>e</sub>), 2.82 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H, H<sub>b</sub>), 2.51 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H, H<sub>d</sub>), 2.26 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.90-1.65 (m, 4H, H<sub>c</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 163.8, 150.3, 146.6, 145.8, 136.8, 133.4, 132.8, 128.2, 128.1, 127.8, 127.8, 127.7, 127.4, 126.9, 126.2, 125.8, 122.3, 122.0, 63.0, 57.0, 55.9, 50.8, 48.9, 42.8, 30.1, 27.7.

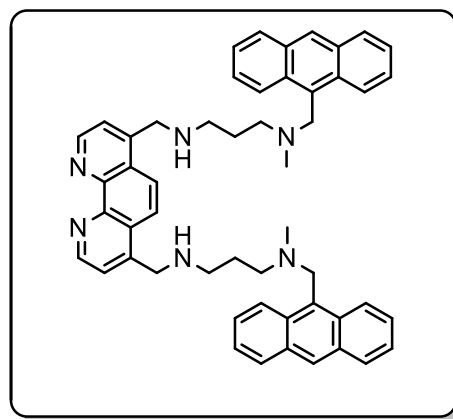
**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>44</sub>H<sub>49</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 661.39

Encontrado: 661.43

**4,7-Bis-*N,N'*-(*N*-metil-*N*-(antraceno-9-metil)aminopropil)aminometil 1,10-fenantrolina (33b)**

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el producto **33b** a partir del dialdehído **18** (43 mg, 0.18 mmol), NEt<sub>3</sub> (154 μL, 1.10 mmol), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y *N*<sup>1</sup>-(antraceno-9-metil)-*N*<sup>1</sup>-metilpropan-1,3-diamina (**32b**) (128 mg, 0.46 mmol). En este caso, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 18 horas. Posteriormente, se llevó a cabo la reducción en las mismas condiciones descritas en el procedimiento general I. De este modo se obtuvieron 40 mg del producto deseado como un aceite amarillo.



**Rto.:** 29 %

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 9.09 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, H-2,9), 8.56 (d, *J* = 8.6 Hz, 4H, H-1,8 Antr), 8.43 (s, 4H, H-10 Antr + H-5,6), 8.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 4H, H-4,5 Antr), 7.84 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, H-3,8), 7.54 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H, H-3,6 Antr), 7.44 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H, H-2,7 Antr), 4.56 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 3.92 (s, 4H, H<sub>e</sub>), 2.89-2.62 (m, 8H, H<sub>b</sub> + H<sub>d</sub>), 2.57 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.00-1.73 (m, 4H, H<sub>c</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 149.9, 145.9, 145.4, 131.2, 131.1, 130.1, 129.0, 127.5, 125.6, 124.7, 121.4, 120.9, 54.8, 54.4, 49.9, 48.3, 42.2, 26.8.

**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>52</sub>H<sub>53</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

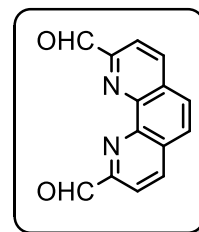
Calculado: 761.43

Encontrado: 761.45

#### 4.1.4 Síntesis de derivados de la 1,10-fenantrolina sustituidos en las posiciones 2 y 9

##### 1,10-Fenantrolina 2,9-dicarbaldéhidó (34)

Se disolvió la 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (1.12 g, 5.3 mmol) en 65 mL de una mezcla de dioxano/agua (96:4, v/v). A continuación, se adicionó  $\text{SeO}_2$  (2.64 g, 23.82 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se filtró, en caliente sobre celita y a vacío. Por último, el filtrado se dejó enfriando a temperatura ambiente durante una noche. El precipitado se filtró a vacío y se lavó con dioxano obteniéndose 910 mg del producto deseado.



Rdto.: 73%

P.f.: 243-244 °C

IR (KBr),  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3600-2800, 1625, 1515, 1120, 1105, 1005, 1000, 875, 825.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz, DMSO),  $\delta$  (ppm): 10.32 (s, 2H, CHO), 8.76 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-3,8), 8.28 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-4,7), 8.26 (s, 2H, H-5,6).

$^{13}\text{C-RMN}$  (75 MHz, DMSO),  $\delta$  (ppm): 194.1, 152.6, 145.7, 138.9, 131.9, 129.7, 120.6.

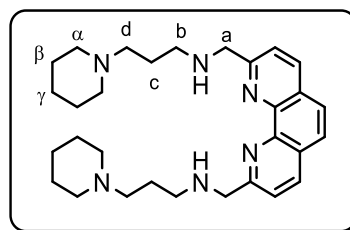
EM (ESI, m/z) para  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :

Calculado: 237.07

Encontrado: 237.12

##### 2,9-Bis[3-(piperidin-1-il)-N-metilenpropilamino] 1,10-fenantrolina (35a)

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el producto **35a** a partir del dialdehído **34**,  $\text{NEt}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y de la 3-(1-piperidinil)propilamina (**9a**) (227 mg, 1.60 mmol) obteniéndose así 174 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 56%

**IR** (KBr),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3370, 2923, 1589, 1455, 1260.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.19 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, H-3,8), 7.77 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, H-4,7), 7.73 (s, 2H, H-5,6), 4.28 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 2.75 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 4H, H<sub>b</sub>), 2.40-2.27 (m, 12H, H<sub>d</sub> + H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.72 (m, 4H, H<sub>c</sub>), 1.53 (m, 8H, H <sub>$\beta$</sub> ), 1.39 (m, 4H, H <sub>$\gamma$</sub> ).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 161.0, 136.5, 127.7, 125.8, 125.5, 122.0, 57.7, 54.7, 48.7, 30.3, 27.3, 26.0, 24.5.

**EM** (ESI, m/z) para C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 489.36

Encontrado: 489.37

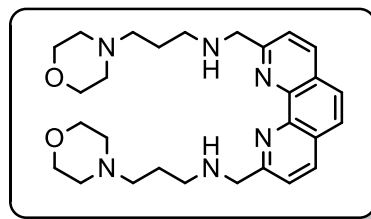
C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>N<sub>6</sub> [M+2H]<sup>2+</sup>:

Calculado: 245.18

Encontrado: 245.19

### **2,9-Bis[3-(morfolin-4-il)-N-metilenpropilamino]1,10-fenantrolina (35b)**

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el producto **35b** a partir de la 1,10-fenantrolina 2,9-dicarbaldéido (**34**), NEt<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y 3-(1-piperidinil)propilamina (**9b**) (232 mg, 1.60 mmol) obteniéndose así 135 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 43%

**IR** (NaCl),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3390, 2851, 1644, 1498, 1261.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.21 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-3,8), 7.76 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2H, H-4,7), 7.75 (s, 2H, H-5,6), 4.30 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 3.67 (m, 8H, H <sub>$\beta$</sub> ), 2.83 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 4H, H<sub>d</sub>), 2.44 (sa, 12H, H<sub>b</sub> + H <sub>$\alpha$</sub> ), 1.83-1.76 (m, 4H, H<sub>c</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 160.7, 145.2, 136.6, 127.8, 125.9, 122.1, 67.0, 57.2, 56.2, 53.7, 48.4, 26.8.

**EM** (ESI, m/z) para  $C_{28}H_{41}N_6$   $[M+H]^+$ :

Calculado: 493.32

Encontrado: 493.34

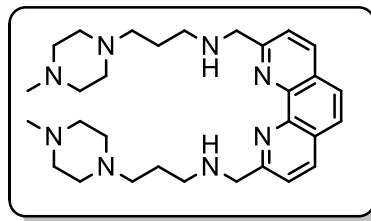
$C_{28}H_{40}N_6$   $[M+2H]^{2+}$ :

Calculado: 247.16

Encontrado: 247.19

**2,9-Bis{3-[(4-metil)piperacínil]-N-metilenpropilamino} 1,10-fenantrolina (35c)**

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el producto **35c** a partir de la 1,10-fenantrolina 2,9-dicarbaldéido (**34**),  $NEt_3$ ,  $Na_2SO_4$  anhidro y de la 3-(4-metil-1-piperacínil)propilamina (274 mg, 1.60 mmol) obteniéndose así 183 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 55%

**IR** (NaCl),  $\bar{\nu}$  ( $cm^{-1}$ ): 3370, 3063, 2936, 2325, 1620, 1147.

**$^1H$ -RMN** (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 8.20 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-3,8), 7.75 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H-4,7), 7.25 (s, 2H, H-5,6), 4.30 (s, 4H,  $H_a$ ), 2.81 (t,  $J = 6.9$  Hz, 4H,  $H_b$ ), 2.50-2.41 (m, 16H,  $H_\alpha + H_\gamma$ ), 2.26 (sa, 10H,  $H_d + CH_3$ ), 1.89-1.71 (m, 4H,  $H_c$ ).

**$^{13}C$ -RMN** (75 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 162.5, 144.9, 136.7, 127.9, 126.1, 122.2, 57.1, 56.6, 55.5, 53.6, 48.9, 46.4, 27.6.

**EM** (ESI, m/z) para  $C_{30}H_{47}N_8$   $[M+H]^+$ :

Calculado: 519.38

Encontrado: 519.41

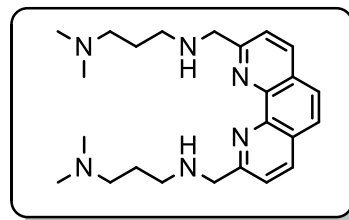
$C_{30}H_{47}N_8$   $[M+2H]^{2+}$ :

Calculado: 260.19

Encontrado: 260.22

**2,9-Bis{3-[N',N'-dimetilamino]-N-metilenpropilamino} 1,10-fenantrolina (35d)**

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el producto **35d** a partir de la 1,10-fenantrolina 2,9-dicarbaldéido (**34**), NEt<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y N,N'-dimetilpropanodiamina (232 mg, 1.60 mmol) obteniéndose así 151 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 58%

**IR** (KBr),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3370, 3063, 2936, 2325, 1620, 1147.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3,8), 7.75 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-4,7), 7.72 (s, 2H, H-5,6), 4.26 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 2.81 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H, H<sub>b</sub>), 2.38 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H, H<sub>d</sub>), 2.22 (s, 12H, CH<sub>3</sub>), 1.76 (q, *J* = 6.6 Hz, 4H, H<sub>c</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 162.5, 144.9, 136.7, 127.9, 126.1, 122.2, 57.1, 56.6, 55.5, 53.6, 48.9, 46.4, 27.6.

**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 409.30

Encontrado: 409.58

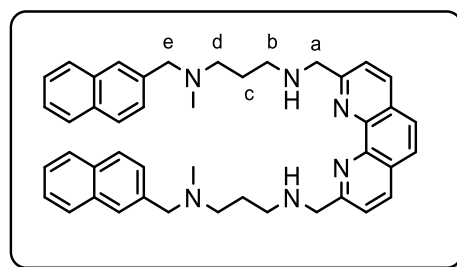
C<sub>24</sub> H<sub>38</sub> N<sub>6</sub> [M+2H]<sup>2+</sup>:

Calculado: 205.15

Encontrado: 205.28

**2,9-Bis-N,N'-(N-metil-N-(naftaleno-2-metil)aminopropil)aminometil-1,10-fenantrolina (36a)**

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el producto **36a** a partir de la 1,10-fenantrolina-2,9-dicarbaldéido (**34**), NEt<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y N,N'-dimetilpropanodiamina (232 mg, 1.60 mmol) obteniéndose así 151 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 87%

**IR** (KBr),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3361, 3053, 2344, 1974, 1589, 1261.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.13 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H, Arom), 7.85 -7.63 (m, 10H, Arom), 7.50 -7.36 (m, 8H, Arom), 4.26 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 3.61 (s, 4H, H<sub>e</sub>), 2.80 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 4H, H<sub>b</sub>), 2.46 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 4H, H<sub>d</sub>), 2.21 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.71 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 4H, H<sub>c</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 160.6, 145.3, 136.9, 136.6, 133.3, 132.7, 127.9, 127.8, 127.6, 127.6, 127.4, 127.3, 127.2, 125.9, 125.5, 122.1, 62.6, 56.1, 48.3, 42.4, 40.2, 29.7.

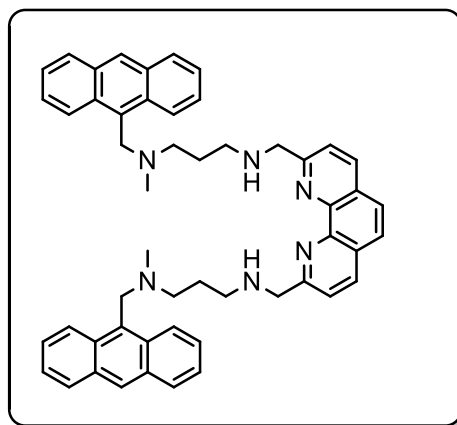
**EM** (ESI, m/z) para C<sub>44</sub>H<sub>49</sub>N<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 661.39

Encontrado: 661.44

**2,9-Bis-*N,N'*-(*N*-metil-*N*-(antraceno-9-metil)aminopropil)aminometil-1,10-fenantrolina (36b)**

Siguiendo el procedimiento general I, se preparó el producto **36b** a partir de la 1,10-fenantrolina-2,9-dicarbaldéido (**34**), NEt<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y de la *N,N'*-dimetilpropanodiamina (232 mg, 1.60 mmol) obteniéndose así 151 mg del producto deseado como un aceite marrón.



**Rdto.:** 70%

**IR** (KBr),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3368, 2922, 2852, 2322, 1740, 1590, 1260.

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.47-8.38 (m, 4H, Arom), 8.35-8.31 (m, 2H, Arom), 8.10 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 2H, Arom), 8.01-7.91 (m, 4H, Arom), 7.71 (s, 2H, Arom), 7.48 -7.35 (m, 10H, Arom), 4.44 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 4.09 (s, 4H, H<sub>e</sub>), 2.69-2.55 (m, 8H, H<sub>b</sub> + H<sub>d</sub>), 2.32 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1.79 (q,  $J$  = 6.6 Hz, 4H, H<sub>c</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm): 157.3, 143.5, 137.5, 132.2, 130.6, 129.8, 128.9,

128.7, 128.5, 125.9, 125.9, 125.8, 125.3, 121.9, 59.0, 55.9, 53.6, 48.4, 43.0, 26.6.

**EM** (ESI, m/z) para  $C_{52}H_{53}N_6$   $[M+H]^+$ :

Calculado: 761.43

Encontrado: 761.48

$C_{52}H_{52}N_6$   $[M+2H]^{2+}$ :

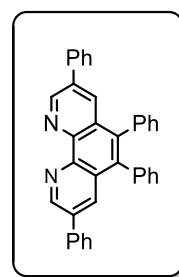
Calculado: 381.21

Encontrado: 381.28

#### 4.1.5 Síntesis de la 3,5,6,8-tetrafenil-1,10-fenantrolina

##### 3,5,6,8-Tetrafenil-1,10-fenantrolina (37)<sup>194</sup>

A una mezcla de tolueno seco (10 mL) y  $Na_2CO_3$  en disolución acuosa 2M (8 mL) en un matraz schlenck se adicionaron 3,5,6,8-tetrabromo-1,10-fenantrolina (200 mg, 0.4 mmol), ácido fenilborónico (293 mg, 2.4 mmol) y  $Pd(PPh_3)_4$  (93 mg, 0.08 mmol). La suspensión se calentó a reflujo y en atmósfera de argón durante 3 días. Después de enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente se vertió sobre agua (20 mL) y se extrajo con  $CHCl_3$  (40 mL). La fase orgánica se concentró a sequedad y el sólido obtenido se lavó con MeOH. De este modo se obtuvieron 117 mg de un sólido amarillo pálido.



**Rdto.:** 60%

**$^1H$ -RMN** (300 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 9.45 (d,  $J = 2.2$  Hz, 2H, H-2,9), 8.10 (d,  $J = 2.2$  Hz, 2H, H-4,7), 7.67-7.58 (m, 4H, H-4 fenilo), 7.54-7.36 (m, 8H, H-2,6 fenilo), 7.36-7.17 (m, 8H, H-3,5 fenilo).

**$^{13}C$ -RMN** (75 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  (ppm): 146.8, 146.3, 138.3, 137.9, 136.8, 131.2, 130.7, 130.1, 129.0, 128.5, 128.1, 126.8.

**EM** (ESI, m/z) para  $C_{36}H_{25}N_2$   $[M+H]^+$ :

Calculado: 485.19

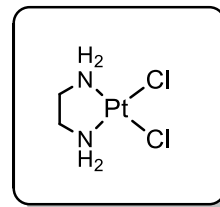
Encontrado: 485.23



#### 4.1.6 Preparación de complejos de Pt(II)

##### **Dicloro(1,2-etanodiamina- $\kappa N^1, \kappa N^2$ ) platino(II) (38)<sup>197</sup>**

A una disolución de tetracloroplatinato(II) de potasio (305 mg, 0.74 mmol) en H<sub>2</sub>O (3 mL) se le adicionó etilendiamina (49  $\mu$ L, 0.74 mmol) y se dejó con agitación durante 45 minutos. A continuación, la mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 2 minutos. Se tomó el sobrenadante, al que se le adicionó etilendiamina de nuevo (49  $\mu$ L, 0.74 mmol) y se dejó con agitación durante otros 45 minutos. Una vez completado este tiempo, se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores, desechando esta vez el sobrenadante. El sólido obtenido se lavó con agua y posteriormente con Et<sub>2</sub>O obteniéndose 151 mg de Pt(en)Cl<sub>2</sub> como un sólido amarillo.



Rto.: 63%

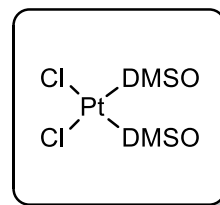
IR (KBr),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3517, 3279, 3203, 2957, 1451, 1366, 1288, 890, 767.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 6.31 (sa, 2H, NH), 6.07 (sa, 2H, NH), 2.53 (sa, 4H, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 48.3, 46.9. (Posible intercambio Cl-DMSO)

##### **Diclorobis[(sulfinil- $\kappa S$ )]bis[metano] platino(II) (39)<sup>219</sup>**

A una disolución de tetracloroplatinato(II) de potasio (219 mg, 0.53 mmol) en H<sub>2</sub>O (3 mL) se le adicionó DMSO (113  $\mu$ L, 1.59 mmol) y se mantuvo con agitación y a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla de reacción se filtró a vacío y se lavó con H<sub>2</sub>O (2 x 2 mL) y con Et<sub>2</sub>O (2 x 2 mL). Así se obtuvieron 155 mg de Pt(DMSO)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como un sólido grisáceo.



Rdto.: 70%

<sup>219</sup> Shahabadi, N.; Heidari, L. *Spectrochim. Acta, Part A* **2014**, *128*, 377-385.

IR (KBr),  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3542, 3178, 3036, 2916, 1571, 1399, 1299, 1156, 1018, 878, 735, 690.

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 3.5 (s+d, 12H, 4CH<sub>3</sub>,  $J_{\text{H-Pt}} = 22.4$  Hz).

#### 4.1.6.1 Síntesis de complejos mixtos de Pt(II) 1:1:1

##### ◆ Procedimiento general M para la preparación de complejos mixtos tipo (1:1:1) <sup>197</sup>

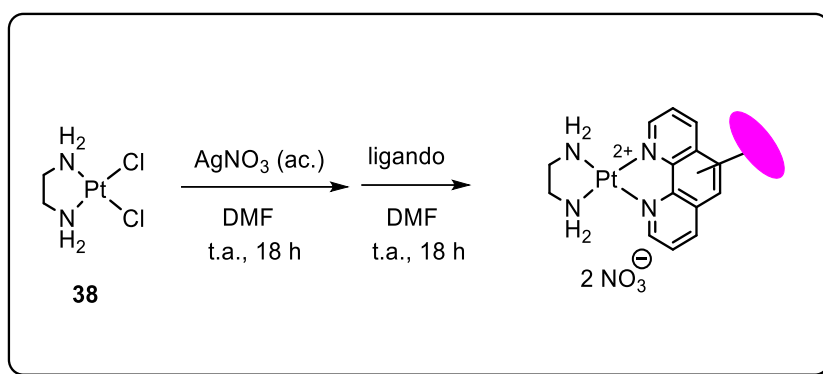


Figura 132. Esquema para la preparación de los complejos mixtos

A una disolución de dicloro(1,2-etanodiamina- $\kappa\text{N}^1, \kappa\text{N}^2$ )platino(II) (**38**) (25 mg, 0.076 mmol) en DMF (2 mL), se adicionó una disolución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  0.1 N (1.53 mL, 0.152 mmol). La mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 18 horas. El  $\text{AgCl}$  precipitado en el medio de reacción se filtró con filtro de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y sobre el filtrado se adicionó el derivado de 1,10-fenantrolina (0.076 mmol). La mezcla de reacción se dejó con agitación durante 18 horas adicionales. Finalmente se concentró a sequedad y el crudo obtenido se lavó con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x5 mL) y con  $\text{EtOH}$  (2x 5 mL).

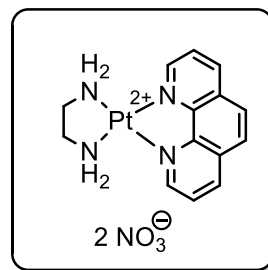
**[Pt(en)(phen)]<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (40)**

Siguiendo el procedimiento general **M**, se preparó el compuesto **40** a partir de la 1,10-fenantrolina (phen) (14 mg, 0.076 mmol) obteniéndose así 23 mg de un sólido blanco.

**Rdto.:** 53 %

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 9.36 -9.01 (m, 4H, H-2,4,7,9), 8.34 (s, 2H, H-5,6), 8.31-8.22 (m, 2H, H-3,8) 6.97 (s, 4H, NH<sub>2</sub>), 2.75 (s, 4H, CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 161.9, 146.4, 141.4, 129.1, 123.8, 121.6, 46.3.



**[Pt(en)(4,7-dmphen)]<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (41a)**

Siguiendo el procedimiento general **M**, se preparó **41a** a partir de la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (4,7-dmphen) (16 mg, 0.076 mmol). Se obtuvieron 23 mg del producto deseado como un sólido beige.

**Rdto.:** 53 %

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 9.09 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz, H-2,9), 8.40 (s, 2H, H-5,6), 8.08 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz, H-3,8), 7.07 (s, 4H, NH<sub>2</sub>), 2.92 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.72 (s, 4H, CH<sub>2</sub>).

**EM** (ESI, m/z) para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>Pt [M-H-2NO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>:

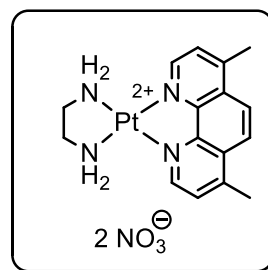
Calculado: 462.11

Encontrado: 462.12

C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>Pt [M-2NO<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>:

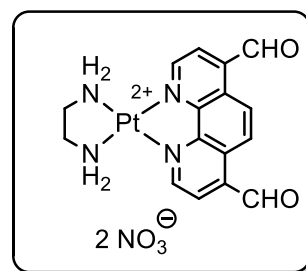
Calculado: 231.50

Encontrado: 231.57



**[Pt(en)(4,7-dCHOphen)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (41b)**

Siguiendo el procedimiento general **M**, se preparó el compuesto **41b** a partir del dialdehído **18** (4,7-dCHOphen) (18 mg, 0.076 mmol). Se obtuvieron de este modo 21 mg de un sólido verde.



**Rdto.:** 42%

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ(ppm): 10.72 (s, 2H), 9.47 (d, *J* = 4.1Hz, 2H), 9.16 (s, 2H), 8.33 (d, *J* = 4.1 Hz, 2H), 6.04 (s, 4H).

**EM** (ESI, m/z) para C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>4</sub>Pt [M-H-2NO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>:

Calculado: 490.08

Encontrado: 490.10

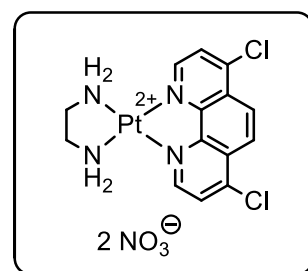
C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>Pt [M-2NO<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>:

Calculado: 245.04

Encontrado: 245.35

**[Pt(en)(DCF)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (41c)**

Siguiendo el procedimiento general **M**, se preparó el compuesto **41c** a partir de la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina (DCF) (19 mg, 0.076 mmol). Se obtuvieron 22 mg del producto deseado como un sólido blanco.



**Rdto.:** 47%

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 9.13 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-2,9), 8.62 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, H-3,8), 8.55 (s, 2H, H-5,6), 6.97 (s, 4H, NH<sub>2</sub>), 2.74 (s, 4H, CH<sub>2</sub>).

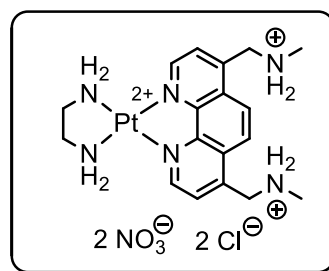
**EM** (ESI, m/z) para C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>Pt [M-H-2NO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>:

Calculado: 503.02

Encontrado: 502.99

**[Pt(en)(4,7-dmamphen)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (41d)**

Siguiendo el procedimiento general **M**, se preparó el compuesto **41d** a partir del bishidrocloruro de la 4,7-bis(*N*-metil-aminometil)-1,10-fenantrolina (4,7-dmamphen) (20 mg, 0.076 mmol) (**29e**). Se obtuvieron así 30 mg del producto deseado como un sólido beige.



**Rdto.:** 61%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 9.80 (s, 4H, NH<sub>2</sub>), 9.31 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, H-2,9), 8.49 (s, 2H, H-5,6), 8.21 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, H-3,8), 5.31 (s, 4H, NH<sub>2</sub> en), 4.93 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 2.76 (s, 4H, CH<sub>2</sub> en), 2.23 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).

**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>Pt [M-2NO<sub>3</sub>-H]<sup>+</sup>:

Calculado: 593.10

Encontrado: 593.10

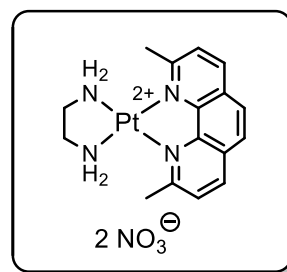
C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>Pt [M -2NO<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>:

Calculado: 297.10

Encontrado: 297.10

**[Pt(en)(2,9-dmphen)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (42a)**

Siguiendo el procedimiento general **M**, se preparó el compuesto **42a** a partir de la 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (2,9-dmphen) (16 mg, 0.076 mmol). Se obtuvieron de este modo 15 mg del producto deseado como un sólido blanco.



**Rdto.:** 35%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 8.68 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3,8), 8.13 (s, 2H, H-5,6), 7.93 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-4,7), 6.02 (s, 4H, NH<sub>2</sub> en), 3.38 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.74 (s, 4H, CH<sub>2</sub> en).

**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>4</sub>Pt [M-H-2NO<sub>3</sub>]<sup>+</sup>:

Calculado: 462.11

Encontrado: 462.12

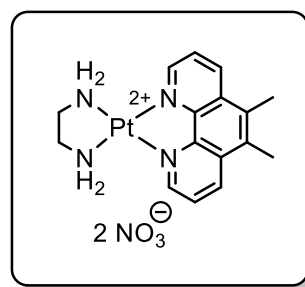
$C_{16}H_{20}N_4Pt [M-2NO_3]^{2+}$ :

Calculado: 231.50

Encontrado: 231.57

**[Pt(en)(5,6-dmphen)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (43)**

Siguiendo el procedimiento general **M**, se preparó el compuesto **43** a partir de la 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina (5,6-dmphen) (16 mg, 0.076 mmol). Se obtuvieron así 26 mg del producto deseado como un sólido blanco.



**Rdto.:** 60%

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 9.22 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H-2,9), 9.03 (dd, *J* = 8.6, 5.3, 2H, H-3,8), 8.24 (dd, *J* = 8.6, 5.3 Hz, 2H, H-4,7), 6.93 (s, 4H, NH<sub>2</sub> en), 2.80 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.76 (s, 4H, CH<sub>2</sub> en).

**EM** (ESI, m/z) para  $C_{16}H_{19}N_4Pt [M-H-2NO_3]^+$ :

Calculado: 462.11

Encontrado: 462.12

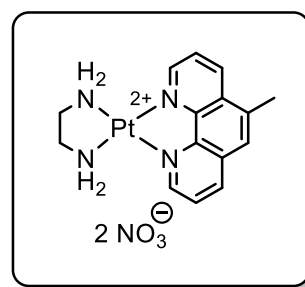
$C_{16}H_{20}N_4Pt [M-2NO_3]^{2+}$ :

Calculado: 231.50

Encontrado: 231.57

**[Pt(en)(5-mphen)]<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (44)**

Siguiendo el procedimiento general **M**, se preparó el compuesto **44** a partir de la 5-metil-1,10-fenantrolina (5-mphen) (15 mg, 0.076 mmol). Se obtuvieron de esta manera 25 mg del producto deseado como un sólido blanco.

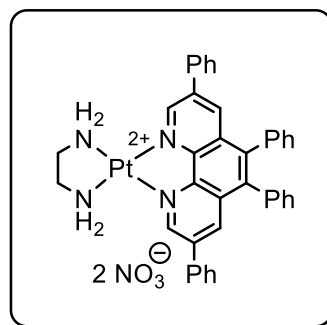


**Rdto.:** 58%

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 9.08 (dd, *J* = 8.2, 5.1 Hz, 2H, H-2,9), 8.78 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-4), 8.62 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-7), 8.00 (s, 1H, H-6), 7.96-7.85 (m, 2H, H-3,8), 6.08 (s, 4H, NH<sub>2</sub> en), 4.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.82 (s, 4H, CH<sub>2</sub>).

**[Pt(en)(3,5,6,8-tphphen)](NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (45)**

Siguiendo el procedimiento general **M**, se preparó el compuesto **45** a partir de la 3,5,6,8-tetrametil-1,10-fenantrolina (3,5,6,8-tphphen) (**37**) (37 mg, 0.076 mmol). Se obtuvieron de este modo 43 mg del producto deseado como un sólido blanco.



**Rdto.:** 65%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 9.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, H-2,9), 8.37 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H, H-4,7), 7.81-7.75 (m, 4H, H-4 fenilo), 7.68-7.54 (m, 8H, H-2,6 fenilo), 7.36-7.10 (m, 8H, H-3,5 fenilo).

**HRMS** (ESI-TOF, *m/z*) para C<sub>38</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>Pt [M+2NO<sub>3</sub>-H]<sup>+</sup>:

Calculado: 738.2194

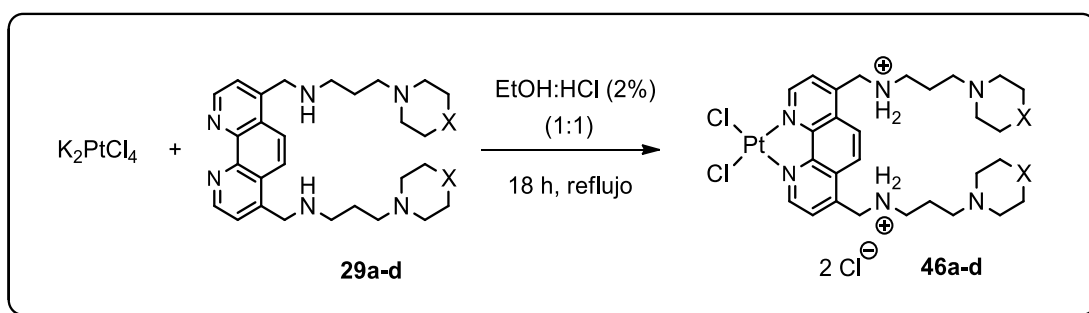
Encontrado: 738.2189

C<sub>38</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>Pt [M-2NO<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>:

Calculado: 369.6134

Encontrado: 369.6130

◆ **Procedimiento general N para la preparación de complejos con cloros como ligandos**



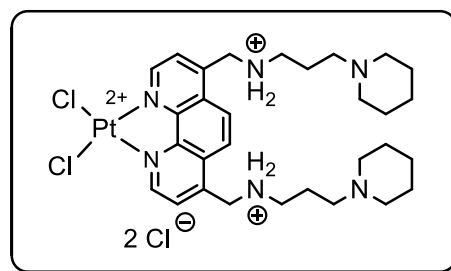
**Figura 133.** Esquema para la preparación de los complejos dicloro **46a-d**

A una disolución de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> en HCl (2%) (3 mL), se adicionó una disolución del correspondiente aminometil ligando (**29a-d**) en EtOH (3 mL) y se mantuvo con agitación

a 70 °C durante 18 horas. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el sólido obtenido se lavó con Et<sub>2</sub>O (3 veces) y con EtOH (2 veces).

**Pt(Ligando-4,7-piperidina) Cl<sub>4</sub> (46a)**

Siguiendo el procedimiento general **N**, se preparó **46a** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (33 mg, 0.08 mmol) y de la 4,7-bis[3-(piperidin-1-il)-N-metilenpropilamino]1,10-fenantrolina (**29a**) (40 mg, 0.08 mmol). Se obtuvieron así 27 mg del producto deseado como un sólido marrón.



**Rdto.:** 42%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 10.58 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 10.39 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 9.60 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, H-2,9), 8.63 (s, 2H, H-5,6), 8.46 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, H-3,8), 4.95 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 3.35-3.01 (m, 12H, H<sub>d</sub> + H<sub>α</sub>), 1.77-1.68 (m, 8H, H<sub>β</sub>), 1.39 (m, 4H, H<sub>γ</sub>).

**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>Pt [M-2Cl-H]<sup>+</sup>:

Calculado: 754.28

Encontrado: 754.39

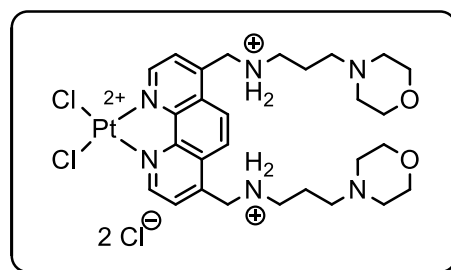
C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>Pt [M-2Cl]<sup>2+</sup>:

Calculado: 378.60

Encontrado: 378.51

**Pt(Ligando-4,7-morfolina) Cl<sub>4</sub> (46b)**

Siguiendo el procedimiento general **N**, se preparó **46b** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (21 mg, 0.051 mmol) y de la 4,7-bis[3-(morfolin-4-il)-N-metilenpropilamino]1,10-fenantrolina (**29b**) (25 mg, 0.051 mmol). Se obtuvieron 29 mg del producto deseado como un sólido marrón.





**Rdto.:** 43%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 11.44 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 10.36 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 9.61 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, H-2,9), 8.61 (s, 2H, H-5,6), 8.46 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, H-3,8), 4.95 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 3.92 (sa, 8H, H<sub>β</sub>), 3.33 (m, 12H, H<sub>b</sub> + H<sub>α</sub>), 3.07 (sa, 4H, H<sub>d</sub>), 2.31 (sa, 4H, H<sub>c</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 148.9, 147.4, 143.0, 129.7, 127.5, 125.5, 63.5, 53.4, 51.4, 45.9, 45.1, 36.7, 21.5, 20.2.

**EM** (ESI, m/z) para C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 759.24

Encontrado: 759.28

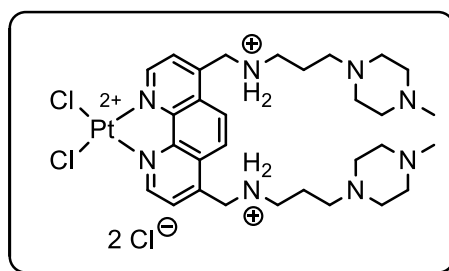
C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+2H]<sup>2+</sup>:

Calculado: 380.12

Encontrado: 380.40

#### **Pt(Ligando-4,7-N-metilpiperacina) Cl<sub>4</sub> (46c)**

Siguiendo el procedimiento general **N**, se preparó **46c** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (16 mg, 0.035 mmol) y de la 4,7-bis{3-[(4-metil)piperazin-il]-N-metilenpropilamino}1,10-fenantrolina (**29c**) (20 mg, 0.035 mmol). Se obtuvieron 11 mg del producto deseado como un sólido marrón.



**Rdto.:** 35%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 10.20 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 9.77 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-2,9), 8.66 (s, 2H, H-5,6), 8.47 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-3,8), 4.97 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 3.30 (sa, 4H, H<sub>b</sub>), 3.15 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.66-2.34 (m, 20H, H<sub>d</sub> + H<sub>α</sub> + H<sub>β</sub>), 2.27 (q, *J* = 6.3 Hz, 4H, H<sub>c</sub>).

**EM** (ESI, m/z) para C<sub>30</sub>H<sub>45</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>8</sub>Pt [M-2Cl-H]<sup>+</sup>:

Calculado: 784.30

Encontrado: 784.29

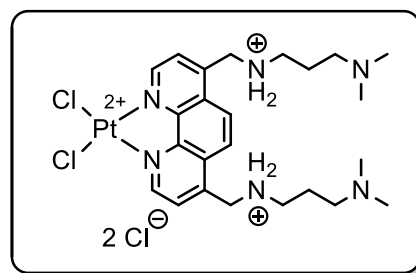
C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>8</sub>Pt [M-2Cl]<sup>+</sup>:

Calculado: 392.70

Encontrado: 393.35

**Pt(Ligando-4,7-dimetilamino) Cl<sub>4</sub> (46d)**

Siguiendo el procedimiento general **N**, se preparó **46d** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (30 mg, 0.081 mmol) y de la 4,7-bis{3-[N',N'-dimetilamino]-N-metilenpropilamino}1,10-fenantrolina (**29d**) (33 mg, 0.081 mmol). Se obtuvieron 42 mg de un sólido marrón.



**Rdto.:** 77%

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm) 10.62 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 10.15 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 9.80 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, H-2,9), 8.66 (s, 2H, H-5,6), 8.46 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, H-3,8), 4.95 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 3.24 (s, 12H, CH<sub>3</sub>), 2.81-2.65 (m, 8H, H<sub>b</sub> + H<sub>d</sub>), 2.30-2.08 (m, 4H, H<sub>c</sub>).

**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>Pt [M-2Cl-H]<sup>+</sup>:

Calculado: 675.22

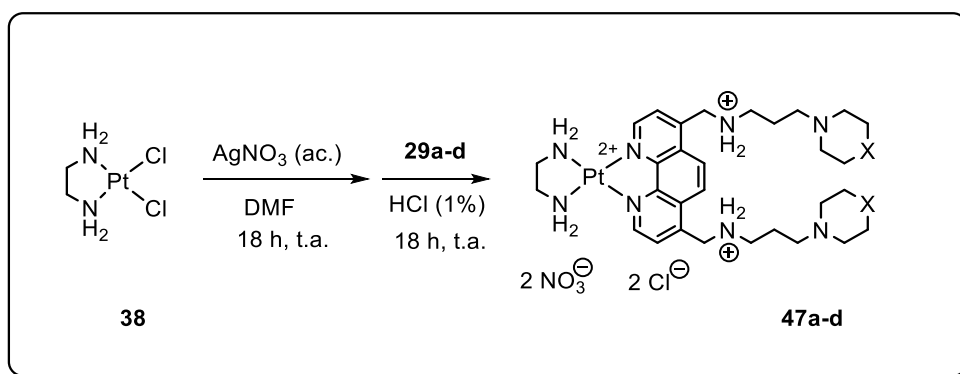
Encontrado: 675.21

C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>Pt [M-2Cl]<sup>2+</sup>:

Calculado: 338.10

Encontrado: 338.11

♦ **Procedimiento general O para la preparación de complejos mixtos tipo 1:1:1**

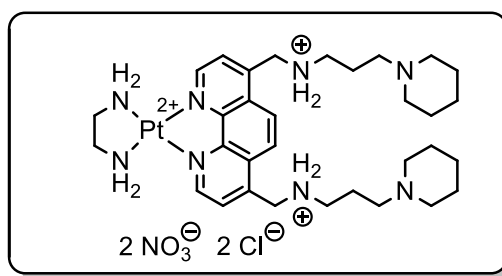


**Figura 134.** Esquema para la preparación de los complejos **47a-d**

A una disolución de **38** en DMF (2 mL), se adicionó una disolución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  0.1 N. La mezcla se mantuvo con agitación a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 18 horas. El  $\text{AgCl}$  precipitado en el medio de reacción se filtró con filtro de nylon de  $0.45 \mu\text{m}$ . Sobre el filtrado se adicionó el correspondiente derivado de la 1,10-fenantrolina **29a-d** disuelto en una disolución de  $\text{HCl}$  (2%) y se dejó con agitación 18 horas más. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el aceite obtenido se lavó con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x 5mL) y con  $\text{EtOH}$  (2x 5mL).

**[Pt(en)(Ligando-4,7-piperidina)]  $\text{Cl}_2(\text{NO}_3)_2$  (**47a**)**

Siguiendo el procedimiento general **O**, se preparó **47a** a partir del dicloro(1,2-etanodiamina- $\kappa\text{N}^1, \kappa\text{N}^2$ )platino(II) (**38**) (27 mg, 0.082 mmol), 4,7-bis[3-(piperidin-1-il)-*N*-metilpropilamino]1,10-fenantrolina (**29a**) (40 mg, 0.082 mmol) y una disolución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  0.1 N (1.64 mL, 0.164 mmol). Se obtuvieron 37 mg del complejo deseado como un sólido marrón.



**Rdto.:** 48%

**$^1\text{H}$ -RMN** (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 10.45 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 10.11 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 9.32 (d,  $J = 4.9$  Hz, 2H, H-2,9), 8.54 (s, 2H, H-5,6), 8.32 (d,  $J = 4.9$  Hz, 2H, H-3,8), 5.31 (s, 4H,  $\text{NH}_2$  en), 4.97 (s, 4H,  $\text{H}_a$ ), 3.42-3.29 (m, 4H,  $\text{H}_b$ ), 3.20-3.07 (m, 4H,  $\text{H}_d$ ), 2.88 (sa, 4H,  $\text{CH}_2$  en) 2.28 (m, 8H,  $\text{H}_\alpha$ ), 1.81 (m, 8H,  $\text{H}_\beta$ ), 1.41 (s, 4H,  $\text{H}_\gamma$ ).<sup>220</sup>

**$^{195}\text{Pt}$ -RMN** (64.2 MHz,  $\text{DMF}-d_7$ ): -2329

**HRMS** (ESI-TOF,  $m/z$ ) para  $\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{Pt}$  [ $\text{M}-2\text{NO}_3-\text{H}$ ]<sup>+</sup>:

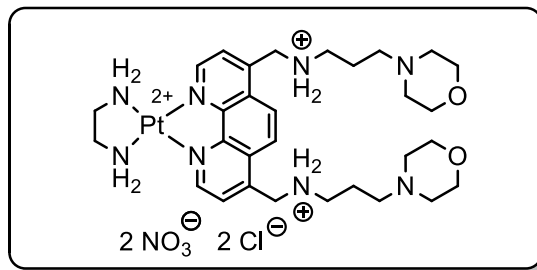
Calculado: 815.3414

Encontrado: 815.3425

<sup>220</sup> La señal correspondiente a  $\text{H}_c$  solapa con la señal del disolvente deuterado.

**[Pt(en)(Ligando-4,7-morfolina)] Cl<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (47b)**

Siguiendo el procedimiento general **O**, se preparó **47b** a partir del dicloro(1,2-etanodiamina-κN<sup>1</sup>,κN<sup>2</sup>)platino(II) (**38**) (27 mg, 0.082 mmol), 4,7-bis[3-(morfolin-4-il)-N-metilenpropilamino]1,10-fenantrolina (**29b**) (41 mg, 0.082 mmol) y una disolución acuosa AgNO<sub>3</sub> 0.1 N (1.64 mL, 0.164 mmol). Se obtuvieron así 32 mg del producto deseado como un sólido marrón.

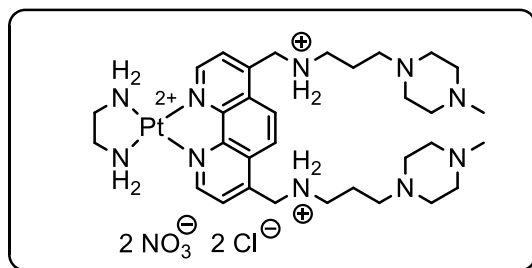


**Rdto.:** 41%

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 10.48 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 10.16 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 9.35 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, H-2,9), 8.57 (s, 2H, H-5,6), 8.33 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, H-3,8), 5.31 (s, 4H, NH<sub>2</sub> en), 4.97 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 3.95 (sa, 8H, H<sub>β</sub>), 3.42-3.29 (m, 4H, H<sub>b</sub>), 3.20-3.07 (m, 4H, H<sub>d</sub>), 2.85 (sa, 4H, CH<sub>2</sub> en) 2.28 (m, 8H, H<sub>β</sub>).<sup>220</sup>

**[Pt(en)(Ligando-4,7-N-metilpiperacina)] Cl<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (47c)**

Siguiendo el procedimiento general **O**, se preparó **47c** a partir del dicloro(1,2-etanodiamina-κN<sup>1</sup>,κN<sup>2</sup>)platino(II) (**38**) (25 mg, 0.077 mmol), 4,7-bis{3-[(4-metil)piperazin-il]-N-metilenpropilamino}1,10-fenantrolina (**29c**) (40 mg, 0.077 mmol) y una disolución acuosa de AgNO<sub>3</sub> 0.1 N (1.54 mL, 0.154 mmol). Se obtuvieron de este modo 28 mg del producto deseado como un sólido marrón.



**Rdto.:** 38%

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ(ppm): 10.63 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 10.22 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 9.36 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-2,9), 8.55 (s, 2H, H-5,6), 8.38 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-3,8), 4.95 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 3.32 (sa, 4H, H<sub>b</sub>), 3.17 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 2.63-2.35 (m, 20H, H<sub>d</sub> + H<sub>α</sub> + H<sub>β</sub>), 2.27 (q, *J* = 6.3 Hz 4H, H<sub>c</sub>).

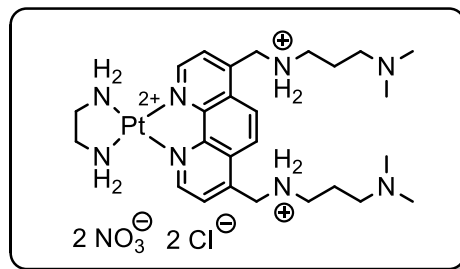
HRMS (ESI-TOF, m/z) para  $C_{32}H_{48}Cl_2N_8Pt$  [M-2NO<sub>3</sub>-2Cl-H]<sup>+</sup>:

Calculado: 774.3505

Encontrado: 774.5286

**[Pt(en)(Ligando-4,7-dimetilamino)] Cl<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (47d)**

Siguiendo el procedimiento general **O**, se preparó **47d** a partir del dicloro(1,2-etanodiamina-κN<sup>1</sup>,κN<sup>2</sup>)platino(II) (**38**) (25 mg, 0.077 mmol), 4,7-bis{3-[N',N'-dimetilamino]-N-metilenpropilamino}1,10-fenantrolina (**29d**) (31 mg, 0.077 mmol) y una disolución acuosa de AgNO<sub>3</sub> 0.1 N (1.54 mL, 0.154 mmol). Se obtuvieron así 41 mg del producto deseado como un sólido marrón.

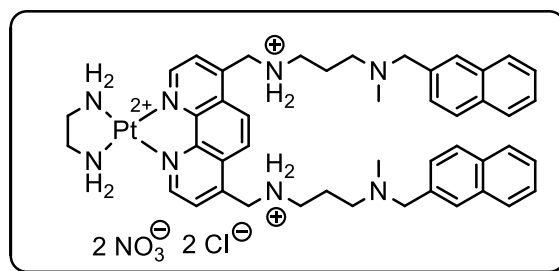


**Rdto.:** 62%

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 11.16 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 9.93 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 9.28 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, H-2,9), 8.47 (s, 2H, H-5,6), 8.19 (d, *J* = 4.6 Hz, 2H, H-3,8), 5.32 (s, 2H, NH<sub>2</sub> en), 4.93 (s, 4H, H<sub>a</sub>), 3.98-3.93 (m, 4H, H<sub>b</sub>), 3.86-3.80 (m, 4H, H<sub>d</sub>), 3.28 (s, 12H, CH<sub>3</sub>), 2.72 (s, 4H, CH<sub>2</sub> en), 2.22 (q, *J* = 6.2 Hz, 4H, H<sub>c</sub>).

**[Pt(en)(Ligando-4,7-naftaleno)] Cl<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (48a)**

Siguiendo el procedimiento general **O**, se preparó **48a** a partir del dicloro(1,2-etanodiamina-κN<sup>1</sup>,κN<sup>2</sup>)platino(II) (**38**) (10 mg, 0.030 mmol), 4,7-bis-*N,N'*-(*N*-metil-*N*-(naftaleno-2-metil)aminopropil)aminometil-1,10-fenantrolina (**33a**) (20 mg, 0.030 mmol) y una disolución acuosa de AgNO<sub>3</sub> 0.1 N (600 μL, 0.06 mmol). Se obtuvieron de este modo 14 mg del producto deseado como un sólido naranja.



**Rdto.:** 45%

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ),  $\delta$ (ppm): 10.94 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 10.05 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 9.29 (d,  $J = 4.5$  Hz, 2H, H-2,9), 8.48 (s, 2H, H-5,6), 8.24 (d,  $J = 4.5$  Hz, 2H, H-3,8), 8.15 (s, 2H, H-1 Naft), 8.03-7.88 (m, 8H, H-3,4,5 Naft), 7.77 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-8 Naft), 7.65-7.38 (m, 4H, H-6,7 Naft), 5.31 (s, 4H,  $\text{NH}_2$  en), 4.93 (s, 4H,  $\text{H}_a$ ), 4.54 (s, 4H,  $\text{H}_e$ ), 4.45 (sa, 8H,  $\text{H}_b + \text{H}_c$ ), 3.56 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 2.72 (s, 4H,  $\text{CH}_2$  en), 2.37 (m, 4H,  $\text{H}_c$ ).

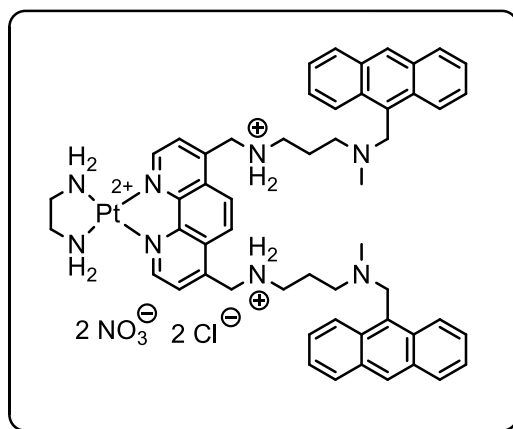
**HRMS** (ESI-TOF, m/z) para  $\text{C}_{46}\text{H}_{58}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{Pt} [\text{M}-2\text{NO}_3]^{2+}$ :

Calculado: 494.1897

Encontrado: 494.1897

**[Pt(en)(Ligando-4,7-antraceno)] Cl<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (48b)**

Siguiendo el procedimiento general **O** se preparó **48b** a partir del dicloro(1,2-etanodiamina- $\kappa\text{N}^1, \kappa\text{N}^2$ ) platino(II) (**38**) (13 mg, 0.039 mmol), 4,7-bis-*N,N'*-(*N*-metil-*N*-(antraceno-9-metil)aminopropil)aminometil 1,10-fenantrolina (**33b**) (30 mg, 0.039 mmol) y una disolución acuosa  $\text{AgNO}_3$  0.1 N (780  $\mu\text{L}$ , 0.078 mmol). Se obtuvieron así 15 mg de un sólido anaranjado.



**Rdto.:** 34%

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 9.99 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 9.76 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 9.26 (d,  $J = 4.6$  Hz, 2H, H-2,9), 8.84 (s, 2H, H-5,6), 8.52 (d,  $J = 7.9$  Hz, 4H, H-1,8 Antr), 8.43 (s, 2H, H-10 Antr), 8.26-8.12 (m, 6H, H-4,5 Antr + H-3,8), 7.71 (t,  $J = 7.9$  Hz, 4H, H-2,7 Antr), 7.61 (t,  $J = 7.9$  Hz, 4H, H-3,6 Antr), 5.47 (s, 4H,  $\text{NH}_2$  en), 5.32 (s, 4H,  $\text{H}_e$ ), 4.92 (s, 4H,  $\text{H}_a$ ), 3.26 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 2.73 (m, 8H,  $\text{H}_b + \text{H}_d$ ), 2.22 (m, 4H,  $\text{H}_c$ ).

**HRMS** (ESI-TOF, m/z) para  $\text{C}_{54}\text{H}_{62}\text{Cl}_2\text{N}_8\text{Pt} [\text{M}-2\text{NO}_3-\text{H}]^+$ :

Calculado: 1087.4037

Encontrado: 1087.4036

#### 4.1.6.2 Síntesis de complejos de Pt(II) 2:1

##### ◆ Procedimiento general P para la preparación de los complejos 1,10-fenantrolina-Pt(II) (2:1)

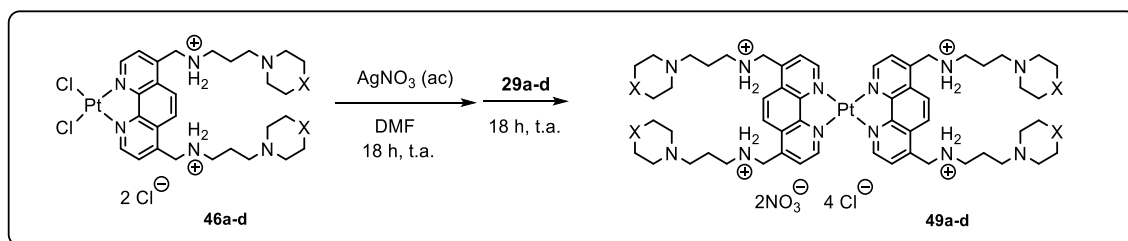
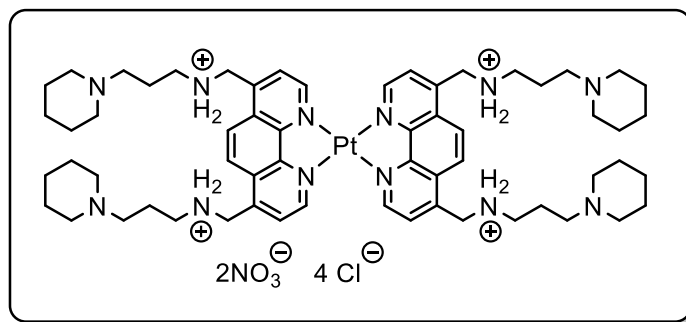


Figura 135. Esquema para la preparación de los complejos 2:1 **49a-d**

A una disolución del complejo dicloro (**46a-d**) en DMF (3 mL), se adicionó una disolución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  0.1 N (1.2 mL, 0.12 mmol) y se mantuvo con agitación, a temperatura ambiente y en la oscuridad, durante 18 horas. El  $\text{AgCl}$  precipitado en el medio de reacción se filtró con un filtro de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ . Sobre el filtrado se adicionó el derivado de 1,10-fenantrolina (**29a-d**) disuelto en una disolución de HCl (2%) y se dejó con agitación 18 horas más. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y el aceite obtenido se lavó con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3x 5 mL) y con EtOH (2x 5 mL).

##### [Pt(Ligando-4,7-piperidina)<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (**49a**)

Seguendo el procedimiento general P, se preparó **49a** a partir del complejo Pt(ligando-4,7-piperidina) Cl<sub>2</sub> (**46a**) (45 mg, 0.06 mmol) y de la 4,7-bis[3-(piperidin-1-il)-N-metilenpropilamino]1,10-fenantrolina (**29a**) (58 mg, 0.12 mmol). De este modo se obtuvieron 21 mg del producto deseado como un sólido marrón.

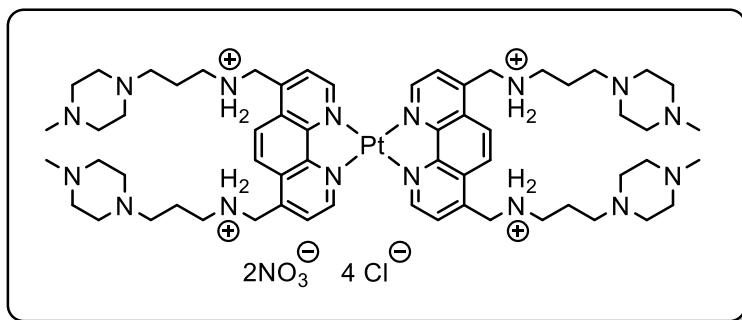


Rdto.: 24%

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 11.02 (s, 4H,  $\text{NH}_2$ ), 10.41 (s, 4H,  $\text{NH}_2$ ), 9.26 (d,  $J = 4.8$  Hz, 4H, H-2,9), 8.50 (s, 4H, H-5,6), 8.42 (d,  $J = 4.8$  Hz, 4H, H-3,8), 4.94 (s, 8H,  $\text{H}_a$ ), 3.39-3.27 (m, 8H,  $\text{H}_b$ ), 3.18-3.05 (m, 8H,  $\text{H}_d$ ), 2.28 (m, 16H,  $\text{H}_\alpha$ ), 1.81 (m, 16H,  $\text{H}_\beta$ ), 1.41 (m, 8H,  $\text{H}_\gamma$ ).

**[Pt(Ligando-4,7-N-metilpiperacina) $_2$ ]Cl $_4$ (NO $_3$ ) $_2$  (49c)**

Siguiendo el procedimiento general **P**, se preparó **49c** a partir de Pt(ligando-4,7-N-metilpiperacina) Cl $_2$  (**46c**) (47 mg, 0.06 mmol) y de la 4,7-bis{3-[(4-metil)piperazin-il]-N-



metilenpropilamino}1,10-fenantrolina (**29c**) (62 mg, 0.12 mmol). De este modo se obtuvieron 26 mg del producto deseado como un sólido amarillo.

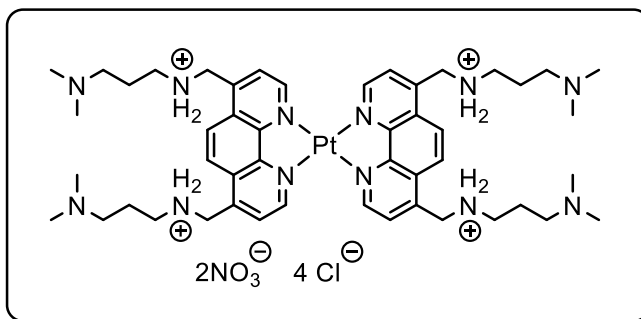
**Rdto.:** 29%

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 10.95 (s, 4H,  $\text{NH}_2$ ), 10.22 (s, 4H,  $\text{NH}_2$ ), 9.28 (d,  $J = 4.5$  Hz, 4H, H-2,9), 8.57 (s, 4H, H-5,6), 8.42 (d,  $J = 4.5$  Hz, 4H, H-3,8), 4.95 (s, 8H,  $\text{H}_a$ ), 3.32 (sa, 8H,  $\text{H}_b$ ), 3.17 (s, 12H,  $\text{CH}_3$ ), 2.63-2.35 (m, 40H,  $\text{H}_d + \text{H}_\alpha + \text{H}_\beta$ ), 2.27 (m, 8H,  $\text{H}_c$ ).



**[Pt(Ligando-4,7-dimetilamino)<sub>2</sub>]Cl<sub>4</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (49d)**

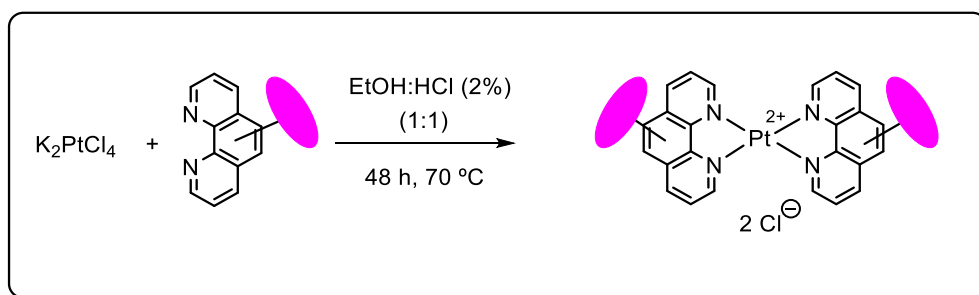
Siguiendo el procedimiento general **P**, se preparó **49d** a partir del complejo Pt(ligando-4,7-dimetilamino)Cl<sub>2</sub> (**46d**) (40 mg, 0.06 mmol) y de la 4,7-bis[3-*N,N'*-dimetilamino]-*N*-metilpropilamino]1,10-fenantrolina (**29d**) (49 mg, 0.12 mmol). De este modo se obtuvieron 34 mg del producto deseado como un sólido marrón.



**Rdto.:** 42%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 11.12 (s, 4H, NH<sub>2</sub>), 10.52 (s, 4H, NH<sub>2</sub>), 9.24 (d, *J* = 4.9 Hz, 4H, H-2,9), 8.48 (s, 4H, H-5,6), 8.42 (d, *J* = 4.9 Hz, 4H, H-3,8), 4.93 (s, 8H, H<sub>a</sub>), 3.27 (sa, 16H, H<sub>b</sub> + H<sub>d</sub>), 2.97-2.69 (s, 24H, CH<sub>3</sub>), 2.32 (m, 8H, H<sub>c</sub>).

♦ **Procedimiento general Q para la preparación de complejos 1,10-fenantrolina-Pt (2:1)**

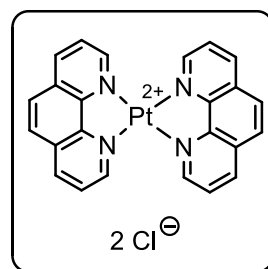


**Figura 136.** Esquema para la preparación de los complejos 2:1

A una disolución de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> en HCl (2%) (3 mL), se adicionó una disolución del correspondiente derivado de 1,10-fenantrolina en EtOH (3 mL). La mezcla se mantuvo con agitación y a 70 °C durante 48 horas y a continuación se concentró a sequedad. El sólido obtenido se lavó con Et<sub>2</sub>O (3x 5 mL) y con EtOH (2x 5 mL).

**[Pt(phen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> (50)**

Siguiendo el procedimiento general **Q**, se preparó **50** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (62 mg, 0.15 mmol) y de la 1,10-fenantrolina (phen) (57 mg, 0.317 mmol). De este modo se obtuvieron 74 mg de [Pt(phen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> como un sólido verde pálido.

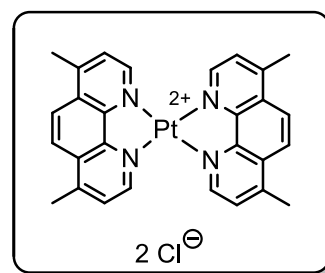


**Rdto.:** 79%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 9.09 (dd, *J* = 4.3, 1.7 Hz, 4H, H-2,9), 8.49 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 4H, H-4,7), 7.99 (s, 4H, H-5,6), 7.77 (dd, *J* = 8.0, 4.3 Hz, 4H, H-3,8).

**[Pt(4,7-dmphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> (51a)**

Siguiendo el procedimiento general **Q**, se preparó **51a** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (49 mg, 0.117 mmol) y de la 4,7-dimetil-1,10-fenantrolina (4,7-dmphen) (49 mg, 0.235 mmol). De este modo se obtuvieron 49 mg de [Pt(4,7-dmphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> como un sólido verde pálido.



**Rdto.:** 62%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 8.92 (d, *J* = 4.1 Hz, 4H, H-2,9), 8.15 (s, 4H, H-5,6), 7.63 (d, *J* = 4.1 Hz, 4H, H-3,8), 2.79 (s, 12H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 149.6, 145.7, 144.9, 128.0, 124.7, 123.0, 19.1.

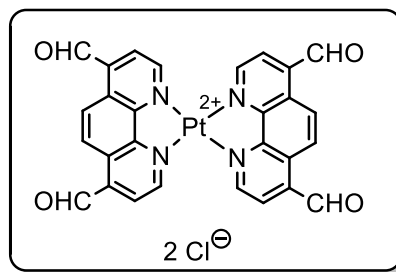
**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>4</sub>Pt [M-Cl]<sup>+</sup>:

Calculado: 647.05

Encontrado: 647.14

### [Pt(dCHO-phen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> (51b)

Siguiendo el procedimiento general **Q**, se preparó **51b** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (46 mg, 0.11 mmol) y de la 1,10-fenantrolina 4,7-dicarbaldehído (**18**) (dCHOphen) (55 mg, 0.23 mmol). De este modo se obtuvieron 53 mg de [Pt(dCHOphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> como un sólido verde pálido.



**Rdto.:** 65%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 10.74 (s, 4H, CHO), 10.04 (d, *J* = 4.6 Hz, 4H, H-2,9), 9.15 (s, 4H, H-5,6), 8.58 (d, *J* = 4.6 Hz, 4H, H-3,8).

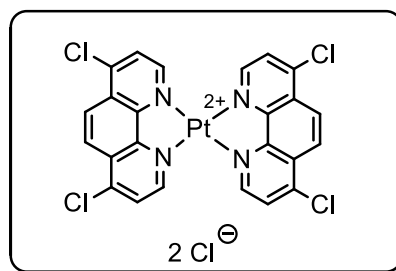
**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Pt KCl [M-Cl-dCHOphen+KCl]<sup>+</sup>:

Calculado: 540.90

Encontrado: 540.90

### [Pt(DCF)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> (51c)

Siguiendo el procedimiento general **Q**, se preparó **51c** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (51 mg, 0.122 mmol) y de la 4,7-dicloro-1,10-fenantrolina (DCF) (61 mg, 0.24 mmol). De este modo se obtuvieron 39 mg de [Pt(DCF)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> como un sólido naranja.



**Rdto.:** 42%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 9.08 (d, *J* = 4.8 Hz, 4H, H-2,9), 8.38 (s, 4H, H-5,6), 8.07 (d, *J* = 4.8 Hz, 4H, H-3,8).

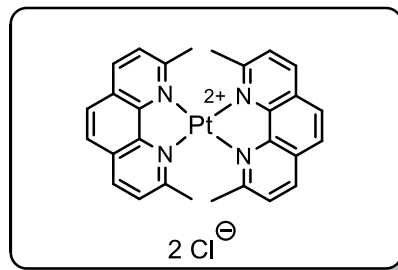
**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>24</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>6</sub>N<sub>4</sub>KPt [M+K+H]<sup>2+</sup>:

Calculado: 400.95

Encontrado: 400.95

**[Pt(2,9-dmphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> (52a)**

Siguiendo el procedimiento general **Q**, se preparó **52a** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (56 mg, 0.135 mmol) y de la 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (2,9-dmphen) (59 mg, 0.27 mmol). De este modo se obtuvieron 32 mg de [Pt(2,9-dmphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> como un sólido marrón.



**Rdto.:** 35%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 8.71 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H, H-3,8), 8.10 (s, 4H, H-5,6), 7.91 (d, *J* = 8.2 Hz, 4H, H-4,7), 2.92 (s, 12H, CH<sub>3</sub>).

**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>28</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>Pt [M+H]<sup>+</sup>:

Calculado: 683.12

Encontrado: 683.1

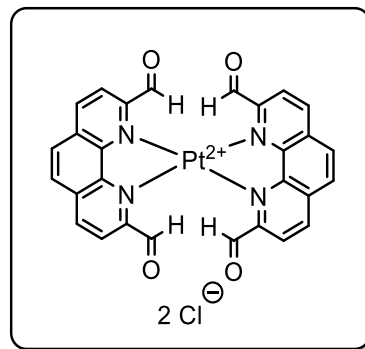
C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>4</sub>Pt [M-Cl]<sup>+</sup>:

Calculado: 646.13

Encontrado: 646.10

**[Pt(2,9-dCHOphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> (52b)**

Siguiendo el procedimiento general **Q**, se preparó **52b** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (54 mg, 0.13 mmol) y de la 1,10-fenantrolina-2,9-dicarbaldehído (**34**) (2,9dCHOphen) (61 mg, 0.26 mmol). De este modo se obtuvieron 37 mg de [Pt(2,9-dCHOphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> como un sólido marrón.



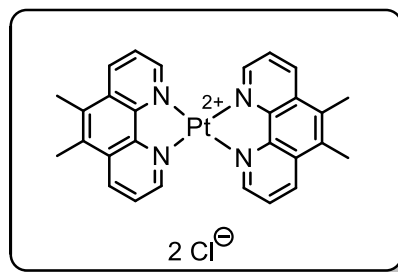
**Rdto.:** 39%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 10.35 (s, 4H, CHO), 8.77 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-3,8), 8.58 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-3,8), 8.40 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-4,7), 8.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-4,7), 8.18 (s, 2H, H-5,6), 8.14 (s, 2H, H-5,6).<sup>221</sup>

<sup>221</sup> Posible mezcla de confórmers.

### [Pt(5,6-dmphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> (53)

Siguiendo el procedimiento general **Q**, se preparó **53** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (50 mg, 0.12 mmol) y de la 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina (5,6-dmphen) (50 mg, 0.24 mmol). De este modo se obtuvieron 60 mg de [Pt(5,6-dmphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> como un sólido marrón.



**Rdto.:** 73%

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 9.04 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H, H-2,9), 8.65 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H, H-3,8), 7.80 (dd, *J* = 7.9, 4.1 Hz, 4H, H-4,7), 2.70 (s, 12H, CH<sub>3</sub>).

**EM** (ESI, *m/z*) para C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>NaPt [M+Na]<sup>+</sup>:

Calculado: 705.10

Encontrado: 705.10

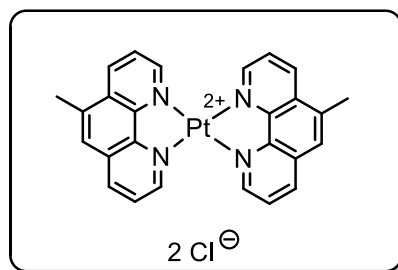
C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>Pt [M-Cl]<sup>+</sup>:

Calculado: 646.13

Encontrado: 646.10

### [Pt(5-mphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> (54)

Siguiendo el procedimiento general **Q**, se preparó **54** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (56 mg, 0.13 mmol) y de la 5-metil-1,10-fenantrolina (52 mg, 0.27 mmol). De este modo se obtuvieron 59 mg de [Pt(5-mphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> como un sólido amarillo.



**Rdto.:** 70%

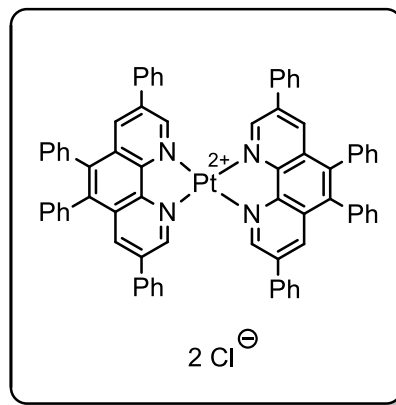
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 9.65 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H, H-2,9), 9.56 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H, H-2,9), 9.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-4,7), 8.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-4,7), 8.14 (m, 2H, H-3,8), 8.07 (s, 2H, H-6), 7.65-7.52 (m, 2H, H-3,8), 2.85 (s, 6H, CH<sub>3</sub>).<sup>222</sup>

<sup>222</sup> Se observan dos conjuntos de señales por lo que posiblemente haya mezcla de isómeros.

**[Pt(3,5,6,8-tphphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> (55)**

Siguiendo el procedimiento general **Q**, se preparó **55** a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (17 mg, 0.042 mmol) y de la 3,5,6,8-tetrafenil-1,10-fenantrolina (3,5,6,8-tphphen) (**37**) (41 mg, 0.084 mmol). De este modo se obtuvieron 39 mg de [Pt(3,5,6,8-tphmphen)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> como un sólido amarillo.

**Rdto.:** 75%



<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>), δ (ppm): 9.44 (s, 4H, H-2,9), 7.92 (s, 4H, H-4,7), 7.65 (d, *J* = 8.9 Hz, 16H, H-2,6 fenilo), 7.57-7.45 (m, 16H, H-3,5 fenilo), 7.36-6.91 (m, 8H, H-4 fenilo).

## **4.2 ESTUDIOS DE INTERACCIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Todos los compuestos estudiados en los distintos ensayos biológicos fueron disueltos en una mezcla de disolventes H<sub>2</sub>O:DMSO en proporción 9:1 obteniéndose así disoluciones madre de concentración 5 mM. Estas disoluciones fueron conservadas a – 20 °C. A partir de estas se realizaron diluciones en agua (grado BPC) para obtener las disoluciones con las concentraciones requeridas para cada uno de los estudios biológicos.

### **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), realizando el ensayo 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, F21T (5'- FAM – GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG – TAMRA - 3') y F10T (5'- FAM – TAT AGC TA TA/Sp18/TA TA GCT ATA – TAMRA - 3'), fueron adquiridos comercialmente a la casa comercial IDT, 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 con cationes potasio: 10 mM KCl, 90 mM LiCl, 10 mM cacodilato de litio (pH = 7.2) y un tampón de cacodilato de litio con 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 de concentración 50 µM. A partir de las disoluciones madre de ADN, tampones (2x) y agua se prepararon disoluciones de concentración 0.25 µM de ADN en el tampón correspondiente, en función del ensayo a realizar. El

plegamiento del ADN se llevó a cabo con las disoluciones de concentración  $0.25 \mu\text{M}$  calentándolas a  $90^\circ\text{C}$  durante 5 minutos y luego se dejaron enfriar a  $25^\circ\text{C}$ , lentamente, durante 3 horas. Las disoluciones preparadas se almacenaron a  $4^\circ\text{C}$  durante una noche.

A partir de las disoluciones madre de los compuestos objeto de estudio se prepararon disoluciones de compuesto de concentración  $25 \mu\text{M}$  o  $50 \mu\text{M}$  en el correspondiente tampón. De este modo los rangos de concentraciones estudiados fueron  $0-5 \mu\text{M}$  o  $0-10 \mu\text{M}$ .

En la microplaca de 96 pocillos se mezclaron  $40 \mu\text{L}$  de la disolución de ADN ( $0.25 \mu\text{M}$ ) con las disoluciones de compuesto estudiado ( $25 \mu\text{M}$  ó  $50 \mu\text{M}$ ) y el tampón correspondiente hasta obtener un volumen total de  $50 \mu\text{L}$ . Para cada compuesto estudiado, se prepararon 11 muestras con la concentración de ligando comprendida entre 0 y  $5 \mu\text{M}$  (o entre 0 y  $10 \mu\text{M}$ ) manteniendo la concentración de ADN constante en cada pocillo ( $0.2 \mu\text{M}$ ). En la figura 137 se representa un ejemplo con la distribución de las disoluciones en la microplaca de 96 pocillos.



**Figura 137.** Representación esquemática de la distribución de las distintas disoluciones empleadas en el ensayo de desnaturalización por FRET

Los valores de fluorescencia correspondientes al fluoróforo FAM se registraron a una longitud de onda de  $516 \text{ nm}$ , tras su excitación a  $492 \text{ nm}$ . El protocolo experimental consistió en una incubación de 5 min a  $24^\circ\text{C}$ , seguida de una rampa de temperatura con velocidad de calentamiento  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . 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 ( $^{\circ}\text{C}$ ) en el eje x, tal y como se muestra en la figura 138.

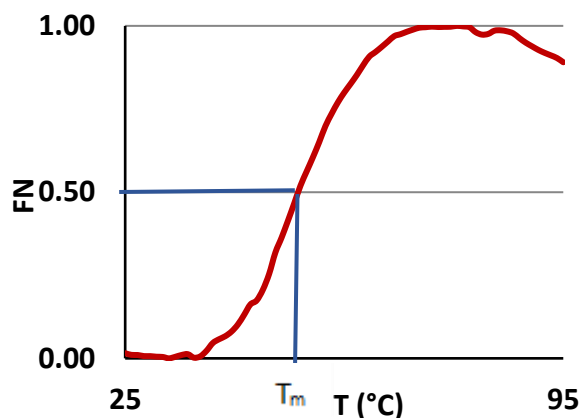


Figura 138. Curva de desnaturalización de ADN obtenida por FRET

La temperatura media de desnaturalización aparente ( $T_m$ ) se define como la temperatura a la que la fluorescencia normalizada alcanza el valor de 0.5. En la figura 139 se muestra un ejemplo de curva de desnaturalización de ADN en ausencia y en presencia de ligando.

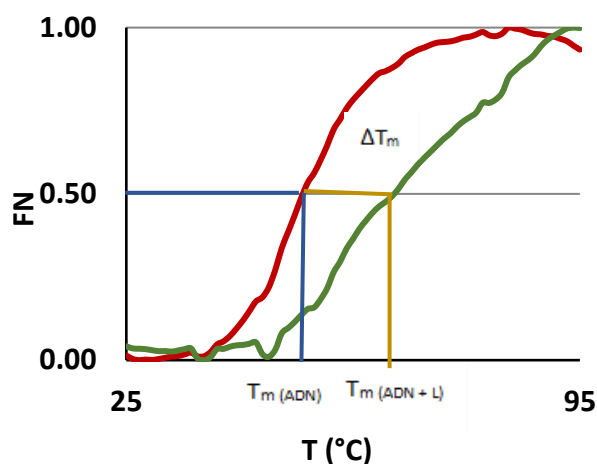


Figura 139. Curva desnaturalización de ADN (curva roja) y curva de desnaturalización en presencia de un ligando (L) estabilizador (curva verde)

Para evaluar la estabilización del ADN producida por el ligando se utiliza el valor de incremento de temperatura media de desnaturalización ( $\Delta T_m$ ), determinado de acuerdo con la fórmula 4.

$$\Delta T_m = T_m(\text{ADN} + \text{L}) - T_m(\text{ADN})$$

**Fórmula 4.**  $\Delta T_m$ : diferencia entre la temperatura media de desnaturalización del ADN en presencia y en ausencia de ligando ( $^{\circ}\text{C}$ );  $T_m(\text{ADN} + \text{L})$ : temperatura media de desnaturalización aparente del ADN en presencia de ligando;  $T_m(\text{ADN})$ : 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 CGA TCC GAT TG - 3') a concentraciones de 3 y 10  $\mu\text{M}$ , lo que supone un exceso estequiométrico en relación a la concentración inicial de ADN cuádruple-G (0.2  $\mu\text{M}$ ) de 15 y 50 veces. La concentración del ligando se mantuvo constante en todos los pocillos (5  $\mu\text{M}$ ).<sup>210,212</sup>

De los datos obtenidos y de los cambios de la temperatura media de desnaturalización ( $\Delta T_m$ ) observados en presencia y en ausencia del oligonucleótido competidor ds26, se puede calcular un valor de selectividad **S**, tal y como se muestra en la fórmula 5. Si el valor de la selectividad de los ligandos **S** se aproxima a 1, se considera que los ligandos muestran una alta selectividad hacia el ADN cuádruple-G.<sup>210</sup>

$$S = \Delta T_m(10 \mu\text{M ds26}) / \Delta T_m(\text{sin ds26})$$

**Fórmula 5.** **S**: selectividad del ligando hacia el ADN cuádruple-G;  $\Delta T_m(10 \mu\text{M ds26})$ : temperatura media de desnaturalización en presencia del oligonucleótido competidor ds26 a concentración 10  $\mu\text{M}$ ;  $\Delta T_m(\text{sin ds26})$ : 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 (5'-AGG GTT AGG GTT AGG GTT AGG G-3') que fue adquirido puro a la casa comercial IDT (Integrated DNA Technologies). Se emplearon dos tampones a pH 7.2, pero con diferentes condiciones iónicas: tampón de potasio (10 mM cacodilato de litio, 90 mM cloruro de litio, 10 mM cloruro de potasio) y tampón de sodio (10 mM cacodilato de litio, 100 mM cloruro de sodio). A partir de la disolución madre de Tel-22 ( $\approx 500 \mu\text{M}$ ) se prepararon disoluciones de oligonucleótidos de concentración  $250 \mu\text{M}$  con los dos tampones (2x) (tampón de potasio y tampón de sodio). A continuación, se calentaron las disoluciones a 90 °C durante 5 minutos y después se enfriaron a 0 °C. Las disoluciones preparadas se mantuvieron a 4 °C hasta el día siguiente.

Para las medidas de interacción se preparó 1 mL de la disolución de ADN a concentración  $4 \mu\text{M}$  y se registró el espectro de DC en ausencia de ligando. A continuación, se añadieron alícuotas de 2  $\mu\text{L}$  de una disolución del ligando 2 mM, 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%.

### **4.2.3 Estudios termodinámicos entre ligandos y ADN cuádruple-G: Diálisis de equilibrio competitiva**

Los oligonucleótidos empleados de ADN cuádruple-G (Tel-22: 5'-AGG GTT AGG GTT AGG GTT AGG G-3') y de ADN dúplex (ds17a: 5'-CCA GTT CGT AGT AAC CC-3' y ds17b: 5'-GGG TTA CTA CGA ACT GG-3') fueron adquiridos puros a IDT (Integrated DNA Technologies). Las membranas de diálisis (Spectra/Por molecular porous membrane

tubing MWCO: 3.5-5.0 kDa;  $\varnothing = 6.4$  mm) fueron adquiridas a Spectrum Laboratories Inc. Las disoluciones acuosas de surfactantes en grado de biología molecular, SDS (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  $\mu\text{M}$ . 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. A partir de las disoluciones madre se prepararon disoluciones de oligonucleótidos con concentración 75  $\mu\text{M}$  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 mantuvieron a 4 °C durante una noche.

Para cada experimento se utilizaron 4 bolsas de diálisis, previamente lavadas con agua milli-Q. Dos de ellas se llenaron con 200  $\mu\text{L}$  de la disolución de ADN cuádruple-G (75  $\mu\text{M}$  u.m.) y las otras dos con 200  $\mu\text{L}$  de la disolución de ADN dúplex (75  $\mu\text{M}$  u.m.). Las 4 bolsas de diálisis se introdujeron en un vaso de precipitados que contenía 200 mL de una disolución de concentración  $\approx 2 \mu\text{M}$  del producto a estudiar. El vaso de precipitados se cerró herméticamente con parafilm, se cubrió con papel de aluminio y se dejó con agitación durante 24 horas, 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  $\mu\text{L}$  de contenido de cada bolsa y con 10  $\mu\text{L}$  de una disolución acuosa de detergente (10%). A continuación, se determinaron las concentraciones del producto libre ( $c_i$ ) en la disolución del dialisato y las concentraciones del producto dentro de las bolsas ( $c_b$ ) empleando espectroscopia

de UV-visible. 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.

$$C_u = C_b - C_l$$

**Fórmula 6.**  $c_b$ : concentración de ligando en la bolsa;  
 $c_l$ : del ligando libre;  $c_u$ : concentración del ligando unido al ADN;

$$K_a = \frac{C_u}{C_l \{ (C_{ADN}) - C_u \}}$$

**Fórmula 7.**  $K_a$ : constante de asociación ( $M^{-1}$ );  $c_b$ : concentración de ligando en la bolsa;  
 $c_l$ : del ligando libre;  $c_u$ : concentración del ligando unido al ADN;  
 $c_{ADN}$ : concentración del ADN en unidades monoméricas (u.m.)

Para estimar el 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.

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

**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 *calf thymus* (Deoxyribonucleic acid, Activated, Type XV) fue adquirido a Sigma Aldrich. El tampón utilizado en este experimento fue 10 mM  $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$ , pH = 7.2. Para la realización de las medidas viscosimétricas se empleó un viscosímetro capilar del modelo ViscoSystem AVS 470 (Figura 140). La temperatura de las muestras se mantuvo a  $25 \pm 0.01$  °C mediante un baño termostatzado.



**Figura 140.** Viscosímetro capilar modelo ViscoSystem AVS 470

La disolución madre de ADN *calif thymus* utilizada en los experimentos de viscosimetría se preparó adicionando 5 mL de tampón fosfato y se dejó con agitación a 0 °C durante 8 horas. Posteriormente se llevó esta disolución a un volumen final de 25 mL y su concentración exacta se determinó por ultravioleta visible a 260 nm utilizando el coeficiente de extinción del ADN ( $\epsilon = 13200 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )

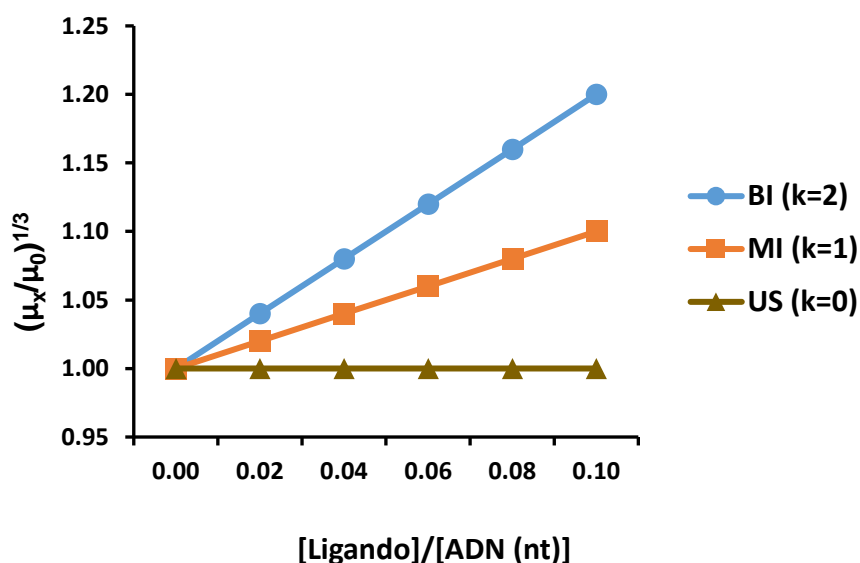
Para llevar a cabo el experimento se prepararon 6 mL de una disolución del ADN de concentración 300-500  $\mu\text{M}$  (en nucleótidos) utilizando 3 mL de disolución madre y 3 mL de tampón fosfato. A continuación, se registró, 20 veces, el tiempo que emplea la disolución en recorrer la distancia entre los dos meniscos del viscosímetro. Posteriormente, se procedió a la adición de pequeñas alícuotas de disoluciones concentradas (0.6-1.5 mM) de los ligandos objeto de estudio preparadas en el mismo tampón. La concentración de ADN fue variable y el porcentaje máximo de dilución se mantuvo inferior al 5 %. Tras la adición de cada alícuota se volvieron a registrar las 20 medidas de tiempo pudiéndose así calcular 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 9.

$$\mu = K \cdot t$$

**Fórmula 9.**  $\mu$ : viscosidad absoluta [ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ];  $K$ : constante del viscosímetro [ $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$ ];  
 $t$ : tiempo promedio (20 determinaciones, en s)

Para el tratamiento matemático de los datos se calcularon los valores  $(\mu_x/\mu_0)^{1/3}$ , donde  $\mu_0$  es el valor de la viscosidad absoluta de la disolución de ADN y  $\mu_x$  representa la viscosidad absoluta de la disolución ADN-ligando después de la adición de cada alícuota  $x$  de compuesto. Los valores de  $(\mu_x/\mu_0)^{1/3}$  para cada punto se representaron frente a la relación molar de concentraciones ligando - ADN ( $[L]/[ADN]$ ). 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 (Figura 141).



**Figura 141.** Gráfica que representa la viscosidad relativa  $(\mu_x/\mu_0)^{1/3}$  frente a la relación  $[Ligando]/[ADN (nt)]$ ;  $\mu_x$ : viscosidad absoluta de la disolución ADN-ligando;  $\mu_0$ : 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,  $k = 0$

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 ensayos de citotoxicidad MTT se llevaron a cabo por personal especializado en la Unidad de Cultivos de la Universidad de Alcalá, perteneciente al Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) en Medicina/Biología.

Este ensayo colorimétrico mide la actividad enzimática (en concreto, deshidrogenasa) de las células vivas o viables, mediante la formación de un compuesto insoluble coloreado, denominado formazán, que puede ser cuantificado a una densidad óptica (DO) de 570/630 nm. Todas las líneas celulares empleadas procedieron de fuentes comerciales (ATTC®). Las líneas celulares empleadas son las siguientes, en el medio que se especifica entre paréntesis: HeLa ( CCL-2™, DMEM), PC3 (CRL-1435™, RPMI), HT29 (HTB-38™, DMEM), RPWE (CRL-11609™, RPMI). Como medio de cultivo se empleó: RPMI 1640 (SIGMA R8758) /DMEM (SIGMA D6429) + 10% FBS (Fetal bovine serum) (SIGMA F7524) + 10% Antibiótico-Antimicótico (Penicilina /Estreptomicina/ Anfotericina B) (SIGMA A5955).

Las células se mantuvieron en cultivo (a 37 °C y en atmósfera 5% CO<sub>2</sub>), renovándose el medio tres veces por semana. El día de la siembra del experimento, cuando las células se encontraron al 80-100% de confluencia, se levantaron del recipiente utilizando tripsina. Luego se centrifugaron y se ajustaron a la concentración deseada (10.000 cel/pocillo). Las placas de 24 pocillos se sembraron y se mantuvieron en cultivo hasta el tratamiento con el compuesto, generalmente tres días. La actividad antitumoral de cada compuesto se ensayó a diferentes concentraciones (1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 5 µM, 25 µM y 100 µM) en triplicado, para un volumen total en el pocillo de 0.5 mL. Transcurrido el periodo de incubación (24 o 72 h), se añadió MTT a cada pocillo (1:10), y se incubó durante 4 h (37 °C/5% CO<sub>2</sub>). Pasado este tiempo, se realizó la solubilización del precipitado con DMSO (0.5 mL) y se llevó a cabo la lectura de absorbancia en un lector de placas ELX-800 (BioTek) a 570nm/650nm.

Los valores obtenidos de absorbancia se normalizaron, en términos de viabilidad (entre el 0 y el 100%), en relación a los controles negativos, realizados también por triplicado, que representan células sometidas al ensayo en ausencia de compuesto. Se representó a continuación el % de viabilidad frente al logaritmo decimal de la concentración de compuesto, en molaridad. La curva sigmoidea obtenida se ajustó, con



ayuda del software Kaleidagraph™ (3.52), a la ecuación  $1/(1+10^{(m2*(\log(m1)-x))})$ ;  $m1=.000003$ ;  $m2=1$ , obteniéndose el valor de  $IC_{50}$ , a partir de  $m1$ .



## **5. Conclusions**

*“Si de verdad quieres algo, trabajas muy duro, aprovechas las oportunidades, y nunca te rindes, vas a encontrar el camino”*

*Jane Goodall*

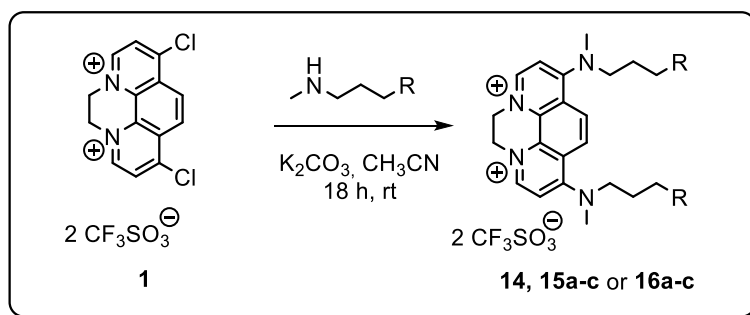


The main conclusions drawn from this doctoral thesis are highlighted and organized according to the family of compounds prepared within this work. These families are:

- 5.1 diquaternized 1,10-phenanthroline derivatives;
- 5.2 1,10-phenanthroline derivatives disubstituted at 4 and 7;
- 5.3 1,10-phenanthroline derivatives disubstituted at 2 and 9 positions;
- 5.4 mixed complexes of Pt(II) 1,10-phenanthroline and ethylenediamine;
- 5.5 2:1 (ligand to metal) Pt(II) complexes derived from substituted 1,10-phenanthrolines.

### 5.1 Diquaternized 1,10-phenanthroline derivatives

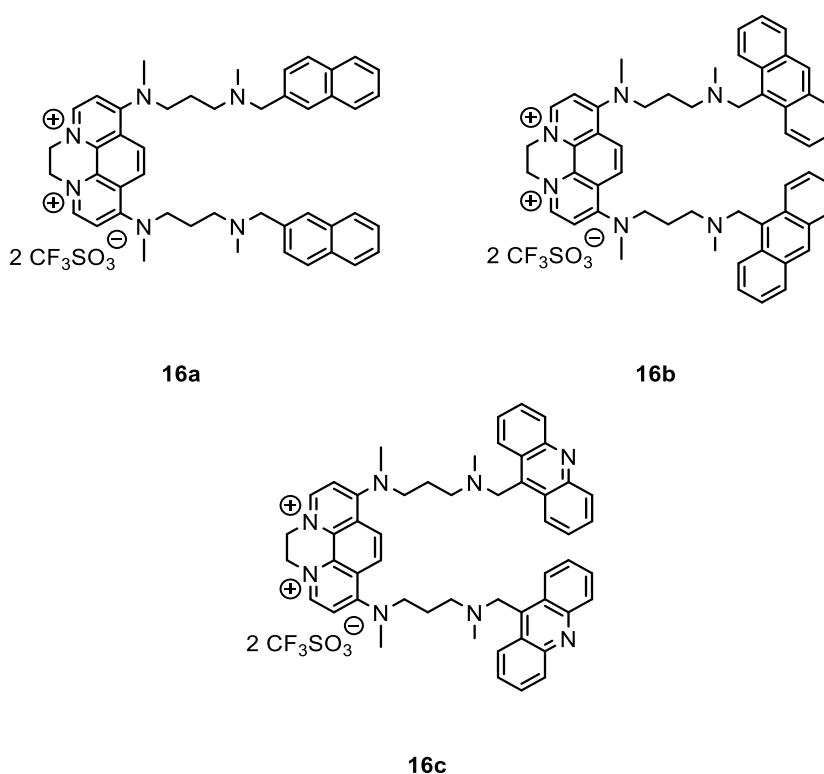
- ◆ Seven derivatives di-substituted at the 4 and 7 positions with polyamines tethered to different heterocyclic or aromatic moieties were synthesized.



- ◆ The general trend observed for this family of ligands is that all of them have good capability to recognize the structure of G-quadruplex DNA under potassium ionic conditions, whereas they show lower affinity under sodium conditions. The best affinity constants determined by equilibrium dialysis ( $K_a = 1.2\text{--}4.9 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$  under potassium conditions) were obtained for the ligands with aromatic moieties (**16a**, **16b** and **16c**).

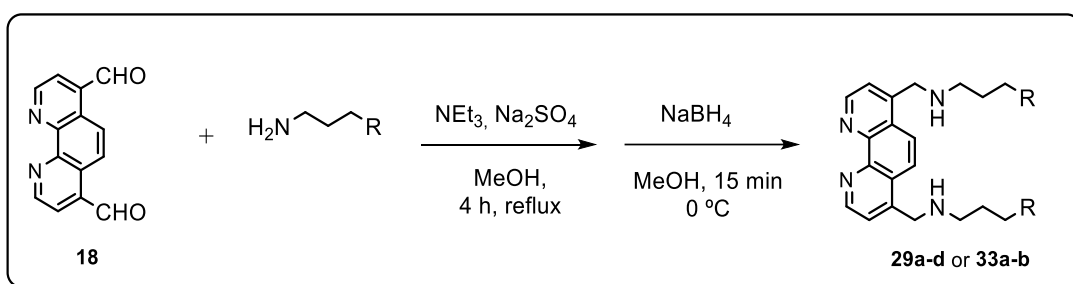
## Conclusions

- ◆ This family of diquaternized 1,10-phenanthroline derivatives are relatively weak quadruplex stabilizers and it was necessary to use 10  $\mu\text{M}$  ligand concentration to determine their stabilization ability using FRET melting assay. In these conditions, the best values for  $\Delta T_m$  were obtained for **16b** and **16c** under potassium conditions (28.5  $^{\circ}\text{C}$  and 24.0  $^{\circ}\text{C}$ , respectively).
- ◆ With respect to cytotoxic assays, only compounds **16a**, **16b** and **16c** showed  $\text{IC}_{50}$  values below 50  $\mu\text{M}$  for three different cancer cell lines tested.
- ◆ As a last conclusion for this family of compounds, we have found that the incorporation of aromatic moieties to the structure considerably improves the recognition and stabilization of quadruplex DNA. Moreover, the compounds that do not have aromatic moieties within their structure, do not present  $\text{IC}_{50}$  values below 100  $\mu\text{M}$ , in any of the tumour cell lines studied.

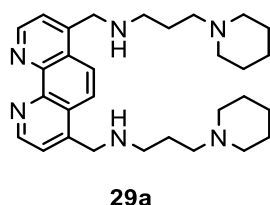


## 5.2 1,10-phenanthroline derivatives disubstituted at 4 and 7 positions

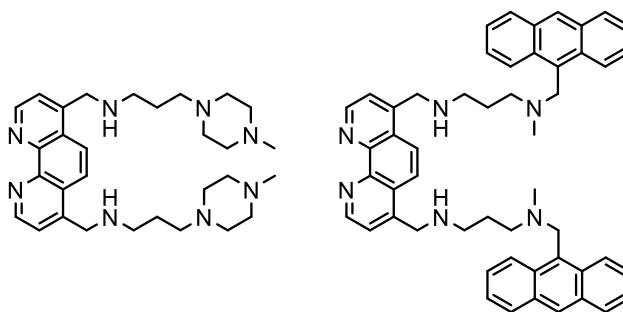
- ◆ Six different derivatives di-substituted at the 4 and 7 positions with polyamines tethered to different heterocyclic or aromatic moieties were obtained.
- ◆ The best way to synthesize compounds **29a-d** and **33a-b** was carrying out the reductive amination with dialdehyde **18** and the corresponding primary amine without previous isolation of the imines **28** (methodology C).



- ◆ The derivative **29a** (piperidine derivative) showed good stabilization values towards G-quadruplex DNA under potassium conditions, at  $1\text{ }\mu\text{M}$  and  $5\text{ }\mu\text{M}$  ligand concentrations ( $8.5\text{ }^\circ\text{C}$  and  $24.8\text{ }^\circ\text{C}$ ).



- ◆ The most selective compounds in this series, as determined by the FRET melting competitive assay, were **29c** (*N*-methylpiperazine derivative) and **33b** (naphthalene derivative).

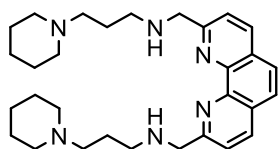


29c

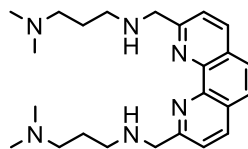
33b

### 5.3 1,10-phenanthroline derivatives disubstituted at 2 and 9

- ◆ This family of six compounds has demonstrated to have a lower stabilizing capacity than the 4,7-disubstituted family with slightly lower yield.
- ◆ This family of compounds were synthesized in the same fashion as their 4,7 disubstituted 1,10-phenanthroline analogues.
- ◆ However, they have a higher selectivity towards G-quadruplex DNA vs duplex DNA, comparing to 4,7 derivatives. The best selectivities were found for compounds **35a** y **35d** (piperidine and dimethylamino derivatives) with selectivity value at 3  $\mu$ M of 0.92 for both compounds.



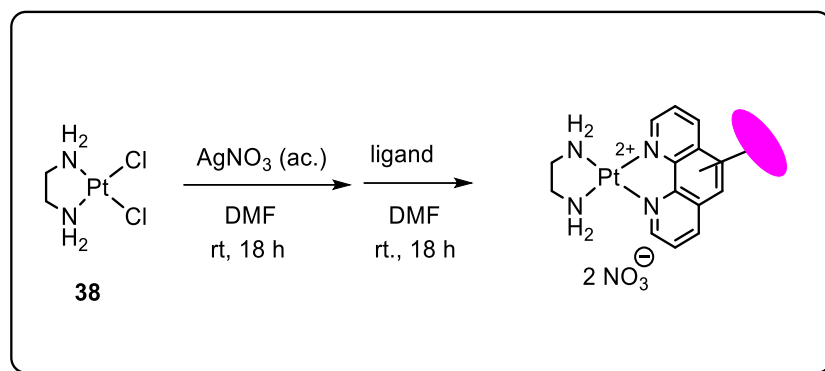
35a



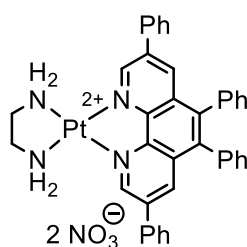
35d

## 5.4 Mixed complexes of Pt (II) 1,10-phenanthroline and ethylenediamine

- ◆ The complexes were synthesized in a straightforward fashion employing the methodology described in bibliography, with some modifications that allowed optimization of the procedure.



- ◆ The complexes based on commercial 1,10-phenanthrolines have a very low capacity to stabilize G-quadruplex DNA and duplex DNA, except complex, **45** with a value for  $\Delta T_m = 20.8$  °C.



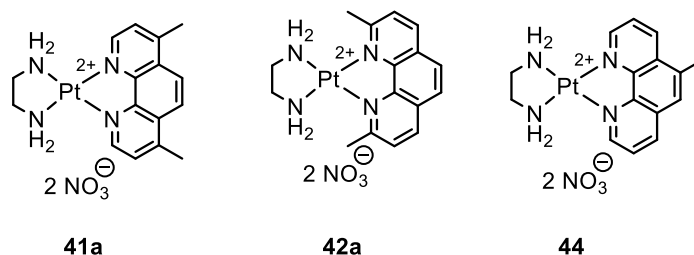
45

- ◆ However, all of them have significant cytotoxic activity, with  $\text{IC}_{50}$  values below 25  $\mu\text{M}$  for PC3 and MCF7 cancer cell lines. The compounds with the best cytotoxic activity for PC3 cancer cell line (**41a**, **42a** and **44**) presented values between 1  $\mu\text{M}$

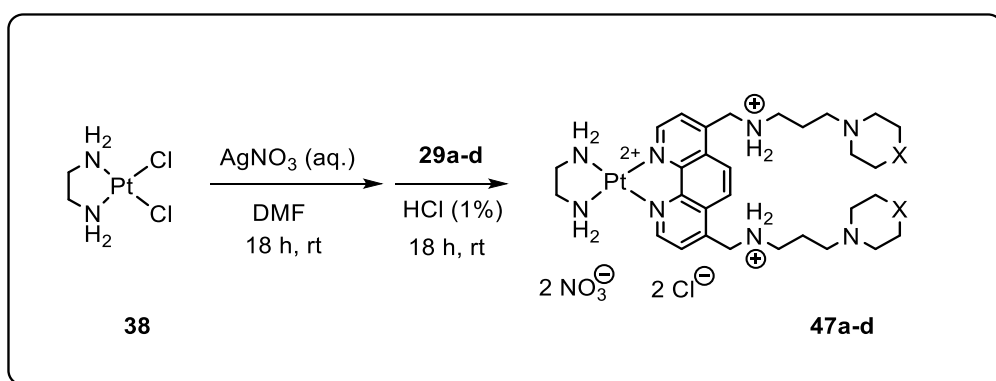


## Conclusions

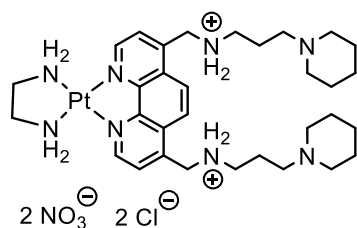
to 3.5  $\mu\text{M}$ . These compounds have methyl groups as substituents in different positions (4 and 7, 2 and 9, 5 respectively).



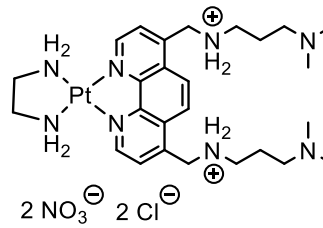
- ◆ The preparation of complexes **47a-d** and **48a-b** was only achieved if HCl is included in the reaction media. When HCl isn't employed in the reaction, the ligand is decomposed and the complex formation does not work.



- ◆ On the other hand, complexes based on 1,10-phenanthroline ligands synthesized previously (**47a-d** and **48a-b**) presented values of  $\Delta T_m$  above 10 °C at a concentration of 5  $\mu\text{M}$  in ionic conditions of  $\text{K}^+$ . The best compounds in terms of DNA stabilization are **47a** and **47d** (piperidine and dimethylamino derivatives), with  $\Delta T_m$  values of 27.8 °C and 23.8 °C, respectively, at 5  $\mu\text{M}$  and 12.3 °C and 8.0 °C, at 1  $\mu\text{M}$ .



47a

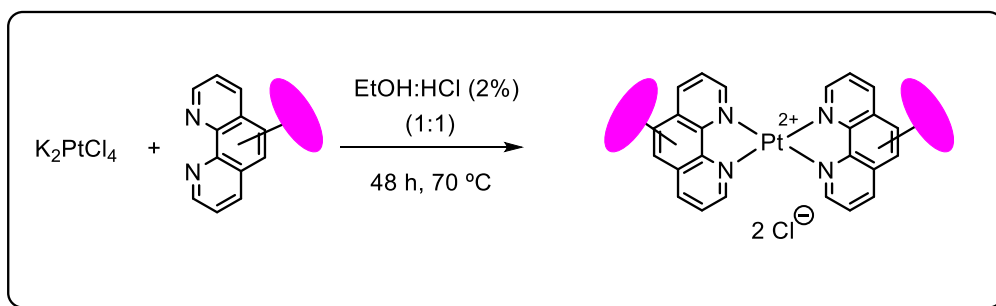


47d

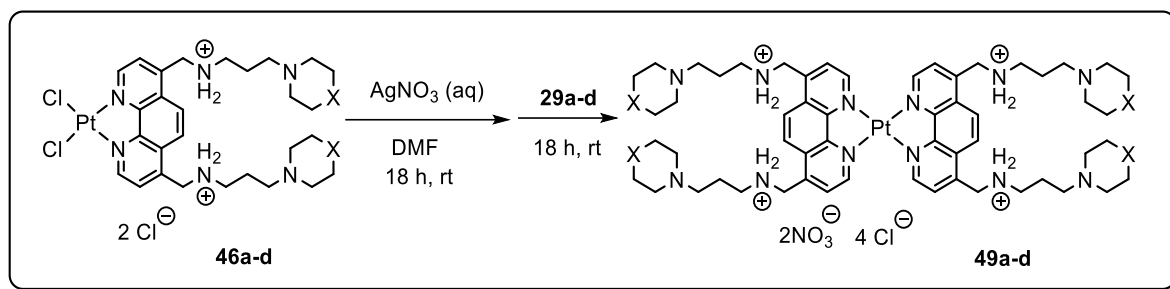
- ◆ All of them have significant cytotoxic activity, with  $IC_{50}$  values between 1.5  $\mu$ M to 5  $\mu$ M for PC3 cancer cell line. The best results were found for **47a** and **47d** (piperidine and dimethylamino derivatives).

### 5.5 2:1 (ligand to metal) Pt(II) complexes derived from substituted 1,10-phenanthrolines.

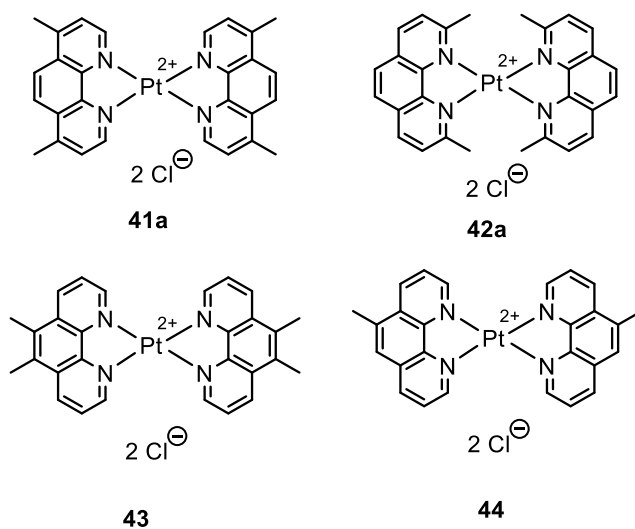
- ◆ The syntheses of complexes **50-55** were carried out in a single reaction step at reflux temperature of H<sub>2</sub>O/EtOH mixture for 48 hours.



- ◆ However, to access complexes **49a-49d** it was necessary two reaction steps obtaining previously the corresponding dichloro derivatives **46a-d**. The addition of HCl was necessary to obtain the complexes in the same way as in the case of complexes **47a-d** and **48a-b**.



- ◆ In the case of compounds **50-55**, those who have methyl groups as substituents present  $\Delta T_m$  values above  $10^\circ \text{C}$ , under potassium conditions.



- ◆ Complexes **49a-49d** are not better quadruplex stabilizing compounds than the corresponding ligand or the corresponding mixed Pt(II) complex.
- ◆ Regarding to cytotoxic activity, complexes **49c** and **49d** (*N*-methypiperazine and dimethyl derivatives) was tested in PC3, MCF7 and HT29 cancer cell lines. Both have  $\text{IC}_{50}$  values below  $15 \mu\text{M}$  for the three cancer cell lines except **49c** in PC3 cell line ( $\text{IC}_{50} = 32 \mu\text{M}$ ).



**ANEXO A: Técnicas para el estudio de interacciones ADN cuádruple-ligando**



## **A.1 Técnicas para el estudio de interacciones ADN cuádruple-ligando y evaluación de la actividad biológica**

La evaluación de la capacidad de unión de moléculas de pequeño tamaño hacia el ADN cuádruple se ha llevado a cabo tradicionalmente a través de la optimización y adecuación de distintos ensayos biofísicos y bioquímicos previamente empleados para el estudio de la interacción entre ligandos y ADN de doble cadena.<sup>223</sup> Todos los métodos empleados son muy sensibles a la composición del tampón empleado (pH, tipo de catión, etc.). Este hecho es especialmente relevante cuando se realizan ensayos con oligonucleótidos con la secuencia telomérica, ya que su topología es muy dependiente de estos parámetros.

Los ensayos para la determinación de la capacidad de interacción de un ligando con el ADN cuádruple se pueden clasificar del siguiente modo:

- a) Ensayos de desnaturalización térmica del ADN. Permiten conocer la capacidad estabilizadora de los ligandos.
- b) Ensayos de determinación de la afinidad o capacidad de unión de los ligandos hacia el ADN.
- c) Ensayos espectroscópicos para determinar datos estructurales.
- d) Ensayos de actividad biológica.

En este apartado se recoge una selección de técnicas y métodos experimentales empleados comúnmente en los estudios de determinación de la interacción entre el ADN cuádruple y distintos ligandos de bajo peso molecular.

---

<sup>223</sup> Fox, K. R. *Drug-DNA Interaction Protocols. Methods in Molecular Biology*, 2<sup>nd</sup> edition, 2010, ISBN 978 1 60327 417 3, Editorial Springer Science (Humana Press)

### A.1.1. Ensayos de desnaturalización térmica

Los estudios de desnaturalización térmica permiten determinar el grado de estabilización que ejercen los ligandos sobre el ADN. Para ello, se pueden utilizar tres técnicas diferentes: UV-visible, espectroscopia FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) y dicroísmo circular (DC).

El valor de  $\Delta T_m$  (incremento de la temperatura media de desnaturalización) se obtiene del mismo modo en las tres técnicas, calculando la diferencia del valor de  $T_m$  de ADN cuádruple en presencia y en ausencia de ligando (Fórmula 4).

$$\Delta T_m = T_{m(ADN+L)} - T_{m(ADN)}$$

*Fórmula 4. Cálculo de  $\Delta T_m$*

De este modo el efecto que produce un ligando se relaciona con un valor característico  $\Delta T_m$ , que varía en función de las concentraciones del ligando presente en el medio.

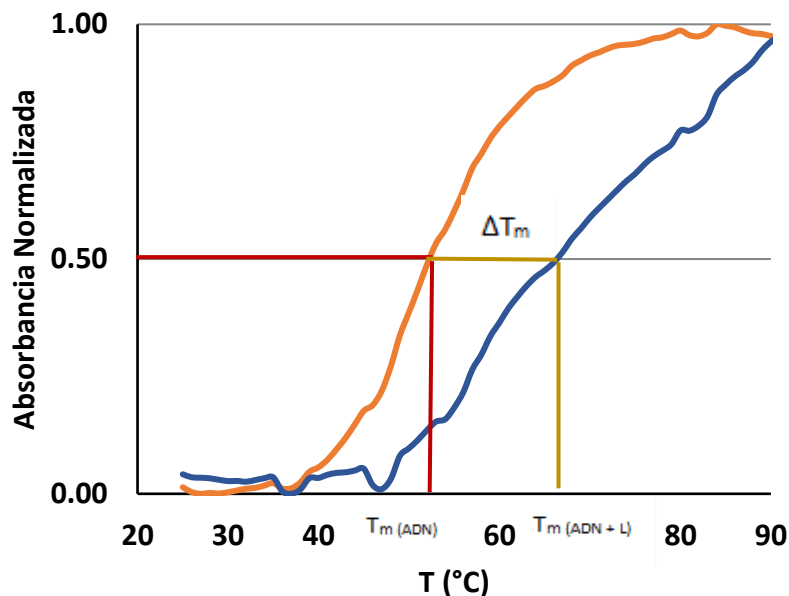
- **Espectroscopia de Ultravioleta-visible**

Los ácidos nucleicos presentan una fuerte absorbanza a 260 nm que se ve reducida cuando el oligonucleótido adquiere su estructura secundaria. En el caso del cuádruple-G, también se observa un máximo a 295 nm característico de la estructura.<sup>224</sup>

Para determinar los valores de  $\Delta T_m$ , se registra la absorbanza en presencia y ausencia de ligando en un rango típico de temperaturas de 20 a 90 °C. La representación gráfica de la temperatura con respecto a la absorbanza normalizada (Figura 142) permitirá conocer el valor de  $T_m$  en ausencia y presencia de ligando, y así poder calcular el grado de estabilización ( $\Delta T_m$ ).

---

<sup>224</sup> Murat, P.; Singh, Y.; Defrancq, E. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5293-5307.



**Figura 142.** Curva de desnaturalización del ADN cuádruple en ausencia (línea *naranja*) y presencia de un ligando estabilizador (línea *azul*).

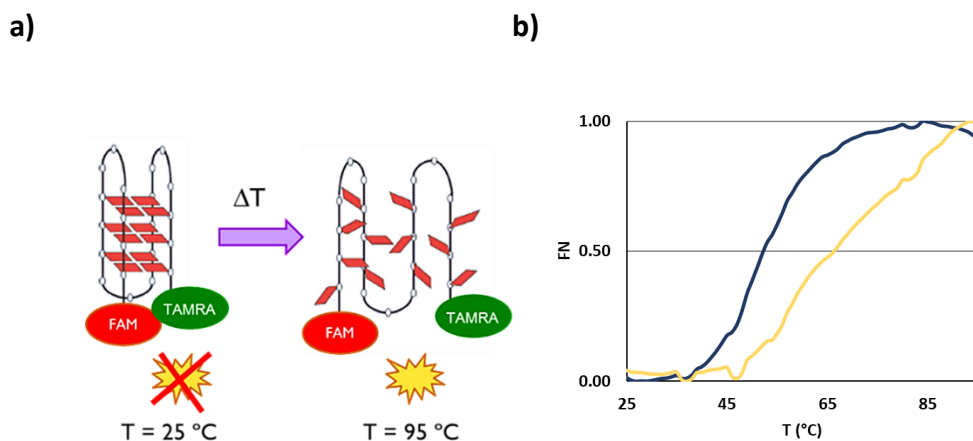
La curva de desnaturalización de ADN tiene una forma sigmoidea y el valor característico  $T_m$  (temperatura de desnaturalización media) representa el punto medio entre la forma del ADN completamente plegada y la forma completamente desplegada.

- **Desnaturalización térmica por FRET**

La determinación del grado de estabilización frente a la desnaturalización térmica mediante el empleo del fenómeno FRET (del inglés, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) consiste en la utilización de un oligonucleótido ligado a dos etiquetas fluorescentes en sus extremos. Normalmente, en el extremo 5' se encuentra el fluoróforo dador FAM (6-carboxifluoresceína) y en el extremo 3' el aceptor TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).<sup>208,209</sup> Cuando el cuádruple se encuentra en su conformación plegada, los fluoróforos están próximos en el espacio y como consecuencia de ello la emisión de fluorescencia está inactivada por el fluoróforo aceptor (*quencher*). El incremento de la temperatura durante el transcurso del experimento produce el desplegamiento de la estructura secundaria del ADN cuádruple



y, como consecuencia de ello, los fluoróforos se alejan suficientemente y produciendo la máxima fluorescencia de emisión del fluoróforo (Figura 143).



**Figura 143. (a)** Representación del proceso de desnaturalización por FRET **(b)** Curva de desnaturalización del ADN cuádruple en ausencia (línea azul) y presencia de un ligando estabilizador (línea amarilla).

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  $\mu\text{M}$ .<sup>62</sup>

Por otro lado, esta técnica presenta como inconveniente la posible interacción de los ligandos con los fluoróforos unidos al ADN.<sup>225,226,227</sup>

Otro de los parámetros que se puede determinar con esta técnica es la selectividad de unión de un ligando al cuádruple-G con respecto a otro tipo de ácidos nucleicos (Fórmula 10). El experimento se puede llevar a cabo añadiendo un segundo ADN sin etiquetas fluorescentes, observando si se produce competición en la unión del ligando a los dos tipos de ADN. Esto se manifiesta con un cambio o no en el valor  $\Delta T_m$  con respecto al resultado obtenido en ausencia de la secuencia competidora. El segundo ácido nucleico empleado suele ser el ADN de timo de ternera o secuencias cortas de ADN dúplex.<sup>210, 212</sup>

<sup>225</sup> Darby, R. A.; Sollogoub, M.; McKeen, C.; Brown, L.; Risitano, A.; Brown, M.; Barton, C.; Brown, T.; Fox, K. R. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e39.

<sup>226</sup> Guyen, B.; Schultes, C. M.; Hazel, P.; Mann, J.; Neidle, S. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 981-988.

<sup>227</sup> Schultes, C. M.; Guyen, B.; Cuesta, J.; Neidle, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4347-4351.

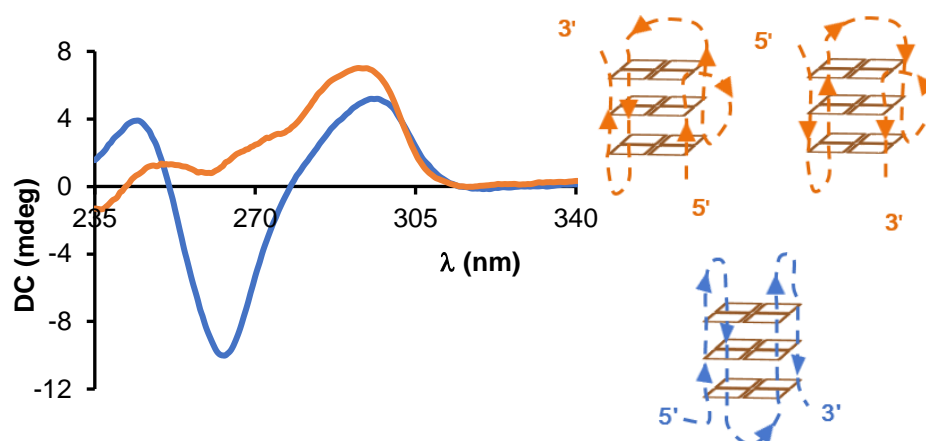
$$S = \Delta T_m (\text{ADN cuádruple-G-ADN dúplex-Ligando}) / \Delta T_m (\text{ADN cuádruple-G-Ligando})$$

**Fórmula 10.** Cálculo de la selectividad.

- **Dicroísmo circular (DC)**

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica ampliamente utilizada para detectar y analizar fenómenos relacionados con la quiralidad de las moléculas. Se emplea frecuentemente para el estudio de macromoléculas quirales como las proteínas o los ácidos nucleicos debido a que sus estructuras secundarias originan señales de dicroísmo circular características.<sup>228</sup>

Existe una gran variedad de conformaciones que pueden adoptar las secuencias ricas en guaninas<sup>47,229</sup> y cada una de ellas tiene un espectro característico de dicroísmo circular. En la figura 144 se representan dos espectros de dicroísmo circular para el oligonucleótido de secuencia telomérica en dos condiciones iónicas, con sus máximos y mínimos característicos para cada conformación.



**Figura 144.** Espectros de DC del oligonucleótido Tel-22 5'-AGGG(TTAGGG)<sub>3</sub>-3', la conformación antiparalela (tampón de sodio, color azul) y la mezcla de estructuras híbridas (tampón de potasio, color naranja)<sup>61</sup>

<sup>228</sup> Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody R. W. (editores), *Circular Dichroism: Principles and Applications 2<sup>nd</sup> edition*, 2000, ISBN 978 0 471 33003 5, Editorial John Wiley & Sons, Inc.

<sup>229</sup> Phillips, K.; Dauter, Z.; Murchie, A. I.; Lilley, D. M.; Luisi, B. J. *Mol. Biol.* 1997, 273, 171-182.

El DC ha sido ampliamente utilizado para monitorizar el desplegamiento del ADN cuádruple al incrementar la temperatura. La determinación de los valores de  $\Delta T_m$  se realiza representando la elipticidad con respecto a la longitud de onda y observando los cambios en el máximo de absorbancia. En el caso de las secuencias teloméricas, se realizará a 288 nm para la secuencia antiparalela (condiciones iónicas de  $\text{Na}^+$ ) y a 290 nm para el híbrido (condiciones iónicas de  $\text{K}^+$ ).

La determinación de la capacidad estabilizadora de los ligandos por DC es muy útil cuando la hipercromicidad o hipocromicidad está poco acentuada (no se podría medir por UV-visible) o cuando los ligandos pueden interactuar con los fluoróforos utilizados para etiquetar los oligonucleótidos utilizados en la técnica FRET.

Además de la obtención de espectros característicos y específicos para cada topología y su uso para determinar valores de  $\Delta T_m$ , esta técnica puede utilizarse para observar los cambios producidos en la estructura del cuádruple en presencia de un ligando no quiral de forma cualitativa. En ocasiones, la unión del ligando no quiral, induce una señal de DC en la longitud de onda correspondiente a la absorbancia del compuesto unido. Por ejemplo, los compuestos intercalantes suelen producir un DC inducido negativo mientras que aquellos que se unen al surco generan una señal positiva en el espectro. 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.<sup>205,230</sup>

### **A.1.2 Determinación de la afinidad o capacidad de unión**

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

El ensayo G4-FID (*G-quadruplex Fluorescence Intercalator Displacement assay*) es un ensayo de evaluación de la interacción de forma indirecta, que se desarrolló en el grupo de investigación de M.P. Teulade-Fichou.<sup>231</sup> El ensayo se basa en el empleo de

---

<sup>230</sup> Paramasivan, S.; Rujan, I.; Bolton, P.H. *Methods* **2007**, *43*, 324-331.

<sup>231</sup> Monchaud, D.; Allain, C.; C., Teulade-Fichou, M. P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4842-4845.

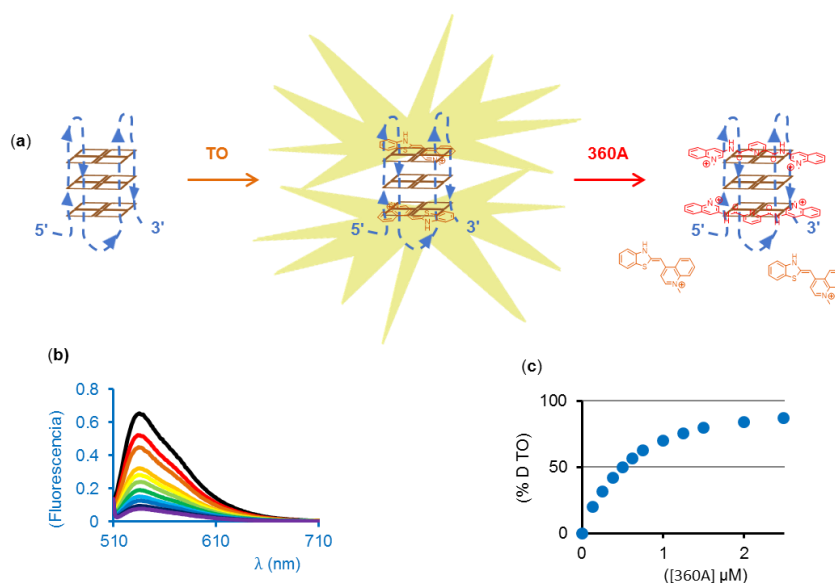
ligandos con capacidad de unión al ADN conocida y que emiten fluorescencia solo cuando están unidos a él, pero no cuando se encuentran en su estado libre.

Habitualmente, el ligando utilizado en esta técnica es el naranja de tiazol (TO, del inglés, *Thiazole orange*). El naranja de tiazol cuando está unido al ADN cuádruplex o al ADN dúplex, emite una fluorescencia característica en el intervalo de 510-750 nm. Al realizar el experimento se mide el área bajo la curva de emisión generado por la unión del TO al ADN y el área bajo la curva de los espectros obtenidos tras la adición sucesiva de alícuotas del ligando objeto de estudio a la disolución inicial (Figura 145, **a** y **b**). Si el ligando a estudiar se une al ADN del mismo modo que el naranja de tiazol, este se verá desplazado y el valor del área bajo la curva será inferior al obtenido inicialmente. 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 145, **c**).

Es importante tener en cuenta que, al ser un método de determinación indirecta de la interacción, 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.<sup>232</sup>

---

<sup>232</sup> Selección de artículos sobre el ensayo G4-FID: **a**) Monchaud, D.; Allain, C.; Bertrand, H.; Smargiasso, N.; Rosu, F.; Gabelica, V.; De Cian, A.; Mergny, J. L.; Teulade-Fichou, M. P. *Biochimie*, **2008**, *90*, 1207-1223; **b**) Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M. P. *G-Quadruplex DNA, Methods and Protocols*, **2010**, 257-271, ISBN 978 1 58829 950 5, Editorial Springer (Humana Press) **c**) Tran, P. L. T.; Largy, E.; Hamon, F.; Teulade-Fichou, M. P.; Mergny, J. L. *Biochimie* **2011**, *93*, 1288-1296; **d**) Largy, E.; Hamon, F.; Teulade-Fichou, M. P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 3419-3427.



**Figura 145. (a)** Procedimiento general del experimento G4-FID: la sonda fluorescente (TO) unida al ADN cuádruple-G emite fluorescencia tras su excitación; al añadir alícuotas de ligando disminuye la fluorescencia emitida por el TO; **(b)** espectros de emisión de fluorescencia obtenidos para el ADN cuádruple-G; disolución de ADN + TO (en color negro); ADN + TO + **ligando** a distintas concentraciones (diferentes colores); **(c)** el porcentaje del naranja de tiazol desplazado (% DTO) por el ligando

Del gráfico obtenido al representar la concentración de ligando con respecto al porcentaje de naranja de tiazol desplazado, se determina el valor de  $^{50}DC$ . Es decir, la cantidad necesaria de ligando para desplazar un 50% de naranja de tiazol del correspondiente ADN. Previamente, en el caso de la secuencia telomérica, fue determinada su constante de afinidad siendo esta  $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ .<sup>233</sup> Esto quiere decir que los ligandos que se unan del mismo modo que el TO al cuádruple, y tengan un valor de  $^{50}DC$  bajo tendrán una afinidad, igual o superior a  $3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ .

Con esta técnica también se puede calcular la selectividad con respecto al dúplex o incluso con respecto a otras estructuras de ADN (Fórmula 11).

<sup>233</sup> Monchaud, D.; Allain, C.; Teulade-Fichou, M. -P. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 1585-1588.

$$S = {}^{50}\text{DC}_{(\text{ADN dúp lex})} / {}^{50}\text{DC}_{(\text{ADN cuádruple-G})}$$

*Fórmula 11. Cálculo de la selectividad*

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

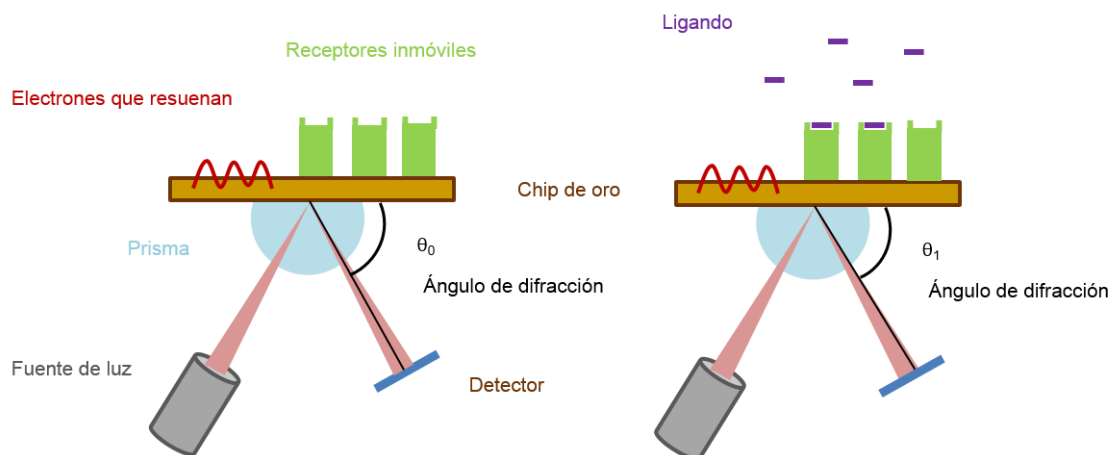
La resonancia de plasmón de superficie (SPR) o la calorimetría isotérmica (ITC) son técnicas empleadas para estudios de cinética y la determinación de los parámetros termodinámicos asociados a la interacción entre ligandos y el ADN cuádruple-G. Por otro lado, podemos incluir en este grupo de técnicas la diálisis de equilibrio competitiva, ya que permite obtener las constantes de asociación  $K_a$  entre el ligando y el ADN.

- **Resonancia de plasmón de superficie (SPR)**

La resonancia de plasmón de superficie SPR (del inglés, *Surface Plasmon Resonance*) es una potente técnica que permite determinar la afinidad y selectividad de las interacciones entre biomoléculas y ligandos. SPR permite el análisis de constantes de asociación ( $K_a$ ), constantes de velocidad, la variación de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) o la estequiometría de la reacción, entre otros. Esta técnica 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 146). Entre las ventajas de este método se pueden destacar la posibilidad de trabajar a concentraciones bajas del oligonucleótido y la posibilidad de obtener datos termodinámicos y cinéticos precisos.<sup>234</sup>

---

<sup>234</sup> Liu, Y.; Wilson, W. D. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *613*, 1-23.

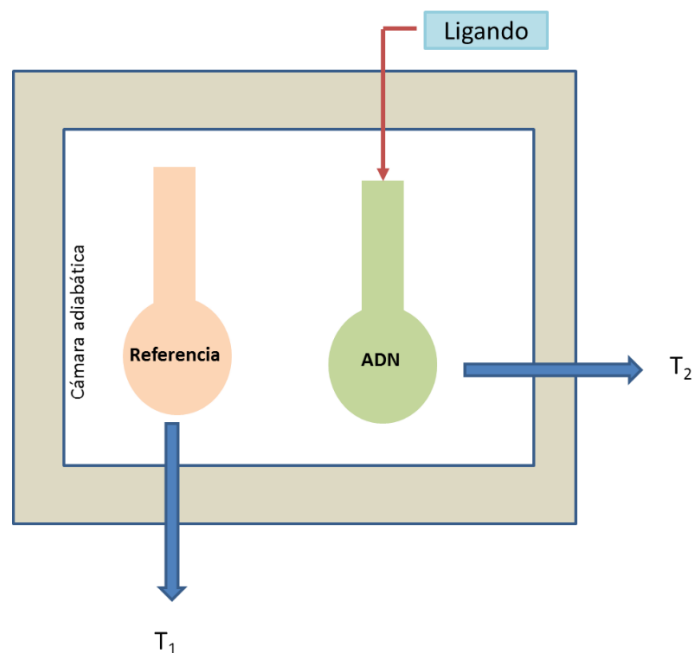


**Figura 146.** Resonancia de plasmón de superficie.  $\theta_0$  – ángulo de difracción en ausencia del ligando;  $\theta_1$  – ángulo de difracción en presencia del ligando. (Imagen procedente de la referencia 61)

- **Valoraciones por calorimetría isotérmica**

Las valoraciones por calorimetría isotérmica son un rápido y robusto método que permite estudiar las interacciones moleculares. Permite obtener una completa caracterización sobre los parámetros termodinámicos involucrados en el proceso de asociación de ligando-proteína o ligando-ADN. La constante de afinidad,  $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  y la estequiometría de unión ( $n$ ) son los parámetros que se pueden determinar mediante esta técnica. Además, realizando el experimento a diferentes temperaturas es posible determinar la variación en la capacidad calorífica del proceso.<sup>235</sup>

<sup>235</sup> Salim, N. N.; Feig, A. L. *Methods* **2009**, *47*, 198-205.



**Figura 147.** Valoración por calorimetría isotérmica

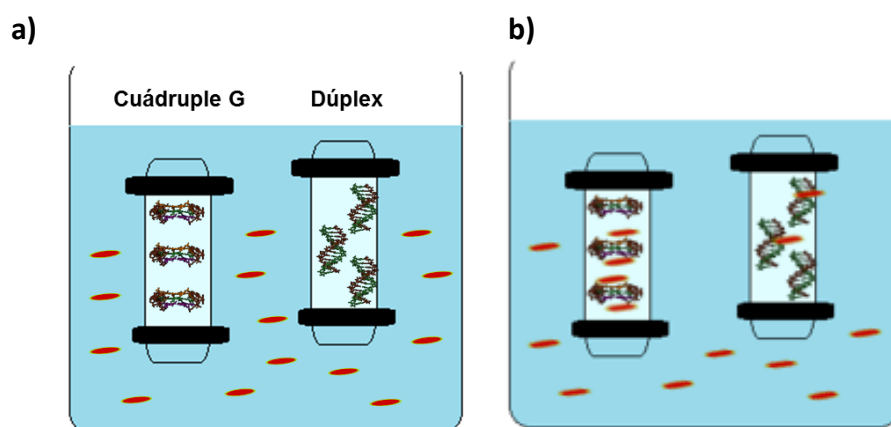
En una cámara adiabática se colocan dos celdas (Figura 147), una con una disolución referencia del ligando a estudiar y otra con la disolución de ADN. Sobre la cámara que contiene la disolución de ADN se van adicionando alícuotas de volumen conocido del ligando y el calor generado se registra. Este valor es corregido con el valor obtenido de la celda referencia. La representación de los valores obtenidos como función de la relación molar entre ligando y el ADN permite la obtención de los parámetros termodinámicos.

- **Diálisis de equilibrio competitiva**

La diálisis de equilibrio competitiva se diseñó inicialmente para estudiar la interacción de moléculas pequeñas con el ADN de doble cadena. Sin embargo, con el tiempo el método ha sido adaptado al estudio de la interacción competitiva de ligandos frente a diferentes tipos de ADN. 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, las diferentes conformaciones de ADN (dúplex y cuádruple-G) se disponen en el interior de membranas de diálisis cuyo tamaño de poro permite la difusión de moléculas pequeñas (ligandos) pero no la salida de macromoléculas (ADN) (Figura 148). Estas membranas se colocan en el interior de un vaso de precipitados que contiene una disolución de concentración conocida del ligando a estudiar. A medida que se alcanza el equilibrio, aumenta la concentración de ligando en el interior de las membranas. Posteriormente, y tras la adición de un detergente adecuado, la concentración de ligando se mide por UV-visible determinando así la selectividad del ligando con respecto a los diferentes tipos de ADN, a través del cálculo de una constante de asociación ( $K_a$ ).<sup>236</sup>



**Figura 148.** Diálisis de equilibrio competitiva: vaso de precipitados con dos bolsas semipermeables, que contienen disoluciones con distintos tipos de ADN. Las bolsas están sumergidas en una disolución de ligando tamponada (a): a tiempo 0 horas y (b) a tiempo 24 horas

### A.1.3. Experimentos espectroscópicos estructurales

- **Espectrometría de masas (EM)**

Uno de los métodos que permite analizar los fenómenos de asociación y disociación entre distintas especies es la espectrometría de masas empleando una

<sup>236</sup> Ragazzon, P.; Chaires, J. B. *Methods* **2007**, *43*, 313-323.

fuentes de ionización de electrospray (ESI-MS, del inglés, *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*). La aplicación de este método en el análisis de la interacción existente entre un ligando y el ADN cuádruple-G es relativamente reciente.<sup>237</sup> Por otra parte, varios estudios han demostrado que por ESI-MS se pueden determinar, por ejemplo, las constantes de asociación 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. Además, con esta técnica es posible la determinación del número de hebras que forman la estructura, el número de cationes unidos o los ligandos unidos, entre otros aspectos.<sup>238</sup>

Sin embargo, la desventaja de esta técnica es que requiere la ausencia absoluta de cationes monovalentes de K<sup>+</sup> y de Na<sup>+</sup> en el medio, por eso se realiza normalmente en un tampón que contiene sales de amonio (acetato amónico).<sup>98,239,240</sup>

- **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. En algunos casos ha sido posible la obtención de los correspondientes complejos ADN-ligando<sup>241,242,243,244</sup> lo que ha permitido conocer el tipo de interacción establecida entre ambos. Por ejemplo, en 2003 se elucidó la estructura formada entre la secuencia telomérica de *Oxytrichia nova* d(GGGGTTTTGGGG) y el ligando BSU6039 (un derivado de acridina). Con ello se pudo determinar que dicho compuesto estabiliza el cuádruple por apilamiento con una de las tétradas terminales y por interacción mediante enlace de hidrógeno con una timina de uno de los bucles.<sup>110</sup>

---

<sup>237</sup> Rosu, F.; De Pauw, E.; Gabelica, V. *Biochimie* **2008**, *90*, 1074-1087.

<sup>238</sup> Ginnari-Satriani, L.; Casagrande, V.; Bianco, A.; Ortaggi, G.; Franceschin, M. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2513-2516.

<sup>239</sup> Gabelica, V. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *613*, 89-101.

<sup>240</sup> Lombardo, C. M.; Martínez, I. S.; Haider, S.; Gabelica, V.; De Pauw, E.; Moses, J. E.; Neidle, S. *Chem. Commun. (Camb.)* **2010**, *46*, 9116-9118.

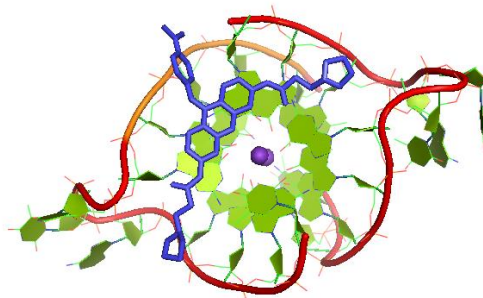
<sup>241</sup> Campbell, N. H.; Patel, M.; Tofa, A. B.; Ghosh, R.; Parkinson, G. N.; Neidle, S. *Biochemistry* **2009**, *48*, 1675-1680.

<sup>242</sup> Campbell, N. H.; Parkinson, G. N.; Reszka, A. P.; Neidle, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6722-6724.

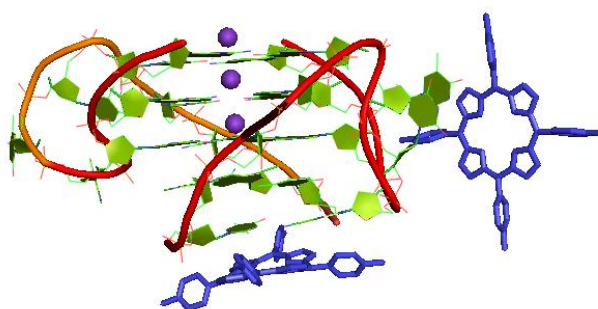
<sup>243</sup> Parkinson, G. N.; Ghosh, R.; Neidle, S. *Biochemistry*, **2007**, *46*, 2390-2397.

<sup>244</sup> Collie, G. W.; Sparapani, S.; Parkinson, G. N.; Neidle, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2721-2728.

a)



b)



**Figura 149.** Ejemplos de determinación del modo de interacción por difracción de rayos X **(a)** Representación de BRACO-19 interaccionando con ADN-cuádruple. PDB id: 3ec5 **(b)** Representación de TMPyP4 interaccionando con ADN-cuádruple PDB id: 2hri

La difracción de rayos X ha sido y es muy útil para el diseño racional de ligandos más selectivos y para estudiar la diferencia de reconocimiento de los ligandos entre el ADN y ARN.<sup>245</sup>

- **Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

El estudio de las interacciones ligando-ADN por resonancia magnética nuclear 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<sup>48</sup> o la interacción entre ligandos y los cuádruples-G en disolución.<sup>246,155</sup>

---

<sup>245</sup> Collie, G.; Reszka, A. P.; Haider, S. M.; Gabelica, V.; Parkinson, G. N.; Neidle, S. *Chem. Commun.* **2009**, 48, 7482–7484.

<sup>246</sup> Cosconati, S.; Marinelli, L.; Trotta, R.; Virno, A.; De Tito, S.; Romagnoli, R.; Pagano, B.; Limongelli, V.; Giancola, C.; Baraldi, P. G.; Mayol, L.; Novellino, E.; Randazzo, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 6425–6433.

Una de las señales características y que cuyo desplazamiento varía cuando existe interacción entre un ligando y la estructura del cuádruple son los protones del oligonucleótido correspondiente a los grupos N-H de las guaninas, que participan en los enlaces tipo *Hoogsteen*. Estas señales aparecen en la zona del espectro entre 10 y 12 ppm y la modificación de estas señales son las que indican la interacción con un ligando.<sup>116</sup>

Para el estudio estructural del cuádruple son necesarios distintos experimentos bidimensionales, como NOESY, TOCSY o <sup>13</sup>C-HSQC.<sup>45,155,245</sup>

#### **A.1.4 Ensayos de actividad biológica**

- **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*).<sup>7</sup> El ensayo TRAP está basado en dos etapas: **i)** la telomerasa realiza su función catalítica adicionando la secuencia TTAGGG a un oligonucleótido; **ii)** 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*). Por último, se separan los fragmentos de ADN amplificados por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida. A partir de la cantidad de ADN extendido se puede cuantificar la actividad de la telomerasa. Los resultados obtenidos con esta técnica se expresan por medio de los valores de <sup>tel</sup>IC<sub>50</sub>. Este parámetro representa la concentración de ligando necesaria para producir una inhibición del 50% de la enzima.

Al adicionar ligandos con capacidad estabilizadora del cuádruple en el ensayo del TRAP, se puede cuantificar la inhibición de la telomerasa producida por dichos ligandos.

- **Protocolo TRAP-LIG**

El ensayo TRAP modificado (TRAP-LIG) incorpora una etapa adicional al procedimiento estándar TRAP: la eliminación del ligando después de la elongación del

oligonucleótido por parte de la telomerasa 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.<sup>247,248</sup>

### **A.1.5 Ensayos en cultivos celulares**

Independientemente de que normalmente se evalúe el efecto biológico producido por los ligandos estabilizadores de cuádruple-G telomérico 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<sup>249</sup> o el ensayo de citotoxicidad con la sulforodamina B (en inglés, el SRB test).<sup>250</sup>

- **Ensayo de Citotoxicidad con MTT**

El ensayo de citotoxicidad con MTT (sal de tetrazolio) 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 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 del producto de reducción del MTT, el formazán (Figura 92).

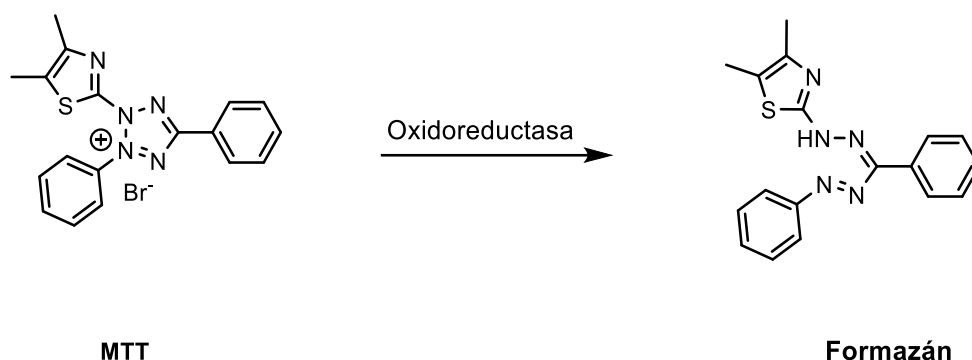
---

<sup>247</sup> Gomez, D.; Mergny, J. L. Riou, J. F. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 3365-3368.

<sup>248</sup> Reed, J.; Gunaratnam, M.; Beltran, M.; Reszka, A.P.; Vilar, R.; Neidle, S. *Anal. Biochem.* **2008**, *380*, 99-105.

<sup>249</sup> Berridge, M-V.; Herst, P. M.; Tan, A. S. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2005**, *11*, 127-152.

<sup>250</sup> Leonetti, C.; Scarsella, M.; Riggio, G.; Rizzo, A.; Salvati, E.; D'Incalci, M.; Staszewsky, M.; Frapolli, L.; Stevens, M. F.; Stoppacciaro, A.; Mottolese, M; Antoniani, B.; Gilson, E.; Zupi, G.; Biroccio, A. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 7284-7291.

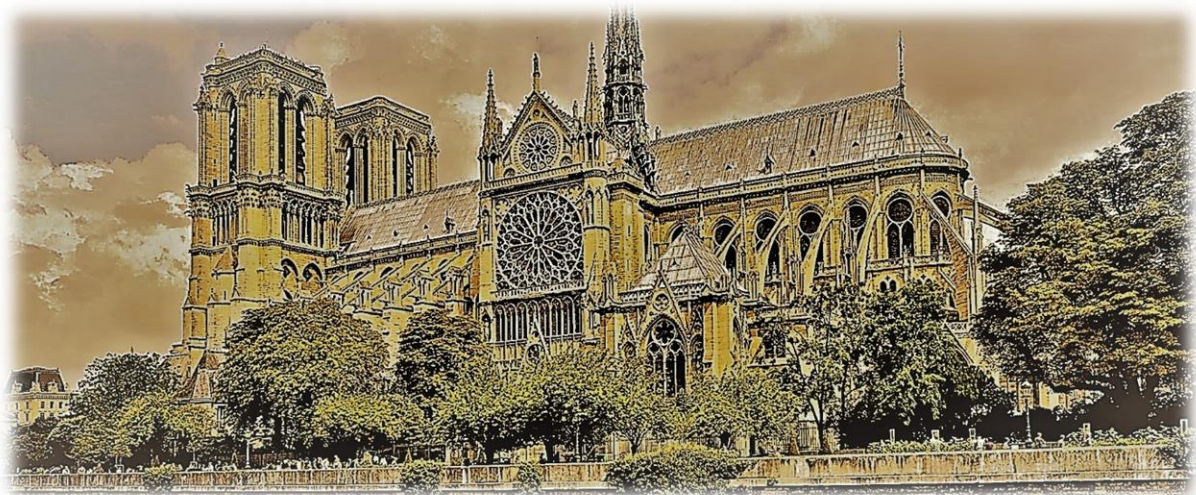


**Figura 92.** Reducción del MTT a formazán

Las oxidoreductasas dependientes de NADPH, en determinadas condiciones, reflejan el número de células vivas. Por lo tanto, tras el periodo de incubación con los ligandos objeto de estudio, se adiciona el compuesto MTT en el ensayo. Debido a la presencia de las oxidoreductasas en las células aún vivas, el MTT se reducirá a formazán y la cantidad de este compuesto se determina por UV-vis (500-600 nm). De este modo, y por comparación con los controles que suponen una viabilidad celular del 100%, se determinan los distintos porcentajes de células viables para cada concentración del ligando objeto de estudio. El porcentaje de células vivas se representa en una gráfica frente a la concentración del compuesto estudiado, y posteriormente se determina el valor IC<sub>50</sub>. Este valor representa la concentración de compuesto necesaria para producir la muerte del 50% de las células tumorales. Como control negativo se utilizan células sometidas a las condiciones del ensayo, en ausencia de compuesto objeto de estudio.

121





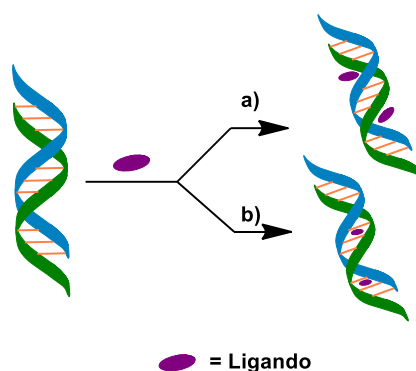
## **ANEXO B:** **Técnica complementaria**





## B.1. Viscosimetría

Las moléculas capaces de unirse al ADN suelen presentar dos tipos de unión: covalente o no covalente. La unión no covalente es un tipo de unión reversible, que se puede producir por unión electrostática externa, unión al surco o intercalación.<sup>251</sup> El tipo o tipos de unión favorecidos serán aquellos cuya energía implicada en el proceso sea más favorable, y en ocasiones dependerá de la secuencia de ADN concreta.



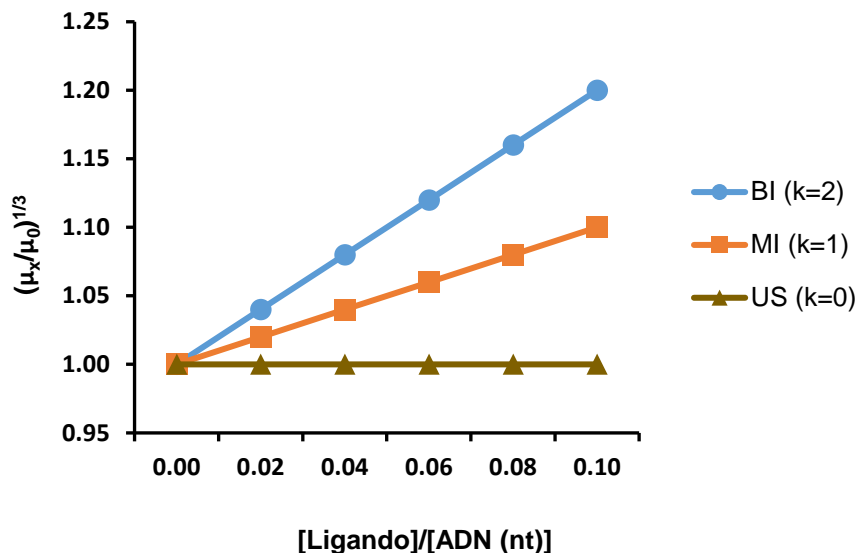
**Figura 150.** Modos de unión al ADN. Unión no covalente (a) por unión al surco (b) por intercalación

Las medidas de viscosimetría nos proporcionan información sobre el tipo de unión no covalente de los ligandos al ADN dúplex. Si un ligando se intercala en la doble hélice, la longitud de contorno de la hélice aumenta. Esto supone un incremento en la viscosidad de la disolución de ADN. Por otro lado, si el ligando no se intercala e interactúa en el surco o con el esqueleto fosfato, la viscosidad no se ve significativamente alterada, ya que no existe aumento en la longitud de la doble hélice.

La pendiente de la recta obtenida al representar la raíz cúbica de la viscosidad de relativa  $(\mu/\mu_0)^{1/3}$  frente a la relación molar de ligando y ADN es la que nos proporcionará información relevante sobre el tipo de interacción. Los valores de la pendiente suelen estar comprendidos entre 0 y 1, donde 0 nos indica que no existe intercalación (sino una unión al surco o unión externa) y 1 indica que nos encontramos ante un intercalante clásico. Por otra parte, los compuestos denominados bisintercalantes, es decir, aquellos

<sup>251</sup> Strekowski, L.; Wilson, B. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2007**, 623, 3-13.

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 151).<sup>252,253</sup>



**Figura 151.** Gráfica que representa la viscosidad relativa  $(\mu_x/\mu_0)^{1/3}$  frente a la relación  $[\text{Ligando}]/[\text{ADN (nt)}]$ ,  $\mu_x$  - viscosidad absoluta de la disolución ADN-ligando;  $\mu_0$  - 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,  $k = 0$

Esta técnica, hasta la fecha, no proporciona información sobre la interacción existente entre ligandos y el ADN cuádruple-G. Sin embargo, nos permite realizar un estudio complementario sobre el tipo de unión que presentan los ligandos que, además de reconocer al cuádruple-G, presentan una afinidad relevante hacia el ADN dúplex.

<sup>252</sup> Fairley, T. A.; Tidwell, R. R.; Donkor, I.; Naiman, N. A.; Ohemeng, K. A.; Lombardy, R. J.; Bentley, J. A.; Cory, M. J. *Med. Chem.* **1993**, *36*, 1746-1753.

<sup>253</sup> Kubota, Y.; Hashimoto, K.; Fujita, K.; Wakita, M.; Miyanoohana, E.; Fujisaki, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *478*, 23-32.



**ANNEX C:**  
**Short stay abroad**



As part of the International Doctorate Program, I spent four months in 2016 as a Visiting Scholar at Professor Marco Bandini's group at the University of Bologna, Italy. One of the purposes of this short stay was to broaden my experimental skills in organic synthesis. I was awarded a travelling grant by the University of Alcalá (UAH), which fully covered my mobility and lodging expenses. I am grateful to UAH for this funding.

One of the projects of Professor Bandini's research group involves the development of new catalytic methodologies based on metal (i.e. Au(I)) or metal-free (Brønsted acid) catalysis.

During my stay in the University of Bologna I took part in the development of the project entitled "*TBAF catalyzed one-pot synthesis of allenyl-indoles*", which was published this year (2017) in *Organic Chemistry Frontiers*.<sup>254</sup>

This project is a part of the doctoral thesis of Professor Marco Bandini's student **Assunta de Nisi**. My principal contribution to this work consisted of the preparation of some final products (numbered in the paper as **2b-k**) for their complete characterization. Additionally, I took part in the writing of the experimental section of the mentioned research article. The publication resulting from this work is included next in this annex.

---

<sup>254</sup> De Nisi, A.; Sierra, S.; Ferrara, M.; Monari, M.; Bandini, M. *Organic Chemistry Frontiers* **2017**, *4*, 1849-1853.



## RESEARCH ARTICLE

View Article Online  
View Journal

Cite this: DOI: 10.1039/c7qo00414a

## TBAF catalyzed one-pot synthesis of allenyl-indoles†

A. De Nisi,<sup>a</sup> S. Sierra,<sup>b</sup> M. Ferrara,<sup>b</sup> M. Monari<sup>a</sup> and M. Bandini<sup>a\*</sup>Received 25th May 2017,  
Accepted 13th June 2017  
DOI: 10.1039/c7qo00414a

rsc.li/frontiers-organic

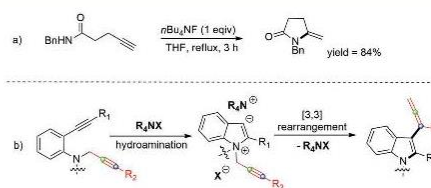
The site selective synthesis of functionalized indoles is presented under environmentally convenient tetrabutylammonium fluoride catalysis. The metal-free approach exploits the combined efficiency of Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup> and F<sup>-</sup> ions in performing a cascade sequence involving intramolecular hydroamination of the C–C triple bond, cleavage of silyl-protecting groups and site-selective sigmatropic aza-Cope-type [3,3]-rearrangement. A range of C(3)-allenyl-(1*H*)-indoles (**2**) is obtained in an efficient manner (yield up to 93%) providing a valuable synthetic alternative to noble metal-based protocols.

The intramolecular hydroamination reaction is among the most powerful and frequently employed synthetic approaches to the synthesis of benzofused aza-heterocycles.<sup>1</sup> The process cannot be spontaneously performed due to the lack of reactivity complementarity in the acyclic precursors, therefore an electrophilic activation becomes mandatory. In this regard, soft metal catalysis has gained important credits over the past few years, triggering efficient activation of the C–C triple bond towards the regioselective inter- as well as intramolecular condensation with heteroatom-based nucleophiles. Among the others, electrophilic metal species based on Pd, In, Au, Pt, Ag, *etc* have found efficient applications in catalytic variants showing good chemical performances and substrate scope.<sup>2</sup> However, the use of noble metals leads to important issues in terms of sustainability, and the replacement of coinage metals with cheaper metal-free catalytic agents is still highly desirable.

In this direction, the employment of strong Brønsted acids as well as bases such as *p*TsOH, TfOH, KOH and Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was found to be competent in the functionalization of alkynes with hetero-nucleophiles even if the protocols suffered from the requirements of harsh reaction conditions and large and even super-stoichiometric amounts of additives.<sup>3,4</sup> Alternatively, soft quaternary ammonium salts are known to act as synthetic equivalents of late-transition metal species in activating unsaturated hydrocarbons towards nucleophilic attack. The subsequent replacement of the ammonium fragment by a proton made catalytic variants potentially amenable.

In this direction, Jacobi and co-workers in 1995 demonstrated that large amounts of tetrabutylammonium fluoride (TBAF) can effectively promote the intramolecular hydroamination of acetylenic amides to give cyclic enamides (Scheme 1a).<sup>5</sup> In line with this seminal work, the methodology found numerous applications in the synthesis of heterocyclic scaffolds through the X–H addition to unsaturated hydrocarbons.<sup>6</sup> However, the use of ammonium salts in catalytic transformations was sporadically documented and never fully and systematically investigated in organic processes.<sup>7</sup>

In conjunction with our ongoing scientific interest focused on the development of sustainable one-pot synthetic routes to functionalized indolyl cores,<sup>8,9</sup> we decided to verify the possibility to replace II and III row transition metals with catalytic amounts of readily accessible and cheap ammonium salts for obtaining synthetically useful C(3)-allenyl-(1*H*)-indoles.<sup>10</sup> The working plan dealt with the initial *N*-alkylated-2-alkynyl aniline cyclization followed by the aza-Cope-type [3,3]-rearrangement of the transient indolinium adduct to deliver the C(3)-substituted indole core with an overall C–N and C–C bond forming process (Scheme 1b).<sup>11</sup>



**Scheme 1** (a) Seminal work on the electrophilic activation of isolated alkynes by means of TBAF. (b) Present research plan for the one-pot synthesis of allenyl-indoles in a metal-free cascade sequence.

<sup>a</sup>Dipartimento di Chimica "G. Ciamician", Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, via Selmi 2, 40126 Bologna, Italy. E-mail: marco.bandini@unibo.it

<sup>b</sup>Departamento de Química Orgánica y Química Inorgánica, Universidad de Alcalá, 28805 Madrid, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 1531577 (2d) and 1531578 (4a). For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c7qo00414a



At the outset of this investigation, *ortho*-alkynyl aniline **1a** was elected as the model acyclic precursor and the choice for **1a** was dictated by its ready availability and high chemical functionality. We envisioned that the use of fluoride-based catalysts could also enable the concomitant cleavage of the silyl protecting group of **1** during the catalysis, with a positive impact on the overall step economy of the process. A survey of reaction conditions involving ammonium salts as catalysts was performed and the results collected are reported in Table 1.

Initial attempts were made in the presence of hydrate tetrabutylammonium fluoride (TBAF) as the promoter in reagent grade THF and in an open-air vial. Interestingly, besides the incomplete reaction at 0 °C with 200 mol% of TBAF·3H<sub>2</sub>O (1 h), the desired product **2a** was generally isolated in very high yields (67–97%).<sup>12</sup> Gratifyingly, a catalytic amount of ammonium salt (20 mol%, entry 4) also proved competence in providing **2a** in a satisfactory yield of 78%, accompanied by the presence of minor components such as the mono- or bis-desilylated acyclic compounds **1a'** and **1a''**. It is worth noting that tetrabutylammonium fluoride plays multiple roles during the reaction course. As a matter of fact, besides the assistance in the hydroaminative event (*vide infra* for mechanistic interpretation), the double cleavage of silyl-units was also operated.

In terms of the reaction machinery, some experimental evidence enabled preliminary conclusions to be drawn. First, inertness or partial/complete desilylation of **1a** occurred with different fluorinating agents or bases (*e.g.* TBACl/KF, CsF and TBAOH, entries 7–9); second, the use of wet THF<sup>13</sup> proved to be mandatory for a complete consumption of **1a**, indicating the success of the cascade methodology. As a matter of fact, dry THF performed less efficiently (yield **2a** = 55%), providing

also **2a'** as the major by-product (entry 6). All at once, only the synergistic action of both *n*Bu<sub>4</sub>N<sup>+</sup> and F<sup>-</sup> ions in TBAF seemed to guarantee the correct chemical environment to provide **2a** in synthetically acceptable extents (*vide infra*).

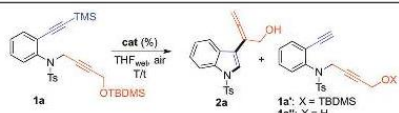
Having established the optimal reaction conditions, the scope of the method was ascertained by subjecting a series of differently substituted *ortho*-alkynyl anilines (**1b–k**) to TBAF·3H<sub>2</sub>O catalysis.

From the results collected in Scheme 2, it emerged that anilines carrying both electron-withdrawing (F, Cl, CF<sub>3</sub>) and electron-donating groups (*e.g.* Me) at different positions were suitable candidates for the present transformation, delivering the corresponding cyclized and deprotected allenyl-indoles **2** in high yields (up to 93%). Interestingly, the methodology was not restricted to silyloxy-ether precursors but also –OBn and NHBn derivatives (**1i,j**) performed in moderate to good extents. We also showed that the easily removable *N*-methyl formate group is tolerated in the process, delivering the *N*-CO<sub>2</sub>Me adduct **2h** in 45% yield. However, the replacement of the TMS group in **1** with an alkyl chain (*i.e.* *n*C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, **1l**) led to the formation of a complex mixture of unknown compounds.

Despite the undoubted synthetic utility of the protocol, several questions concerning mechanistic aspects are still open.

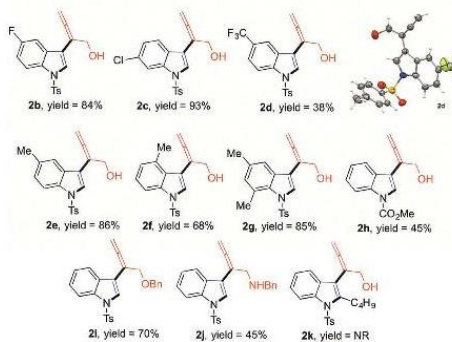
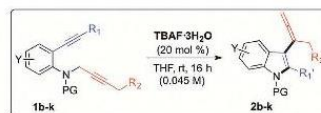
In this direction, experimental as well as spectroscopic analyses have been performed. With the purpose of ascertaining the order of chemical events in the cascade process and the role of the trialkylsilyl functions in the overall reaction machinery, compounds **1a'** and **1l** were subjected the best catalytic conditions (Scheme 3). Interestingly, while **1l** reacted smoothly giving **2a** in 82% yield, the employment of the terminal alkyne **1a'** caused the failure of the process.<sup>14</sup> The latter evidence suggests that the initial hydroaminative step, triggered by the

Table 1 Optimization of the catalytic system<sup>a</sup>

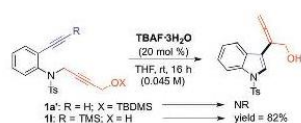


Run	Cat. (%)	T(°C)/t(h)	Yield <sup>b</sup> (%) <b>2a/1a'/1a''</b>
1 <sup>c</sup>	TBAF·3H <sub>2</sub> O (200)	0/1	67/—/33
2	TBAF·3H <sub>2</sub> O (100)	25/16	97/—/—
3	TBAF·3H <sub>2</sub> O (50)	25/16	97/—/—
4	TBAF·3H <sub>2</sub> O (20)	25/16	78/10/5
5 <sup>d</sup>	TBAF·3H <sub>2</sub> O (20)	25/2	70/—/—
6 <sup>e</sup>	TBAF·3H <sub>2</sub> O (20)	25/16	55/—/—
7	TBACl/KF·2H <sub>2</sub> O (300)	25/16	—/42/—
8	TBAOH·30H <sub>2</sub> O (300)	25/16	NR
9	CsF (100)	25/16	—/88/—

<sup>a</sup>All the reactions were carried out in reagent grade THF without moisture prevention, unless otherwise specified (0.045 M). <sup>b</sup>Isolated yield. <sup>c</sup>Conversion by NMR. <sup>d</sup>Concentration = 0.1 M. <sup>e</sup>Dry THF was employed. Compound **2a'** (*vide infra*) was also observed in the reaction crude. TBAF: tetrabutylammonium fluoride. TBACl: tetrabutylammonium chloride. TBAOH: tetrabutylammonium hydroxide. TMS: trimethylsilyl. TBDMS: tertbutyldimethylsilyl. NR = no reaction.



Scheme 2 Scope and limitations of the catalytic protocol (NR = no reaction).



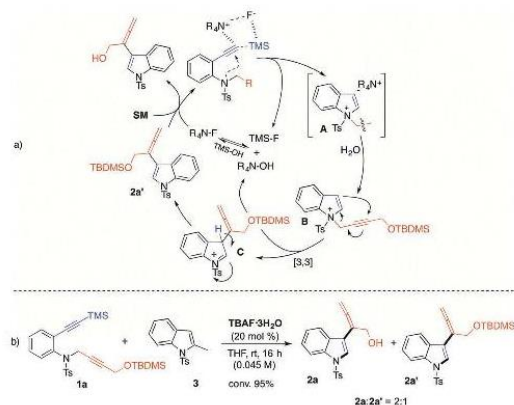
**Scheme 3** Proving the role of the silyl groups in the cascade process (NR: no reaction).

synergistic action of the ammonium cation and the fluoride anion, is crucial for the overall reaction profile. Differently, the positive result obtained with **1l** suggests that the TBDMS group is not directly involved in the crucial bond forming steps of the process, as also testified by the promising results obtained with compounds **1i,j** as shown in Scheme 2.

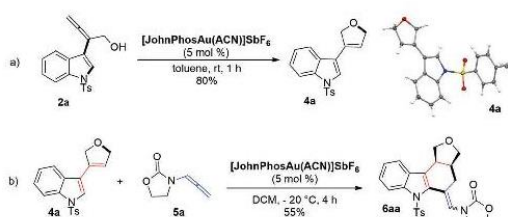
Additionally, the  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopic investigation (THF- $d_6$ , dry, rt) of the reaction course (**1a** in the presence of TBAF·3H $_2$ O 30 mol%) showed a very fast reaction profile (see the ESI† for details). In particular, after a 2 min reaction time, **2a** was formed in 49.5% conversion along with two new compounds. Among them, the still *O*-silylated indole **2a'** was identified as a reaction intermediate. Full conversion into **2a** was reached in 3 h. Although a univocal mechanistic picture is not available at present, the following reaction profile can be proposed (Scheme 4a).

Initially, TBAF is invoked in triggering the hydroamination step with the simultaneous cleavage of the TMS group ( $\text{Bu}_4\text{N}^+$  can stabilize the incipient acetylenic carbanion), leading upon C(3)-protonation to the partially indolynium species **B**.

The latter intermediate can undergo intramolecular [3,3]-aza-Cope sigmatropic rearrangement resulting in the partially demethylated adduct **C**. Fast rearomatization would lead to the detected *O*-silylated species **2a'** that can finally deliver the indolyl-alcohol **2a** via the cleavage of the TBDMS group. A certain content of water is therefore required for both the protonation of the intermediate **A** and the transformation of **2a'** into



**Scheme 4** (a) Hypothesis of the reaction mechanism. (b) Scrambled-control experiment.



**Scheme 5** Proving the synthetic flexibility of allenyl-indoles **2**. Synthesis of tetrahydrocarbazole **6aa**.

**2a**. The incomplete consumption of **1a** with dry THF (Table 1, entry 6) can be consequently addressed.<sup>15</sup> Additionally, a scrambled control experiment with 2-methyl-*N*-tosylindole **3** (1.5:1 ratio with respect to **1a**) was carried out in order to assess the possible cleavage of the propargylic chain with consequent intermolecular condensation with the concomitantly delivered indole core (Scheme 4b). Here, the isolation of a **2a**:**2a'** mixture (2:1) without any significant incorporation of 2Me-indole in the final product (**3** was quantitatively recovered upon flash chromatography) ruled out this possibility.

Finally, the synthetic utility of the 3-allenyl-(1*H*)-indoles **2** was demonstrated by subjecting allenol **2a** to the gold catalyzed ring-closing protocol. Upon a screening of [Au(I)] species (see the ESI† for details), [JohnPhosAu(ACN)]SbF $_6$  (5 mol%) was elected as the catalyst of choice delivering the corresponding dihydrofuran **4a** in 80% yield under mild reaction conditions (1 h, toluene, rt, Scheme 5a).<sup>16</sup> Interestingly, compound **4a** proved to be a reliable dienophile in a formal [4 + 2]-cycloaddition type reaction<sup>17</sup> when condensed with allenamide **5a** (−20 °C, 4 h).<sup>18,19</sup> In this case, the electrophilic activation of the latter  $\pi$ -system promoted by gold was crucial in order to isolate the tetrahydrocarbazole **6aa** in good yield and high regioselectivity (55%, −20 °C, 4 h, Scheme 5).

## Conclusions

In conclusion, a new efficient and environmentally acceptable metal free-catalytic protocol for the one-pot synthesis of densely functionalized C(3)-(1*H*)-indoles is documented. The use of economically acceptable TBAF·3H $_2$ O as a catalyst (20 mol%), in a reagent-grade solvent and an open-air flask, makes the present methodology a desirable synthetic alternative to the classic noble metal-based synthesis of heterocyclic scaffolds. The synthetic flexibility of the obtained allenyl-indoles was finally proved in the synthesis of densely functionalized polycyclic fused tetrahydrocarbazoles.

## Acknowledgements

The University of Bologna is acknowledged for the financial support. STS thanks the “Mobility Grant for Researchers” by



the Universidad de Alcalá. Prof. Steven P. Nolan is kindly acknowledged for the generous gift of Au(IPr)Cl.

## Notes and references

- (a) J. J. Brunet and D. Neibecker, in *Catalytic Heterofunctionalization*, ed. A. Togni and H. Grützmacher, Wiley-VCH, Weinheim, 2001, pp. 91–132; (b) Y. Fukumoto, *J. Synth. Org. Chem., Jpn.*, 2009, **67**, 735; (c) J. Hannedouche and E. Schultz, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 4972; (d) A. L. Reznichenko, A. J. Nawara-Hultzsich and K. C. Hultzsich, in *Stereoselective formation of amines, Topics in Curr. Chem.*, ed. W. Li and X. Zhang, 2014, vol. 343, p. 191.
- (a) S. Cacchi and G. Fabrizi, *Chem. Rev.*, 2005, **105**, 2873; (b) S. Cacchi and G. Fabrizi, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, PR215; (c) R. Vicente, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 6469; B. Alcaide, P. Almendros and J. M. Alonso, *Molecules*, 2011, **16**, 7815; (d) M. Platon, R. Amardeil, L. Djakovitch and J.-C. Hierso, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 3929; (e) G. Abbiati, F. Marinelli, E. Rossi and A. Arcadi, *Isr. J. Chem.*, 2013, **53**, 856; (f) L. Huang, M. Arndt, K. Goossen, H. Heydt and L. J. Goossen, *Chem. Rev.*, 2015, **115**, 2596, and references therein; (g) N. Gupta and D. Goyal, *Chem. Heterocycl. Compd.*, 2015, **51**, 4; (h) J. Herraiz-Cobo, F. Albericio and M. Alvarez, *Adv. Heterocycl. Chem.*, 2015, **116**, 1.
- For some representative examples, see: (a) H. Wang, L. Liu, Y. Wang, C. Peng and J. Zhang, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 6841; (b) M. Jacobert, O. Provot, J.-F. Peyrat, A. Hamze, J.-D. Brion and M. Alami, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 3775; (c) V. Prieur, N. Heindler, J. Rubio-Martínez, G. Guillaumet and M. D. Pujol, *Tetrahedron*, 2015, **71**, 1207; (d) M. Patel, R. K. Saunthwal, D. K. Dhaked, P. V. Bharatam and A. K. Verma, *Asian J. Org. Chem.*, 2016, **5**, 213. For a recent review on the I<sub>2</sub> mediated ring-closing process, see: T. Aggarwal, S. Kumar and A. K. Verma, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 7639.
- For an elegant example of Frustrated Lewis Pair assisted intermolecular hydroamination of alkynes, see: T. Mahdi and D. W. Stephan, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 12418.
- (a) P. A. Jacobi, H. L. Briemann and S. I. Hauck, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 1193; (b) P. A. Jacobi, H. L. Briemann and S. I. Hauck, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 5013.
- For some representative examples, see: (a) W. Chen, Y. Zhang, L. Zhang, M. Wang and L. Wang, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 10476; (b) C. Raji Reddy, G. Krishna, N. Kavitha, B. Latha and D.-S. Shin, *Eur. J. Org. Chem.*, 2012, 5381; (c) F. Huguenot, C. Delalande and M. Vidal, *Tetrahedron Lett.*, 2014, **55**, 4632; (d) M. Wang, P. Li, W. Chena and L. Wang, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 26918; (e) R. Belderrama-Martínez-Sotomayor, M. Flores-Jarrillo and A. Alvazerez-Hernandez, *ARKIVOC*, 2016, 36.
- K. Hiroya, R. Jouka, M. Kameda, Y. Yasuhara and T. Sakamoto, *Tetrahedron*, 2001, **57**, 9697.
- (a) G. Cera, S. Piscitelli, M. Chiarucci, G. Fabrizi, A. Goggiamani, R. S. Ramón, S. P. Nolan and M. Bandini, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 9891–9895; (b) M. Chiarucci, R. Mocci, L.-D. Syntrivanis, G. Cera, A. Mazzanti and M. Bandini, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 10850–10853; M. Chiarucci, E. Matteucci, G. Cera, G. Fabrizi and M. Bandini, *Chem. – Asian J.*, 2013, **8**, 1776–1779; (c) P. Giacinto, G. Cera, A. Bottoni, M. Bandini and G. P. Miscione, *ChemCatChem*, 2015, **7**, 2480–2484.
- For general reviews on indole synthesis, see: (a) M. Bandini and A. Eichholzer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 9608; (b) S.-L. You, Q. Cai and M. Zeng, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 2190; (c) A. Palmieri, M. Petrini and R. R. Shaikh, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **8**, 1259; (d) A. V. Karchava, F. S. Melkonyan and M. A. Yurovskaya, *Chem. Heterocycl. Compd.*, 2012, **48**, 391; (e) M. Inman and C. J. Moody, *Chem. Sci.*, 2013, **4**, 29; (f) G. Bartoli, R. Dalpozzo and M. Nardi, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 4728; (g) W. Zi, Z. Zuo and D. Ma, *Acc. Chem. Res.*, 2015, **48**, 702; (h) I. Szatmari, J. Sas and F. Fulop, *Curr. Org. Chem.*, 2016, **22**, 2393; (i) G. Chelucci, *Coord. Chem. Rev.*, 2017, **331**, 37.
- (a) T. V. Sravanthi and S. L. Manju, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2016, **91**, 1; (b) Q. Lu, S. GrefSies, F. J. R. Klauack and F. Glorius, *Angew. Chem., Int. Ed.*, DOI: 10.1002/anie.201701767.
- For examples of LTM-catalyzed similar cascade processes, see: S. Cacchi, G. Fabrizi and L. Moro, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 5101.
- M. Taguchi, Y. Tokimizu, S. Oishi, N. Fujii and H. Ohno, *Org. Lett.*, 2015, **7**, 6250.
- The use of acetonitrile as the solvent (reagent grade) led to the exclusive deprotection of the alkynyl moiety (yield **1a'** = 88%).
- Unreacted **1a'** was fully recovered at the end of the process.
- The content of water present in the commercially available hydrate-TBAF can account for the 55% isolated yield in **2a** via dry THF.
- For comprehensive articles on the gold catalyzed functionalization of allenes, see: (a) T. Manda, in *Modern Allene Chemistry*, ed. N. Krause and A. S. K. Hashmi, Wiley-VCH, 2008; (b) N. Krause and C. Winter, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 1994; (c) B. Alcaide and P. Almendros, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 939.
- For the use of vinyl-indoles in formal [4 + 2]-cycloadditions with allenamides: (a) V. Pirovano, M. Dell'Acqua, D. Facchetti, S. Rizzato, G. Abbiati and E. Rossi, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, 6267; (b) V. Pirovano, L. Decataldo, E. Rossi and R. Vicente, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 3594; (c) V. Pirovano, E. Arpini, M. Dell'Acqua, R. Vicente, G. Abbiati and E. Rossi, *Adv. Synth. Catal.*, 2016, **358**, 403; (d) E. Rossi, G. Abbiati and V. Pirovano, *Eur. J. Org. Chem.*, DOI: 10.1002/ejoc.201700120; (e) V. Pirovano, M. Borri, G. Abbiati, S. Rizzato and E. Rossi, *Adv. Synth. Catal.*, 2017, **359**, 1912–1918.
- For recent reviews on the impact of allenamides on organic synthesis, see: (a) L.-L. Wei, H. Xiong and H. R. P. Hsung, *Acc. Chem. Res.*, 2003, **36**, 773; (b) T. Lu, Z. Lu, Z.-X. Ma, Y. Zhang and R. P. Hsung, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 4862;

- (c) E. Manoni and M. Bandini, *Eur. J. Org. Chem.*, 2016, 3135.
- 19 For previous studies by the group on the organo- and gold-assisted manipulation of allenamides, see: (a) M. Jia, G. Cera, D. Perrotta and M. Bandini, *Chem. – Eur. J.*, 2014, **20**, 9875; (b) C. Romano, M. Jia, M. Monari, E. Manoni and M. Bandini, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 13854; (c) M. Jia, M. Monari, Q.-Q. Yang and M. Bandini, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 2320; (d) M. M. Mastandrea, N. Mellonei, P. Giacinto, A. Collado, S. P. Nolan, G. P. Miscione, A. Bottoni and M. Bandini, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 14885; (e) R. Ocello, A. De Nisi, M. Jia, Q.-Q. Yang, P. Giacinto, A. Bottoni, G. P. Miscione and M. Bandini, *Chem. – Eur. J.*, 2015, **21**, 18445; (f) L. Rocchigiani, M. Jia, M. Bandini and A. Macchioni, *ACS Catal.*, 2015, **5**, 3911.

