



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2015**

**OLIGOESCUARAMIDAS CÍCLICAS: SÍNTESIS Y
ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Ángel Sampedro Palerm



**Universitat de les
Illes Balears**

**TESIS DOCTORAL
2015**

**Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología
Química**

**OLIGOESCUARAMIDAS CÍCLICAS: SÍNTESIS Y
ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Ángel Sampedro Palerm

**Director/a: Antonio Costa Torres
Director/a: M^a del Carmen Rotger Pons**

Doctor/a por la Universitat de les Illes Balears



Universitat de les Illes Balears

Dr. Antonio Costa Torres y Dra. M^a del Carmen Rotger Pons, de la Universitat de les Illes Balears,

DECLARAMOS:

Que la Tesis Doctoral que lleva por título "Oligoescuaramidas cíclicas: síntesis y actividad biológica", presentada por Ángel Sampedro Palerm para la obtención del título de Doctor, ha sido dirigida bajo nuestra supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmamos este documento.

Dr. Antonio Costa Torres

Dra. M^a del Carmen Rotger Pons

Palma de Mallorca, 23 de Febrero de 2015

*A mi familia y amigos,
no toda la "química" es mala.*

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

1. Villalonga, P.; Fernández de Mattos, S.; Ramis, G.; Obrador-Hevia, A.; Sampedro, A.; Rotger, C.; Costa, A.; Cycloesquaramides as Kinase Inhibitors with Anticancer Activity. *ChemMedChem*, **2012**, 7, 1472-1480.

DOI: 10.1002/cmdc.201200157

2. Sampedro, A.; Villalonga-Planells, R.; Vega, M.; Ramis, G.; Fernández de Mattos, S.; Villalonga, P.; Costa, A.; Rotger, C.; Cell Uptake and Localization Studies of Squaramide Based Fluorescent Probes. *Bioconjugate Chem.*, **2014**, 25, 1537-1546.

DOI: 10.1021/bc500258b

ABREVIATURAS

°C	grado centígrado
μl	microlitro
μM	micromolar
¹³ C-RMN	resonancia magnética nuclear de carbono
¹ H-RMN	resonancia magnética nuclear de protón
2D (RMN)	experimento bidimensional
Å	angstrom
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
AcONH ₄	acetato amónico
ADN	ácido desoxirribonucleico
AMP	adenosin monofosfato
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosin trifosfato
Boc	tert-butiloxicarbonilo
BODIPY	<i>boron-dipyrrromethene</i>
cm	centímetro
COSY	COrrrelation Spectroscopy
CPP	péptido de penetración celular
DCC	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona
DiMAP	4-dimetilaminopiridina
DiPEA	N,N'-diisopropiletilamina
DMF	N,N'-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfoxido
DSC	calorimetría diferencial de barrido
DSS	ácido 4,4-dimetil-4-silapentanosulfónico
ESI (MS)	ionización por electrospray
Et ₂ O	éter dietílico
Et ₃ N	triethylamina
EtOH	etanol
FBP	fructosa 1,6-bisfosfato
FBS	suero fetal bovino
FITC	fluoresceína 5-isotiocianato
FRET	transferencia de energía por resonancia de Förster
g	gramo
GSH	glutatión
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
HRMS	espectrometría de masas de alta resolución
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy
Hz	hercio
ITC	calorimetría de valoración isotérmica
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
K	grado Kelvin
K _{as}	constante de asociación
Kcal	kilocaloría
K _i	constante de ionización
kJ	kilojulio

Oligoesquaramidas cíclicas: síntesis y actividad biológica

M	molar
M1	coeficiente de solapamiento de Mander del canal 1 sobre el 2
M2	coeficiente de solapamiento de Mander del canal 2 sobre el 1
M6P	manosa 6-fosfato
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight
mbar	milibar
MeOH	metanol
mg	miligramo
MHz	megahercio
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mmol	milimol
mM	milimolar
MΩ	megaohmio
NIH3T3	fibroblastos embrionarios de ratón
nM	nanomolar
nm	nanómetro
NMP	N-metilpirrolidona
OG	Oregon Green 488
P	coeficiente de correlación de Pearson
PBS	tampon salino de fosfato
PCh	fosfocolina
PET	transferencia electronica fotoinducida
PGA	penicilina G amidasa
pH	acidez del medio
pK _a	constante de acidez
QS	sulfato de quinina
Rdto	rendimiento
RFP	proteína roja fluorescente
RMN	resonancia magnética nuclear
ROE	Rotating-frame Overhauser Enhancement
ROS	especies reactivas de oxígeno
TBA	tetrabutilamonio
TBP	tributilfosfina
tBuOH	tert-butanol
TCEP	tris(2-carboxietil)fosfina
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TMSE	trimetilsilil etanol
TSTU	tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio
U87MG	células de glioma humano
UIB	Universitat de les Illes Balears
UV-Vis	ultravioleta-visible
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
β	constante global de estabilidad
ΔH	entalpía de formación
ΔS	entropía
ε	coeficiente de extinción molar
λ	longitud de onda
Φ	rendimiento cuántico

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral, titulada “**Oligoescuaramidas cíclicas: síntesis y actividad biológica**”, se recoge la síntesis de diferentes derivados escuaramídicos con aplicaciones biológicas. La Tesis se divide en cuatro capítulos. El primer capítulo es una introducción y los tres capítulos restantes recogen los resultados obtenidos siguiendo el flujo de trabajo temporal, ya que los objetivos de cada capítulo derivan de los resultados del capítulo anterior.

El primer capítulo es una introducción donde se describe la unidad escuaramida y las aplicaciones biológicas de algunos compuestos que incluyen esta estructura.

En el segundo capítulo se presenta la síntesis de oligoescuaramidas cíclicas con diferentes modificaciones estructurales. Una vez resuelta la síntesis y elucidación estructural, se ha estudiado su actividad antitumoral comparando los resultados con los obtenidos en un estudio previo. En este capítulo se detallan además las diferentes alternativas sintéticas que se han seguido para hacer frente a los inconvenientes que se han ido presentando durante las etapas de elongación y macrociclación.

En el tercer capítulo se describe la síntesis de tres sondas fluorescentes con la finalidad de seguir la evolución temporal y la localización intracelular de las oligoescuaramidas una vez realizado el tratamiento. El estudio se ha realizado utilizando la oligoescuaramida cíclica de menor tamaño debido a su baja citotoxicidad.

En total se han preparado tres sondas que se diferencian en el fluoróforo utilizado y en el método de conjugación. Los mejores resultados se han obtenido con una sonda que incluye un derivado de BODIPY como marcador fluorescente. Esta sonda se internaliza mediante transporte activo y es fotoestable.

La facilidad de internalización celular se ha explicado en base a la afinidad observada entre la oligoescuaramida cíclica y moléculas fosforiladas presentes en la membrana celular y en el citoplasma. Para apoyar esta hipótesis, se describen los estudios realizados mediante ITC para determinar la afinidad entre una oligoescuaramida cíclica cuaternizada y modelos de algunas biomoléculas relevantes tales como: manosa 6-fosfato, fosfocolina, etc.

Los conjugados covalentes de oligoescuaramidas cíclicas pueden facilitar el transporte de fármacos. Por esto y contando con las evidencias de la internalización celular, se ha planteado su utilización futura como transportadores autoinmolativos. Así pues, el cuarto capítulo se ha dedicado al diseño, síntesis y evaluación de un sistema autoinmolativo compuesto por una unidad escuaramida y un modelo de "carga", en este caso un fluoróforo. Después de diversos intentos se ha conseguido optimizar un sistema basado en el uso de grupos disulfuro como gatillo. El sistema desarrollado

libera la totalidad de la “carga” en condiciones fisiológicas propias de un entorno intracelular en un periodo de dos horas. De este modo se abre la posibilidad de funcionalizar uno de sus extremos con oligoescuaramidas cíclicas u otros transportadores, activando la liberación de la “carga” únicamente en el interior celular y separando de esta manera el transportador de la "carga".

RESUM

A aquesta Tesi Doctoral, titulada “**Oligoesquaramides cícliques: síntesis i activitat biològica**”, es recull la síntesis de diferents derivats esquaramídics amb aplicacions biològiques. La Tesi es divideix en quatre capítols. El primer capítol és una introducció i els tres capítols restants recullen els resultats obtinguts seguint un flux de treball temporal, ja que els objectius de cada capítol deriven dels resultats del capítol anterior.

El primer capítol és una introducció on es descriu la unitat esquaramida i les aplicacions biològiques d’alguns composts que inclouen aquesta estructura.

Al segon capítol es presenta la síntesis d’oligoesquaramides cícliques amb diferents modificacions estructurals. Una vegada resolta la síntesis i elucidació estructural, s’ha estudiat la seva activitat antitumoral comparant els resultats amb els obtinguts a un estudi previ. En aquest capítol es detallen a més les diferents alternatives sintètiques que s’han seguit per fer front als inconvenients que s’han anat presentant durant les etapes d’elongació i macrociclació.

Al tercer capítol es descriu la síntesis de sondes fluorescent amb la finalitat de seguir l’evolució temporal i la localització intracel·lular de les oligoesquaramides una vegada realitzat el tractament. L’estudi s’ha realitzat emprant l’oligoesquaramida cíclica més petita degut a la seva baixa citotoxicitat.

En total s’han preparat tres sondes fluorescent que es diferencien al fluoròfor emprat i al mètode de conjugació. Els millors resultats s’han obtingut amb una sonda que inclou un derivat de BODIPY com a marcador fluorescent. Aquesta sonda s’internalitza mitjançant transport actiu i es fotoestable.

La facilitat d’internalització cel·lular s’ha explicat en base a l’afinitat observada entre l’oligoesquaramida cíclica i molècules fosforilades presents a la membrana cel·lular i al citoplasma. Per suportar aquesta hipòtesis, es descriuen els estudis realitzats amb ITC per determinar l’afinitat entre una oligoesquaramida cíclica quaternitzada i models d’algunes biomolècules rellevants tals com: manosa 6-fosfat, fosfocolina, etc.

Els conjugats covalents d’oligoesquaramides cícliques poden facilitar el transport de fàrmacs. Per aquest motiu i amb les evidències de la internalització cel·lular, s’ha plantejat la seva utilització futura com a transportadors autoimmolatius. Així doncs, el quart capítol s’ha dedicat al disseny, síntesis i avaluació d’un sistema autoimmolatiu format per una unitat esquaramida i un model de “càrrega”, en aquest cas un fluoròfor. Després de diversos intents s’ha aconseguit optimitzar un sistema basat en l’ús de grups disulfur com a gallet. El sistema desenvolupat allibera la totalitat de la “càrrega” en condicions fisiològiques pròpies d’un entorn intracel·lular en un període

de dues hores. D'aquesta forma s'obre la possibilitat de funcionalitzar un dels seus extrems amb oligoesquaramides cícliques o altres transportadors, activant l'alliberació de la "càrrega" únicament a l'interior cel·lular i separant d'aquesta forma el transportador de la "càrrega".

SUMMARY

This Doctoral thesis, entitled “**Cyclic oligosquaramides: synthesis and biological activity**”, put together the synthesis of different squaramidic derivatives with biological applications. The Thesis is divided in four chapters. The first one is an introduction and the remaining three chapters compile the results obtained following a temporal workflow. This evolution is because of the objectives of every chapter come from the results of the previous one.

In the first chapter are described an introduction of the squaramide unit and the biological applications of some compounds with this structure.

The second chapter presents the synthesis of cyclic oligosquaramides with different structural modifications. Once solved the synthesis and structural elucidation, their antitumor activity has been evaluated, comparing the results with those obtained in a previous assay. In this chapter are also included the different synthetic strategies followed in order to overcome the drawbacks arisen during the elongation and macrocyclization stages.

The third chapter reports the synthesis of fluorescent probes with the aim of following the temporary evolution and the inner cell localization of the oligosquaramides once the treatment is done. The study has been done with the smallest cyclic oligosquaramide due to its low cytotoxicity.

Altogether, three fluorescent probes have been prepared, differing in the fluorophore used and the conjugation procedure. Best results have been achieved with a probe containing a BODIPY derivative as a fluorescent marker. This probe is internalized by active transport and has a great photostability.

The easily achieved cell internalization has been explained with the affinity observed between the cyclic oligosquaramide and phosphorylated molecules found in cell membranes and in the cytoplasm. To support this hypothesis, this chapter includes the experiments done with ITC in order to determine the affinity between a cyclic quaternized oligosquaramide and models from some relevant biomolecules as: mannose 6-phosphate, phosphocholine, etc.

The covalent conjugates with cyclic oligosquaramides are able to facilitate drugs transportation. Because of this, and with the evidence of the observed cell internalization, its utilization as autoimmolative carriers has been proposed. So, fourth chapter has been dedicated to the design, synthesis and evaluation of an autoimmolative system consisting in a squaramide unit and a load, in this case a fluorophore. After some attempts, the system has been optimized using a disulfide bond as the trigger. The developed autoimmolative system releases the entire load in

physiological conditions after two hours. In this way, it is possible to functionalize one of the ends of the disulfide with cyclic oligosquaramides and other transporters, triggering the release of the load only in the inner cell, dividing with this methodology the load from the carrier.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 La química supramolecular y la biología	3
1.1.1 Interacciones intermoleculares	3
1.2 El ácido escuárico y sus derivados	5
1.2.1 Propiedades conformacionales	7
1.2.2 Interacción mediante enlace de hidrógeno	11
1.2.3 Carácter bioisótero de las escuaramidas	14
1.2.4 Antecedentes de actividad biológica de escuaramidas	16
1.2.4.1 <i>Escuaramidas con propiedades anticancerígenas</i>	17

CAPÍTULO 2. DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE OLIGOESCUARAMIDAS CÍCLICAS

2.1 Introducción	23
2.2 Oligoescuaramidas cíclicas: principios de diseño	26
2.2.1 Síntesis de oligoescuaramidas cíclicas	26
2.2.2 Evaluación biológica de las oligoescuaramidas cíclicas C2-C6: descripción y resultados previos	28
2.2.2.1 <i>Ensayos de viabilidad</i>	28
2.2.2.2 <i>Estudios iniciales: actividad antitumoral de las oligoescuaramidas cíclicas C2-C6</i>	28
2.3 Cinasas	31
2.4 Objetivos	37
2.5 Resultados y discusión	39
2.5.1 Modificaciones estructurales	39
2.5.2 Metodología general para la síntesis de oligoescuaramidas cíclicas	41
2.5.2.1 <i>Protección de grupos amino</i>	43
2.5.2.2 <i>Síntesis del módulo de crecimiento 6</i>	43
2.5.2.3 <i>Síntesis del módulo central 5</i>	44
2.5.2.4 <i>Elongación de oligómeros</i>	45
2.5.2.5 <i>Macro ciclación</i>	46
2.5.2.6 <i>Síntesis de la oligoescuaramida cíclica C7 18</i>	47
2.5.3 Síntesis de oligoescuaramidas cíclicas con el sustituyente del nitrógeno terciario modificado	49
2.5.3.1 <i>Síntesis de la oligoescuaramida cíclica C5(N-Bencilo) 25</i>	50
2.5.3.2 <i>Síntesis de la oligoescuaramida cíclica C5(N-Leucina) 31</i>	52
2.5.4 Síntesis de oligoescuaramidas cíclicas con uno de los espaciadores modificado	57
2.5.4.1 <i>Síntesis de la oligoescuaramida cíclica C5(c₇) 41</i>	58

2.5.4.2 Síntesis de las oligoescuaramidas cíclicas C5(Met-c ₃) 50 y C6(Met-c ₃) 51	60
2.5.6 Bioensayos	64
2.5.6.1 Ensayos de viabilidad celular	65
2.5.6.2 Resultados de los ensayos	67
2.5.6.3 Análisis de resultados de los IC ₅₀ obtenidos	69
2.6 Conclusiones	71
2.7 Métodos experimentales	73
2.7.1 Síntesis	74
2.7.2 Tests de viabilidad	87
2.7.3 Ensayos de IC ₅₀	88
2.8 Colección de espectros de RMN de los productos relevantes	89

CAPÍTULO 3. SONDAS MOLECULARES FLUORESCENTES

3.1 Introducción	107
3.2 Marcadores celulares	107
3.3 Fluorescencia	110
3.3.1 Quenching	111
3.3.2 Rendimiento cuántico	114
3.3.3 Ventajas y aplicaciones de la fluorescencia en sistemas biológicos	115
3.4 Sondas moleculares fluorescentes	116
3.4.1 Clasificación de fluoróforos	116
3.4.2 Derivatización de fluoróforos	118
3.4.2.1 Fluoresceína	118
3.4.2.2 BODIPY	122
3.5 Transporte trans-membrana	127
3.5.1 Internalización selectiva	130
3.6 Objetivos	135
3.7 Resultados y discusión	137
3.7.1 Síntesis de las sondas fluorescentes	137
3.7.1.1 Síntesis de la oligoescuaramida cíclica apta para la conjugación con fluoróforos	137
3.7.1.2 Elección y síntesis de los fluoróforos	139
3.7.1.3 Síntesis de la sonda fluorescente C2-BDP 69	143
3.7.1.4 Síntesis de la sonda fluorescente C2-FITC 70	144
3.7.1.5 Síntesis de la sonda fluorescente C2-Pyr 72	145
3.7.2 Caracterización fotofísica de las sondas fluorescentes	146
3.7.2.1 Espectros de absorción-emisión	146
3.7.2.2 Variación de la fluorescencia en función del pH	149
3.7.2.3 Cálculo de los rendimientos cuánticos	150
3.7.3 Evaluación biológica de las sondas fluorescentes	155

3.7.3.1 Estudios de colocación celular con la sonda C2-BDP 69	156
3.7.3.2 Experimentos de inhibición del transporte activo	159
3.7.4 Interacción de la oligoescuaramida cíclica 74 con grupos fosfato como modelos de componentes de membranas biológicas	161
3.8 Conclusiones	177
3.9 Métodos experimentales	179
3.9.1 Síntesis	180
3.9.2 Obtención de espectros de absorción-emisión	191
3.9.3 Variación de la fluorescencia en función del pH	192
3.9.4 Cálculo de los rendimientos cuánticos	192
3.9.5 Fotoestabilidad de la sonda C2-BDP 69 en PBS	194
3.9.6 Obtención de las constantes termodinámicas de los compuestos fosforilados	194
3.9.7 Obtención de las constantes termodinámicas de los complejos 74·Fosfato	195
3.10 Colección de espectros de RMN de los productos relevantes	197

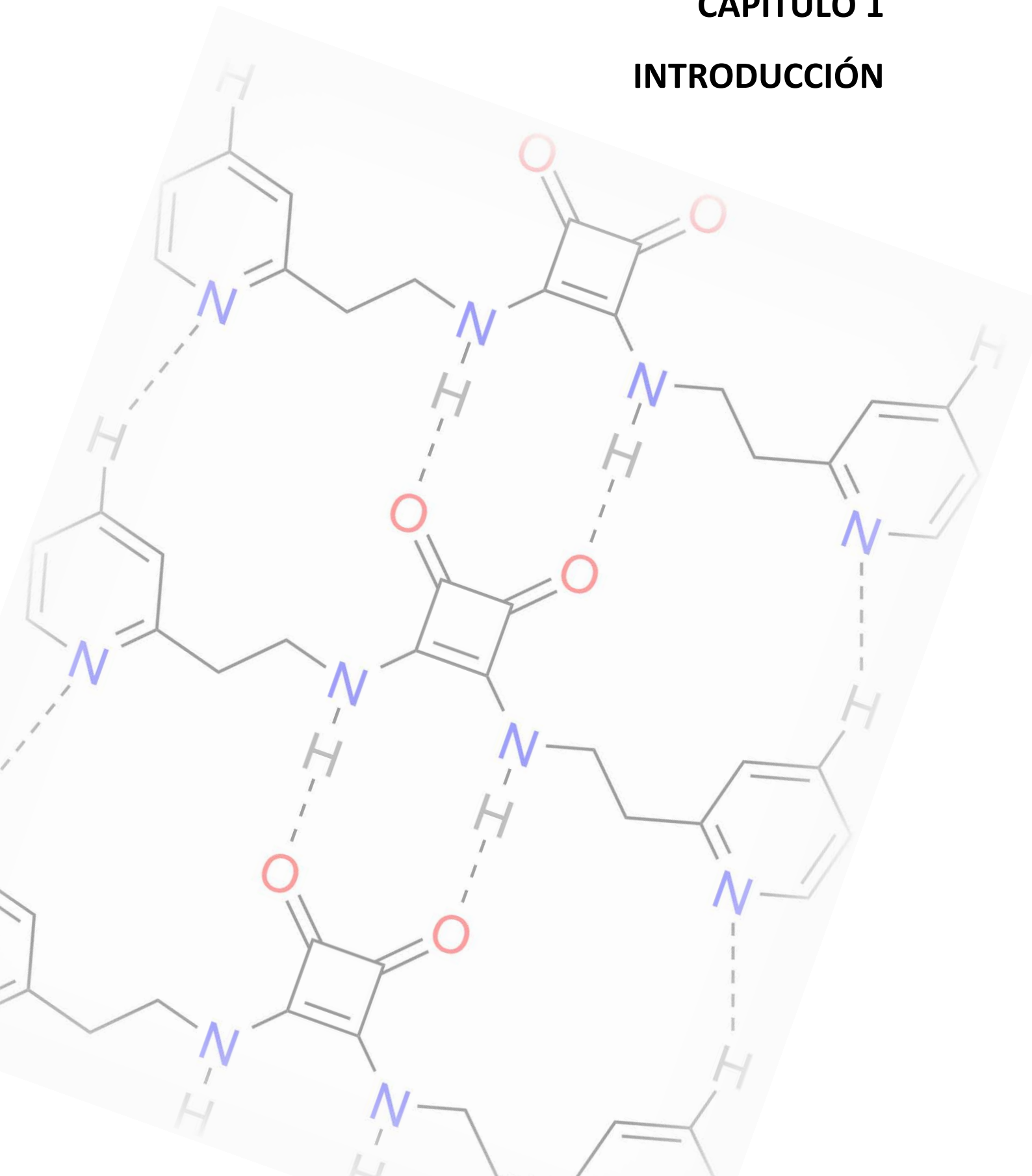
CAPÍTULO 4. ESPACIADORES AUTOINMOLATIVOS

4.1 Motivación del capítulo	215
4.2 Introducción	216
4.3 Sistemas autoinmolativos	218
4.3.1 Transportadores	219
4.3.1.1 Transportadores no específicos o funcionalizables: nanomateriales	219
4.3.1.2 Transportadores específicos	221
4.3.2 Gatillos	224
4.3.2.1 Gatillos enzimáticos	224
4.3.2.2 Gatillos no enzimáticos	227
4.3.3 Espaciadores autoinmolativos	232
4.4 Módulos autoinmolativos escuaramídicos	238
4.5 Objetivos	239
4.6 Resultados y discusión	241
4.6.1 Diseño de un sistema autoinmolativo de base escuaramida	241
4.6.1.1 Elección de la carga	241
4.6.1.2 Diseño del espaciador autoinmolativo	242
4.6.2 Síntesis y evaluación de diferentes grupos funcionales como activadores del proceso autoinmolativo	243
4.6.2.1 Síntesis de derivados escuaramido-cumarínicos	244
4.6.2.2 Evaluación inicial de los derivados escuaramido-cumarínicos	244
4.6.3 Sistemas autoinmolativos derivados de escuaramido-cumarinas con grupos tiol	246

4.6.3.1 Ventajas del grupo tiol frente al grupo amino	246
4.6.3.2 Elección del disulfuro	247
4.6.3.3 Síntesis del producto de ciclación C1NS 83	248
4.6.3.4 Síntesis del sistema autoinmolativo 86 como modelo de trabajo	249
4.6.3.5 Agentes reductores de disulfuros	250
4.6.3.6 Evaluación del modelo de sistema autoinmolativo 86	252
4.6.3.7 Síntesis del sistema autoinmolativo 96	257
4.6.3.8 Evaluación del modelo de sistema autoinmolativo 96	259
4.6.4 Sistemas autoinmolativos derivados de escurato-cumarinas con grupos tiol	262
4.6.4.1 Síntesis y evaluación del sistema autoinmolativo 97	262
4.6.4.2 Síntesis del sistema autoinmolativo 104	266
4.6.4.3 Evaluación del sistema autoinmolativo 104 mediante RMN	270
4.6.4.4 Evaluación del sistema autoinmolativo 104 mediante UV-Vis y fluorimetría	272
4.6.4.5 Fotoestabilidad del sistema autoinmolativo 104 en disolución	275
4.6.4.6 Estabilidad cinética del sistema autoinmolativo 104 frente a nucleófilos	277
4.6.4.7 Autoinmolación en presencia de GSH como reductor	278
4.6.4.8 Dependencia del proceso autoinmolativo en función del pH del medio	279
4.6.5 Perspectivas de aplicabilidad en sistemas biológicos	281
4.7 Conclusiones	283
4.8 Métodos experimentales	285
4.8.1 Síntesis	286
4.8.2 Procedimiento general para la realización de los estudios de evolución temporal mediante espectrometría UV-Vis y fluorimetría	296
4.8.3 Procedimiento general para la realización de los estudios de evolución temporal mediante RMN	297
4.8.4 Procedimiento general para la obtención de los coeficientes de extinción molar	297
4.8.5 Procedimiento general para el cálculo de las velocidades iniciales de aparición/desaparición	297
4.8.6 Variación de la fluorescencia de la cumarina 106 en función del pH	298
4.8.7 Estabilidad y evolución temporal del producto 104 en función del pH	299
4.8.8 Estabilidad y evolución temporal del producto 104 frente a nucleófilos	299
4.9 Colección de espectros de RMN de los productos relevantes	301

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN



1.1 La química supramolecular y la biología

Los procesos biológicos que regulan la existencia de los seres vivos comprenden una multitud de reacciones e interacciones entre sistemas muy diversos. La química supramolecular permite identificar y categorizar las interacciones moleculares que ocurren en el mundo biológico de forma que ayudan a comprender mejor mecanismos de procesos cuya naturaleza es intrínsecamente compleja. Las interacciones receptor-substrato, claves para cualquier proceso biológico, son las responsables de la gran especificidad observada en los seres vivos. La replicación y transcripción del ADN, la síntesis de nuevas proteínas a partir de ARN, la degradación y posterior asimilación de proteínas externas y aminoácidos, el sistema inmunológico, la sinapsis nerviosa, la actividad enzimática, etc. Son tan solos unos pocos ejemplos de procesos claramente biológicos que ponen de manifiesto la importancia de las interacciones no covalentes en los seres vivos.

Habitualmente las interacciones no covalentes se dan entre un receptor proteínico muy específico, encargado del reconocimiento, y un sustrato que puede variar tanto en composición como estructura. Éstas interacciones abarcan macromoléculas como son las proteínas y ácidos nucleicos, que presentan una gran variabilidad conformacional, hasta moléculas discretas tales como aminoácidos, acetilcolina, etc.

Este principio referido a la especificidad de las interacciones moleculares es el que describió Emil Fischer mediante el modelo llave-cerradura,¹ modificado con posterioridad por la hipótesis de la adaptación inducida de Daniel E. Koshland.² En el modelo llave-cerradura tanto la conformación del receptor proteínico como la del sustrato son fijas, mientras que en la hipótesis de la adaptación inducida las conformaciones de ambos se adaptan mutuamente para conseguir una complementariedad estructural y funcional entre el centro activo y el sustrato, dándose un reconocimiento entre ambas estructuras mediante interacciones intermoleculares.³

1.1.1 Interacciones intermoleculares

Las interacciones no covalentes que se establecen entre diferentes moléculas presentan unas energías de disociación más bajas que los enlaces covalentes. Es por este motivo que se suelen catalogar como fuerzas débiles. Este tipo de fuerzas pueden ser ión-ión, ión-dipolo, dipolo-dipolo, enlace de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals

¹ Fischer, E.; Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1894**, 27, 2985-2993.

² Koshland Jr., D. E.; Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1958**, 44, 98-104.

³ Cram, D. J.; Preorganization – From Solvents to Spherands. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1986**, 25, 1039-1057.

entre otras. Las energías de disociación de los principales tipos de interacciones están representadas en la tabla 1.⁴

Tabla 1 – Intervalos energéticos de las principales interacciones no covalentes.⁴

Interacción	Energía (kJ/mol)
Ión – ión	50 – 300
Metal – ligando	50 – 300
Ión – dipolo	50 – 200
Dipolo – dipolo	5 – 50
Enlace de hidrógeno	4 – 120
Catión – π	5 – 80
π – π	0 – 50
Van der Waals	<10

El enlace de hidrógeno es una de las interacciones más relevantes a nivel biológico. Se establece entre un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un heteroátomo electronegativo, como el oxígeno o el nitrógeno, llamado donador, y un átomo electronegativo con pares de electrones disponibles que actúa como aceptor. El hidrógeno que participa en un enlace de hidrógeno tiene una densidad de carga positiva que interactúa electrostáticamente con el par de electrones del aceptor de forma direccional. Como se ha indicado en la figura anterior, los valores energéticos de este tipo de interacciones oscilan entre 4 y 120 kJ/mol y presentan una distancia internuclear de unos 3 Å.

En la bibliografía se pueden encontrar multitud de ejemplos de compuestos que presentan este tipo de interacciones intermoleculares con otras especies, en muchos casos mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Grupos hidroxilo, amidas, ureas, carboxilatos, aminas o guanidinos son algunos ejemplos de los grupos que se pueden encontrar en la mayoría de receptores naturales.

Un compuesto que presenta grupos capaces de formar enlaces hidrógeno es el ácido escuárico y sus derivados, ácidos escuarámicos y escuaramidas.

⁴ Stedd, J. W.; Atwood, J. L.; *Supramolecular Chemistry*, pp. 20-30, John Wiley, New York, **2000**.

1.2 El ácido escuárico y sus derivados

El ácido escuárico y sus derivados, ácidos escuarámicos y escuaramidas, son compuestos no naturales con una masa molecular baja, comparable a la de los aminoácidos, y con una notable capacidad de formación de enlaces hidrógeno (Fig. 1).

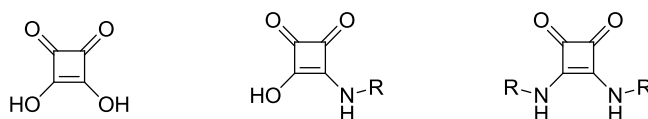


Figura 1 – Estructura química del ácido escuárico, el ácido escuarámico y la escuaramida.

El ácido escuárico, cuya nomenclatura IUPAC es 3,4-dihidroxi-3-ciclobuten-1,2-diona, consiste en un anillo ciclobuténico con dos grupos carbonilo opuestos al doble enlace y dos grupos hidroxilo directamente enlazados al anillo, resultando en su estado dianiónico a pH neutro una estructura aromática con un eje de simetría C_4 . Los pK_a de este diácido son de 1,5 y 3,4 respectivamente (Fig. 2).

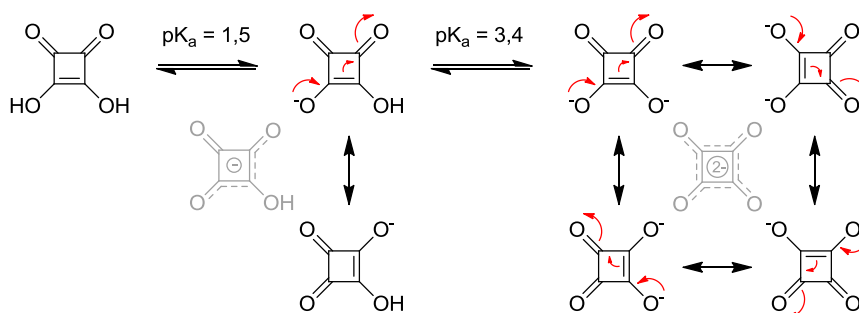
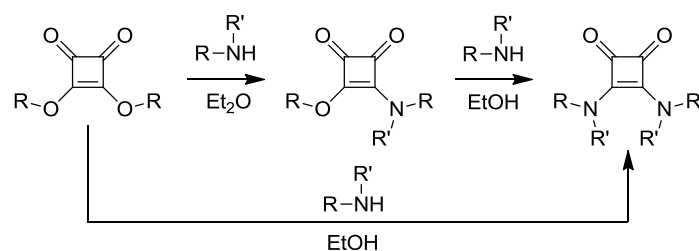


Figura 2 – Estructura del ácido escuárico, equilibrios ácido-base donde se indican los valores de pK_a correspondientes y formas resonantes de la forma dianiónica.

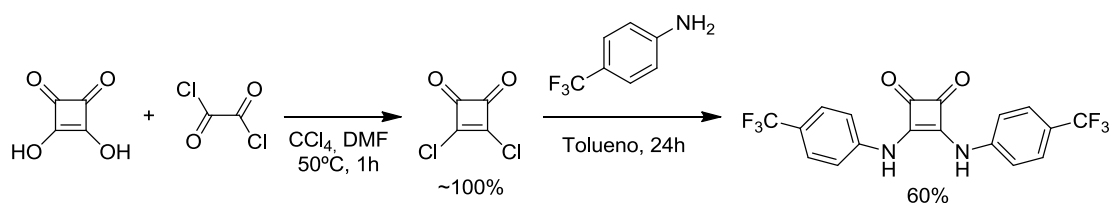
El ácido escuárico presenta alguna similitud con ácidos carboxílicos convencionales. Como tal diácido, el ácido escuárico forma diésteres, comerciales en algunos casos, que son los productos de partida habituales en la preparación de otros derivados. Los ésteres del ácido escuárico son compuestos relativamente reactivos capaces de dar reacciones de adición-eliminación frente a nucleófilos sin necesidad de ningún tipo de activación. Así la reacción con aminas primarias y secundarias conduce a la formación de escuaramidas secundarias y terciarias, respectivamente.

La reactividad de los ésteres del ácido escuárico puede modularse en función del medio de reacción. Así, si se utilizan disolventes apolares o ligeramente polares como el Et_2O se obtienen monoescuaramidas (escuaramida-éster), mientras que con disolventes más polares como el etanol conducen a diescuaramidas (Esquema 1).



Esquema 1 –Obtención de mono y di-escuaramidas mediante la funcionalización de ésteres del ácido escuárico con aminas. R': alquil (escuaramidas terciarias), H (escuaramidas secundarias).

Este procedimiento es viable cuando la nucleofilia de las aminas es suficientemente elevada. Sin embargo, cuando ésta no lo es, es necesario el uso de alternativas. La primera alternativa es el uso de derivados 3,4-dicloro a modo de cloruros de acilo. Para la obtención de este derivado, una de las alternativas más eficientes es la de hacer reaccionar ácido escuárico con dos equivalentes de cloruro de oxalilo, obteniendo rendimientos casi cuantitativos.⁵ En la bibliografía se encuentran multitud de ejemplos de la aplicación del dicloruro del ácido escuárico para la obtención de escuaramidas a partir de aminas poco nucleófilas o incluso para la obtención de ésteres del ácido escuárico como por ejemplo el escuarato de difenilo.⁶ Un ejemplo concreto de esta alternativa es el representado en el esquema que se muestra a continuación, donde se obtiene la escuaramida derivada de la p-trifluorometilanilina (Esquema 2).⁷



Esquema 2 – Síntesis de escuaramidas derivadas de aminas poco nucleófilas mediante el uso del dicloruro del ácido escuárico como intermedio.⁷

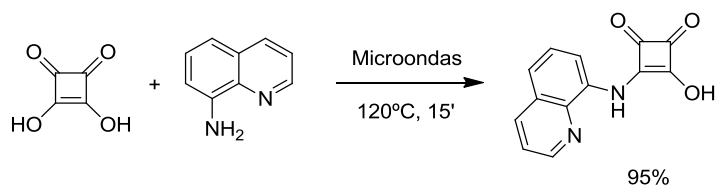
Otra alternativa para la obtención de escuaramidas es el uso de microondas, utilizando ácido escuárico y aminas especialmente básicas como por ejemplo anilinas. El ejemplo representado a continuación se encuentra descrito en la bibliografía, obteniendo con tiempos de reacción cortos unos buenos rendimientos, variables no obstante en función de la amina utilizada (Esquema 3).⁸

⁵ Lunelli, B.; New, optimized preparation of 1,2-dichlorocyclobuten-3,4-dione (C4O2Cl2) from squaric acid and oxalyl chloride. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 3595-3597.

⁶ Prashar, D.; Cui, D.; Bandyopadhyay, D.; Luk, Y. Y.; Modification of Proteins with Cyclodextrins Prevents Aggregation and Surface Adsorption and Increases Thermal Stability. *Langmuir*, **2011**, 27, 13091-13096.

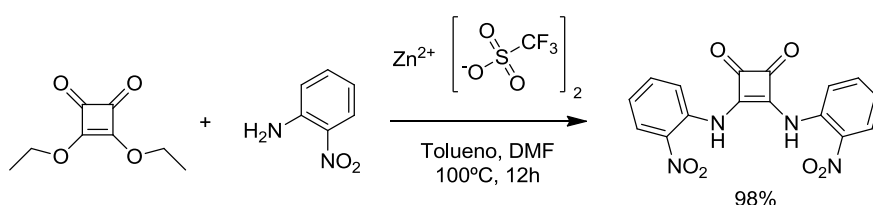
⁷ Amendola, V.; Fabbrizzi, L.; Mosca, L.; Schmidtchen, F. P.; Urea-, Squaramide-, and Sulfonamide-Based Anion Receptors: A Thermodynamic Study. *Chem. Eur. J.*, **2011**, 17, 5972-5981.

⁸ López, C.; Vega, M.; Sanna, E.; Rotger, C.; Costa, A.; Efficient microwave-assisted preparation of squaric acid monoamides in water. *RSC Advances*, **2013**, 3, 7249-7253.



Esquema 3 – Síntesis de ácidos escuarámicos mediante microondas a partir del ácido escuárico y aminas especialmente básicas.⁸

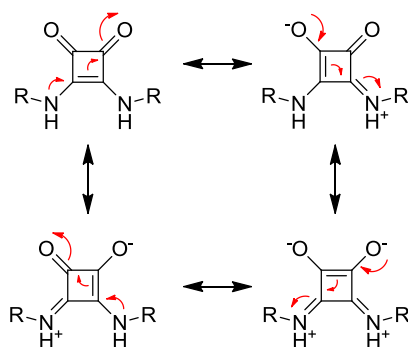
Un método reciente, muy efectivo para escuaramidas derivadas de aminas aromáticas consiste en el uso de ácidos de Lewis a modo de catalizadores, como el triflato de zinc. De esta forma se incrementa la electrofilia de los ésteres, favoreciendo la sustitución por parte de aminas menos nucleófilas (Esquema 4).⁹



Esquema 4 – Síntesis de escuaramidas a partir de escuarato de dietilo y aminas poco nucleófilas mediante catálisis con un ácido de Lewis.⁹

1.2.1 Propiedades conformacionales

En las escuaramidas secundarias el par electrónico del nitrógeno entra en conjugación con los carbonilos del extremo contrario del anillo, dando lugar a una serie de estructuras resonantes al igual que ocurre con el ácido escuárico (Esquema 5).

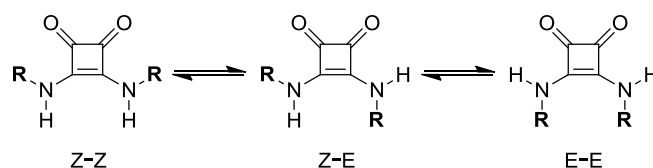


Esquema 5 – Formas resonantes de las escuaramidas secundarias.

⁹ Rostami, A.; Colin, A.; Li, X. Y.; Chudzinski, M. G.; Lough, A. J.; Taylor, M. S.; N-N'-Diarylsquaramides: General, High-Yielding Synthesis and Applications in Colorimetric Anion Sensing. *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 3983-3992.

Como consecuencia el enlace C-N escuaramídico es más corto (1,32 Å) de lo que cabría esperar para un enlace simple C-N (1,46 Å) o incluso un enlace C-N de una amida (1,37 Å). Además de la distancia de enlace más corta, la resonancia observada provoca que exista una rotación restringida alrededor de este enlace.

La energía de la barrera de rotación de este enlace es de unos 63 kJ/mol,¹⁰ menor que la de las amidas secundarias que es de unos 80 kJ/mol, pero suficientemente elevada para que potencialmente puedan existir hasta tres conformémeros en equilibrio, si bien, hasta la fecha, no se ha descrito la presencia de estructuras de tipo E-E en disolución (Esquema 6).



Esquema 6 – Conformaciones existentes en una bis-esquaramida en función de la rotación del enlace C-N.

Los conformémeros designados como Z,Z y Z,E de bis-esquaramidas y de escuaramida-ésteres son reconocibles mediante RMN de protón (¹H-RMN) (Fig. 3).

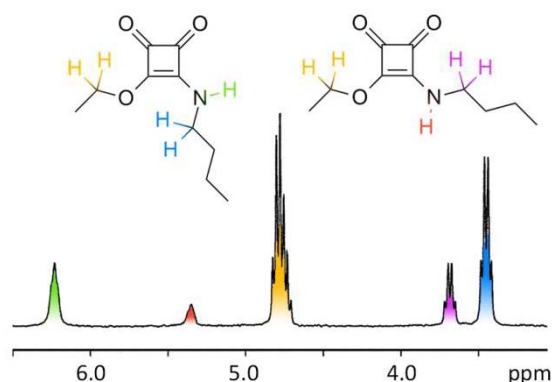
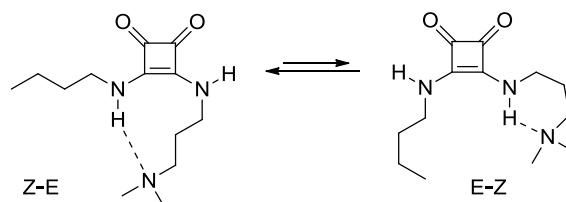


Figura 3 – Espectro de ¹H-RMN y asignación de las señales en α a una semiesquaramida-éster.

En disolución, la diferencia de energía entre ambos rotámeros es de alrededor de 1,5 kJ/mol en favor del conformémero E,Z (Z,E). En condiciones normales ambos conformémeros se encuentran en equilibrio y la proporción relativa de cada uno de ellos depende de la naturaleza las cadenas laterales, la temperatura, el disolvente, o la presencia de sustratos que interaccionan con la unidad escuaramida.

¹⁰ Rotger, M. C.; Piña, M. N.; Frontera, A.; Martorell, G.; Ballester, P.; Deyà, P. M.; Costa, A.; Conformational Preferences and Self-Template Macrocyclization of Squaramide-Based Foldable Modules. *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 2302-2308.

La formación de enlaces hidrógeno intramoleculares permite modificar selectivamente la proporción de los conformeros presentes en disolución. Así por ejemplo, se ha descrito un módulo inductor de giro- β basado en la unidad escuaramida mediante la formación de un enlace de hidrógeno entre el NH escuaramídico y el nitrógeno terciario de la cadena alquílica adyacente. Esta estructura mimetiza los giros generados por aminoácidos como la prolina en las cadenas peptídicas (Esquema 7).¹⁰



Esquema 7 – Estructura escuaramídica capaz de formar un enlace de hidrógeno intramolecular mimética de giros- β en dos de las conformaciones posibles.¹⁰

Los giros- β se establecen de forma natural en las proteínas mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos NH del enlace peptídico, que actúan como donadores, y los carbonilos, que actúan como aceptores, separados por tres aminoácidos, formando de esta manera estructuras cíclicas intramoleculares de diez miembros. Siguiendo este principio se ha estudiado la idoneidad de la formación de un giro- β intramolecular mediante la formación de un enlace de hidrógeno entre el hidrógeno de un grupo NH escuaramídico y un carbonilo amídico en función de la longitud de la cadena que contiene el grupo carbonilo. Los estudios realizados utilizando compuestos escuaramídicos como los de la figura 4 indican que el modelo permite la formación de un ciclo intramolecular de diez miembros, obteniendo estructuras miméticas de giros- β . Sin embargo, la inducción del giro en los sistemas estudiados que podrían formar ciclos de 8 o 9 miembros no pudo observarse. De esta forma, utilizando la unidad de giro escuaramídica caracterizada se obtuvo un polipéptido plegado, con un tamaño del ciclo similar al que se da de forma natural (Fig. 4).¹¹

¹¹ Martínez, L.; Sampedro, A.; Sanna, E.; Costa, A.; Rotger, C.; Synthesis and conformational studies of péptido-squaramide foldable modules: a new class of turn-mimetic compounds. *Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 1914-1921.

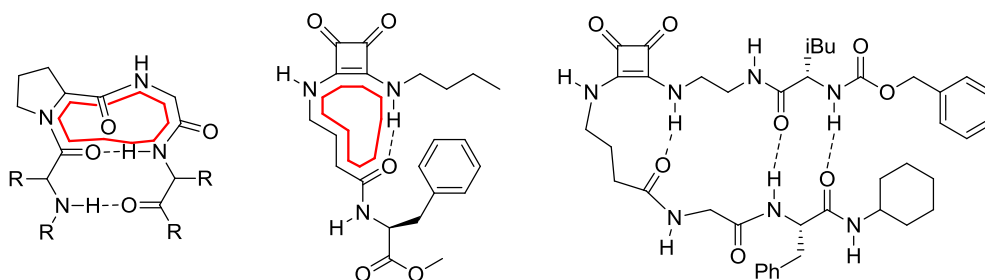
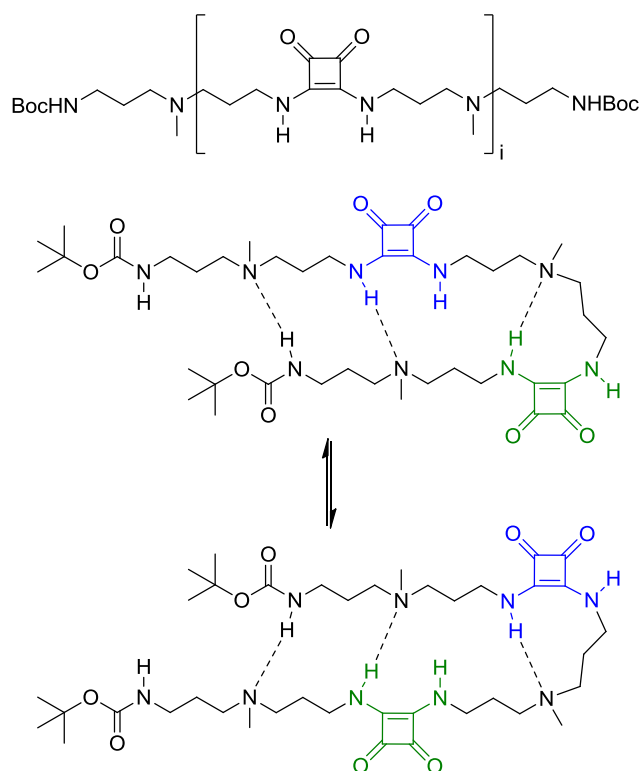


Figura 4 – Giro- β en una estructura peptídica convencional (izquierda), estructura escuaramídica inductora de giro- β formando in ciclo intramolecular de 10 miembros (centro) y una de las estructuras del polipéptido obtenido identificada mediante estudios de RMN (derecha).¹¹

Se ha observado también que oligómeros formados por unidades escuaramida unidas entre sí por cadenas alifáticas conteniendo un átomo donador de enlace de hidrógeno (N u O) en la posición γ de la cadena alquílica, forman estructuras monoméricas estables tipo “hairpin” inducidas por la formación de una serie de enlaces de hidrogeno intramoleculares, mostrando estas estructuras plegadas un patrón similar al giro observado en el esquema 7 (Esquema 8).¹⁰



Esquema 8 – Estructura general de los oligómeros y equilibrio del patrón de enlaces de hidrógeno intramoleculares en la estructura plegada propuesta para el oligómero de dos unidades escuaramida ($i = 2$).

Estos giros se dan en la conformación Z-E de la escuaramida y están inducidos por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre los grupos NH escuaramídicos y los nitrógenos terciarios, formando un ciclo de nueve miembros que se mantiene incluso en presencia de disolventes polares competitivos.

Se pueden preparar oligómeros de diferente longitud ($i = 1-5$) con lo que se incrementa la estabilidad de la estructura plegada a medida que se aumenta el número de unidades escuaramida. Ello es debido al mayor número de interacciones de enlace de hidrógeno que se pueden establecer y que se traduce en un aumento de la temperatura de fusión del oligómero medida por DSC. Estos oligómeros se han utilizado en reacciones de macrociclación, donde la efectividad de preorganizar los precursores lineales ha quedado patente. Este apartado se discute en mayor profundidad en el capítulo 2 de esta Tesis.

1.2.2 Interacción mediante enlace de hidrógeno

Hasta este punto se ha puesto en evidencia la capacidad de la unidad escuaramida para formar enlaces de hidrógeno. Debido a su estructura, es capaz de actuar tanto como donador, mediante los grupos amino secundarios, o bien como aceptor de enlace de hidrógeno, utilizando para ello los carbonilos (Fig. 5).

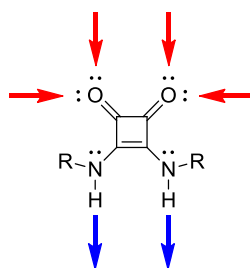


Figura 5 – Estructura de una diescuaramida secundaria donde se han indicado las posiciones susceptibles de actuar como aceptores de enlace de hidrógeno (rojo) o como donadores (azul).

Este comportamiento convierte a la unidad escuaramida en una estructura ideal como unidad de reconocimiento. No obstante, esta misma capacidad para actuar como donador y aceptor al mismo tiempo es la causante, muchas veces, de la baja solubilidad en disolventes orgánicos de muchos compuestos escuaramídicos. Esto se debe a la posibilidad de establecer interacciones intermoleculares entre ellos mismos formando agregados del tipo cabeza-cola (Fig. 6).

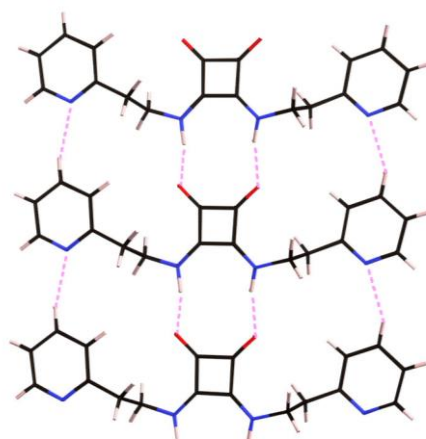


Figura 6 – Estructura cristalina de la Bis[2-(2-piridil)etilamino] escuaramida donde se forman agregados cabeza-cola mediante enlaces de hidrógeno.¹⁶

Además de formar estos agregados, se ha descrito en multitud de ocasiones la capacidad de los compuestos escuaramídicos para formar complejos con oxoaniones incluso en disolventes altamente competitivos como por ejemplo DMSO o disoluciones acuosas (Fig. 7).¹²⁻¹⁸

¹² Prohens, R.; Rotger, M. C.; Piña, M. N.; Deyà, P. M.; Morey, J.; Ballester, P.; Costa, A.; Thermodynamic characterization of the squaramide-carboxylate interaction in squaramide receptors. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 4933-4936.

¹³ Piña, M. N.; Rotger, C.; Costa, A.; Ballester, P.; Deyà, P. M.; Evaluation of anion selectivity in protic media by squaramide-Cresol Red ensembles. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 3749-3752.

¹⁴ Piña, M. N.; Rotger, C.; Soberats, B.; Ballester, P.; Deyà, P. M.; Costa, A.; Evidence of anion-induced dimerization of a squaramide-based host in protic solvents. *Chem. Commun.* **2007**, 963-965.

¹⁵ Piña, M. N.; Soberats, B.; Rotger, C.; Ballester, P.; Deyà, P. M.; Costa, A.; Selective sensing of competitive anions by non-selective hosts: the case of sulfate and phosphate in water. *New J. Chem.* **2008**, 32, 1919-1923.

¹⁶ Rotger, C.; Soberats, B.; Quiñonero, D.; Frontera, A.; Ballester, P.; Buchholz, J. B.; Deyà, P.; Costa, A.; Crystallographic and Theoretical Evidence of Anion- π and Hydrogen-Bonding Interactions in a Squaramide-Nitrate Salt. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 11, 1864-1868.

¹⁷ Sun, C. G.; Lin, Q.; Fu, N. Y.; A novel squaraine dye with squaramide as a scaffold and the colorimetric detection of amine. *Chin. Chem. Lett.*, 2012, 23, 217-220.

¹⁸ Jin, C.; Zhang, M.; Deng, C.; Guan, Y.; Gong, J.; Zhu, D.; Pan, Y.; Jiang, J.; Wang, L.; Novel calix[4]arene-based receptors with bis-squaramide moieties for colorimetric sensing of anions via two different interaction modes. *Tetrahedron Lett.*, **2013**, 54, 796-801.

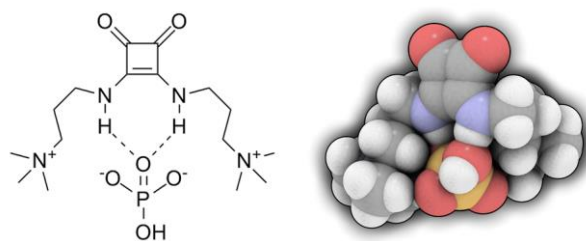


Figura 7 – Modelo de la interacción entre una escuaramida y un grupo fosfato mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos escuaramídicos (donadores) y los oxígenos del anión fosfato (aceptores).

Una de las aplicaciones que han permitido este tipo de interacciones supramoleculares es la detección colorimétrica de oxodianiones como sulfato o hidrógeno fosfato mediante desplazamiento competitivo de un indicador (Fig. 8).

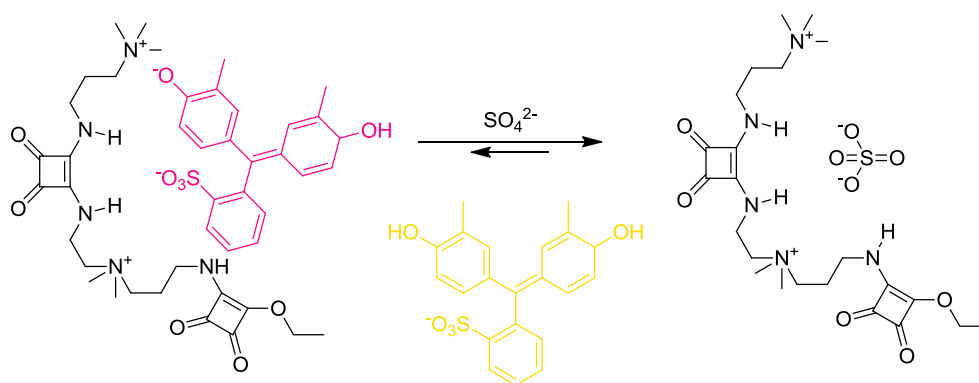


Figura 8 – Mecanismo de acción de la sonda colorimétrica de oxoaniones.¹³ Se observa el desplazamiento que sufre el indicador mediante la adición de sulfato a la disolución.

En la figura anterior se ejemplifica el mecanismo de acción de esta sonda colorimétrica mediante el uso del indicador Rojo de Cresol. Una vez complejado el indicador, presenta una coloración distinta a la del indicador libre en disolución. La constante de asociación receptor-indicador es de $9,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ y la adición de un sustrato competitivo incrementa la concentración del indicador en disolución produciendo un cambio en la coloración global de la disolución. Al realizar una valoración competitiva mediante la adición del oxoanión se produce un intercambio con el indicador, observando de esta forma una variación en el espectro ultravioleta-visible de la disolución.

En otro ejemplo descrito por C. Jin y colaboradores,¹⁸ una estructura de calix[4]areno se utiliza para la detección de aniones fosfato, fluoruro y acetato mediante dos mecanismos diferentes en función del receptor utilizado (Fig. 9).

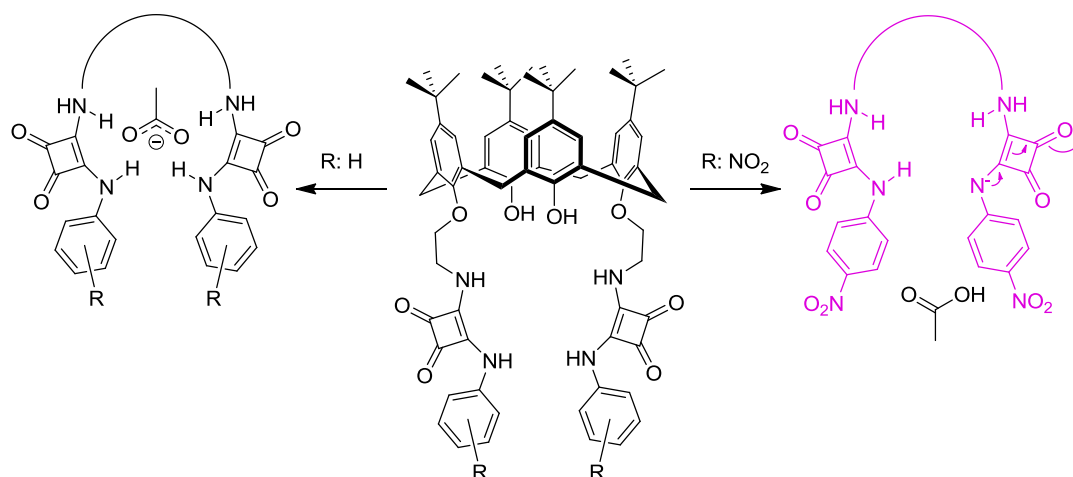


Figura 9 – Estructura del receptor diesquaramídico propuesto por C. Jin y colaboradores y respuesta observada en función de la sustitución del anillo aromático.¹⁸

Según el ejemplo anterior, en el caso de escuaramidas conjugadas con sustituyentes aromáticos electroatrayentes, como son grupos nitro en posición para, la interacción anión-receptor provoca la desprotonación de la escuaramida, dando una coloración morada y obteniendo de esta forma un sensor colorimétrico. Por otra parte, en ausencia de estos grupos atrayentes, la interacción se produce mediante enlace de hidrógeno con las escuaramidas, pudiendo ser detectado mediante RMN. En este último caso las constantes de asociación entre el receptor y los aniones oscilan entre $2,2 \times 10^4$ y $5,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. El sensor colorimétrico ha demostrado ser específico principalmente para fluoruro y acetato, no mostrando ninguna señal para otros haluros, nitrato o sulfato.

1.2.3 Carácter bioisótero de las escuaramidas

Los grupos bioisóteros son aquellos grupos o sustituyentes con propiedades químicas y físicas similares que otorgan a un compuesto propiedades biológicas semejantes. Un ejemplo de grupos bioisóteros es un átomo de cloro, que se puede sustituir en una estructura por un grupo trifluorometilo. El volumen que ocupan ambos grupos es muy similar, por tanto, la interacción con un posible centro activo no se vería demasiado afectada. No obstante, las propiedades fisico-químicas podrían verse alteradas por esta sustitución provocando una respuesta biológica diferente.

En el diseño de nuevos fármacos, el hecho de intercambiar un grupo funcional por un bioisótero pretende mejorar determinadas propiedades, como por ejemplo su resistencia a la hidrólisis, sin modificar en exceso la estructura química. Esta estrategia se utiliza también para atenuar la toxicidad, modular la actividad o alterar el metabolismo de un fármaco.

En el caso concreto de las escuaramidas, la particular distribución de los grupos donadores y aceptores convierte a su estructura análoga a la de las amidas, tal y como se ha comentado al principio de este capítulo. De esta forma se pueden definir las escuaramidas como bioisósteras de este grupo funcional (Fig. 10).

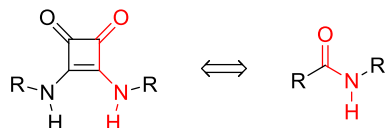


Figura 10 – Comparación de las similitudes estructurales entre una escuaramida secundaria y un grupo amida típico de un enlace peptídico.

Además se encuentran en la bibliografía referencias donde se describen los derivados del ácido escuárico como bioisósteros de diferentes grupos funcionales, tales como aminoácidos,¹⁹ ácidos carboxílicos^{20,21} o fosfatos²² entre otros (Fig. 11).

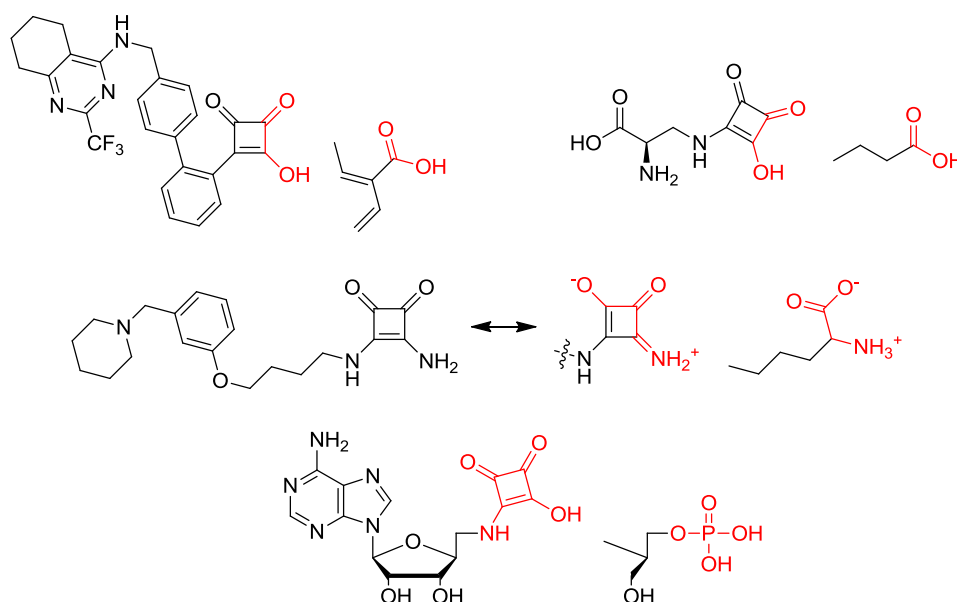


Figura 11 – Compuestos derivados del ácido escuárico que actúan como bioisósteros de carboxilatos (arriba),^{20,21} aminoácidos (centro)¹⁹ o fosfatos (abajo).²²

¹⁹ Kinney, W. A.; Lee, N. E.; Garrison, D. T.; Podlesny Jr., E. J.; Simmonds, J. T.; Bramlett, D.; Notvest, R. R.; Kowal, D. M.; Tasse, R. P.; Bioisosteric replacement of the .alpha.-amino carboxylic acid functionality in 3-amino-5-phosphonopentanoic acid yields unique 3,4-diamino-3-cyclobuten-1,2-dione containing NMDA antagonists. *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 4720-4726.

²⁰ Chan, P. C. M.; Roon, R. J.; Koerner, J. F.; Taylor, N. J.; Honek, J. F.; A 3-amino-4-hydroxy-3-cyclobutene-1,2-dione-Containing Glutamate Analogue Exhibiting High Affinity to Excitatory Amino Acid Receptors. *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 4433-4438.

²¹ Soll, R. M.; Kinney, W. A.; Primeau, J.; Garrick, L.; McCaully, R. J.; Colatsky, T.; Oshiro, G.; Park, C. H.; Hartupee, D.; White, V.; McCallum, J.; Russo, A.; Dinish, J.; Wojdan, A.; 3-hydroxy-3-cyclobutene-1,2-dione: Application of novel carboxylic acid bioisostere to an in-vivo active non-tetrazole angiotensin-II antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3, 757-760.

²² Seio, K.; Miyashita, T.; Sato, K.; Sekine, M.; Synthesis and Properties of New Nucleotide Analogues Possessing Squaramide Moieties as New Phosphate Isosters. *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 5163-5170.

En estos trabajos, el anillo ciclobuténico aporta unas propiedades similares a los grupos funcionales originales, permitiendo además el reconocimiento por parte de las proteínas. Sin embargo, al poseer una estructura y reactividad diferente, estos compuestos se comportan como antagonistas, permitiendo el bloqueo de la proteína y ejerciendo una actividad terapéutica para el tratamiento del Parkinson, el Alzheimer o la hipertensión arterial.

1.2.4 Antecedentes de actividad biológica de escuaramidas

El incremento de popularidad de los derivados del ácido escuárico como bioisómeros ha permitido explotar esta característica terapéuticamente. Se han desarrollado multitud de compuestos escuaramídicos donde se describe la actividad en sistemas vivos con diferentes finalidades. Además de los ejemplos comentados, se puede destacar el tratamiento de enfermedades relacionadas con la señalización intercelular,^{23,24} tales como el cáncer, inflamaciones crónicas o fibrosis quística, el tratamiento de desórdenes relacionados con los canales de potasio,²⁵ como incontinencia urinaria, disfunción eréctil, epilepsia, o más recientemente como antiparasitarios,^{26,27} para el tratamiento de la malaria o la enfermedad de Chagas (Fig. 12).

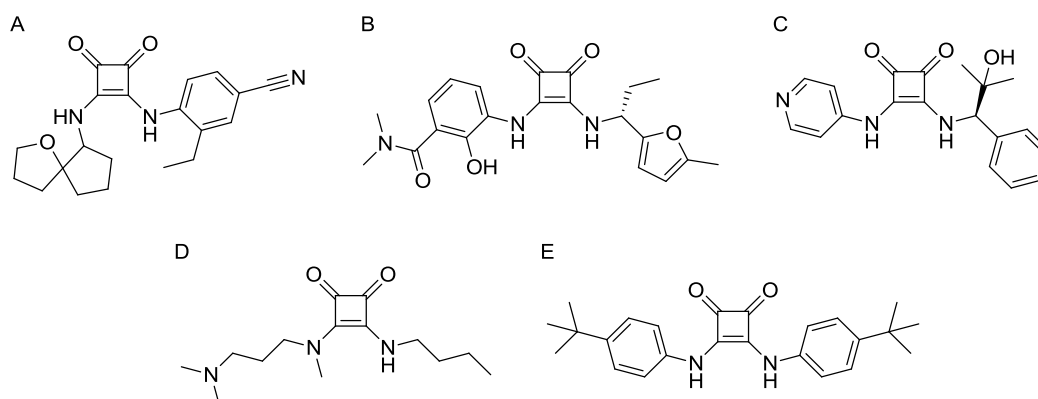


Figura 12 – Compuestos escuaramídicos con actividad relacionada con la apertura de los canales de potasio (A),²⁵ inhibición de quimioquinas CXC (B),²³ inhibición de cinasas (C),²⁴ y antiparasitaria (D y E).^{27,26}

²³ Chao, J.; Czarmiecki, M. F.; He, Z.; Lai, G.; Merritt, J. R.; 3,4-di-substituted cyclobutene-1,2-diones as cxc-chemokine receptor ligands. WO 2008/005570 A1.

²⁴ Lovering, F. E.; Kirincich, S. J.; Wang, W.; Telliez, J. B.; Resnick, L.; Sabalski, J. E.; Banker, A. L.; Butera, J.; McFadyen, I.; Squarate kinase inhibitors. WO 2009/012375 A2.

²⁵ Lanter, J. C.; Sui, Z.; Derives de 3,4-diamino-3-cyclobutene-1,2-dione en tant qu'agents d'ouverture du canal potassique. WO 2007/115071 A1.

²⁶ Kumar, S. P.; Glória, P. M. C.; Gonçalves, L. M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Moreira, R.; Santos, M. M. M.; Squartic acid: a valuable scaffold for developing antimalarials?. *Med. Chem. Commun.*, **2012**, 3, 489-493.

²⁷ Olmo, F.; Rotger, C.; Ramírez-Macías, I.; Martínez, L.; Marín, C.; Carreras, L.; Urbanová, K.; Vega, M.; Chaves-Lemaur, G.; Sampedro, A.; Rosales, M. J.; Sánchez-Moreno, M.; Costa, A.; Synthesis and Biological Evaluation of N,N'-Squaramides with High in Vivo Efficacy and Low Toxicity: Toward a Low-Cost Drug against Chagas Disease. *J. Med. Chem.*, **2014**, 57, 987-999.

Muchos de estos compuestos están bajo la protección de patentes, poniendo de manifiesto su potencial terapéutico. Estas estructuras, basadas en la unidad escuaramida, tienen una alta especificidad, comportándose en algunos casos como inhibidores de proteínas concretas con un papel importante en el desarrollo o evolución de diferentes enfermedades, como la ya comentada, el cáncer.

1.2.4.1 Escuaramidas con propiedades anticancerígenas

El cáncer es un término que se usa para definir un grupo de enfermedades en las que células anormales se dividen sin control. Hay más de cien tipos diferentes de cáncer en función del tipo de células que lo originan, como por ejemplo osteosarcoma (hueso), glioma (células gliales del sistema nervioso), melanoma cutáneo (melanocitos de la piel), adenocarcinoma (colon), etc.

Los tratamientos más comunes para esta enfermedad son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia.

La quimioterapia consiste en el uso de fármacos o sustancias químicas con actividad antitumoral. Se pueden diferenciar diferentes tipos de fármacos utilizados en la quimioterapia en función de su modo de actuación sobre el organismo, diferenciando a grandes rasgos aquellos que son inespecíficos, que son la mayoría, o los específicos.

Los fármacos inespecíficos se caracterizan por afectar tanto a células tumorales como a células sanas. Éstas últimas conservan las capacidades de reparación intactas y por tanto pueden reparar aquellos errores provocados por los fármacos antitumorales. A menudo afectan bien al ADN o a determinados procesos relacionados con la división celular, generando errores que al no ser reparados acaban provocando la muerte de la célula. Ejemplos de este tipo de fármacos inespecíficos son los agentes alquilantes, que provocan la alquilación de la posición 7 de la guanina en el ADN, como por ejemplo los derivados del gas mostaza (Fig. 13-a) o los complejos de cis-platino (Fig. 13-b). Otros ejemplos de fármacos inespecíficos son determinados alcaloides, como el paclitaxel, que actúa sobre los microtúbulos, importantes durante la fase de división; antibióticos con actividad antitumoral, como la doxorubicina (Fig. 13-c); antimetabolitos, como el metotrexato, antimetabolito del ácido fólico (Fig. 13-e), que sustituyen a sus correspondientes homólogos impidiendo la normal evolución del sistema, o inhibidores de las topoisomerasas, impidiendo los cambios conformacionales en el ADN provocados por estas proteínas, como por ejemplo la amsacrina (Fig. 13-d).²⁸

²⁸ Copyright © 2003, Chemocare.com. All rights reserved.

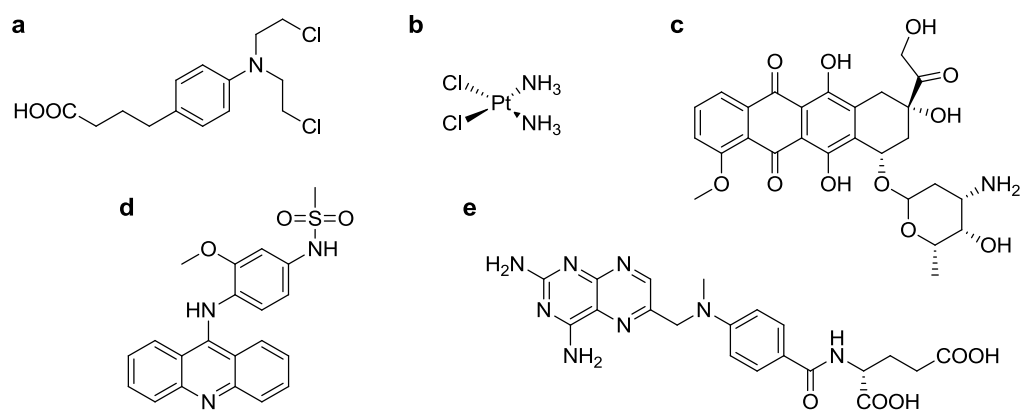


Figura 13 – Estructuras de diferentes fármacos antitumorales inespecíficos. De izquierda a derecha y de arriba a abajo: clorambucilo (a), cisplatino (b), doxorubicina (c), amosacrina (d) y metotrexato (e).

Como se ha dicho, estos fármacos inespecíficos actúan tanto sobre células tumorales, como sobre células sanas, especialmente sobre aquellas de rápida división como las células hematopoyética, siendo esta la causa principal por la que provocan diferentes efectos secundarios tales como pérdida de apetito, caída del pelo, dolor, náuseas o desórdenes sanguíneos entre otros.

Las características que diferencian a las células tumorales de las células sanas se encuentran descritas en la bibliografía de forma muy detallada.²⁹ Existen también multitud de trabajos que relacionan la presencia de determinadas proteínas, metabolitos o condiciones físicas con el cáncer. Con la finalidad de evitar o minimizar los efectos secundarios se han desarrollado lo que se denominan fármacos específicos o terapia dirigida cuya actividad se orienta en función de las características específicas de las células a tratar.

Basados en este principio, existen diversos ejemplos descritos en la bibliografía donde el uso de derivados del ácido escuárico, especialmente escuaramidas, se han utilizado para la obtención de fármacos específicos que demuestran una predilección por determinadas características de las células tumorales. Un ejemplo de esto son la serie de compuestos patentados por A. Crew y colaboradores, que se comportan como inhibidores del protooncogén c-Kit, relacionado con la embriogénesis, melanogénesis, tumores gastrointestinales y otros tumores sólidos, además de ciertas leucemias (Fig. 14).³⁰

²⁹ Hanahan, D.; Weinberg, R. A.; Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, **2011**, 144, 646-674.

³⁰ Crew, A.; Li, A. H.; Qiu, L.; Castelhana, A. L.; Dong, H.; Smith, A.; Tardibono, L.; Zhang, T.; (arylamidoaryl)squaramide compounds. WO 2006/034111 A1.

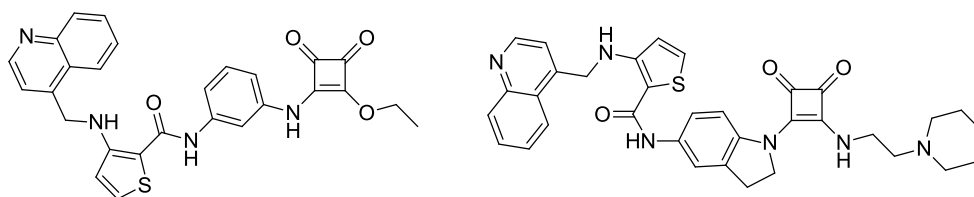


Figura 14 – Estructuras de dos de los compuestos derivados del ácido escuárico patentados como inhibidores del protooncogén c-Kit.³⁰

Se ha descrito también el uso de estos derivados como fármacos específicos para el cáncer como inhibidores de cinasas, encontrando hasta seis patentes de aplicación desarrolladas por Merck Patent GmbH desde 2006. Los compuestos presentados contienen, de forma general, un grupo arilo como el primer sustituyente y un grupo 3-hidroxi o 3-metoxibencilo como segundo sustituyente del anillo ciclobuténico. Se comportan como inhibidores de las cinasas Chk1, Chk2 y SGK, responsables de procesos de transducción de señales. Su actividad difiere en función de la estructura, obteniendo para algunos casos, como por ejemplo el del compuesto de la figura 15, valores de IC_{50} enzimáticas muy bajas (10 nM) para la inhibición de la cinasa SGK.³¹

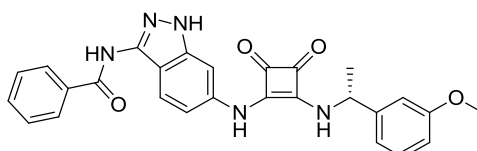


Figura 15 – Estructura de la escuaramida inhibidora de la enzima SGK, con una concentración IC_{50} enzimática de 10 nM.³¹

Otro ejemplo más reciente de estructuras escuaramídicas con actividad antitumoral son los descritos en la patente de M. D. Alexander y colaboradores, en este caso como inhibidores de la cinasa MK2, un importante regulador de la producción de citoquinas (Fig. 16).³²

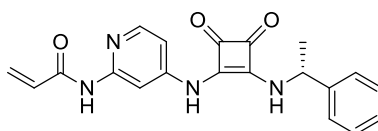


Figura 16 – Una de las estructuras escuaramídicas con actividad inhibitoria de MK2 patentada por M. D. Alexander.³²

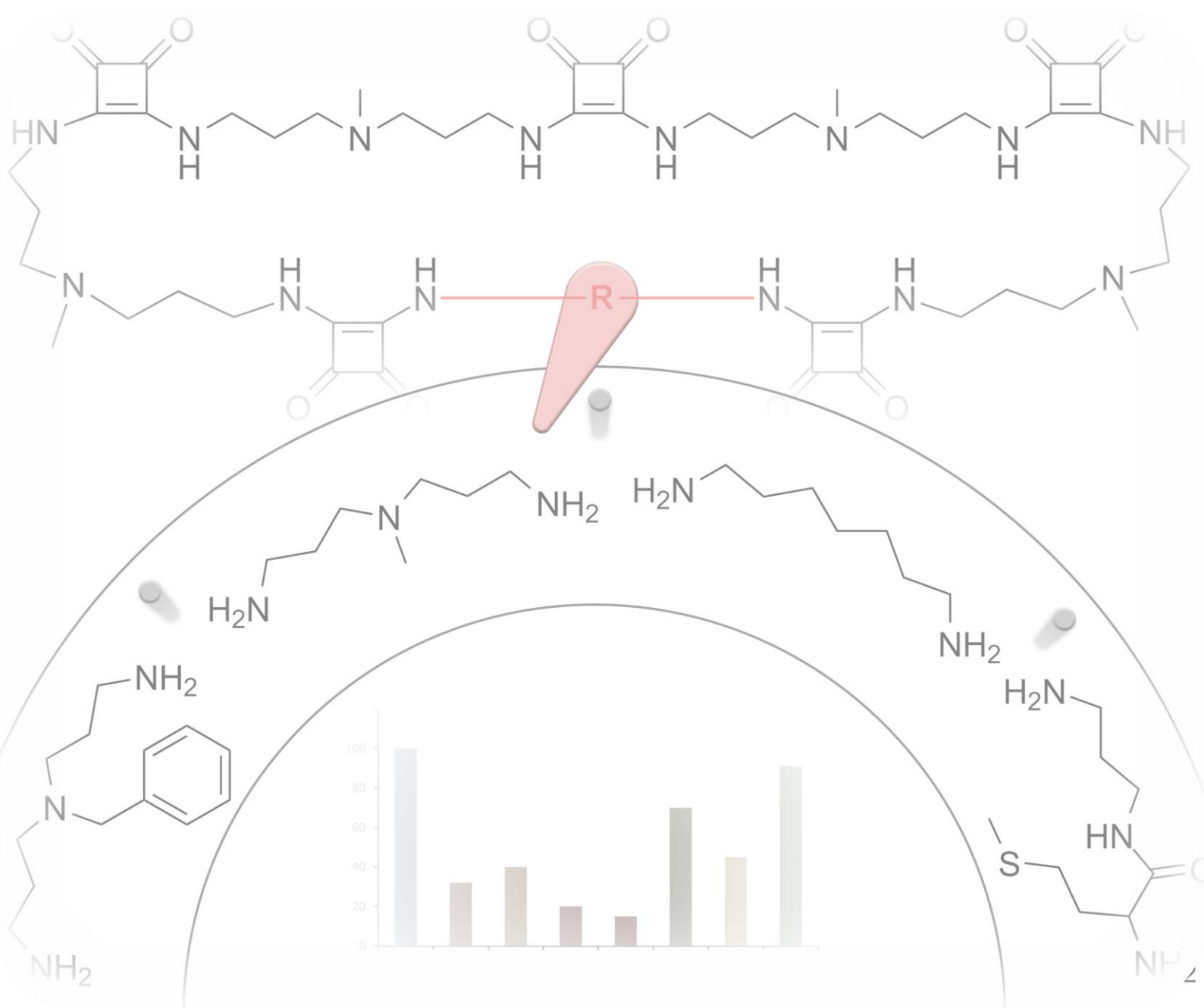
Considerando el conjunto de trabajos publicados en este campo, el uso de derivados del ácido escuárico como una aproximación a la terapia dirigida ha experimentado un gran desarrollo en los últimos años, lo que ejemplifica el gran potencial de estas estructuras como una nueva alternativa a la quimioterapia tradicional.

³¹ Janetka, J. W.; Ashwell, S.; Checkpoint kinase inhibitors: a review of the patent literature. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2009**, 19, 165-197.

³² Alexander, M. D.; McDonald, J. J.; Ni, Y.; Niu, D.; Petter, R. C.; Qiao, L.; Singh, J.; Wang, T.; Zhu, Z.; Mk2 inhibitors and uses thereof. WO2014/149164 A1

CAPÍTULO 2

DISEÑO, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE OLIGOESCUARAMIDAS CÍCLICAS



2.1 Introducción

Existe una necesidad creciente de nuevos agentes terapéuticos con mayor efectividad, que provoquen menos efectos secundarios y para los cuales no se haya desarrollado resistencia. Un grupo importante de compuestos farmacológicamente activos son las estructuras macrocíclicas de masa inferior a 2000 daltons, que es el límite de masa superior para que un compuesto pueda atravesar la membrana celular (Fig. 17).^{33,34,35,36}

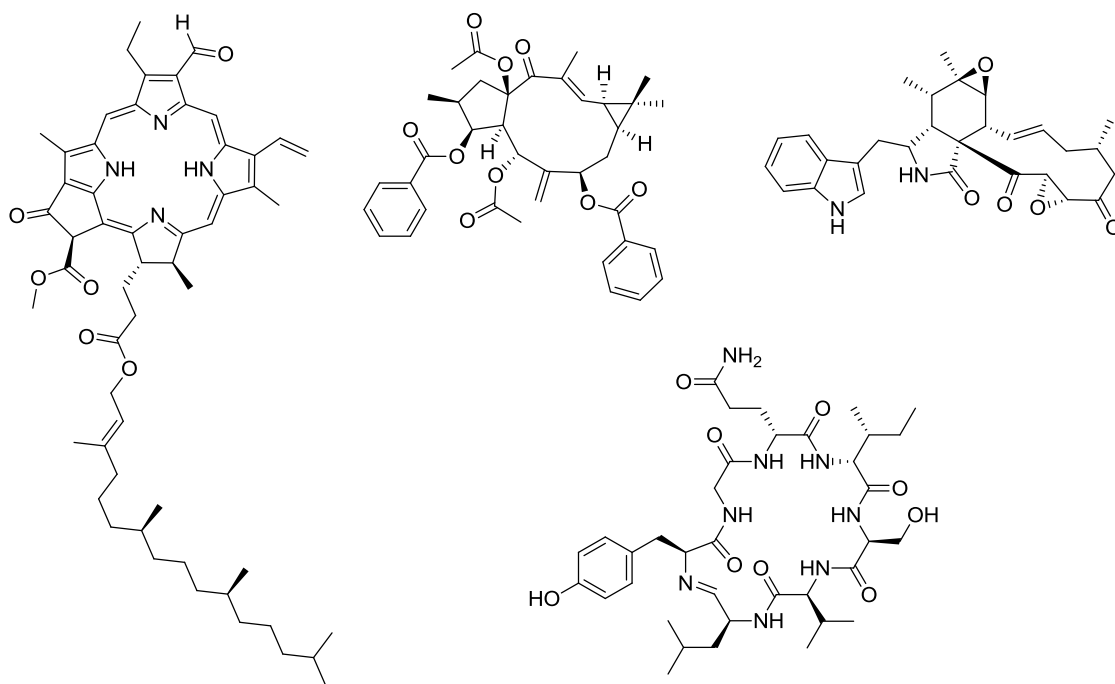


Figura 17 – Diferentes ejemplos de estructuras macrocíclicas naturales. Izquierda: Clorofila B, con un anillo de porfirina. Centro: Diterpenoide aislado de la planta *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii*.³⁵ Derecha: Citocalasina aislada del hongo *Pseudeurotium zonatum*.³⁶ Abajo: Scitonemida A, un ciclopeptido aislado de la cianobacteria *Scytonema hofmannii*.³⁴

Actualmente, los compuestos macrocíclicos son uno de los grupos más numerosos de agentes terapéuticos que se encuentran en fase pre-clínica y clínica de investigación, abarcando un amplio rango de enfermedades como el cáncer, enfermedades coronarias y vasculares, demencia, infecciones bacterianas, epilepsia, síndrome del X frágil, degeneración muscular, hepatitis C, VIH, obesidad, Parkinson, artritis, etc. A pesar de todo esto, muy pocos de estos compuestos llegan al mercado.³⁶

³³ Wessjohann, L. A.; Ruijter, E.; García-Rivera, D.; Brandt, W.; What can a chemist learn from nature's macrocycles? – A brief, conceptual view. *Mol. Divers.*, **2005**, 9, 171-186.

³⁴ Kronic, A.; Vallat, A.; Mo, S.; Lantvit, D. D.; Swanson, S. M.; Orjala, J.; Scytonemides A and B, Cyclic Peptides with 20S Proteasome Inhibitory Activity from the Cultured Cyanobacterium *Scytonema hofmannii*. *J. Nat. Prod.*, **2010**, 73, 1927-1932.

³⁵ Appendino, G.; Belloro, E.; Tron, G. C.; Jakupovic, J.; Ballero, M.; Diterpenoids from *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii*. *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62, 1399-1404.

³⁶ Feng, Y.; Blunt, J. W.; Cole, A. L. J.; Munro, M. H. G.; Three Novel Cytochalasins X, Y, and Z from *Pseudeurotium zonatum*. *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 1274-1277.

Paradójicamente, y a pesar de que encontramos muchos macrociclos en la naturaleza, la estructura del anillo, responsable de sus interesantes propiedades, es la causante de que sean unos compuestos difíciles de obtener en el laboratorio y por tanto su fabricación es muy costosa. De hecho, la gran mayoría de fármacos macrocíclicos actuales son productos naturales o bien sus derivados directos.

Entre éstos macrociclos los ciclopéptidos naturales son particularmente importantes, como por ejemplo la ciclosporina o la bacitracina entre otros muchos. (Fig. 18).

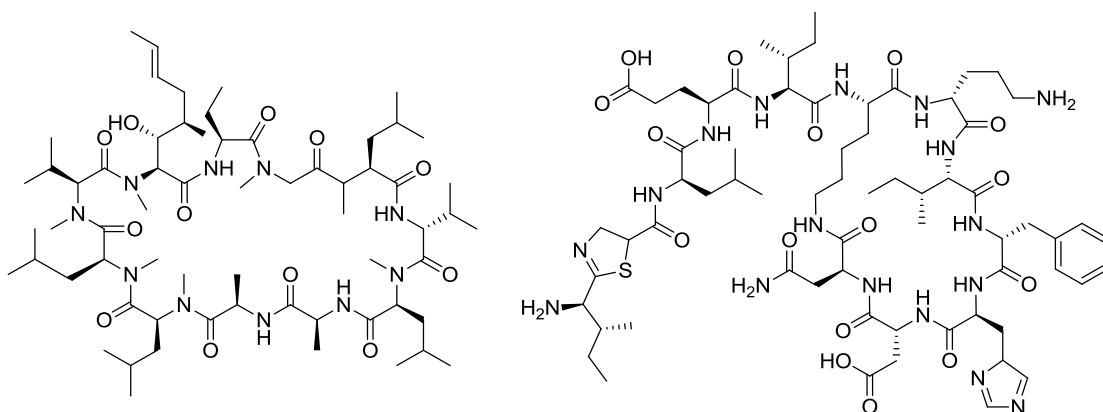


Figura 18 – Estructuras de los ciclopéptidos naturales ciclosporina (izquierda) y bacitracina (derecha).

De forma general, los macrociclos son anillos compuestos por uniones de doce o más átomos, formados principalmente por átomos de carbono, nitrógeno y oxígeno. Como consecuencia de su estructura y una cierta preorganización, las estructuras macrocíclicas pueden interactuar con los centros activos de las proteínas en la forma biológicamente activa sin un coste entrópico importante. Esta preorganización, no obstante, en ocasiones puede otorgar a la molécula una elevada rigidez. Idealmente se debe conseguir un equilibrio entre la preorganización y la flexibilidad necesaria para amoldarse a un receptor y maximizar el número de interacciones. En este punto, la optimización de la estructura permite adaptarse a estas necesidades.³⁷ Una de las principales características de los macrociclos es su elevada resistencia frente al arsenal degradativo de los sistemas vivos y por tanto, una elevada biodisponibilidad.

Las estructuras macrocíclicas son, a priori, muy adecuadas para el desarrollo de nuevos fármacos, y durante los últimos 50 años han sido una gran fuente de inspiración para la industria farmacéutica que ha utilizado estructuras derivadas de productos naturales activos con la finalidad de maximizar su eficacia. La vancomicina y la eritromicina como antibióticos, el paclitaxel (Taxol™) como antitumoral, la ciclosporina como un inmunosupresor o la amfotericina como antifúngico son ejemplos de macrociclos naturales que o bien se utilizan como fármacos o bien han servido de base para sintetizar derivados más específicos y/o efectivos (Fig. 19).

³⁷ Driggers, E. M.; Hale, S. P.; Lee, J.; Terrett, N. K.; The exploration of macrocycles for drug discovery – an underexploited structural class. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2008**, 7, 608-624.

2. Diseño, síntesis y evaluación biológica de oligoescuaramidas cíclicas

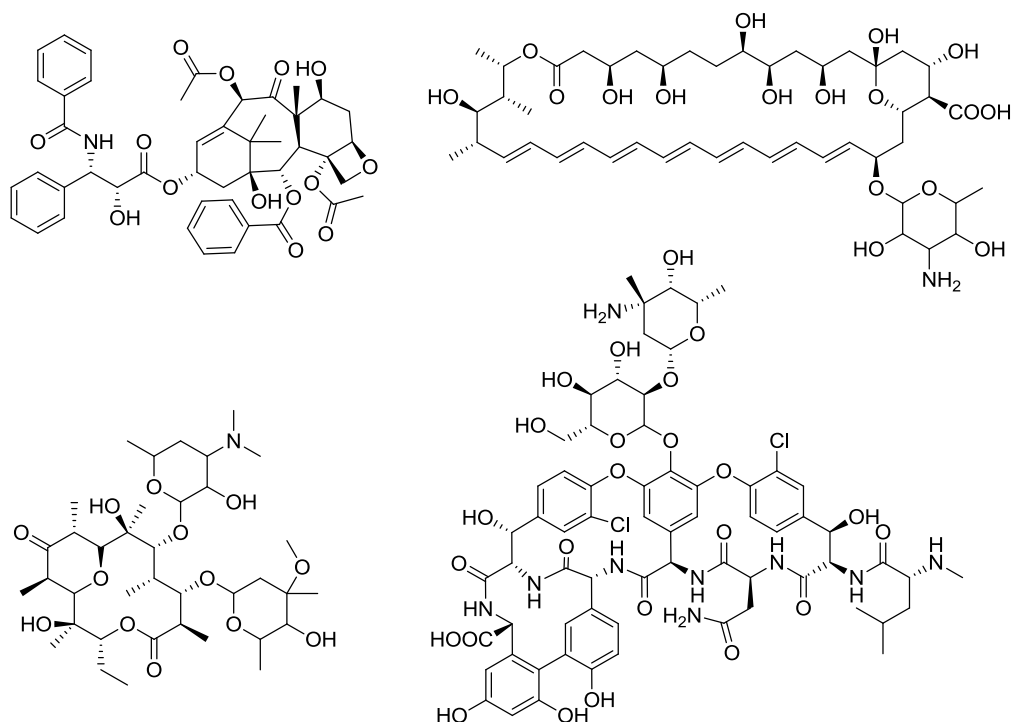


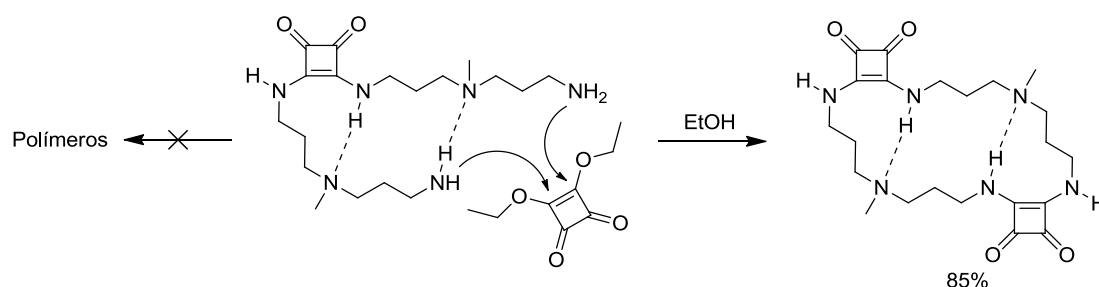
Figura 19 – Estructuras macrocíclicas utilizadas actualmente como fármacos. De arriba abajo y de izquierda a derecha: paclitaxel, amfotericina, eritromicina y vancomicina.

La mayor resistencia que presentan los macrociclos respecto a la degradación permite, por ejemplo, reducir significativamente la dosis necesaria para alcanzar la dosis efectiva. Su resistencia se puede ver incrementada además introduciendo grupos bioisómeros y/o estructuras miméticas naturales en la propia estructura macrocíclica.

Las escuaramidas, como bioisómeros del enlace peptídico, resultan interesantes para la obtención de estructuras macrocíclicas, aprovechando de este modo la capacidad de reconocimiento propia de estas unidades, además de la resistencia que aporta la estructura macrocíclica.

2.2 Oligoescuaramidas cíclicas: principios de diseño

Los oligómeros amino-escuaramídicos pueden establecer enlaces hidrógeno intramoleculares entre los NH escuaramídicos y los nitrógenos terciarios, formando estructuras miméticas de giros- β que "pliegan" el esqueleto lineal de los oligómeros y dirigen la macrociclación, permitiendo la conjugación de los dos grupos amino terminales sobre una misma unidad de escuarato de dietilo. A nivel preparativo la reacción de macrociclación se puede llevar a cabo en disolventes polares como el EtOH y sin requerir condiciones de alta dilución, obteniendo rendimientos alrededor del 85% sin que el tamaño del oligómero, y por tanto del macrociclo resultante, afecte a este rendimiento significativamente (Esquema 9).³⁸



Esquema 9 – Reacción de macrociclación favorecida por la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, evitando de esta forma la formación de polímeros.³⁸

Este resultado supone uno de los pocos casos descritos de oligómeros no naturales, diseñados para tener una estructura plegada mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares, y su aplicación para la obtención de grandes estructuras macrocíclicas.

La estructura final de los oligómeros cíclicos contiene un número concreto de unidades escuaramida secundarias, constituyendo éstas una plantilla ideal para el desarrollo de nuevos compuestos con actividad biológica. Estos macrociclos reúnen las propiedades biológicamente relevantes de las escuaramidas, capacidad de formación de enlaces hidrógeno y resistencia a la biodegradación, junto a las que confiere la estructura macrocíclica en sí misma.

2.2.1 Síntesis de oligoescuaramidas cíclicas

Habitualmente la síntesis de las oligoescuaramidas cíclicas se lleva a cabo mediante una metodología modular y por pasos donde se combinan diferentes módulos estructurales (Fig. 20).

³⁸ Rotger, C.; Piña, M. N.; Vega, M.; Ballester, P.; Deyà, P. M.; Costa, A.; Efficient Macrocyclization of Preorganized Palindromic Oligosquaramides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 6844-6848.

2. Diseño, síntesis y evaluación biológica de oligoescuaramidas cíclicas

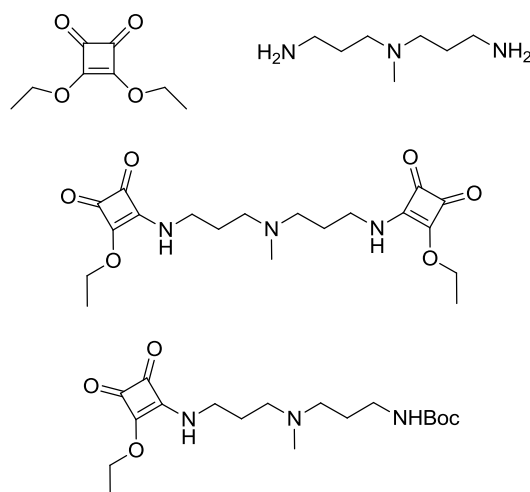
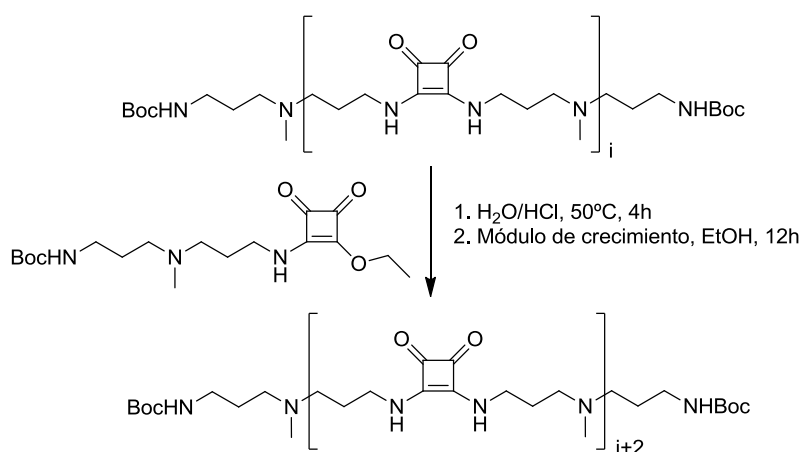


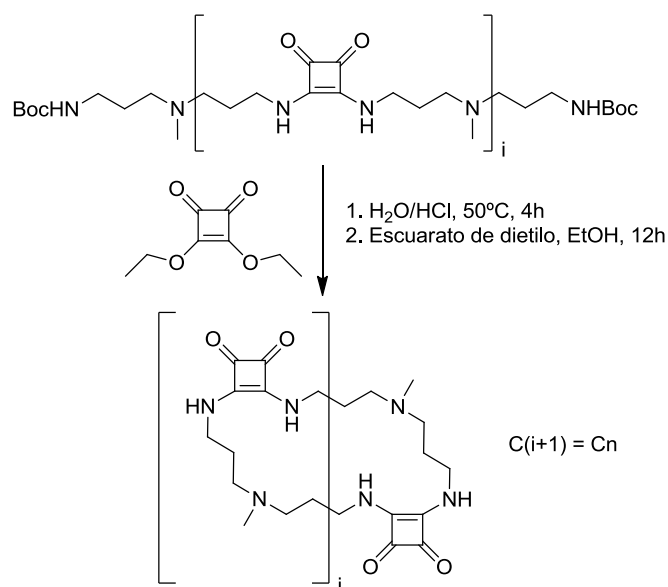
Figura 20 – Módulos estructurales utilizados para la obtención de las oligoescuaramidas cíclicas.

Estos módulos se preparan a escala multigramo, en pocos pasos sintéticos y a partir de productos comerciales. La combinación de estos módulos permite construir las cadenas oligoescuaramídicas paso a paso, obteniendo un crecimiento controlado del precursor lineal por los dos extremos (Esquema 10).³⁸



Esquema 10 – Reacción general para la elongación de los oligómeros de i unidades escuaramida mediante un módulo común de crecimiento.³⁸

Los oligómeros resultantes, a diferencia de la mayoría de compuestos escuaramídicos, son solubles en cloroformo y disolventes poco polares. Ello se debe a su capacidad de formar enlaces de hidrogeno intramoleculares, que evita la formación de agregados supramoleculares insolubles como los de tipo cabeza-cola descritos en el capítulo anterior. A partir de los oligómeros lineales desprotegidos, con “ i ” unidades escuaramida, la condensación con un escuarato de etilo, en EtOH y sin necesidad de utilizar condiciones de alta dilución como es habitual en este tipo de reacciones, permite aislar los respectivos macrociclos, denominados C_n , donde “ n ” representa el número de unidades escuaramida totales (Esquema 11).



Esquema 11 – Reacción general de obtención oligoescuaramidas cíclicas (C2-C6) a partir de los oligómeros correspondientes ($i = 1-5$).³⁸

Las características estructurales de preorganización observadas en los macrociclos obtenidos junto con los antecedentes de actividad biológica descritos para las escuaramidas, convierten a los nuevos compuestos oligoescuaramídicos en unos buenos candidatos para ser evaluados como agentes antitumorales.

2.2.2 Evaluación biológica de las oligoescuaramidas cíclicas C2-C6: descripción y resultados previos

La evaluación de las oligoescuaramidas cíclicas como agentes antitumorales se ha realizado sobre diferentes cultivos celulares, como resultado de la colaboración de nuestro grupo de trabajo con el grupo de Biología Celular del Cáncer de la UIB.

2.2.2.1 Ensayos de viabilidad

Los ensayos de viabilidad permiten conocer la cantidad de células viables que hay en un determinado volumen de cultivo después de incubarlo durante un tiempo definido junto con una concentración conocida del compuesto a ensayar. La cantidad de células viables se cuantifica midiendo la cantidad de ATP intracelular presente, ya que una vez que la célula deja de ser viable, el ATP se degrada rápidamente.

2.2.2.2 Estudios iniciales: actividad antitumoral de las oligoescuaramidas cíclicas C2-C6

En primer lugar, se determinó la actividad biológica de las oligoescuaramidas cíclicas con 2, 3, 4, 5 y 6 unidades escuaramida, de sus respectivos oligómeros precursores y de otros productos escuaramídicos sintetizados previamente en el grupo de Química Supramolecular, frente a dos líneas tumorales humanas, ambas de linfoma B, Jeko-1 y Granta-519.

Para esta determinación se utilizaron los valores de viabilidad, que representan el porcentaje de células viables de la muestra respecto a una muestra mantenida en las mismas condiciones pero sin tratamiento con el macrociclo, obteniendo valores más bajos mientras más efectivo es el tratamiento antitumoral.

Los primeros resultados evidenciaron que los oligómeros y otras estructuras más pequeñas, no presentaban ningún tipo de actividad antitumoral. No obstante, las oligoescuaramidas cíclicas más grandes demostraron unos resultados muy satisfactorios, observando una clara actividad antiproliferativa de las líneas celulares con tiempos de incubación de 48 horas (Fig. 21). Se observó también cierta selectividad ya que la citotoxicidad varía en función de la línea celular utilizada.

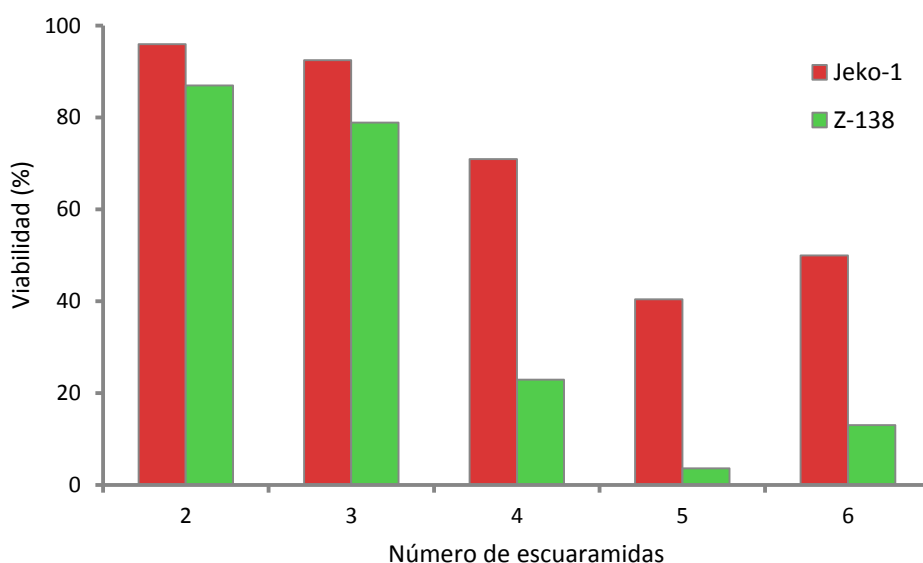


Figura 21 – Viabilidad observada para las oligoescuaramidas cíclicas C2-C6, a una concentración 10 μ M durante 48 horas en dos líneas celulares, Jeko-1 (rojo) y Z-138 (verde).

La actividad antitumoral máxima se observó para la oligoescuaramida C5, que posee un gran número de centros donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno. La “regla del 5”, originalmente propuesta por C. A. Lipinski,³⁹ no predice una buena absorción o permeabilidad para compuestos con un peso molecular mayor de 500 g/mol, y con un número no superior a cinco donadores o diez aceptores de enlace de hidrógeno. El macrociclo C6, con una masa molecular de 1339,63 g/mol y una elevada actividad antitumoral, presenta doce donadores y dieciocho grupos aceptores, unos valores muy superiores a los sugeridos por la regla de Lipinski. Además, a pH fisiológico, los grupos amino terciario se protonan convirtiendo la oligoescuaramida en una molécula catiónica, reduciendo su carácter hidrofóbico. Sin embargo, los macrociclos no suelen

³⁹ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J.; Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2001**, 46, 3-26.

ajustarse a estas reglas tan ampliamente establecidas para el diseño de nuevos fármacos, tal y como ocurre por ejemplo en el ciclopéptido natural ciclosporina.

Debido a su mayor actividad en estudios posteriores se utilizó siempre la oligoescuaramida C5.

En la tabla 2 se muestran los resultados de viabilidad obtenidos frente a un panel de líneas celulares diversas con el macrociclo C5 a una concentración 10 μ M durante el tiempo indicado.

Tabla 2 – Valores de viabilidad obtenidos después del tratamiento de las diferentes líneas celulares con la oligoescuaramida C5 a una concentración 10 μ M durante el tiempo indicado.

Línea celular		Viabilidad (%)
Glioblastoma (72 h)	U87MG	25
	U251	85
Linfoma T (72 h)	Hut	60
	Karpas-45	13
Linfoma B (48 h)	Jeko-1	46
	JVM-2	24
	Rec-1	44
	Granta-519	58

La actividad antitumoral de la oligoescuaramida C5 se evaluó adicionalmente frente al panel NCI-60. Este panel es un estándar desde 1992 y está formado por 60 líneas celulares tumorales humanas de diferentes tejidos que representan los tipos de cáncer con más incidencia en humanos. Los valores de IC₅₀ obtenidos con este panel se encuentran en el orden de magnitud de 10⁻⁶ M para todas las líneas celulares a excepción de nueve de ellas, para las cuales los valores fueron superiores a 10⁻⁵ M.

Dada la actividad antiproliferativa observada, se procedió a estudiar los efectos de la oligoescuaramida sobre la evolución del ciclo celular mediante la técnica de citometría de flujo. Se observó que para aquellas células tratadas con el macrociclo C5, su ciclo se veía arrestado en la fase G1, la cual corresponde a una fase de alta actividad enzimática donde se dan multitud de procesos de señalización celular y duplicación de los componentes del citoplasma (Fig. 22).

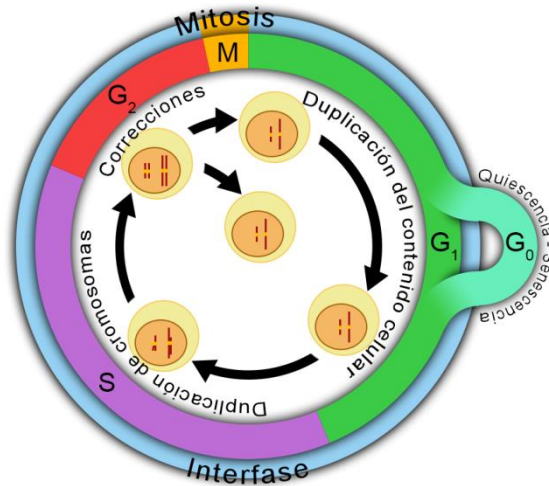


Figura 22 – Fases del ciclo de división celular en organismos eucariotas.

Estas señales de transducción en las células eucariotas se encuentran reguladas por un conjunto de proteínas llamadas cinasas.

2.3 Cinasas

Las cinasas son la familia más numerosa de proteínas de señalización celular. La función de éstas es la de catalizar la transferencia de grupos fosfato como el ATP a otras proteínas, proceso conocido como fosforilación, y hecho por el cual también son llamadas fosfotransferasas (Fig. 23).

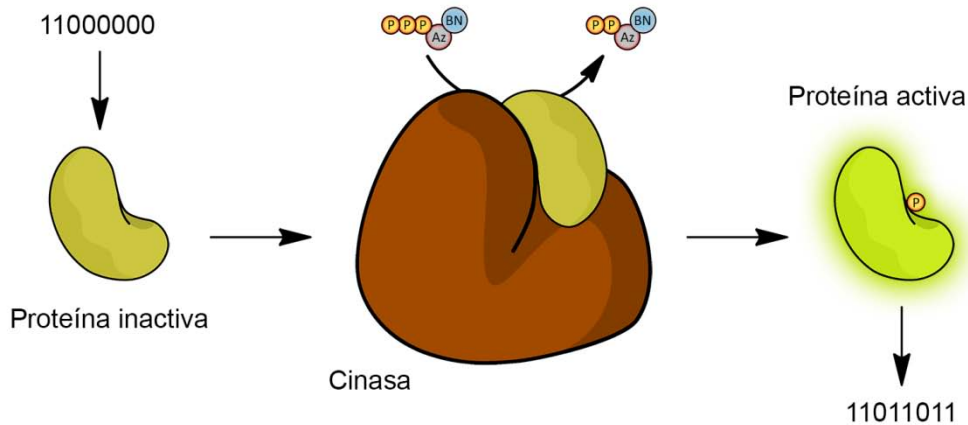
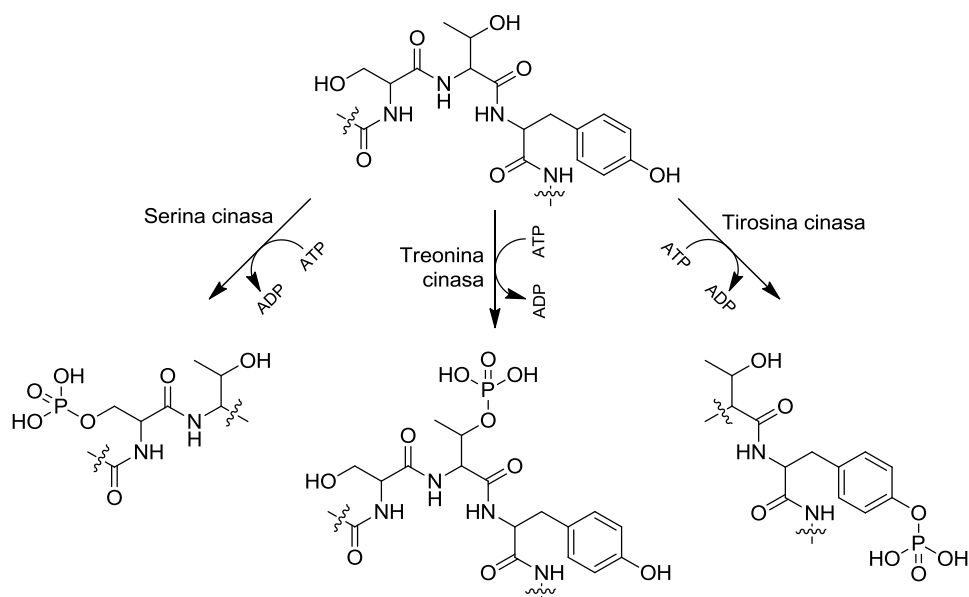


Figura 23 – Representación esquemática de la transducción de una señal binaria mediante activación de una proteína. Esta activación se produce mediante el proceso de fosforilación que consiste en la transferencia de un grupo fosfato, llevada a cabo por una cinasa.

Se han contabilizado más de 500 cinasas en el genoma humano y la gran mayoría son del tipo serina/treonina cinasas. Este tipo de cinasas fosforilan el grupo alcohol de los residuos de los aminoácidos serina o treonina respectivamente. Otro grupo principal de cinasas son las tirosina cinasas, que realizan la misma función sobre residuos de este aminoácido (Esquema 12).



Esquema 12 – Fosforilación de un residuo de serina (arriba), treonina (centro) o tirosina (abajo) mediante la acción de la cinasa correspondiente sobre un supuesto polipéptido conteniendo estos tres aminoácidos.

El centro activo de las cinasas presenta una secuencia de aminoácidos y una estructura proteínica muy conservada en todo el cinoma humano, siendo en la regulación de la actividad donde las cinasas se han diferenciado a lo largo de la evolución.⁴⁰ La regulación de la actividad tan específica que demuestran las cinasas se explica añadiendo al sistema cinasa-sustrato (ATP) las interacciones entre este complejo y otros ligandos secundarios que se unen al dominio de la cinasa. Estas interacciones provocan cambios conformacionales que modifican la especificidad de la cinasa, regulando de esta forma su actividad. Estos procesos se denominan procesos alostéricos (Fig. 24).

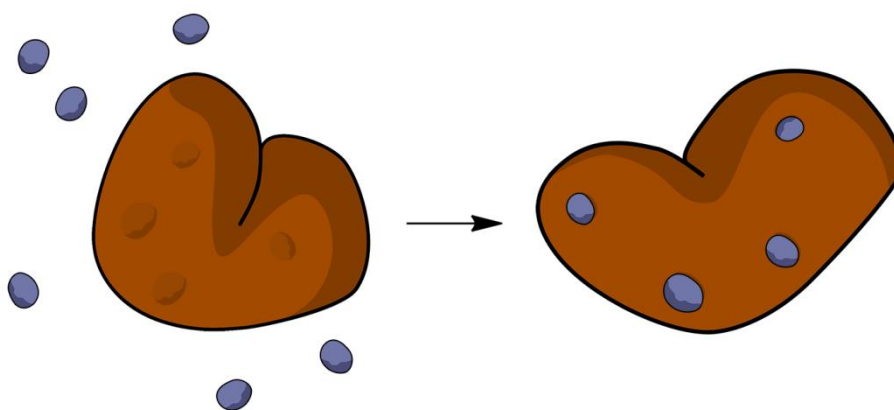


Figura 24 – Representación de los cambios conformacionales de una cinasa mediante los procesos alostéricos.

⁴⁰ Noble, M. E. M.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N.; Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure. *Science*, **2004**, 303, 1800-1805.

La desregulación de la actividad de las cinasas mediante mutaciones ha demostrado estar relacionada principalmente con desórdenes metabólicos y del desarrollo, además de ciertos tipos de cáncer.⁴¹

Mediante ensayos de inhibición enzimática se confirmó que una mayor actividad antiproliferativa representa una mayor inhibición *in vitro*. A partir de un ensayo de inhibición de un panel de 210 cinasas representativas del cinoma humano y el macrociclo C5, se pudo comprobar que esta oligoescuaramida cíclica reducía en más de un 80% la actividad enzimática de una veintena de las 210 cinasas evaluadas. Además se observó también la activación de determinadas cinasas. Adicionalmente, ensayos realizados con una selección de cinasas más reducida demostró que otros productos sin actividad celular no demostraron capacidad inhibitoria enzimática *in vitro* (Fig. 25).⁴²

Por último, con la intención de obtener más información acerca de la interacción entre la oligoescuaramida C5 y las cinasas, ya que todas ellas tienen un centro activo muy conservado, se realizó un estudio competitivo con ATP. De este modo, la proteína tirosina cinasa ABL1 se trató con una concentración fija del macrociclo a cuatro concentraciones diferentes de ATP, obteniendo valores similares de IC₅₀ enzimáticas en todos los casos. De esta forma queda demostrado que la oligoescuaramida C5 no se comporta como un antagonista de ATP para esta enzima.

⁴¹ Lahiry, P.; Torkamani, A.; Schork, N. J.; Hegele, R. A.; Kinase mutations in human disease: interpreting genotype-phenotype relationships. *Nat. Rev. Genet.*, **2010**, 11, 60-74.

⁴² Costa, A.; Rotger, M. C.; Fernández, S.; Villalonga, P.; Use of cycloquaramide compounds as antitumour agents. WO 2010/066933 A1.

THE Human Kinome

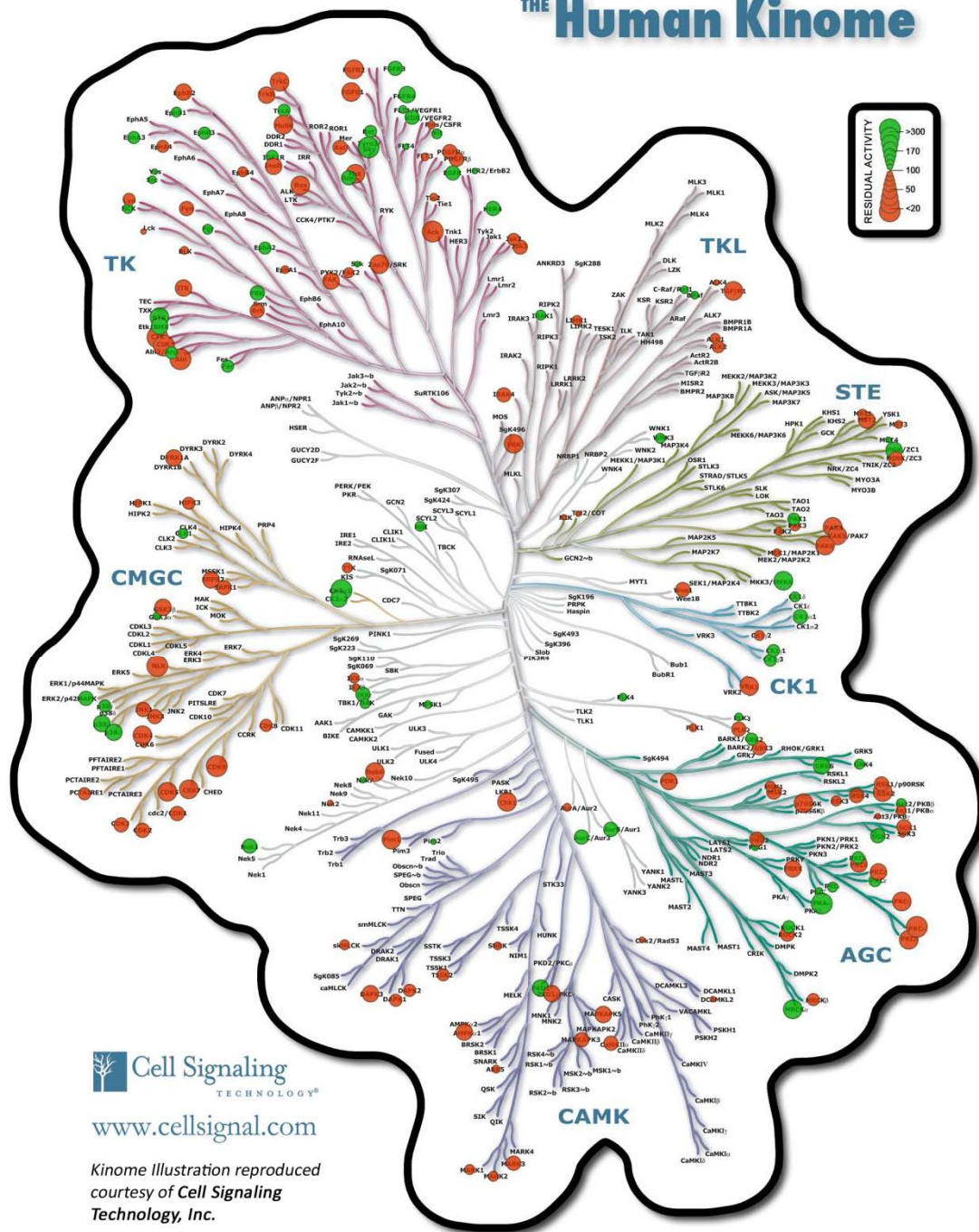


Figura 25 – Mapa del cinoma humano donde se ha indicado la actividad, inhibidora (rojo) o activadora (verde), de la oligoescuramida C5 sobre las cinasas analizadas. El tamaño de los círculos representa la intensidad de la inhibición/activación.

Debido a que la regulación anormal de cinasas y fosfatasas parece contribuir directamente al desarrollo de un gran número de tipos de cáncer, existe un gran interés en la búsqueda de inhibidores selectivos de cinasas con la finalidad de bloquear el ciclo celular, evitando de esta forma la proliferación descontrolada. Otra alternativa al bloqueo del ciclo celular es la inhibición de los puntos de control del ciclo, llamados “checkpoints”, evitando de esta forma la reparación del daño en el ADN provocado por los antitumorales clásicos. La combinación de agentes antitumorales clásicos con estos nuevos inhibidores selectivos de cinasas permitiría reducir la dosis de citotóxicos sin perder eficacia en el tratamiento y reduciendo de esta forma los efectos secundarios.

El ejemplo más representativo de este tipo de inhibidores de cinasas es el Imatinib (Fig. 26), un medicamento comercializado con el nombre de Glivec® por la farmacéutica Novartis. Fue el primero de los fármacos contra el cáncer en utilizar la inhibición selectiva de cinasas. Se sabe que en la leucemia mielógena crónica, la cinasa ABL se bloquea en su forma activa, provocando la multiplicación masiva de las células. El Imatinib es un inhibidor específico de determinadas tirosina cinasas. Su interacción con la enzima se produce en un lugar cercano al centro activo del ATP, provocando un cambio conformacional en la enzima que queda bloqueada en su conformación inactiva, siendo por tanto una inhibición semicompetitiva.⁴³

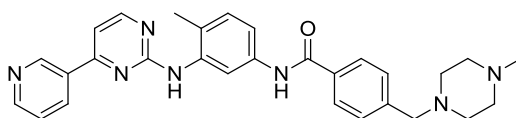


Figura 26 – Estructura del inhibidor selectivo de tirosina cinasas Imatinib (Glivec®).

Los macrociclos C5 y C6 han demostrado tener una interesante actividad antitumoral frente a diferentes líneas celulares, mostrando cierta selectividad. Además, la actividad obtenida con cultivos celulares y posteriormente en los ensayos de inhibición de cinasas es del mismo orden de magnitud, demostrando la buena penetrabilidad de estos compuestos.

⁴³ Takimoto, C. H.; Calvo, E.; Principles of oncologic pharmacotherapy. *Oncology J.*, 2005.

2.4 Objetivos

Una vez establecido que los compuestos oligoescuaramídicos cíclicos con cinco unidades escuaramida, C5, y seis unidades escuaramida, C6, presentan actividad antitumoral moderada e inhibitoria de cinasas, el objetivo de este capítulo es la de realizar modificaciones estructurales en las oligoescuaramidas cíclicas, intentando conseguir una mayor actividad antitumoral. De esta forma, los objetivos de este capítulo son los de:

- Sintetizar nuevos derivados oligoescuaramídicos cíclicos introduciendo modificaciones estructurales.
- Evaluar si las modificaciones estructurales introducidas afectan la reacción de macrociclación.
- Evaluar si estas modificaciones alteran la actividad antitumoral mediante la obtención y posterior comparación de los valores de IC_{50} celulares.
- Establecer una relación estructura-actividad que permita optimizar las estructuras macrocíclicas.

2.5 Resultados y discusión

Dada la actividad antitumoral descrita para las oligoescuaramidas cíclicas C_n, se han realizado modificaciones estructurales sobre su estructura aprovechando la síntesis modular desarrollada anteriormente en el grupo de Química Supramolecular. Estas modificaciones permitirán establecer una relación entre estructura y actividad además de permitir evaluar qué consecuencias tendrán sobre la capacidad de plegamiento y macrociclación de las oligoescuaramidas.

2.5.1 Modificaciones estructurales

Las modificaciones que se pueden realizar sobre la estructura macrocíclica son numerosas, cambiando su polaridad, tamaño, hidrofobicidad, etc. En este trabajo se ha optado por modificar tan solo uno de los espaciadores alifáticos que unen las unidades escuaramida, permitiendo de esta forma mantener la metodología sintética establecida, las propiedades de preorganización de los oligómeros escuaramídicos y esperando mantener también la actividad antitumoral (Fig. 27).

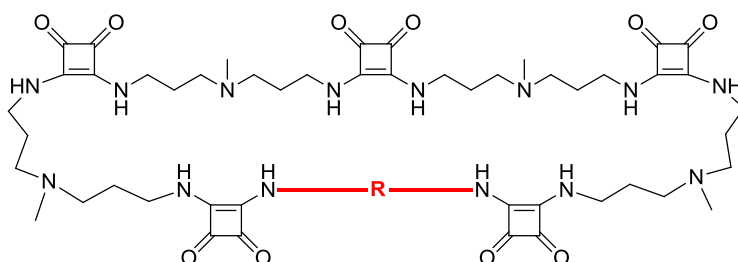


Figura 27 – Representación de la oligoescuaramida C5 donde se ha señalado el espaciador sobre el cual se han realizado las modificaciones, manteniendo el resto de la estructura invariable.

Las modificaciones planteadas se pueden clasificar en función del tipo de sustitución realizada:

- Se ha observado en los estudios realizados con las oligoescuaramidas, que son los antecedentes directos de este trabajo, que la actividad antitumoral e inhibitoria de cinasas es mucho más acusada para los macrociclos C5 y C6, es decir, para los que poseen estructuras de mayor tamaño. Ante este resultado se plantea la síntesis de un macrociclo mayor, con siete unidades escuaramida, pudiendo comprobar de esta forma si se mantiene la relación entre la actividad antitumoral y el tamaño del macrociclo (Fig. 28).

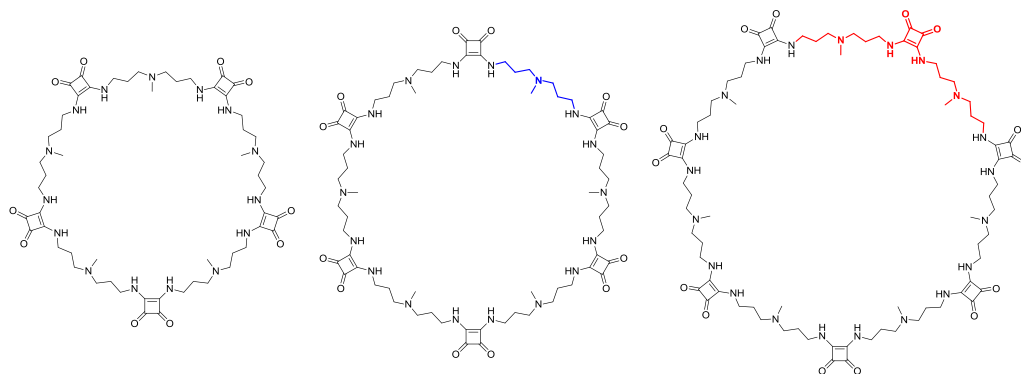


Figura 28 – Aumento del tamaño relativo en las estructuras oligoescuaramídicas cíclicas al añadir una unidad escuaramida mediante el uso de los espaciadores habituales.

- Sustitución del grupo metilo enlazado al nitrógeno terciario de la cadena alifática por un sustituyente más voluminoso. Se han elegido dos casos, la introducción de un grupo bencilo o del aminoácido leucina. Este tipo de modificación no elimina la capacidad donadora del enlace de hidrógeno del espaciador por lo que no cabría esperar una disminución en el grado de preorganización y por tanto en el proceso de macrociclación. Sin embargo introduce dos nuevos grupos funcionales que modifican especialmente las interacciones con otras moléculas o proteínas mediante la introducción de grupos funcionales diferentes. (Fig. 29).

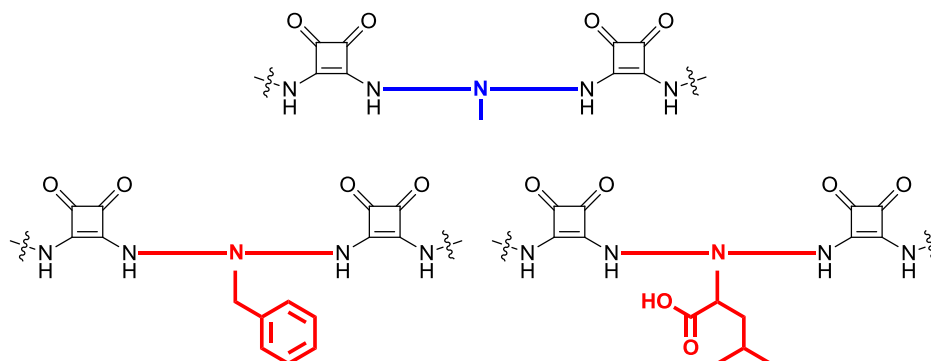


Figura 29 – Estructuras del módulo espaciador original (arriba) y de los nuevos grupos funcionales introducidos sobre el nitrógeno central del espaciador.

- Alterar la estructura de la cadena espaciadora mediante la modificación de los grupos donadores o aceptores de enlace de hidrógeno. Concretamente, eliminar un átomo de nitrógeno terciario de la cadena alifática, con capacidad donadora de enlace de hidrógeno, y sustituirlo por un grupo metileno CH_2 . Con esta modificación se elimina la posibilidad de establecer una interacción de enlace de hidrógeno a lo largo de todo el espaciador, pudiendo afectar a la reacción de macrociclación. Por otra parte, la introducción de un aminoácido en la secuencia del espaciador, la metionina, añade un grupo amida al espaciador alifático, además de la cadena lateral del propio aminoácido, aumentando el número de interacciones de enlace de hidrógeno que se pueden establecer con el espaciador. Este aminoácido incrementa el grado de

mimetismo del macrociclo respecto a los ciclopéptidos naturales, pudiendo incrementar de esta manera su biocompatibilidad (Fig. 30).

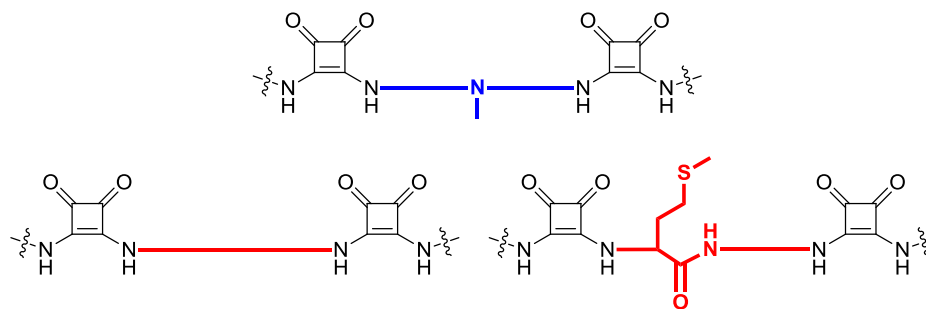


Figura 30 – Estructuras del módulo espaciador original (arriba) y de las nuevas estructuras del espaciador mediante la eliminación o adición de donadores/aceptores de enlace de hidrógeno.

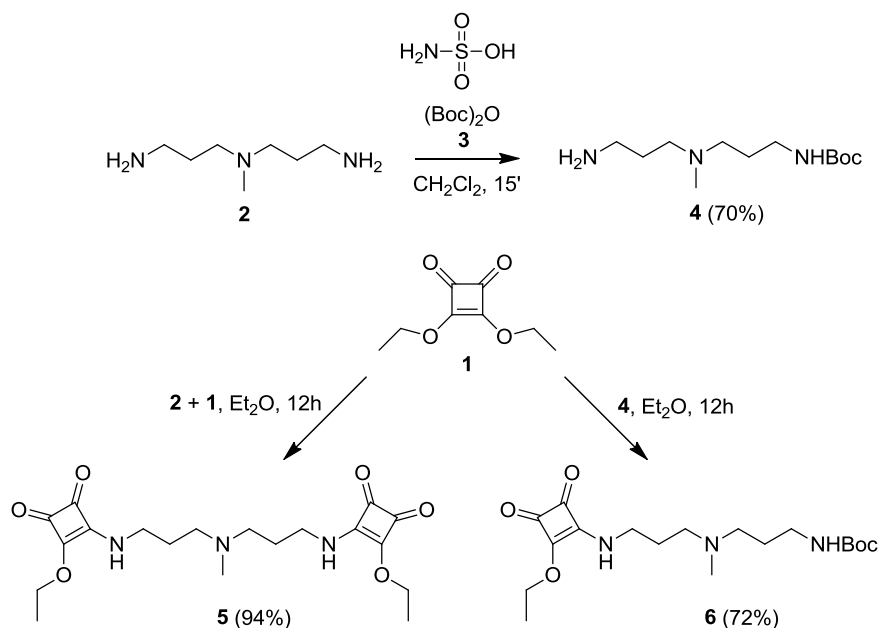
El doble objetivo de evaluar la actividad biológica de los nuevos macrociclos diseñados y su potencial uso como fármacos implica que estos compuestos se deben obtener en buenos rendimientos.

2.5.2 Metodología general para la síntesis de oligoescuaramidas cíclicas

Tal y como se ha descrito en la introducción del capítulo, la obtención de la oligoescuaramidas cíclicas se realiza mediante una metodología de síntesis por pasos, combinando diferentes módulos estructurales, y siguiendo una estrategia de protección/desprotección de los grupos funcionales amino.

Esta metodología general es ideal para introducir las modificaciones estructurales objetivo de este capítulo, ya que tan solo es necesario preparar nuevos módulos, con una reactividad equivalente a la de los originales y con los nuevos grupos funcionales a introducir, e incorporarlos en la ruta sintética en el momento oportuno.

Los módulos utilizados en la metodología original, y que se muestran a continuación, se obtienen a partir de productos comerciales, con pocos pasos sintéticos y en una escala multigramo (Esquema 13).



Esquema 13 – Síntesis de los módulos sintéticos originales para la obtención de las oligoescuaramidas cíclicas.

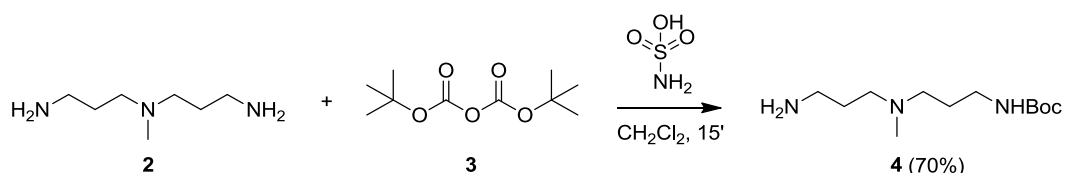
La preparación de los módulos de partida se realiza, de forma general, por condensación de diaminas con escuarato de dietilo. Para controlar la reactividad de las diaminas, éstas se utilizan monoprotegidas cuando es necesario, evitando que reaccionen por los dos extremos al mismo tiempo. En cuanto a la reactividad del escuarato de dietilo, ésta se puede modular en función de la polaridad del disolvente controlando que se produzcan una o dos condensaciones con la amina. En el caso de usar disolventes polares como el EtOH se obtiene una doble condensación. Sin embargo, al utilizar disolventes menos polares como el Et₂O, se permite la primera entrada sobre el escuarato de dietilo pero se ralentiza la velocidad de la segunda. Además la baja solubilidad de la escuaramida-éster resultante en Et₂O favorece su precipitación, dificultando aún más la segunda reacción. Esta estrategia permite obtener productos asimétricamente sustituidos con elevados rendimientos.

Los módulos utilizados corresponden a una unidad central, que bien puede ser el compuesto **1**, **2**, o **5**, a partir de la cual se incrementa la longitud de la cadena oligomérica mediante el módulo de crecimiento **6**.

Los oligómeros deben presentar en sus extremos terminales dos grupos amino protegidos con Boc. Por este motivo, el uso de los módulos centrales **1** o **5** implica que en primer lugar deben reaccionar con la diamina monoprotegida **4**.

2.5.2.1 Protección de grupos amino

El grupo protector Boc se utiliza tradicionalmente en la síntesis peptídica al permitir el uso de otros grupos protectores ortogonales. Se puede eliminar fácilmente en medio ácido liberando el grupo amino, unas condiciones que no interfieren con la estabilidad del resto de grupos funcionales con los que se trabaja. La monoprotección de diaminas con el grupo Boc se puede obtener mediante la reacción de éstas con Boc-ON (2-([tert-butoxicarbonil]-oxiimino)-2-fenilacetonitrilo) en dioxano durante 12 horas a temperatura ambiente y 3 horas más a 90 °C, obteniendo un rendimiento del 74%. Otra alternativa para la protección de estos grupos amino es mediante la adaptación del procedimiento descrito por G. Cravotto y colaboradores,⁴⁴ usando el anhídrido del grupo protector Boc **3** y ácido sulfámico como catalizador, en CH₂Cl₂ a 0 °C y en tan solo 15 minutos de tiempo de reacción, obteniendo un rendimiento similar al caso anterior (Esquema 14). Ambas alternativas requieren del uso de cinco equivalentes de la amina con la intención de reducir la probabilidad de una doble protección de los grupos amino.

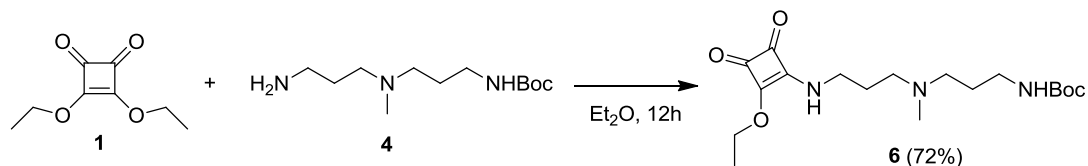


Esquema 14 – Procedimiento sintético para la monoprotección con el grupo Boc de la diamina **2** mediante catálisis con ácido sulfámico.

Esta metodología se ha aplicado a la protección con el grupo tert-butoxicarbonil de los grupos amino que se describen en este trabajo.

2.5.2.2 Síntesis del módulo de crecimiento **6**

La unidad de crecimiento básica, la escuaramida-éster **6**, se obtiene por reacción entre un equivalente de escurato de dietilo con un equivalente de la diamina 3,3'-diamino-N-metildipropilamina monoprotegida por el grupo tert-butoxi carbonil (Boc) **4** en Et₂O, aislando el producto con un 95% de rendimiento (Esquema 15).



Esquema 15 – Síntesis del módulo de crecimiento **6** a partir del escurato de dietilo **1** y la diamina monoprotegida **4**.

⁴⁴ Upadhyaya, D. J.; Barge, A.; Stefania, R.; Cravotto, G.; Efficient, solventless N-Boc protection of amines carried out at room temperature using sulfamic acid as recyclable catalyst. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, 48, 8318-8322.

2.5.2.3 Síntesis del módulo central **5**

Se denomina módulo central a la unidad estructural a partir de la cual se hace crecer la cadena oligomérica de forma simétrica. En la metodología utilizada se utilizan hasta tres módulos centrales diferentes, el primero de ellos corresponde al escuarato de dietilo **1**, el segundo a la diamina **2** y el tercero al doble semiéster **5** (Fig. 31).

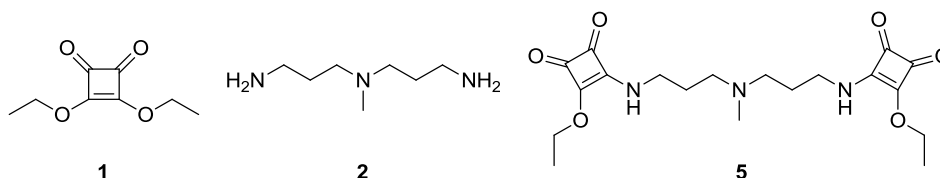
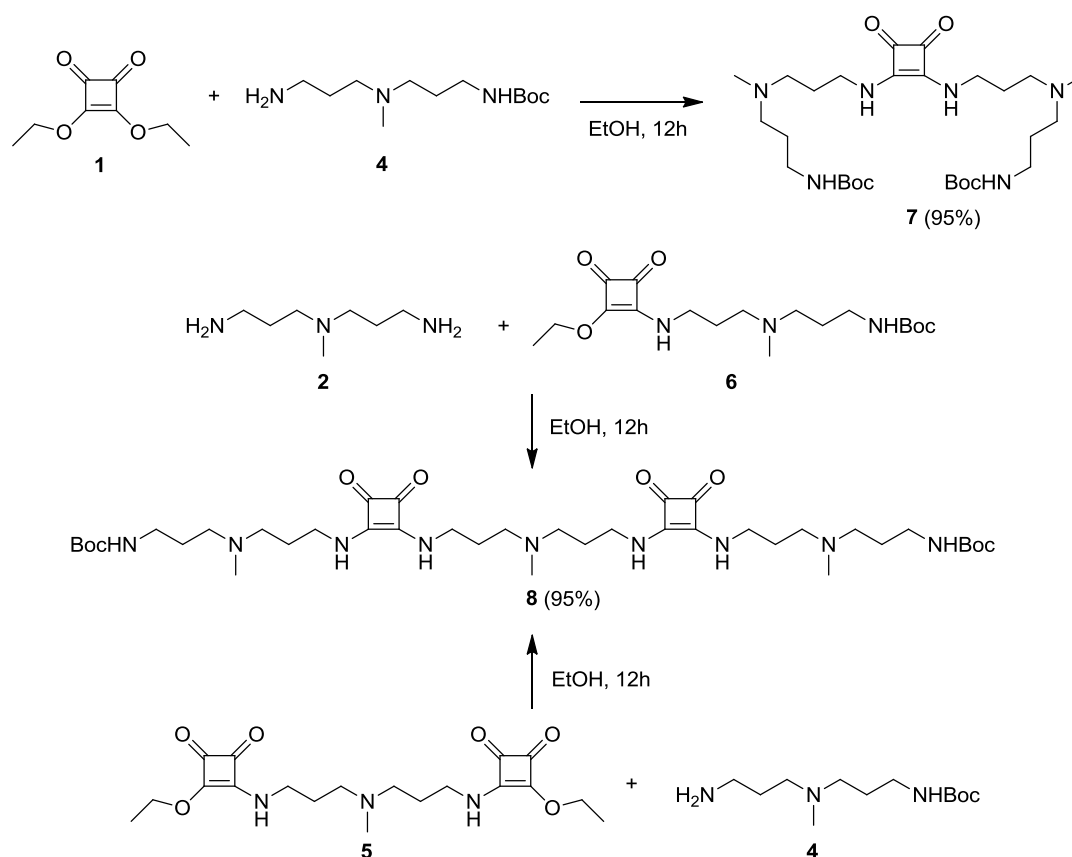


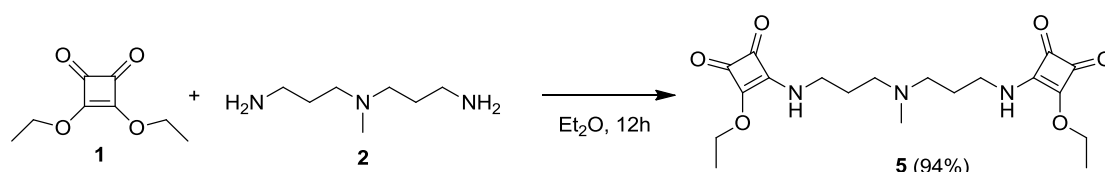
Figura 31 – Estructuras de los módulos centrales para la obtención de los oligómeros.

En el caso de comenzar la síntesis con escuarato de dietilo **1** se debe realizar una condensación con dos equivalentes de la diamina monoprotectada **4**, obteniendo de esta forma el oligómero con una unidad escuaramida **7**. En el caso de comenzar por una diamina como es el caso de **2**, por ejemplo, la conjugación con dos equivalentes del módulo de crecimiento **6** da lugar al oligómero **8**, con dos unidades escuaramida, el mismo producto que se obtiene en el caso de realizar una doble conjugación entre el módulo **5** y dos equivalentes de la diamina monoprotectada **4** (Esquema 16).



Esquema 16 – Síntesis de los primeros oligómeros, **7** y **8**, con una y dos unidades escuaramida, a partir de los diferentes módulos centrales propuestos en la figura anterior.

Para la obtención de este módulo inicial **5** se utilizan dos equivalentes de escuarato de dietilo **1** por cada mol de la diamina 3,3'-diamino-N-metildipropilamina **2** en Et₂O, obteniendo el producto **5** con un 94% de rendimiento (Esquema 17).

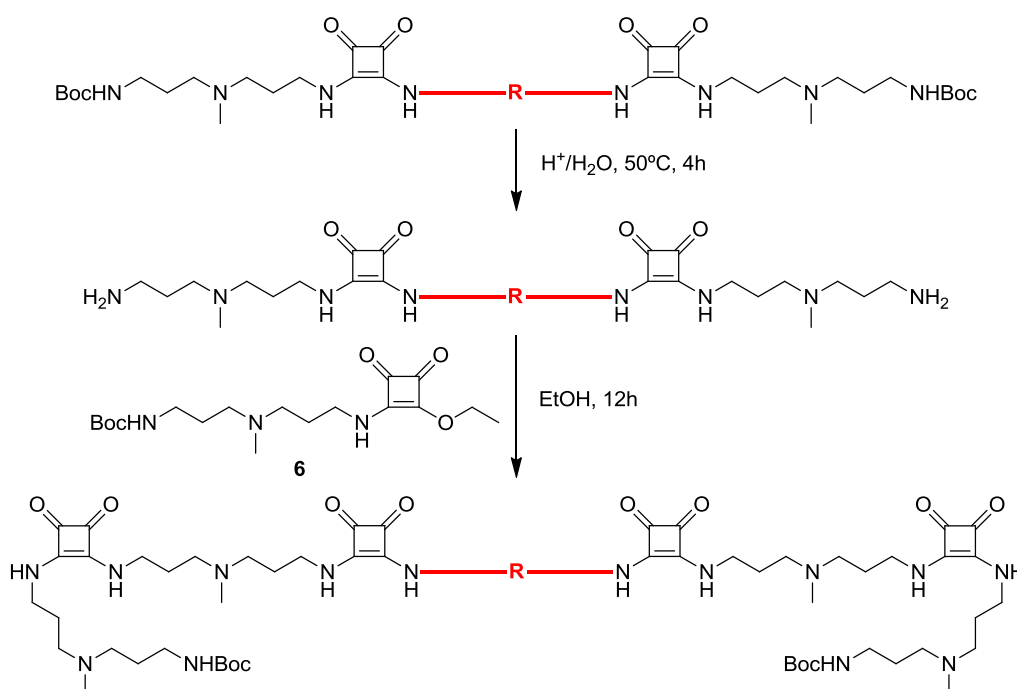


Esquema 17 – Síntesis del módulo central con dos unidades escuaramida **5** a partir del escuarato de dietilo **1** y la diamina **2**.

La elección del módulo inicial determina si el número de escuaramidas de los oligómeros lineales será par o impar ya que cada elongación incrementa en dos el número de unidades escuaramida.

2.5.2.4 Elongación de oligómeros

De forma general, la obtención de los oligómeros se realiza mediante la desprotección cuantitativa de los grupos amino terminales tratándolos con H₂O/HCl a 50 °C durante un mínimo de 4 horas. A continuación se realiza la condensación entre estos oligómeros desprotegidos y dos equivalentes del módulo de crecimiento **6**, en medio EtOH, obteniendo oligómeros con dos unidades escuaramida más que los oligómeros de partida (Esquema 18).

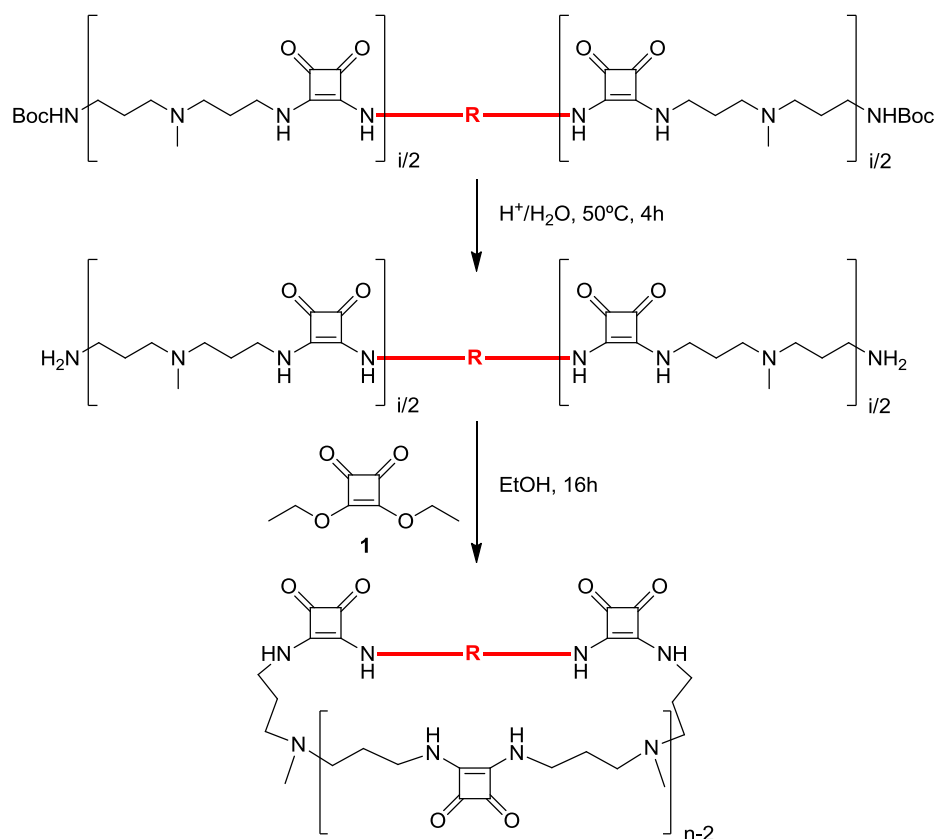


Esquema 18 – Procedimiento general para la elongación de los oligómeros independiente del número de escuaramidas.

2.5.2.5 Macro ciclación

En todos los casos, la última etapa para la obtención de oligoescuaramidas cíclicas es la reacción de macro ciclación a partir del oligómero lineal preorganizado. Como se ha indicado en la introducción de este capítulo, la preorganización inducida por la formación de una serie de enlaces intramoleculares deja los dos grupos amino de los extremos de la molécula en una disposición adecuada para que, una vez desprotegidos, reaccionen con la misma unidad de escuarato de dietilo cerrando la estructura. Así por ejemplo, para la obtención de los macrociclos con cinco unidades escuaramida, se prepara en primer lugar un oligómero lineal con cuatro unidades escuaramida. A partir de éste, una vez desprotegidos los grupos amino, se hace reaccionar con un equivalente de escuarato de dietilo en EtOH para obtener el macrociclo con cinco unidades escuaramida (Esquema 19). Para la obtención de macrociclos con tres o siete unidades escuaramida se sigue el mismo procedimiento.

Siguiendo un razonamiento análogo al anterior, la síntesis de macrociclos con número par de unidades escuaramida debe comenzar por un módulo central con una unidad escuaramida.



Esquema 19 – Procedimiento de síntesis general para la macro ciclación de los oligómeros con “ i ” unidades escuaramida, obteniendo macrociclos con un número impar de escuaramidas correspondiente a $n = i + 1$.

Las oligoescuaramidas cíclicas son insolubles en la mayoría de disolventes orgánicos, especialmente en disolventes apolares, pero son solubles en medios acuosos ligeramente ácidos. Esto es debido a que los nitrógenos terciarios de las cadenas alifáticas tienen un pK_a que oscila entre valores de 6 y 9, por tanto, en función del pH del medio, los centros nitrogenados se encuentran protonados formando un polication amonio soluble en medios acuosos. La diferente solubilidad en función del pH se ha aprovechado para la purificación de las oligoescuaramidas. El método general de purificación consiste en una primera etapa donde el crudo de la reacción de macrociclación se suspende con un disolvente orgánico como el Et_2O , eliminando de esta forma trazas de escurato de etilo o de oligómero sin reaccionar. Seguidamente, el residuo sólido se disuelve en la mínima cantidad de agua a pH 2 y se filtra, eliminando los productos que no son solubles en medio ácido. Por último, la disolución se basifica lentamente hasta pH 9-10 con una disolución de NaOH 1M. El macrociclo precipita en estas condiciones aislándose por filtración.

Siguiendo la metodología general descrita para la obtención de las oligoescuaramidas cíclicas, se ha procedido a la síntesis de un nuevo macrociclo, de mayor tamaño, sirviendo éste de ejemplo concreto de la aplicación de las reacciones de elongación y macrociclación descritas.

2.5.2.6 Síntesis de la oligoescuaramida cíclica C7 **18**

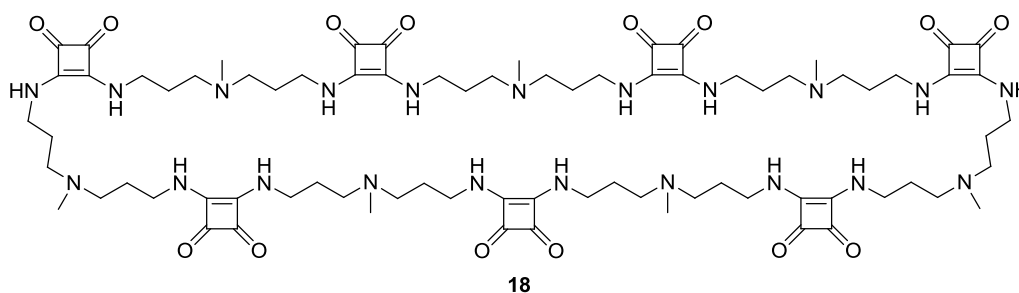
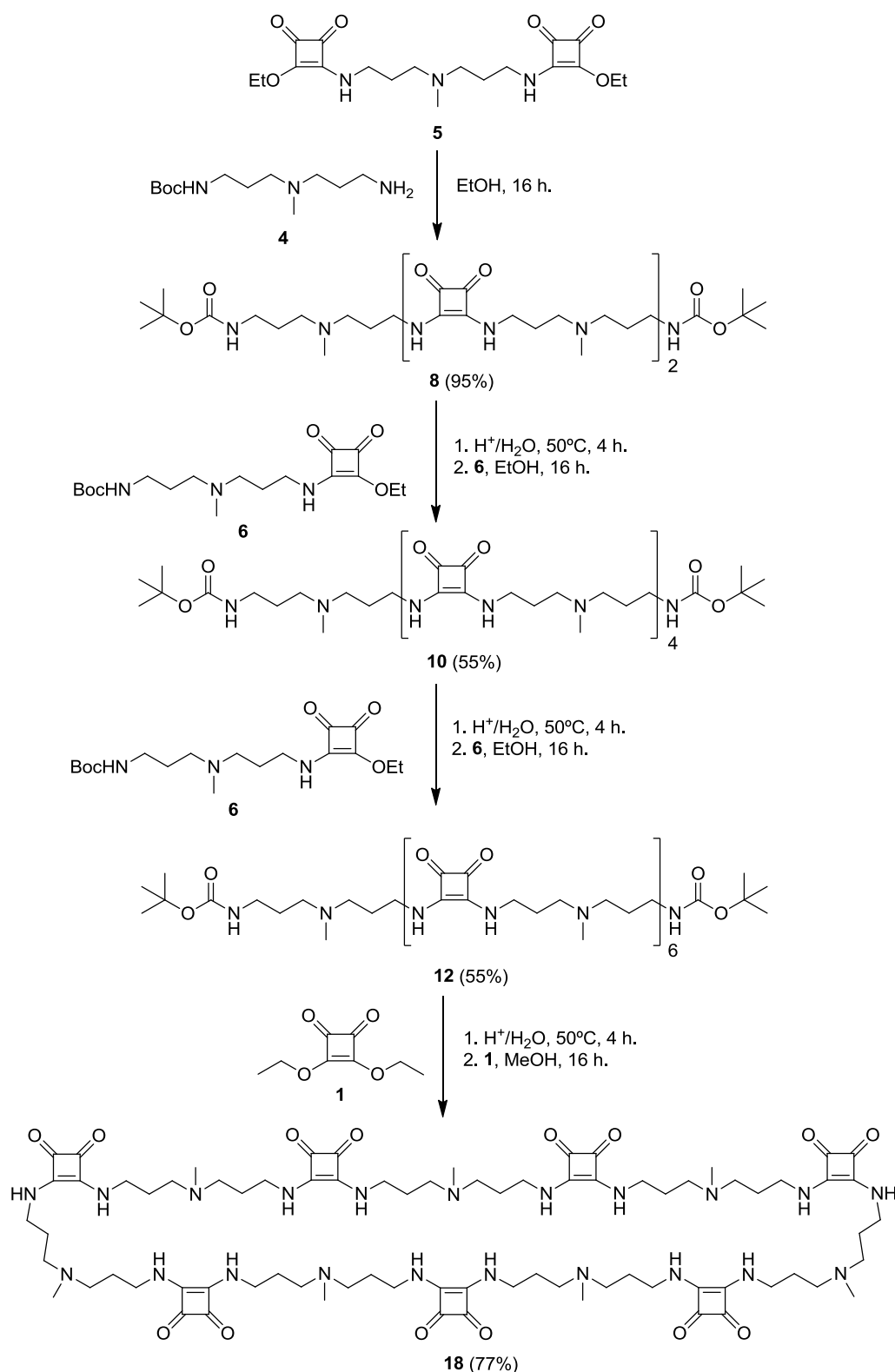


Figura 32 – Estructura de la oligoescuaramida C7 **18**.

El esquema que sigue a continuación describe la síntesis completa del macrociclo **18**, denominado C7 por contener siete unidades escuaramida. Éste se ha sintetizado utilizando la metodología descrita previamente a partir del oligómero que contiene seis unidades escuaramida **12** y llevando a cabo la reacción de macrociclación con escurato de dietilo **1**. De esta manera se incorpora a la estructura la séptima unidad escuaramida. Para obtenerlo se han utilizado únicamente los módulos descritos hasta el momento ya que no se introduce ningún grupo funcional diferente (Esquema 20).



Esquema 20 – Síntesis del macrociclo C7 **18** partiendo del módulo central **5**, utilizando el módulo de crecimiento **6** y realizando la reacción de macrociclación con escuarato de dietilo **1**.

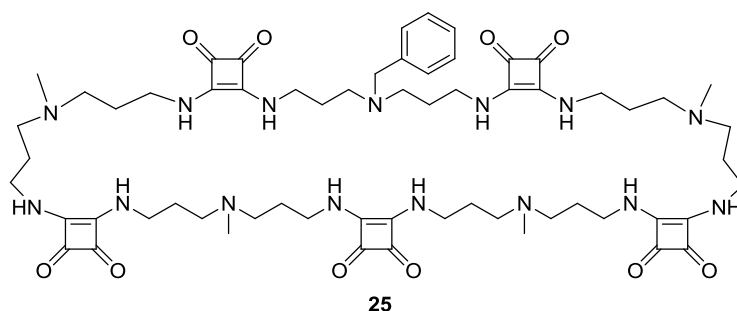
El primer paso consiste en la incorporación de una cadena espaciadora en cada extremo del módulo central **5** para la obtención de un oligómero con número par de escuaramidas. Para esta reacción se ha utilizado la diamina monoprotendida **4**,

aislándose el oligómero **8** que contiene dos unidades escuaramida y tres cadenas espaciadoras en su estructura. Esta molécula presenta dos grupos amino protegidos en los extremos de la molécula. La reacción de desprotección transcurre con rendimientos casi cuantitativos cuando se utiliza una mezcla EtOH:H₂O como disolvente y once equivalentes de HCl. La diamina obtenida puede reaccionar con dos equivalentes del módulo de crecimiento **6**, en EtOH. De esta forma se aísla el oligómero formado por cuatro unidades escuaramida **10** que también tiene los dos grupos amino terminales Boc-protectados. La repetición de los dos últimos pasos sintéticos permite aislar el oligómero formado por seis unidades escuaramida **12**.

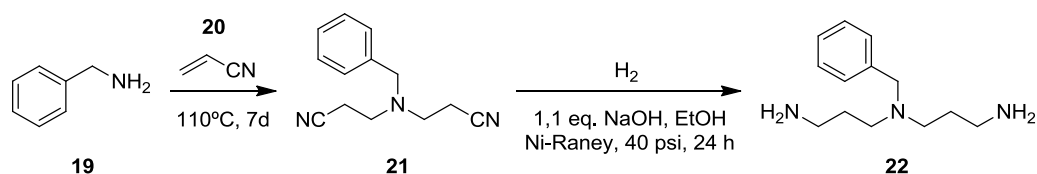
Para obtener el macrociclo con siete unidades escuaramida se ha seguido el procedimiento de macrociclación habitual, ligeramente modificado para la obtención de los macrociclos más grandes. En estos casos la macrociclación se realiza en MeOH en lugar de EtOH. Este cambio de disolvente se debe a dos motivos. En primer lugar por la mayor solubilidad que presentan estos oligómeros de mayor tamaño en dicho disolvente, y en segundo lugar por el intercambio que se produce con el escuarato de etilo, obteniendo derivados metil-éster, más reactivos. Además, como paso previo, el oligómero desprotegido **12** debe mantenerse bajo agitación con el medio y en caliente con el fin de facilitar su disolución. Una vez enfriado el conjunto a temperatura ambiente, se adiciona el escuarato de dietilo **1**. De esta forma el macrociclo C7 **18** se obtiene con un rendimiento del 77%.

2.5.3 Síntesis de oligoescuaramidas cíclicas con el sustituyente del nitrógeno terciario modificado

Dada la orientación de los macrociclos escuaramídicos como moléculas bioactivas se consideró necesario estudiar cómo afectaba a sus propiedades biológicas y a la síntesis la introducción de grupos laterales. Puesto que el macrociclo C5 **16** se ha utilizado como referencia en la mayoría de pruebas biológicas realizadas previamente, resulta interesante comparar la actividad de los nuevos macrociclos con la del macrociclo C5. Para ello la estrategia que se ha seguido ha sido la de introducir nuevos sustituyentes en el nitrógeno de una de las cadenas espaciadoras, preparando nuevas diaminas que contienen los sustituyentes elegidos y la misma longitud que la 3,3'-diamino-N-metildipropilamina utilizada como espaciador.

2.5.3.1 Síntesis de la oligoescuaramida cíclica C5(N-Bencilo) **25**Figura 33 – Estructura de la oligoescuaramida C5(N-Bencilo) **25**.

En primer lugar es necesario preparar la diamina que contiene en el nitrógeno terciario un grupo bencilo. Esta amina, la 3,3'-diamino-N-benzildipropilamina **22** se ha obtenido siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía.⁴⁵ De forma resumida, el nuevo espaciador se obtiene a partir de la reacción de la bencilamina **19** con dos equivalentes de acrilonitrilo **20** y posterior hidrogenación del dinitrilo **21** utilizando Ni-Raney como catalizador (Esquema 21).

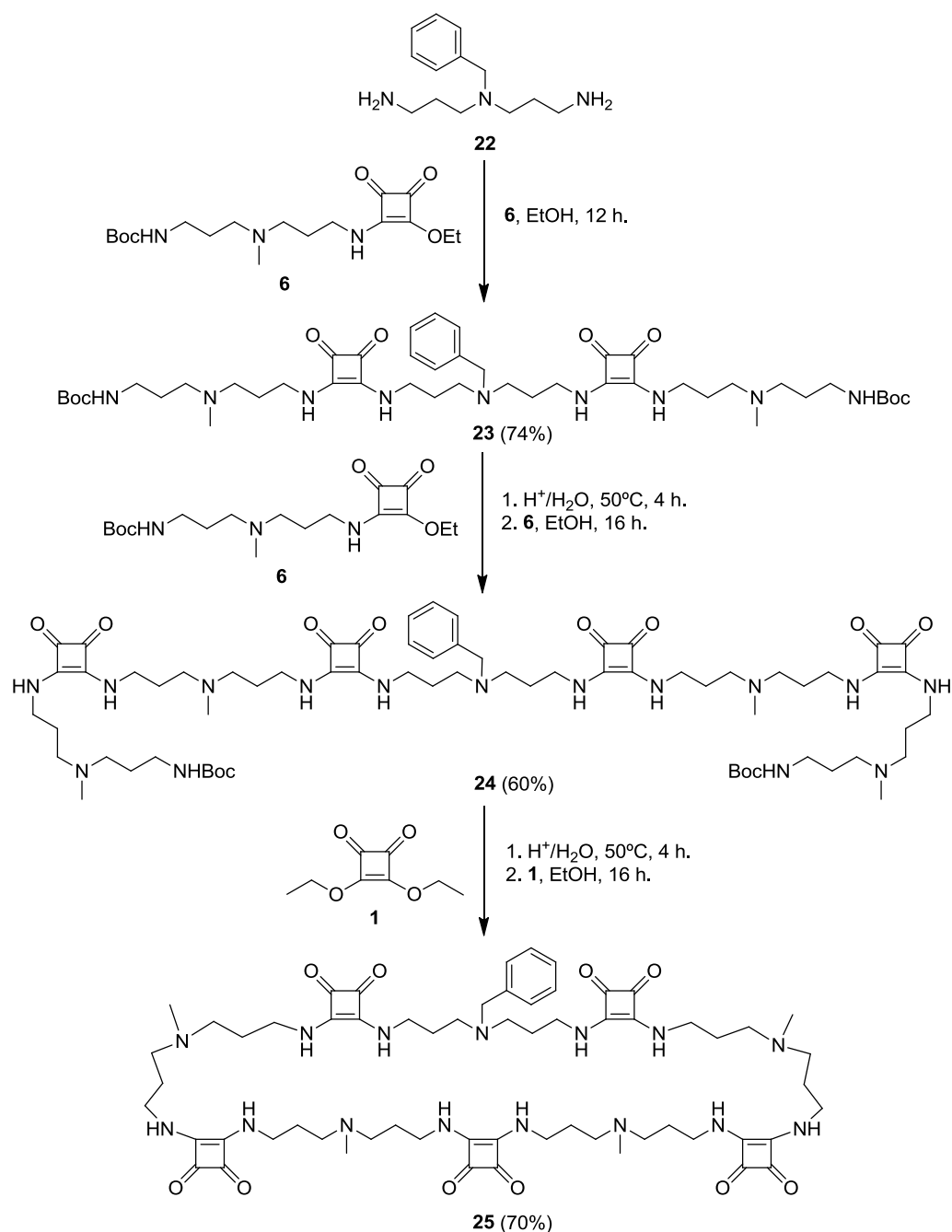


Esquema 21 – Síntesis de la diamina espaciadora conteniendo el grupo bencilo.

El oligómero **23**, con dos unidades escuaramida, se ha preparado a partir de la diamina **22** con dos equivalentes del módulo de crecimiento **6** en EtOH. A partir de este punto se ha seguido el procedimiento habitual para la elongación de los oligómeros. Es decir, desprotección de **23** y condensación con el módulo de crecimiento **6** para dar el oligómero **24**. En este caso el oligómero desprotegido **24** es insoluble y la condensación con escuarato de dietilo se realiza en DMSO-MeOH durante 72 horas para obtener el macrociclo C5(N-bencilo) **25** con un rendimiento del 70% (Esquema 22).

⁴⁵ Bergeron, R. J.; Garlich, J. R.; Amines and Polyamines from Nitriles. *Synthesis*, **1984**, 9, 782-784.

2. Diseño, síntesis y evaluación biológica de oligoescuaramidas cíclicas



Esquema 22 – Síntesis del macrociclo C5(N-bencilo) **25** partiendo de la amina debidamente funcionalizada **22**, y utilizando el módulo de crecimiento **6**.

El resultado práctico a nivel de síntesis indica que la presencia del grupo bencilo no afecta significativamente ni a la obtención de los oligómeros ni a la etapa de macrociclación. Esta última etapa es la más sensible ya que requiere un alto grado de preorganización de la estructura lineal impidiendo de esta manera la formación competitiva de polímeros lineales que conlleva una reducción en el rendimiento del macrociclo.

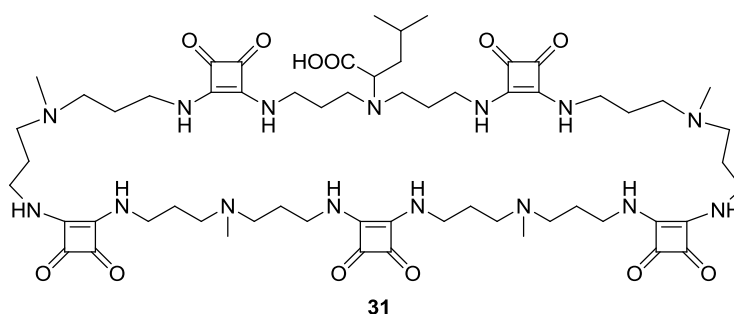
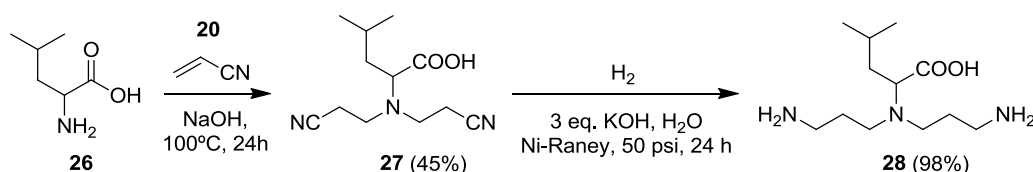
2.5.3.2 Síntesis de la oligoesquaramida cíclica C5(N-Leucina) **31**

Figura 34 – Estructura de la oligoesquaramida C5(N-Leucina) **31**.

La leucina es un aminoácido con una cadena de iso-butilo. Se ha decidido utilizar su grupo amino como punto de enlace para introducirlo en la estructura en lugar del nitrógeno terciario de la posición gamma de la cadena alifática, intercambiando uno de los grupos metilo presentes en los espaciadores habituales por el iso-butilo y el carboxilato del aminoácido. Esta modificación es significativa, ya que introduce en la estructura del macrociclo un grupo carboxilo que además de ser ionizable con la consiguiente posible modificación de la penetrabilidad celular, ofrece un centro de reacción útil para posteriores modificaciones y/o para la conjugación con otras moléculas.

Para la síntesis del nuevo macrociclo es necesario, al igual que en el caso anterior, preparar la correspondiente diamina **28**, siguiendo para ello el procedimiento descrito en la bibliografía,⁴⁶ y que es análogo al realizado para obtener la 3,3'-diamino-N-benzildipropilamina **22** descrita en el apartado anterior. La reacción con acrilonitrilo de la leucina **26** y la posterior reducción del producto de reacción **27** resulta en la diamina **28** con un 45% de rendimiento global (Esquema 23).

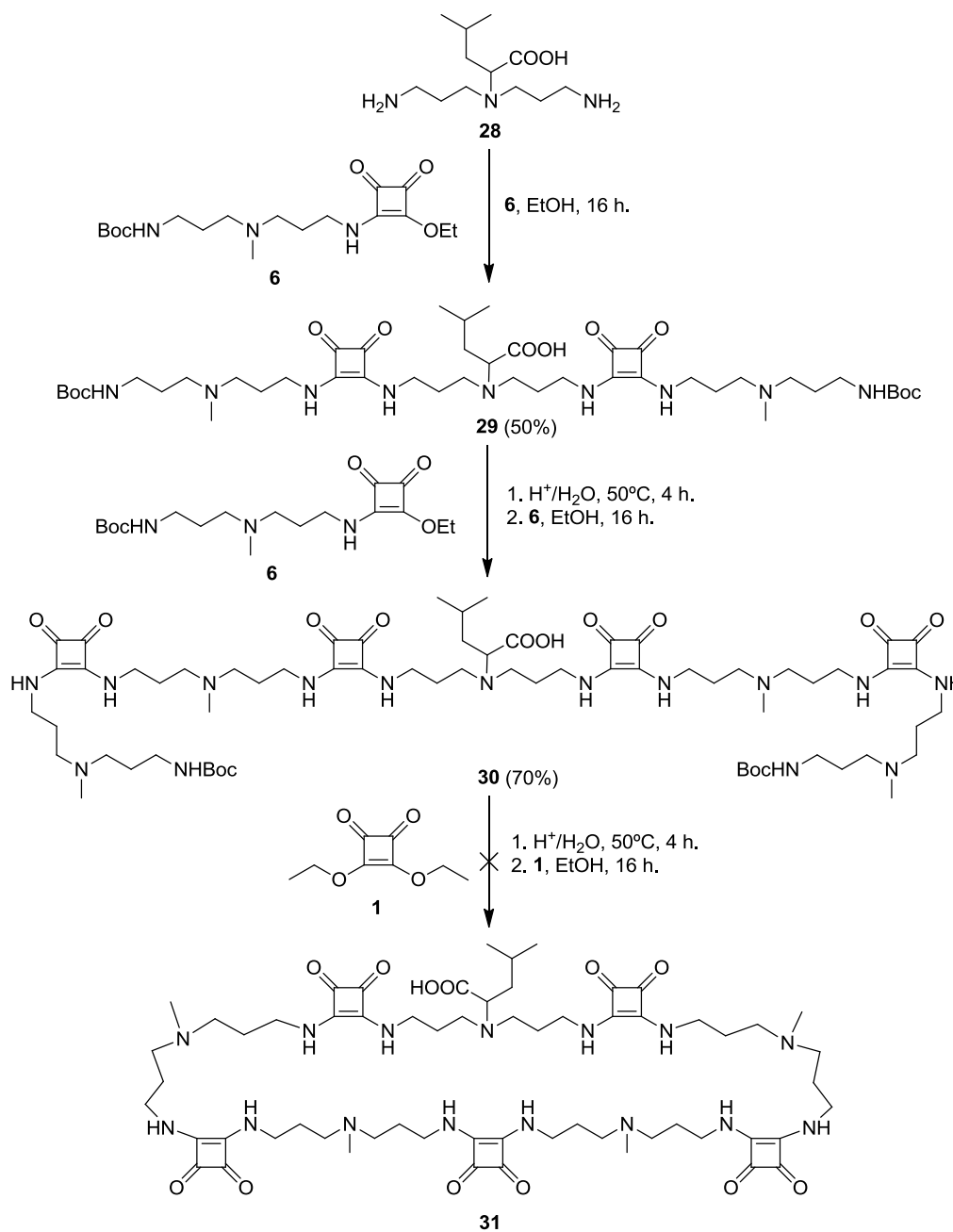


Esquema 23 – Síntesis de la diamina espaciadora conteniendo el aminoácido leucina.

Al igual que en el caso anterior de la bencilamina, para la obtención del oligómero con dos unidades escuaramida **29**, se ha conjugado directamente la diamina **28** con dos equivalentes del semiéster **6** en EtOH. A partir de este oligómero se ha seguido la metodología habitual, según la cual se obtiene primero el oligómero con cuatro unidades escuaramida **30**. Para la etapa de macrociclación, el planteamiento es el habitual, desproteger en primer lugar el oligómero **30** en disolución ácida acuosa y

⁴⁶ Kim, Y.; Zeng, F.; Zimmerman, S. C.; Peptide Dendrimers from Natural Amino Acids. *Chem. Eur. J.*, **1999**, *5*, 2133-2138.

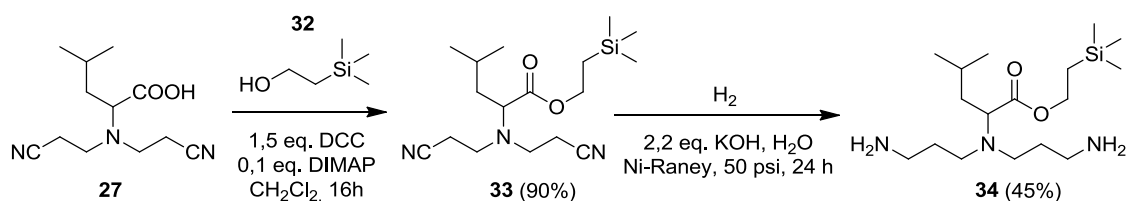
posterior reacción con un equivalente de escuato de dietilo **1** para obtener el macrociclo C5(N-Leucina) **31** (Esquema 24).



Esquema 24 – Síntesis del macrociclo C5(N-Leucina) **31** partiendo de la amina debidamente funcionalizada **28**, y utilizando el módulo de crecimiento **6**.

La modificación estructural introducida afecta sutilmente al rendimiento de las etapas de elongación de la cadena oligomérica en comparación con el uso de espaciadores sin modificaciones, ya que se obtienen rendimientos del 50 y 70% respectivamente. Por otra parte, la macrociclación no se produce, sino que se obtienen productos poliméricos. Ello ocurre probablemente debido a que la ya conocida interacción del grupo carboxilato con escuaramidas destruye la preorganización de los oligómeros requerida para la macrociclación.⁴⁷

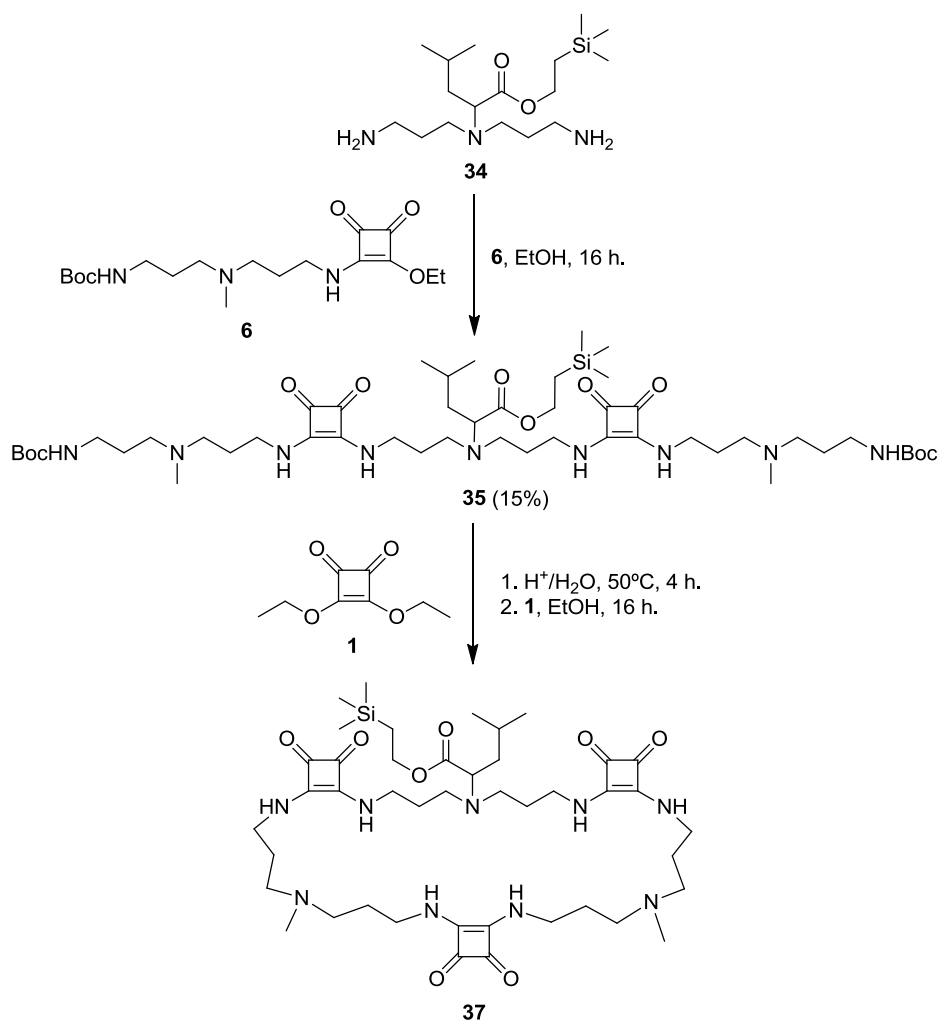
Con el fin de superar esta dificultad el grupo carboxílico se ha protegido como éster con trimetilsilil etanol (TMSE) **32**. La protección del ácido carboxílico se ha realizado sobre el derivado de leucina funcionalizado con los nitrilos **27**, mediante la formación de un éster con DCC en medio CH₂Cl₂, y realizando posteriormente la reducción de los nitrilos en condiciones similares a las anteriores (Esquema 25).



Esquema 25 – Protección del ácido carboxílico del dinitrilo **21** y posterior reducción, obteniendo la diamina espaciadora **34** que contiene el aminoácido leucina con el carboxilato protegido.

Una vez obtenida la diamina **34** se ha obtenido el oligómero con dos unidades escuaramida **35** de la misma forma que en el caso anterior, mediante conjugación con dos equivalentes del módulo de crecimiento **6**. Con la intención de comprobar en este punto si el grupo protector resuelve el problema, se ha realizado una reacción de macrociclación para obtener el macrociclo con tres unidades escuaramida **37**, mediante la desprotección primero de los grupos amino en medio ácido acuoso y posterior condensación con escuarato de dietilo **1** (Esquema 26).

⁴⁷ Prohens, R.; Tomàs, S.; Morey, J.; Deyà, P. M.; Ballester, P.; Costa, A.; Squaramido-Based Receptors: Molecular Recognition of Carboxylate Anions in Highly Competitive Media. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 1063-1066.



Esquema 26 – Síntesis del macrociclo C3(N-Leucina-TMSE) **37** partiendo de la amina debidamente funcionalizada **34**, y utilizando el módulo de crecimiento **6**.

El macrociclo C3 **14** se puede obtener siguiendo la misma metodología general descrita anteriormente para el macrociclo C7 **18**, mediante la reacción de macrociclación del oligómero con dos unidades escuaramida **8** y escuarato de dietilo **1**, obteniendo un rendimiento similar a los que se obtienen con los macrociclos más grandes. Sin embargo, para el caso del oligómero que contiene la leucina **35**, al analizar el crudo de la reacción de macrociclación entre el oligómero y escuarato de dietilo **1** mediante espectrometría de masas (ESI-MS), se observan señales que corresponden a una mezcla de productos. Por una parte, se puede identificar la señal correspondiente al macrociclo de tres unidades escuaramida ($[MH^+]$: 870,4), sin embargo, también se observa otro grupo de señales de un producto desconocido ($[MH^+]$: 1040,7), que podrían pertenecer a la estructura propuesta en la figura 35.

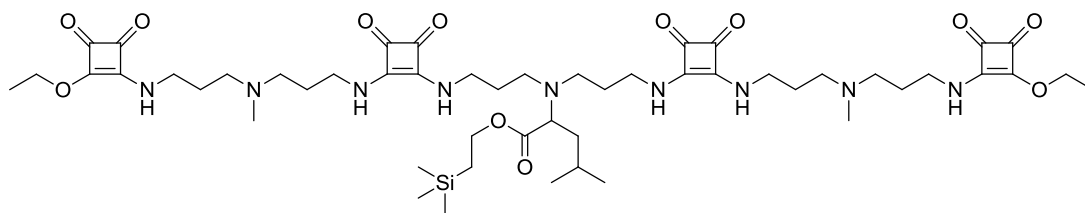
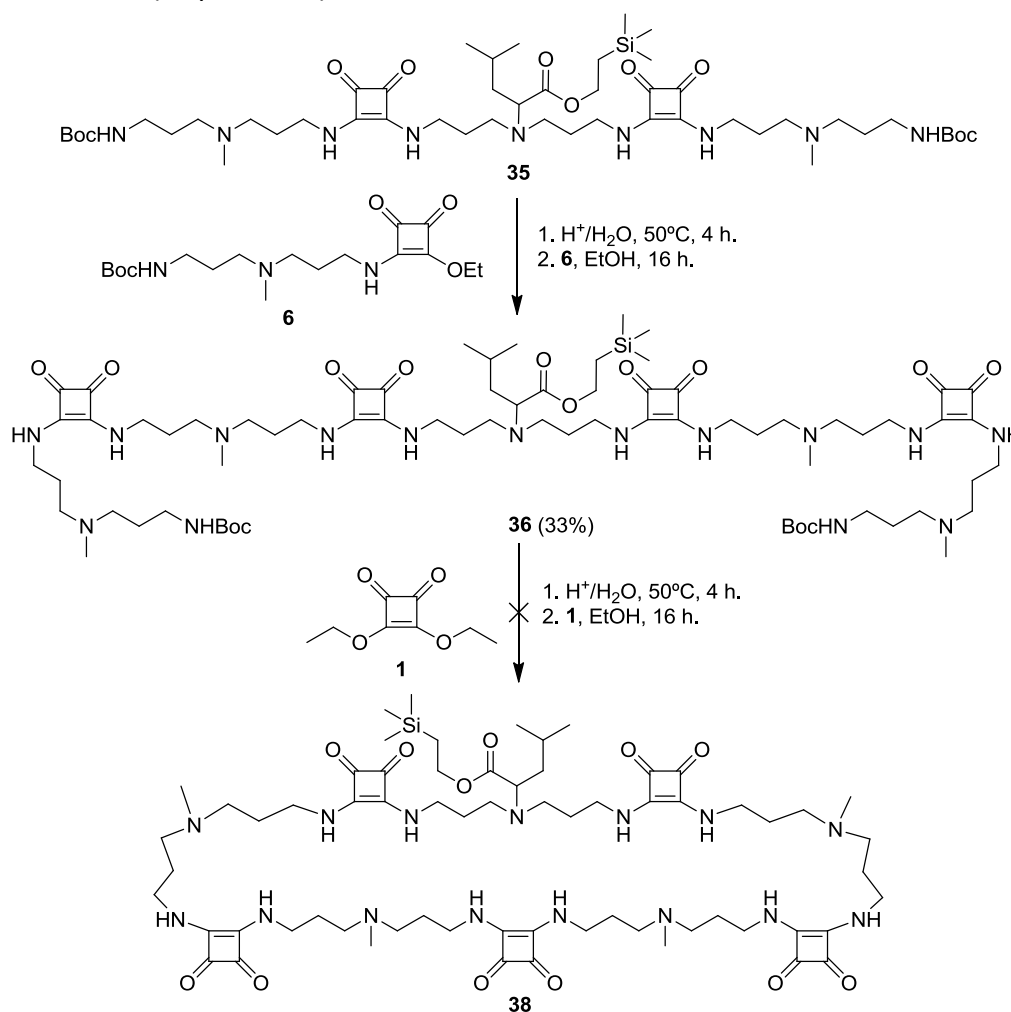


Figura 35 – Estructura propuesta para la señal observada mediante espectrometría de masas del crudo de la reacción de macrociclación del oligómero **35**. $C_{52}H_{86}N_8O_{12}Si$, MH^+ : 1040,6 m/z.

Este segundo producto, que corresponde a una doble entrada del escuarato de dietilo sobre las aminas terminales, indica que la preorganización que se da en el oligómero no es la óptima para obtener el macrociclo correspondiente.

Por otra parte, siguiendo la metodología habitual, y a partir del oligómero **35**, se ha preparado el oligómero con cuatro unidades escuaramida **36** con la intención de obtener el macrociclo **38** con cinco unidades escuaramida, esperando que la mayor longitud del oligómero permita una mejor preorganización previa a la etapa de macrociclación (Esquema 27).



Esquema 27 – Síntesis del macrociclo $C_5(N\text{-Leucina-TMSE})$ **38** partiendo del oligómero con dos unidades escuaramida **35**, y utilizando el módulo de crecimiento **6** y escuarato de dietilo **1** para la reacción de macrociclación.

El oligómero **36** se obtiene con bajo rendimiento. Además, se observa que el grupo protector TMSE resulta ser lábil en las condiciones acuosas utilizadas para desproteger el grupo protector Boc de las diaminas, liberando parcialmente el carboxilato. Ésta podría ser la causa del bajo rendimiento de las reacciones posteriores. De hecho, al intentar llevar a cabo la reacción de macrociclación con un equivalente de escuarato de dietilo **1**, no se ha podido aislar el macrociclo deseado.

Con estos resultados, se descarta la introducción de cualquier aminoácido utilizando el grupo amino del aminoácido como punto de unión al macrociclo, dejando de esta forma un carboxilato libre, ya que esta alternativa inhibe la macrociclación del oligómero.

2.5.4 Síntesis de oligoescuaramidas cíclicas con uno de los espaciadores modificado

En este grupo de modificaciones estructurales se modifica la capacidad de establecer interacciones mediante enlace de hidrógeno en uno de los espaciadores de la estructura, que se hace coincidir con la diamina central. Por una parte, la eliminación de uno de los nitrógenos terciarios de uno de los espaciadores reduce esta capacidad, mientras que por otra parte, el uso de un nuevo espaciador que contiene dentro de su estructura un enlace amida modifica esta capacidad, intercambiando el centro aceptor e incorporando un donador, modificando además la disposición de estos grupos en la estructura del espaciador (Fig. 36).

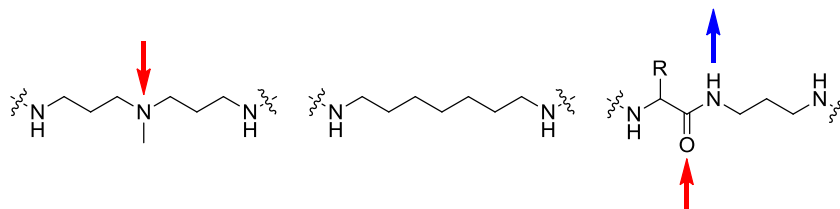


Figura 36 – Estructura del espaciador original (izquierda) y las modificaciones propuestas en este apartado (centro y derecha), señalando las posicionesceptoras (rojo) o donadoras (azul) de enlace de hidrógeno.

La introducción del grupo amida se ha realizado aprovechando la estructura de un aminoácido, permitiendo también introducir los grupos funcionales propios de su cadena lateral. En concreto se ha utilizado la metionina como representante de este grupo de compuestos.

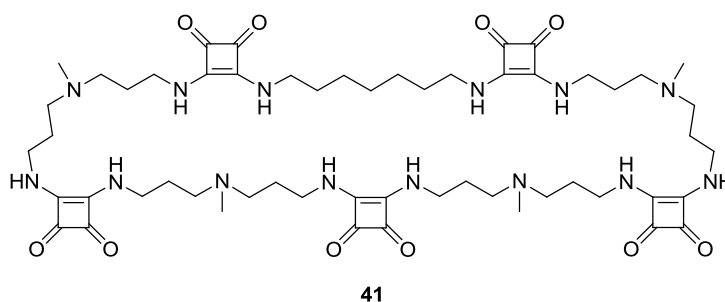
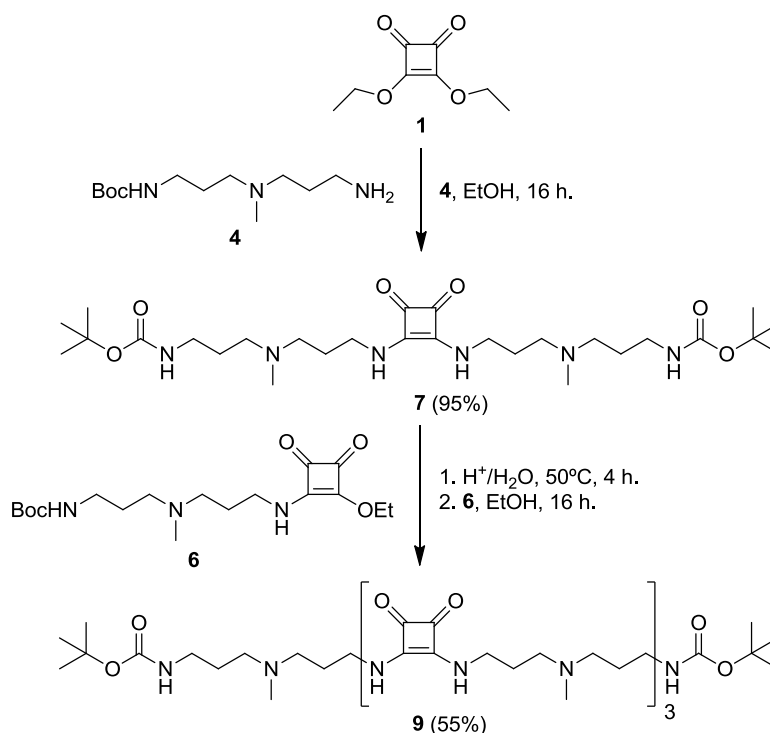
2.5.4.1 Síntesis de la oligoescuaramida cíclica C5(c₇) **41**

Figura 37 – Estructura de la oligoescuaramida C5(c₇) **41**.

Este macrociclo difiere de la estructura original del macrociclo C5 **16** en que se ha cambiado uno de los espaciadores por la heptildiamina **39**. Como fruto de la experiencia previa del grupo de Química Supramolecular, se sabe que la eliminación del nitrógeno central, centro aceptor de enlace de hidrógeno, impide la obtención del menor de los macrociclos, de dos unidades escuaramida, C2, y conduce a la formación de polímeros insolubles, indudablemente debido a la ausencia total de preorganización del correspondiente oligómero.⁴⁸ Dado este precedente y con el objetivo de poder evaluar esta modificación sobre el efecto antitumoral del macrociclo, resulta aconsejable plantear una ruta sintética alternativa. Para ello se ha diseñado un módulo central con tres unidades escuaramida para, posteriormente, realizar la macrociclación con el doble semiéster obtenido con la heptildiamina **40** según se indica en el esquema 29. Ello permite obtener oligómeros cíclicos con cinco unidades escuaramida, sin que la falta del átomo aceptor influya en el plegamiento del oligómero precursor. La preparación del oligómero con número impar de escuaramidas se realiza según el procedimiento descrito previamente,³⁸ mediante la condensación en EtOH de escuarato de dietilo **1** y dos equivalentes de la diamina monoprotectada **4**, obteniendo un oligómero con una unidad escuaramida central **7**. Posteriormente, el procedimiento habitual de elongación de los oligómeros da lugar al oligómero con tres unidades escuaramida **9** (Esquema 28).

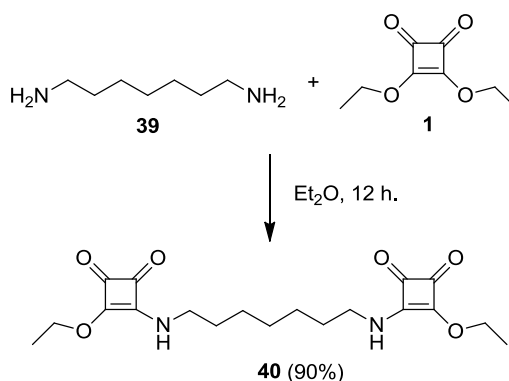
⁴⁸ Rotger, M. C.; Piña, M. N.; Frontera, A.; Martorell, G.; Ballester, P.; Deyà, P. M.; Costa, A.; Conformational Preferences and Self-Template Macrocyclization of Squaramide-Based Foldable Modules. *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 2302-2308.

2. Diseño, síntesis y evaluación biológica de oligoescuaramidas cíclicas



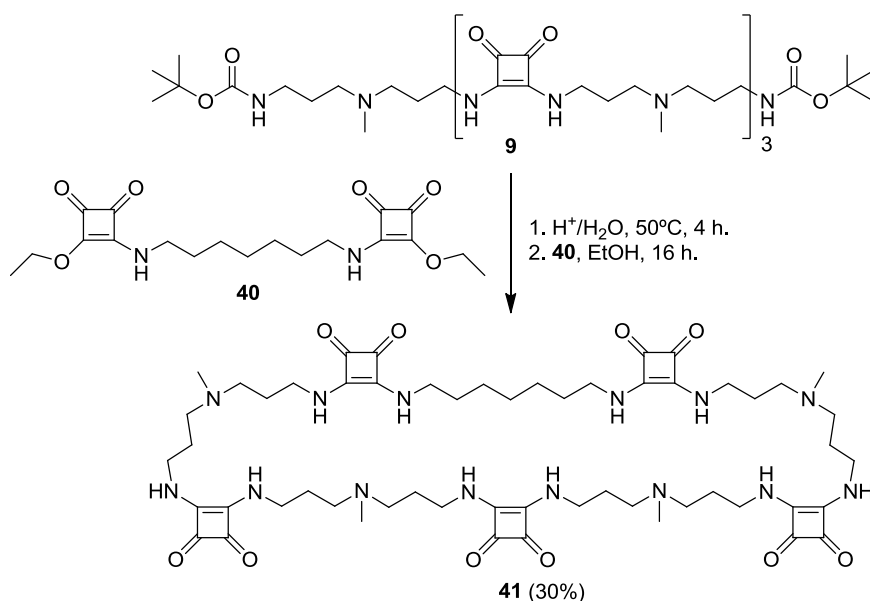
Esquema 28 – Síntesis del oligómero con tres unidades escuaramida **9** sintetizado según el procedimiento general descrito.

El doble semiéster necesario para la macrociclación se prepara por condensación en Et₂O de dos equivalentes de escuaramida de dietilo **1** por cada equivalente de heptildiamina **39**, favoreciendo con este disolvente la entrada de cada uno de los grupos amino sobre la primera de las posiciones del escuaramida de etilo (Esquema 29).



Esquema 29 – Síntesis del módulo de macrociclación **40** con dos unidades escuaramida.

A partir de los dos módulos ya descritos, **9** y **40**, se realiza la reacción de macrociclación según los procedimientos habituales, en EtOH durante 16 horas. El resultado ha sido el esperado y se ha aislado el macrociclo C5(c₇) **41** con un rendimiento del 30%, inferior a los rendimientos habituales pero suficiente para realizar los ensayos de viabilidad (Esquema 30).



Esquema 30 – Síntesis del macrociclo $C5(c_7)$ **41** a partir del oligómero con tres unidades escuaramida **9** y el diéster derivado de la heptildiamina **40**.

De esta manera se valida la metodología alternativa utilizada para la obtención de oligoescuaramidas macrocíclicas con modificaciones estructurales que pueden afectar al plegamiento de los oligómeros, aun reduciendo el rendimiento del proceso de macrociclación.

2.5.4.2 Síntesis de las oligoescuaramidas cíclicas $C5(\text{Met-}c_3)$ **50** y $C6(\text{Met-}c_3)$ **51**

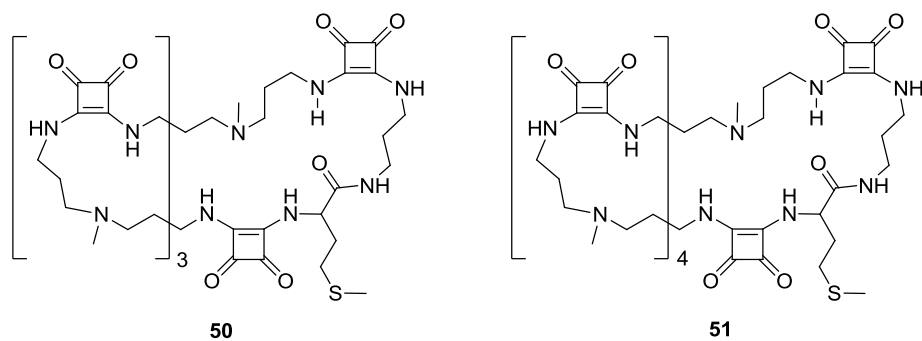
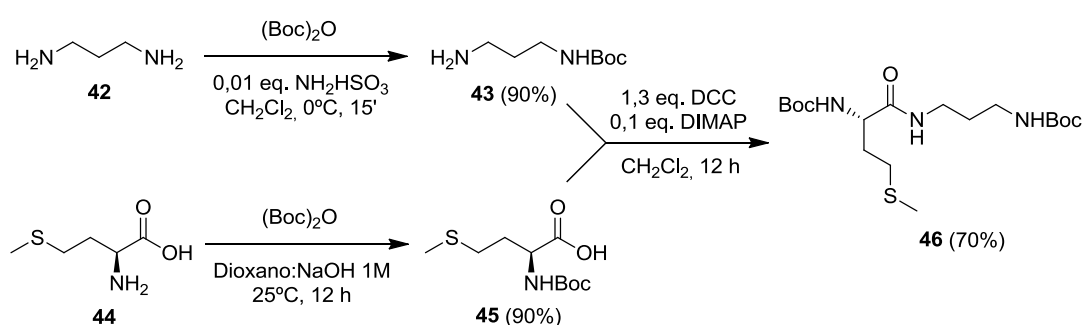


Figura 38 – Estructura de las oligoescuaramidas $C5(\text{Met-}c_3)$ **50** y $C6(\text{Met-}c_3)$ **51**.

La última modificación planteada es la de incrementar las posibilidades de establecer un mayor número de interacciones mediante enlace de hidrógeno añadiendo en este caso un centro donador y modificando la posición de estos centros en el espaciador. Para ello se ha introducido un aminoácido en la estructura del espaciador como si de un polipéptido se tratara, la metionina. Este aminoácido contiene un grupo tioéter en la cadena lateral. Como consecuencia de la estructura de la metionina, la longitud de la cadena de diamina modificada se reduce en un átomo de carbono, un hecho que no se espera tenga mucha relevancia en las interacciones intramoleculares y por tanto en la elongación o ciclación de los oligómeros.

La síntesis de esta diamina se ha realizado por condensación entre el grupo amino de la 1,3-propandiamina monoprottegida con el grupo Boc **43** y el grupo carboxilo del aminoácido metionina con su resto amino también protegido con Boc **45**. La protección de la 1,3-propandiamina se ha realizado según el procedimiento optimizado anteriormente, usando ácido sulfámico como catalizador en CH₂Cl₂, obteniendo un rendimiento del 90%. Para la protección del aminoácido se ha seguido una metodología descrita en la bibliografía, usando una mezcla de disolventes compuesta por dioxano y NaOH 1M en H₂O, obteniendo un rendimiento del 90%.⁴⁹ La reacción de condensación entre ambos fragmentos se ha realizado utilizando DCC como agente de acoplamiento, obteniendo la diamina protegida con un rendimiento del 70% (Esquema 31).



Esquema 31 – Síntesis del nuevo espaciador conteniendo la cadena lateral de la metionina.

La disposición de los centros donadores y aceptores de este nuevo espaciador permite establecer interacciones intramoleculares similares a las que dan lugar a la preorganización en los oligómeros originales, resultando en ciclos de 8 y 11 miembros (Fig. 39).

⁴⁹ Maity, P.; Zabel, M.; König, B.; Tetrahydrofuran α -Tetrasubstituted Amino Acids: Two Consecutive β -Turns in a Crystalline Linear Tripeptide. *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 8046-8053.

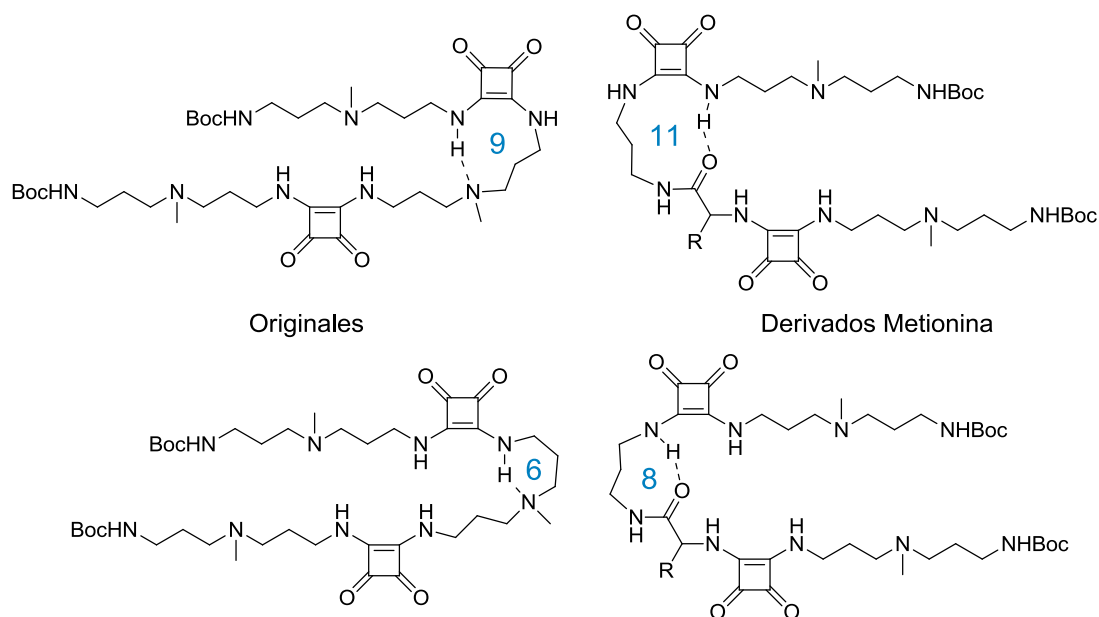
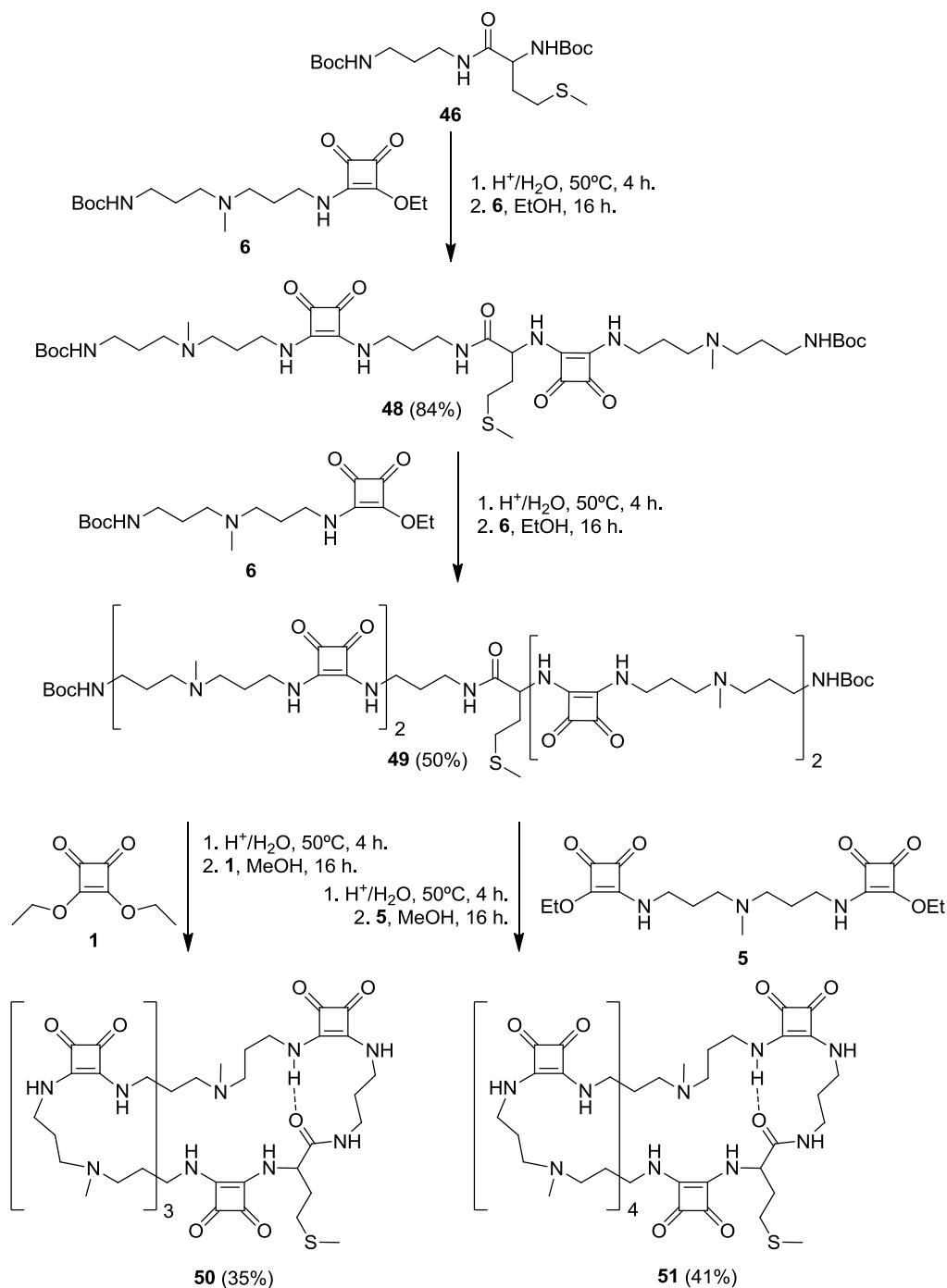


Figura 39 – Estructuras plegadas originales comparadas con las que resultarían utilizando aminoácidos modificados.

A partir de la diamina protegida **46**, se ha procedido a la obtención de los oligómeros habituales de dos **48** y cuatro unidades escuaramida **49**, realizando primero la desprotección de los grupos terminales en H₂O/HCl seguida de la elongación mediante condensación con el módulo de crecimiento **6**. Los rendimientos obtenidos en el proceso de elongación han sido del 84% y del 50%, respectivamente. Aprovechando la nueva metodología de macrociclación diseñada para la obtención del macrociclo C₅(C₇) **41**, se han realizado dos reacciones de macrociclación diferentes utilizando escuarato de dietilo **1** y el doble semiéster con el espaciador habitual **5**, obteniendo de esta forma los macrociclos modificados de cinco y seis unidades escuaramida **50** y **51** respectivamente.

Así, la oligoescuaramida C₅(Met-C₃) **50** se obtiene a partir de la condensación del oligómero **49** desprotegido con escuarato de dietilo **1** en MeOH con un rendimiento del 35%. Por otra parte, la desprotección del oligómero **49** y condensación con el doble semiéster **5** también en MeOH da lugar a la oligoescuaramida C₆(Met-C₃) **51**, con un rendimiento del 41% (Esquema 32).

2. Diseño, síntesis y evaluación biológica de oligoescuaramidas cíclicas



Esquema 32 – Procedimiento sintético para la obtención de los macrociclos C5(Met-c3) **50** y C6(Met-c3) **51** a partir del nuevo espaciador sintetizado conteniendo el aminoácido metionina **46**.

Esta nueva modificación en la estructura ha permitido obtener los macrociclos derivados de metionina **50** y **51**, análogos al C5 **16** y C6 **17** respectivamente. Los rendimientos de las reacciones de macrociclación, algo inferiores a los obtenidos en las síntesis de los macrociclos sin modificaciones, sugieren que la preorganización es suficiente para que se dé la macrociclación pero no tan eficiente, provocando la disminución del rendimiento. Las oligoescuaramidas cíclicas derivadas de la metionina

se han purificado mediante la misma técnica de precipitación selectiva utilizada con anterioridad.

Así pues, se han podido obtener tres nuevos macrociclos con cinco unidades escuaramida que presentan diferencias estructurales significativas en uno de sus espaciadores respecto al macrociclo C5 original. Además se ha obtenido un derivado de la oligoescuaramida C6 mediante una nueva estrategia para la obtención de macrociclos con número par de escuaramidas, permitiendo de esta forma usar el mismo oligómero precursor que el utilizado para el macrociclo de cinco miembros. Por último se ha sintetizado también un macrociclo mayor, con siete unidades escuaramida. Estos cinco macrociclos se han evaluado como agentes antitumorales en comparación con los macrociclos originales.

2.5.6 Bioensayos

Los experimentos descritos en este apartado se han realizado en los laboratorios del grupo de Biología Celular del Cáncer de la UIB, que viene colaborando con el grupo de Química Supramolecular desde el año 2007. Esta colaboración ha permitido, además de proporcionar el material, los cultivos celulares y su mantenimiento, recibir la formación necesaria para manipular cultivos celulares y realizar los ensayos de viabilidad celular.

Los resultados de la actividad antitumoral de la oligoescuaramida C5, obtenidos previamente, se han utilizado como punto de comparación. Además se ha incluido la oligoescuaramida cíclica de mayor tamaño C6, como punto de comparación para los macrociclos que contienen seis y siete unidades escuaramida.

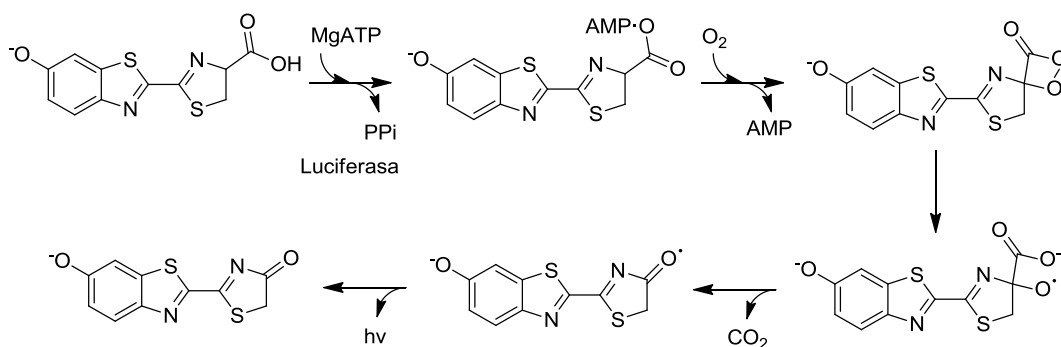
La evaluación de la actividad biológica se ha realizado a partir de ensayos de viabilidad celular mediante el cálculo de los índices IC_{50} celulares para cada uno de los compuestos estudiados. La línea celular utilizada para realizar los ensayos ha sido la llamada Jeko-1, una línea de linfoma no-Hodgkin de tipo B humano. Este tipo de linfoma representa a nivel comparativo aproximadamente un 3,5% de los casos de cáncer, suponiendo unos 250.000 nuevos casos solo en 2008. La incidencia ha aumentado en las últimas décadas y es mayor en países desarrollados, sin embargo estos datos pueden atribuirse a una mejora en los diagnósticos.⁵⁰ Se ha elegido esta línea celular por dos motivos. Por una parte, son células en suspensión y por tanto son más sencillas de manipular que las líneas adherentes. Por otra parte, las células Jeko-1 han resultado ser una línea muy sensible al tratamiento con la oligoescuaramida C5 **16**, con una viabilidad del 46% después de un tratamiento con C5 a una concentración 10 μ M durante 48 horas. De esta forma, la influencia de las modificaciones realizadas se debería apreciar más fácilmente que en el caso de líneas celulares donde la acción del C5 es mucho más agresiva, o por el contrario, en líneas inmunes a su acción.

⁵⁰ Boffetta, P.; Epidemiology of adult non-Hodgkin lymphoma. *Ann. Oncol.*, **2011**, 22, iv27-iv31.

2.5.6.1 Ensayos de viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad se realizan mediante la determinación de la cantidad de ATP intracelular. Esta determinación se realiza mediante un kit comercial de detección por luminiscencia (CellTiter-Glo® de Promega). Este kit proporciona una alta velocidad, sensibilidad y reproducibilidad en las lecturas. El procedimiento que utiliza este kit para la determinación de ATP se basa en una reacción quimioluminiscente, que proporciona una señal proporcional a la concentración de ATP. Para ello, los reactivos incluidos en el kit provocan la lisis de las células y la generación de una señal luminiscente estable gracias a una luciferasa termoestable (Luciferasa Recombinante Ultra-Glo™), un enzima oxidativo muy utilizado en bioluminiscencia.

La reacción de oxidación no catalizada de la luciferina es muy lenta, pero en presencia del enzima luciferasa, y Mg^{2+} , ATP y oxígeno como cofactores, obteniéndola oxidación se acelera produciendo oxiluciferina en estado excitado, que mediante relajación interna da lugar a la luminiscencia observada (Esquema 33).



Esquema 33 – Mecanismo de actuación de la enzima Luciferasa sobre la luciferina, y evolución de la oxiluciferina para obtener la señal luminiscente.

Esta luminiscencia tiene una vida media de más de cinco horas, lo que permite realizar la adición del reactivo y la lectura de toda una serie de muestras al mismo tiempo, consiguiendo de esta forma una alta reproducibilidad.

En función de las condiciones de incubación, las células contienen una cantidad de ATP variable y por esta razón la señal luminiscente siempre se referencia respecto a la señal de un cultivo control, el cual no se ha tratado con el producto pero se ha incubado durante el mismo tiempo y en las mismas condiciones que las células tratadas. Estos cultivos deben provenir del mismo cultivo madre, obteniendo de esta forma cultivos iniciales con el mismo número de células.

De forma general, se preparan disoluciones madre de la oligoescuaramida cíclica correspondiente a una concentración 100 mM en DMSO, utilizando posteriormente diluciones de esta disolución para tratar los cultivos celulares durante el tiempo previsto. Una vez finalizado el periodo de incubación se determina la cantidad de células viables mediante el kit CellTiter-Glo®.

La determinación de los valores de IC₅₀ para todos los productos se realiza siguiendo el mismo procedimiento, realizando ensayos a diferentes concentraciones. Para ello, a partir de la disolución madre se han obtenido disoluciones en DMSO de concentraciones 10, 2, 0,2 y 0,02 mM, a partir de las cuales se han obtenido cultivos celulares con concentraciones de oligoescuaramida de 200, 50, 20, 8, 3, 1, 0,3, 0,1, 0,05 y 0,01 μM (Fig. 40).

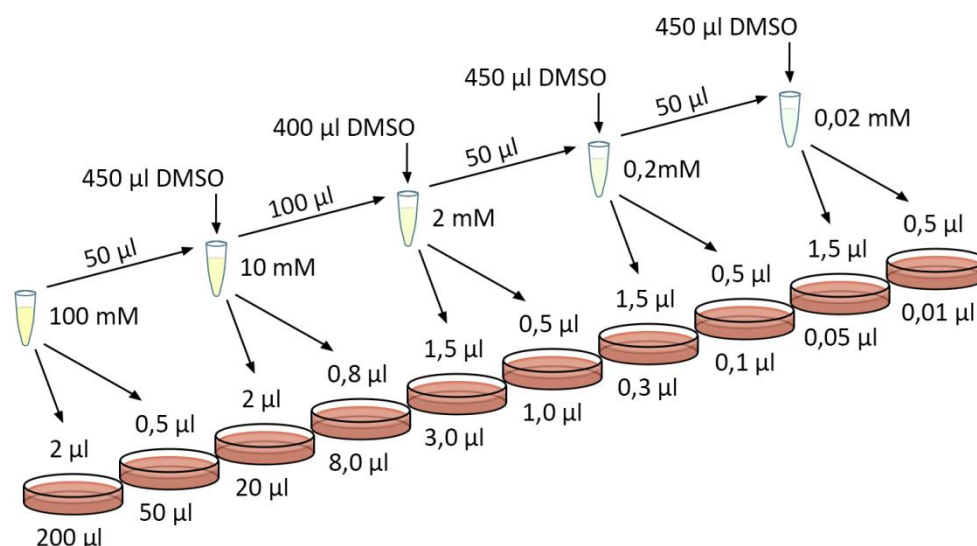


Figura 40 – Diluciones realizadas para obtener las concentraciones deseadas en los cultivos celulares para la obtención de los valores de IC₅₀.

Para asegurar la reproducibilidad del tratamiento, los tratamientos se realizan por triplicado, con un cultivo control común para todos ellos. Transcurridas 48 horas desde la administración de la oligoescuaramida se determina la viabilidad celular.

Para cada compuesto analizado se obtienen un total de 96 lecturas, que se analizan mediante el software Prism5 de GraphPad, utilizando un modelo de inhibición sigmoideal de pendiente variable para obtener el valor de IC₅₀ como la concentración a la cual la viabilidad celular se ha reducido en un 50%. El programa ajusta los datos a la ecuación 1.

$$y = \frac{y_{max}}{1+10^{(\log IC_{50}-x)n}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Siendo “y” la respuesta observada (viabilidad), “x” la concentración del compuesto a ensayar y “n” el coeficiente de Hill.

Asimismo se obtienen los valores de IC₅₀ para los macrociclos C2, C5 y C6 (compuestos **13**, **16** y **17**) con fines comparativos. El análisis de este valor para la oligoescuaramida C2 permite evaluar el método. Al no haber demostrado una actividad antitumoral significativa en las pruebas anteriores se debería obtener un valor de IC₅₀ mucho más elevado.

2.5.6.2 Resultados de los ensayos

Los resultados obtenidos para los macrociclos C2, C5 y C6 (compuestos **13**, **16** y **17**) concuerdan con los obtenidos de las pruebas de viabilidad previas a una concentración fija (10 μM). Como era de esperar, el macrociclo C2 no ha mostrado actividad en el intervalo de concentración estudiado, descartando su toxicidad. Para las oligoescuaramidas cíclicas más grandes se observa el incremento de la actividad esperada y en función del tamaño de éstas (Fig. 41). Las curvas obtenidas en los ensayos del cálculo de la IC_{50} son de tipo sigmoidal y la pendiente de esta curva a un 50% de viabilidad representa la pendiente de Hill o factor de Hill.⁵¹

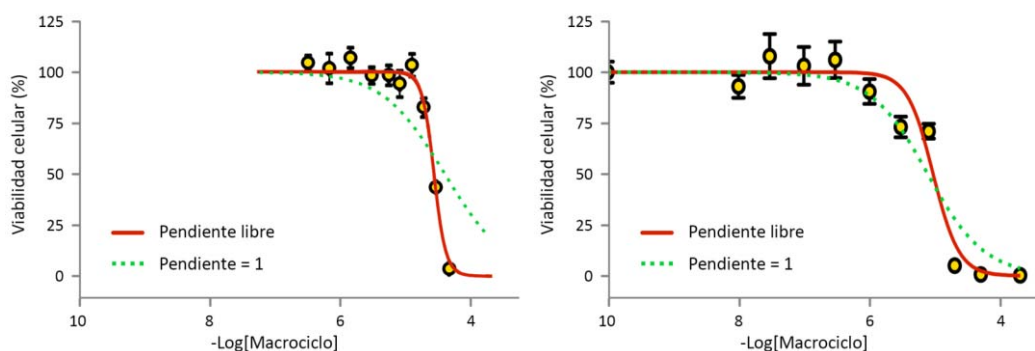


Figura 41 – Representación porcentual de los valores de viabilidad obtenidos en función de la concentración para las oligoescuaramidas cíclicas de referencia C5 **16** (izquierda) y C6 **17** (derecha). Los valores obtenidos para la oligoescuaramida C5 corresponden a ensayos en el intervalo de concentraciones entre 0,5 y 50 μM .

De modo similar se han determinado los valores de IC_{50} para las oligoescuaramidas cíclicas modificadas (Fig. 42).

⁵¹ La pendiente de Hill es un valor referente a ensayos de activación-inhibición entre un sustrato y una enzima, pudiendo obtener valores mayores que 1, que corresponde a una interacción cooperativa positiva, valores cercanos a 1, indicando que no existe cooperatividad, o bien valores menores que 1, existiendo en este caso una cooperatividad negativa.

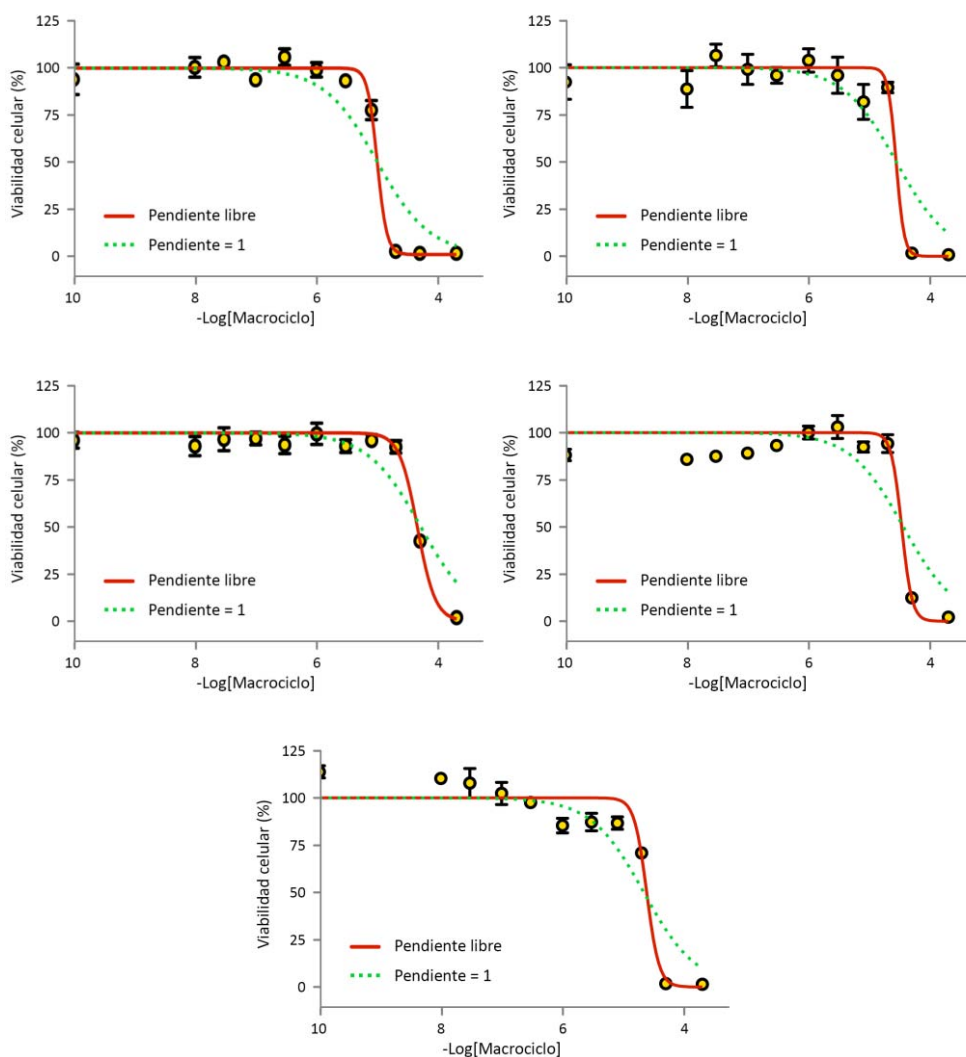


Figura 42 – Representación porcentual de los valores de viabilidad obtenidos en función del logaritmo de la concentración para las oligoescuaramidas (de arriba abajo y de izquierda a derecha) C7 **18**, C5(N-Bencilo) **25**, C5(C₇) **41**, C5(Met-c₃) **50** y C6(Met-c₃) **51**.

A modo de resumen se representan a continuación los valores obtenidos (Tabla 3) y la representación gráfica los valores de IC₅₀ de todas las oligoescuaramidas evaluadas (Fig. 43).

Tabla 3 – Resumen de los valores obtenidos del Log de IC₅₀, el valor de la pendiente de Hill.

	Valor ± σ		IC ₅₀ (μM)
	Log IC ₅₀	Pendiente	
C5	-4,51 ± 0,01	-5,4 ± 0,9	30,7
C5(N-Bencilo)	-4,56 ± 0,09	-6,6 ± 4,3	27,6
C5(C₇)	-4,34 ± 0,02	-3,0 ± 0,6	45,3
C5(Met-c₃)	-4,47 ± 0,04	-5,1 ± 1,2	34,2
C6	-5,03 ± 0,05	-2,2 ± 0,5	9,4
C6(Met-c₃)	-4,61 ± 0,04	-4,3 ± 1,6	24,4
C7	-5,00 ± 0,04	-5,5 ± 2,2	10,0

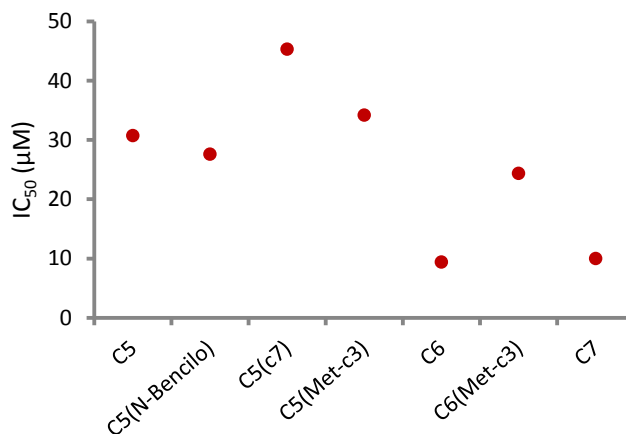


Figura 43 – Representación gráfica de los valores de IC₅₀ para las diferentes oligoescuaramidas cíclicas.

2.5.6.3 Análisis de resultados de los IC₅₀ obtenidos

A la vista de los resultados obtenidos se puede indicar que la oligoescuaramida C7 **18**, que es el macrociclo más grande de la serie oligoescuaramídica sin modificaciones, presenta un valor IC₅₀ de 10 µM, similar a la del macrociclo C6 **17**, y en ambos casos inferior a la obtenida para el compuesto C5 **16**. Se puede afirmar, por tanto, que el hecho de aumentar el tamaño del macrociclo de seis a siete unidades de escuaramida no incrementa significativamente la actividad antitumoral, descartando la posibilidad de seguir incrementando el número de escuaramidas con el fin de obtener una mayor actividad antitumoral.

Para la oligoescuaramida C5(Met-c₃) **50** se ha obtenido un valor de IC₅₀ de 34 µM, similar al observado para su homólogo, el macrociclo C5 **16**, con un valor de 30,7 µM, pudiendo descartar cualquier influencia del cambio de la estructura del espaciador o del resto de la metionina en la actividad antitumoral. Para las dos oligoescuaramidas cíclicas con seis unidades escuaramida, se observa una pequeña diferencia en los valores de IC₅₀, 24,4 µM para el compuesto modificado **51** frente a un valor de 9,4 µM de la oligoescuaramida cíclica original **17**, sin embargo, esta diferencia no es significativa, pudiendo descartar igualmente la influencia del residuo de metionina. Comparando los valores obtenidos entre los dos derivados de la metionina se confirma la tendencia observada en los respectivos macrociclos sin modificaciones, el tamaño de la oligoescuaramida afecta a la actividad, incrementándose en los compuestos con seis escuaramidas.

El macrociclo C5(c₇) **41** ha mostrado el valor más elevado de IC₅₀, con un valor de 45,3 µM. En una hipótesis inicial, se puede relacionar este resultado con la reducción en el número de nitrógenos terciarios, que reduce el número de interacciones por enlace de hidrógeno, o por la reducción de los centros básicos, sin embargo para poder explicar

este resultado sería necesario conocer el mecanismo por el cual actúan estos macrociclos.

El último caso, el C5(N-Bencilo) **25** ha demostrado unos resultados poco satisfactorios en cuanto a la precisión de los experimentos llevados a cabo, obteniendo valores de desviación estándar muy superiores a los observados para los otros compuestos. Al haber realizado todos los experimentos en paralelo se elimina la posibilidad de un error experimental en cuanto al tratamiento, pudiendo deberse a la limitada solubilidad del macrociclo y la posible precipitación en el medio de cultivo. Aun así, la IC_{50} obtenida se encuentra dentro del mismo orden de magnitud de los otros macrociclos con cinco unidades escuaramida, con un valor de 27,9 μM .

Respecto a los valores obtenidos para la pendiente de Hill, éstos no se deben tomar como un resultado definitivo ya que no son experimentos directos de inhibición enzimática, sin embargo, las conclusiones obtenidas concuerdan con los experimentos realizados sobre la inhibición de cinasas in vitro y los estudios de inhibición competitiva con ATP con el macrociclo C5. Los valores negativos obtenidos indican que los macrociclos actúan mediante un mecanismo de inhibición, donde, a medida que se incrementa la concentración del sustrato, disminuye la viabilidad celular. El valor absoluto de esos valores es mayor que 1, indicando de esta forma que existe una cooperatividad positiva.

En general estos datos parecen indicar que nos encontramos frente a un tipo de inhibidor alostérico donde los macrociclos interaccionan con las cinasas mediante las interacciones tipo “docking” comentadas en la introducción.

En cuanto a los valores de IC_{50} obtenidos en general, son del orden de magnitud de los obtenidos de los ensayos de IC_{50} de inhibición enzimática con la oligoescuaramida C5 **16** y el panel de 210 cinasas in vitro. Esto pone de manifiesto que estos compuestos se internalizan rápida y eficazmente en la célula.

Los resultados obtenidos en este capítulo, a pesar de no haber mejorado la actividad antitumoral mediante las modificaciones estructurales realizadas, han demostrado la solidez de la estructura del macrociclo C5 desde el punto de vista que, manteniendo aproximadamente un 85% de la molécula invariable, la actividad se mantiene prácticamente constante. Además, desde el punto de vista sintético, la oligoescuaramida C5 es la más sencilla de obtener, siendo por tanto una buena candidata para proseguir con los estudios del uso de las oligoescuaramidas cíclicas como agentes antitumorales.

2.6 Conclusiones

1. Se han sintetizado una serie de derivados oligoescuaramídicos cíclicos, introduciendo variaciones estructurales de diferente naturaleza en su estructura.
2. La incorporación de aminoácidos en la estructura macrocíclica utilizando el grupo amino como centro de unión no resulta ser una buena estrategia a seguir, ya que la preorganización de los productos precursores de los macrociclos se ve suficientemente alterada como para no dar lugar a los respectivos macrociclos. Por otra parte, la introducción de aminoácidos formando un nuevo espaciador mediante un enlace amida ha resultado ser un buen método para obtener los macrociclos derivados, pudiendo obtener de esta forma macrociclos funcionalizados en su superficie con cadenas laterales de aminoácidos.
3. Se ha introducido satisfactoriamente en la estructura del macrociclo un grupo bencilo, sin suponer un inconveniente para la macrociclación.
4. Se ha desarrollado una ruta alternativa de macrociclación en la cual se introducen dos unidades escuaramida en la reacción final, resultando efectiva en aquellos casos donde la preorganización de los precursores lineales se puede ver alterada por las modificaciones estructurales introducidas.
5. El estudio de la viabilidad celular y el cálculo de los índices de IC_{50} realizados con cultivos celulares de linfoma humano de tipo B han demostrado que las modificaciones realizadas en la estructura macrocíclica no han supuesto unos cambios significativos en su actividad antitumoral respecto a los macrociclos originales, aunque se ha detectado la menor actividad para el C5(c₇) **41** donde se ha reducido el número de centros básicos.

2.7 Métodos experimentales

Todos los disolventes utilizados han sido adquiridos a Scharlau y Sigma-Aldrich. Cuando ha sido necesario, estos disolventes se han secado y destilado según los procedimientos indicados en la bibliografía.⁵² El agua utilizada en los procesos de síntesis, elaboración o preparación de muestras se ha purificado por electroósmosis con un equipo ELIX10 (Millipore) y, posteriormente, por tratamiento a través de un equipo MilliQ (Millipore) consiguiendo una resistividad máxima de 18,2 MΩ. El DMSO utilizado para realizar las disoluciones y diluciones destinadas a la realización de ensayos biológicos se ha adquirido a través de la casa comercial Sigma-Aldrich con calidad BioReagent, y se ha usado siempre en condiciones estériles.

Los disolventes deuterados utilizados en los experimentos de RMN se han adquirido con calidad espectroscópica para RMN con una riqueza del 99,98% siendo utilizados sin tratamiento previo.

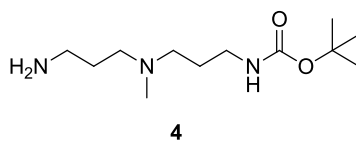
Todos los reactivos y sales utilizados han sido adquiridos a través de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Panreac o TCI Chemicals. Se han utilizado sin purificación previa a no ser que se indique lo contrario.

Los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) se han registrado en un instrumento Bruker AVANCE-300. Los desplazamientos químicos indicados están referenciados a la señal residual del disolvente utilizado en el caso de DMSO y CDCl_3 . En el caso de los espectros realizados en D_2O , se ha utilizado la sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfónico como patrón interno. Los espectros de masas se han registrado con un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) Micromass AutoSpec 3000, provisto de un sistema de entrada de la muestra mediante electroespray (ESI). El lector de placas utilizado para las medidas de luminiscencia ha sido un Hidex Plate Chameleon 425-104 multilabel counter, utilizando placas ELISA opacas, adecuadas para el instrumento y el método, de 96 pozos de 250 μl de capacidad cada uno.

⁵² Armarego, W. L. F.; Chai, C.; Purification of Laboratory Chemicals, 6th Ed., 2009, Butterworth Heinemann, Elsevier. Oxford, UK.

2.7.1 Síntesis

3-amino(N-terc-butoxicarbonil)-3'-amino-N-metildipropilamina **4**:



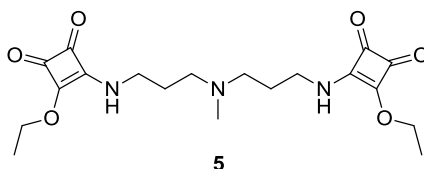
4,214 g de 3,3'-diamino-N-metildipropilamina (**2**) (29,01 mmol) se disuelven en 30 ml de CH₂Cl₂. Se añaden 0,028 g de ácido sulfámico (0,29 mmol) que se dejan en suspensión y agitación. La suspensión resultante se deja con agitación unos minutos y en un baño de agua-hielo. Por otra parte 1,266 g de dicarbonato de di-terc-butilo (anhídrido Boc) (**3**) (5,80 mmol) se disuelven en 10 ml de CH₂Cl₂ y se añaden sobre la suspensión de la amina gota a gota. El conjunto de reacción se mantiene con una atmósfera inerte de argón durante la adición.

Finalizada la adición se retira el baño de agua-hielo y se deja agitando 15 minutos adicionales. Se lava la disolución resultante con 3 x 20 ml de H₂O, secando la fase orgánica con Na₂SO₄ anhidro y evaporando el disolvente a baja presión.

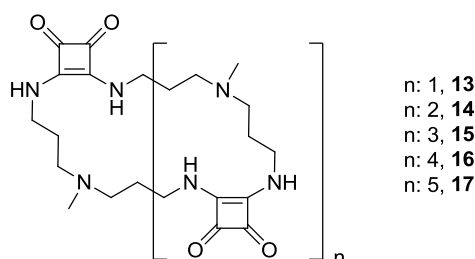
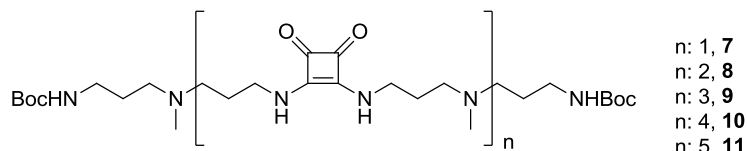
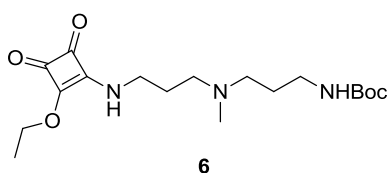
Una vez concentrada la disolución se diluye con 10 ml de H₂O y se acidifica hasta pH 3 con HCl concentrado. Ésta se lava con 3 x 10 ml de Et₂O y la fase acuosa se basicifica hasta pH 10 con una disolución concentrada de NaOH. El producto se extrae de esta disolución acuosa con 3 x 20 ml de CH₂Cl₂, se seca con Na₂SO₄ anhidro y se elimina el disolvente, obteniendo 1,032 g (4,21 mmol) de **4** como un aceite incoloro. Rdto: 70%

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 1,2 (s, 2H, NH₂), 1,44 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,61 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂), 2,18 (s, 3H, NCH₃), 2,40 (m, 4H, CH₂NCH₂), 2,74 (t, 2H, CH₂NH₂), 3,17 (q, 2H, CH₂NH), 5,39 (s, 1H, NHCOO). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 28,9, 30,4, 32,8, 41,7, 42,4, 43,9, 57,5, 58,2, 80,7, 158,1. HRMS (ESI) calc. para 246,2182 (M+H⁺; C₁₂H₂₈N₃O₂⁺) encontrado: 246,2182.

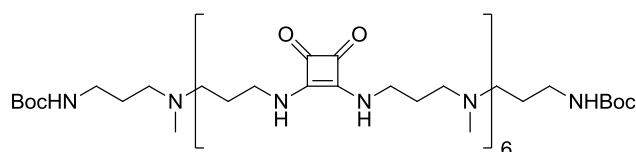
Diéster **5**:



Sintetizado tal y como se describe en la bibliografía.⁴⁸

Semiester 6, Oligoescuaramidas 7-11 y Oligoescuaramidas cíclicas 13-17:

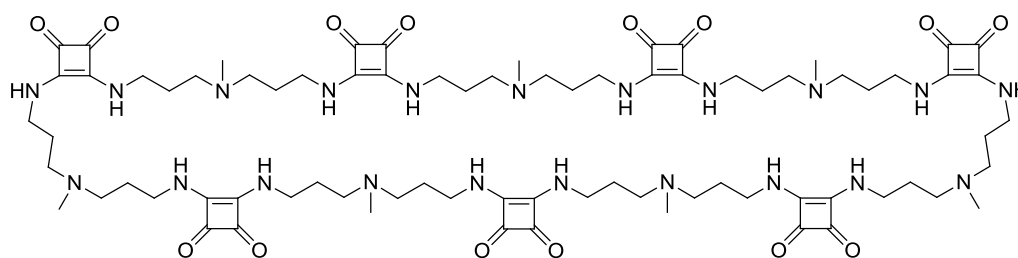
Sintetizados tal y como se describe en la bibliografía.³⁸

Oligoescuaramida 12:

El procedimiento descrito para la síntesis de este oligómero es el descrito en la bibliografía para los oligómeros **9**, **10** y **11**, sin embargo el oligómero con seis unidades escuaramida no se ha descrito anteriormente.

1,0 g del oligómero con cuatro unidades escuaramida **10** (0,8 mmol) se disuelve en 10 ml de H₂O con la adición de 0,4 ml de HCl al 37% (4,8 mmol). La disolución se mantiene a 50 °C durante 4 horas.

Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente y se basifica lentamente con Na₂CO₃ hasta un pH de 10. La disolución se concentra a sequedad obteniendo un aceite denso, que se disuelve en 10 ml de EtOH y se filtra. Esta disolución se añade sobre otra que contiene 0,626 g del módulo de crecimiento **6** (1,7 mmol) disueltos en 10 ml de EtOH. La reacción se mantiene con agitación durante 12 horas, concentrando posteriormente el disolvente a sequedad para obtener un sólido que se disuelve en 10 ml de CH₂Cl₂, se filtra y se precipita con la adición de 20 ml de Et₂O. Se obtiene el producto **12** como un sólido de color amarillo pálido (0,741 g, 0,44 mmol). Rdto: 55%

C7 18:

El procedimiento descrito para la síntesis de esta oligoesquaramida cíclica es el descrito en la bibliografía para los macrociclos **13**, **14**, **15**, **16** y **17**, con las pequeñas modificaciones pertinentes para la obtención de los macrociclos más grandes.

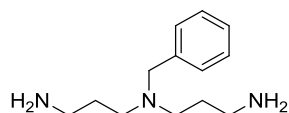
La desprotección de los grupos amino del oligómero con seis unidades escuaramida (**12**) se lleva a cabo siguiendo el mismo descrito para la obtención de este mismo oligómero, incrementando el número de equivalentes de HCl en 2 unidades.

Para ello, 0,35 g del oligómero **12** (0,24 mmol) se tratan con 1,2 ml de HCl 3M (3,6 mmol) en H₂O (10 ml). La solución se calienta a 50 °C durante 6 horas. La mezcla se enfría a temperatura ambiente y se lleva a pH 9-10 con la adición de Na₂CO₃ sólido. El disolvente se evapora a sequedad.

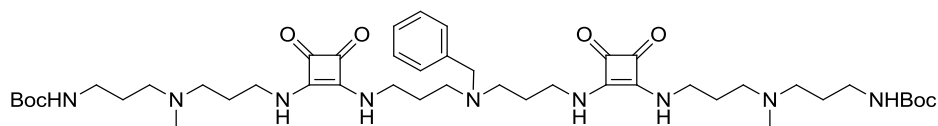
El residuo se redisuelve en MeOH (14 ml) y se filtra. Se mantiene después a una temperatura de 70 °C durante 30 minutos. Posteriormente se deja enfriar y se añade Na₂CO₃ (106 mg) y una disolución de escurato de dietilo **1** (41 mg, 0,24 mmol) en MeOH (6 ml). La disolución se mantiene en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente.

El disolvente se evapora entonces a sequedad obteniendo un residuo que se disuelve en una disolución acuosa a pH 2 (1,5 ml). Esta disolución se filtra y se basifica con una disolución de NaOH 1M a pH 9, obteniendo un precipitado que se aísla por filtración. Este residuo sólido se trata con 3 x 20 ml de THF y 3 x 20 ml de acetona, la suspensión formada se lleva a ebullición durante 20 minutos y se filtra obteniéndose **18** como un sólido amarillo pálido (288 mg, 0,18 mmol). Rdto: 77%

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,65 (m, 28H, CH₂CH₂CH₂), 2,1 (s, 21H, NCH₃), 2,3 (m, 28H, CH₂NCH₂), 3,5 (m, 28H, CH₂NH(sq)), 7,43 (s, 14H, NH). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O+HCl): δ = 28,0, 42,7, 43,8, 55,9, 170,7, 184,3. HRMS (ESI) calc. para 1584,9138 (M+Na⁺; C₇₇H₁₁₉N₂₁NaO₁₄⁺) encontrado: 1584,9156.

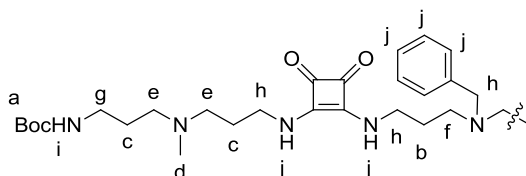
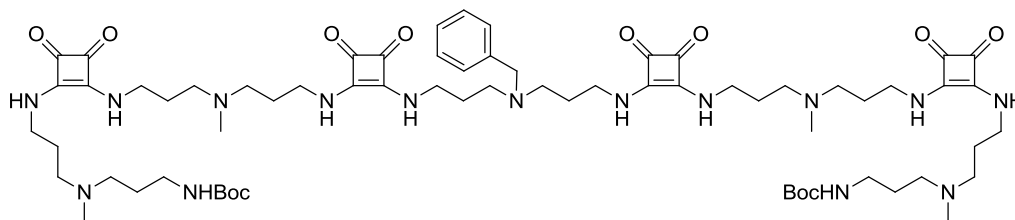
[N-N'-Bis-(2-aminopropil)]-bencilamina 22:

Este producto se ha sintetizado según el procedimiento descrito en la bibliografía.^{53,45}

Oligoescuaramida-2(N-bencilo) 23:

Se obtiene del mismo modo que la oligoescuaramida **8**, utilizando como reactivos de partida 445 mg de la diamina derivada de la bencilamina **22** (2,01 mmol), y 1,78 g del semiéster **6** (4,82 mmol) como módulo de crecimiento, obteniendo la oligoescuaramida **23** como un sólido amarillo pálido (1,32 g, 1,49 mmol). Rdto: 74%

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,36 (s, 18H, CH₃^a), 1,49 (m, 4H, CH₂^b), 1,66 (m, 8H, CH₂^c), 2,10 (s, 6H, CH₃^d), 2,27(m, 8H, CH₂^e), 2,42 (m, 4H, CH₂^f), 2,91 (m, 4H, CH₂^g), 3,52 (m, 10H, CH₂^h), 6,76 (m, 2H, NHⁱ), 7,1-7,6 (m, 5+4H, CH^j). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O+HCl): δ = 27,7, 29,0, 39,0, 42,3, 42,4, 50,9, 55,0, 55,3, 58,4, 78,1, 127,5, 128,8, 128,4, 140,1, 156,4, 168,7, 183,1. HRMS (ESI) calc. para 890,5471 (M+Na⁺; C₄₅H₇₃N₉NaO₈⁺) encontrado: 890,5441.

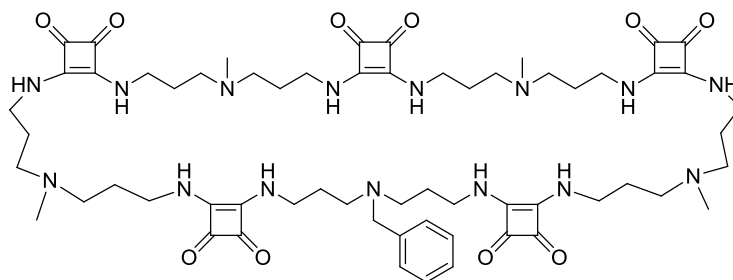
**Oligoescuaramida-4(N-bencilo) 24:**

Se sintetiza siguiendo el procedimiento habitual de elongación de oligoescuaramidas utilizando como reactivo de partida 486 mg de la oligoescuaramida **23** (0,60 mmol) y 454 mg del módulo de crecimiento **6** (1,23 mmol). El producto **24** se obtiene como un sólido blanco (477 mg, 0,36 mmol). Rdto: 60%

⁵³ Bergeron, R. J.; Burton, P. S.; Mcgovern, K. A.; Kline, S. J.; Reagents for the Selective Acylation of Spermidine, Homospermidine, and Bis[3-aminopropyl]-amine. *Synthesis*, **1981**, 9, 732-733.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 1.35$ (s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.48 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.64 (m, 16H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.10 (s, 12H, CH_3), 2,24 (br, 16H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.40 (m, 4H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.90 (m, 4H, CH_2NHCOO), 3.49 (br, 2H, $\text{NCH}_2\text{Ar} + 16\text{H}$, $\text{CH}_2\text{NH}(\text{sq})$), 6.76 (br, 2H, CH_2NHCOO), 7.0–7.8 ppm (br, 5H Ar + 8H, NH). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, $\text{D}_2\text{O}+\text{HCl}$): $\delta = 27,2, 28,7, 37,9, 42,0, 42,1, 50,4, 54,5, 54,9, 58,0, 78,2, 78,5, 127,2, 128,5, 129,2, 139,5, 156,3, 168,1, 182,5$. HRMS (ESI) calc. para 1336,8116 ($\text{M}+\text{Na}^+$; $\text{C}_{67}\text{H}_{107}\text{N}_{15}\text{NaO}_{12}^+$) encontrado: 1336,8148.

C5(N-bencilo) 25:

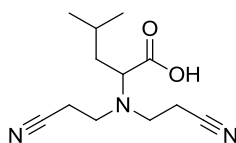


El procedimiento seguido para la síntesis de esta oligoescuaramida cíclica es similar al habitual, a partir de 477 mg de la oligoescuaramida **24** (0,36 mmol) y 54 μl de escuarato de dietilo **1** (0,36 mmol).

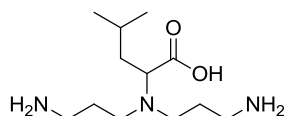
La oligoescuaramida **24** se disuelve en H_2O (15 ml) y HCl 3M (1,1 ml, 3,3 mmol) y se agita a 50 °C durante 5 horas. La solución resultante se deja enfriar y se añade lentamente Na_2CO_3 hasta conseguir un pH de 9. El disolvente se evapora y el crudo se disuelve en DMSO (2 ml) y MeOH (40 ml). La disolución se filtra y posteriormente se añade el escuarato de dietilo **1** disuelto en MeOH (10 ml). La mezcla de reacción se mantiene en agitación durante 72 horas.

El MeOH se concentra hasta obtener un residuo con DMSO , que se diluye añadiendo una disolución acuosa del 5% de Na_2CO_3 (20 ml). Esta disolución se extrae con CHCl_3 (4 x 15 ml) y $\text{CHCl}_3/\text{tBuOH}$ (50:50) (2 x 15 ml). Los extractos orgánicos se secan sobre Na_2SO_4 y se evapora el disolvente. El sólido resultante se cristaliza con una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Et}_2\text{O}$ (30:70) para obtener la oligoescuaramida cíclica **25** como un sólido amarillo pálido (303 mg, 0,25 mmol). Rdto: 70%

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 1,67$ (m, 20H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,14 (m, 12H, NCH_3), 2,38 (m, 20H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3,03 (m, 2H, $\text{NCH}_2(\text{C}_6\text{H}_5)$), 3,50 (m, 20H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 7,2-8,2 (m, 10 + 5H, $\text{CH}_2\text{NH}(\text{sq}) + \text{CH}_2(\text{C}_6\text{H}_5)$). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 27,8, 42,7, 44,0, 52,5, 55,9, 131,4, 131,9, 132,6, 133,4, 170,3, 182,9$. HRMS (ESI) calc. para 1192,6990 ($\text{M}+\text{H}^+$; $\text{C}_{61}\text{H}_{90}\text{N}_{15}\text{O}_{10}^+$) encontrado: 1192,6969.

[N-N'-Bis-(2-cianoetil)]-Leucina 27:

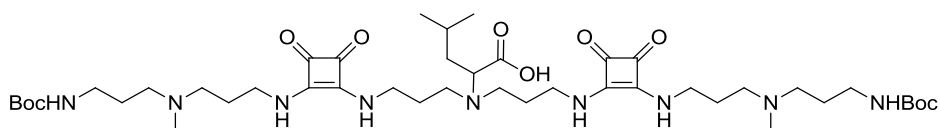
Sintetizado según se describe en la bibliografía.⁴⁶ Rdto: 45%

[N-N'-Bis-(2-aminopropil)]-Leucina 28:

Sintetizado según el método de reducción descrito en la bibliografía ligeramente modificado, añadiendo a 0,5 g de **27** (2,1 mmol), 0,6 ml de KOH 10,8 M (6,5 mmol) y 0,8 g de Ni-Raney.⁵⁴

La elaboración del producto se lleva a cabo evaporando el disolvente y solubilizando el crudo en t-BuOH. La fase orgánica se lava con NaOH 1M (3 x 15 ml) y se elimina el disolvente, obteniendo la diamina **28** como un aceite. Rdto: 98%

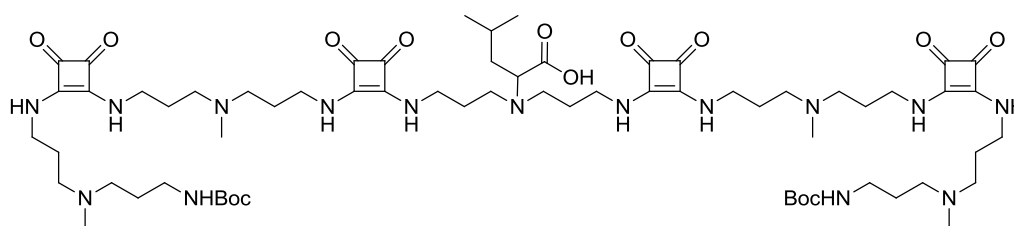
¹H-RMN (300 MHz, D₂O): δ = 0,79 (d, 6H, CH(CH₃)₂), 1,29 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂), 1,45 (m, 3H, CH₂CH(CH₃)₂), 2,38 (m, 4H, CH₂N), 2,55 (t, 4H, CH₂NH₂), 2,97 (s, 1H, NCHCOOH).

Oligoescuaramida-2(N-Leucina) 29:

Se obtiene del mismo modo que la oligoescuaramida **8**, utilizando como reactivos de partida la diamina derivada de la leucina **28**, y el semiéster **6** como módulo de crecimiento. Rdto: 50%

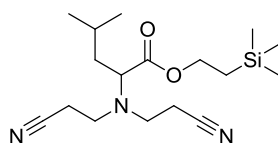
⁵⁴ Burk, M. J.; de Koning, P. D.; Grote, T. M.; Hoekstra, M. S.; Hoge, G.; Jennings, R. A.; Kissel, W. S.; Le, T. V.; Lennon, I. C.; Mulhern, T. A.; Ramsden, J. A.; Wade, R. A.; An Enantioselective Synthesis of (S)-(+)-3-Aminomethyl-5-methylhexanoic Acid via Asymmetric Hydrogenation. *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 5731-5734.

Oligoescuaramida-4(N-Leucina) 30:



Se sintetiza siguiendo el procedimiento habitual de elongación de oligoescuaramidas utilizando como reactivo de partida la oligoescuaramida **29**. Rdto: 70%

(S)-2-([N,N-Bis-(2-cianoetil)]amino)-4-metilpentanoato de 2-(trimetilsilil)etil 33:



La reacción de condensación se lleva a cabo según el procedimiento descrito en la bibliografía con algunas modificaciones.⁵⁵

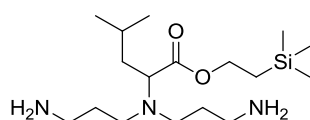
Una mezcla de 1,0 g de **27** (4,2 mmol), 0,747 g de trimetilsilil etanol (TMSE) **32** (6,3 mmol) y 51 mg de DiMAP (0,4 mmol) disueltos en 30 ml de CH₂Cl₂ anhidro, se añaden gota a gota y en atmósfera de argón sobre otra disolución de 1,303 g de DCC (6,3 mmol) en 15 ml de CH₂Cl₂ anhidro, en un baño de agua-hielo y con agitación constante. Acabada la agitación se retira el baño y se deja a temperatura ambiente durante la noche.

El crudo de reacción, en forma de suspensión, se filtra y concentra, obteniendo un crudo que se purifica mediante cromatografía en columna de sílica utilizando como fase móvil un 100% inicial de hexano y variando esta proporción hasta un 70% de hexano en AcOEt.

El producto obtenido se disuelve en EtOH y se concentra a 60 °C y 400 mbar de presión. Se obtiene de esta forma el nitrilo **33** (1,287 g, 3,81 mmol). Rdto: 90%

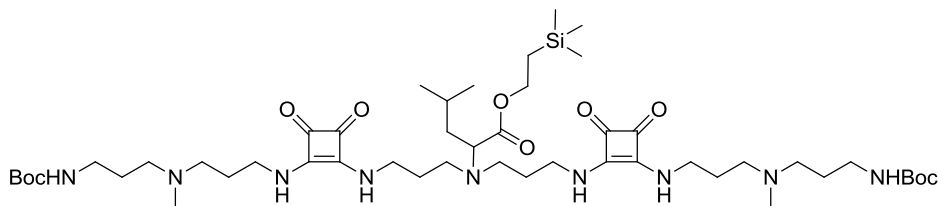
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 0,05 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0,95 (dd, 6H, (CH₃)₂CH), 1,00 (dd, 2H, CH₂Si), 1,58 (m, 2H, CHCH₂CH), 1,78 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 2,48 (t, 4H, (CH₂CH₂)₂N), 3,02 (m, 4H, NCCH₂CH₂), 3,37 (dd, 1H, NCHCOO), 4,19 (dd, 2H, COOCH₂CH₂). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = -1,53, 17,9, 18,6, 22,1, 23,1, 24,8, 39,4, 47,9, 62,2, 63,3, 118,5, 173,4. HRMS (ESI) calc. para 360,2078 (M+Na⁺; C₁₇H₃₁N₃NaO₂Si⁺) encontrado: 360,2083.

⁵⁵ Kai, T.; Sun, X. L.; Faucher, K. M.; Apkarian, R. P.; Chaikof, E. L.; Design and Synthesis of Asymmetric Acyclic Phospholipid Bolaamphiphiles. *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 2606-2615.

(S)-2-([N,N-Bis-(2-aminopropil)]amino)-4-metilpentanoato de 2-(trimetilsilil)etil 34:

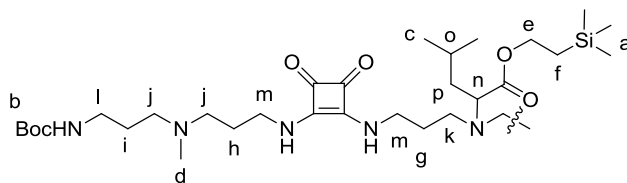
Se utilizan las mismas condiciones que las usadas para la obtención de la amina **28**, utilizando como producto de partida 0,7 g del nitrilo **33** (2,07 mmol), KOH (0,42 ml 10,8 M, 4,6 mmol) y Ni-Raney (1,1 g). El crudo de la reducción se filtra y el filtrado se lava con H₂O y EtOH. Se elimina el etanol de la disolución a presión reducida y la disolución acuosa resultante se lava CH₂Cl₂ (3 x 15 ml). Los extractos orgánicos se lavan posteriormente con una disolución de HCl a pH 3 (3 x 15 ml). Se secan con Na₂SO₄ y al añadir Et₂O precipita el producto. Se aísla el producto **34** por filtración (0,32 g, 0,93 mmol). Rdto: 45%

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 0,04 (s, 9H, Si(CH₃)₃), 0,90 (dd, 6H, (CH₃)₂CH), 0,99 (dd, 2H, CH₂Si), 1,47 (m, 2H, CHCH₂CH), 1,58 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂), 1,65 (m, 1H, (CH₃)₂CH), 2,50 (t, 4H, (CH₂CH₂)₂N), 2,71 (m, 4H, NH₂CH₂), 3,38 (t, 1H, NCHCOO), 4,16 (dd, 2H, COOCH₂CH₂).

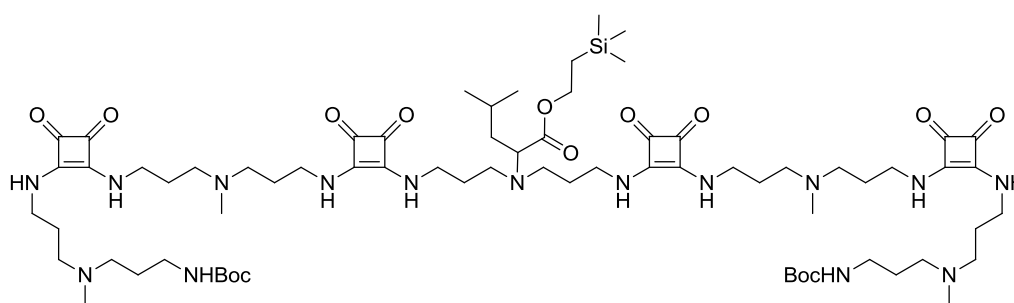
Oligoescuaramida-2(N-Leucina-TMSE) 35:

Este producto se obtiene del mismo modo que la oligoescuaramida **8**, utilizando como productos de partida la diamina derivada de la leucina protegida **34** (0,2 g, 0,7 mmol), y el semiéster **6** como unidad de crecimiento (0,59 g, 1,5 mmol). Rdto: 15%

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 0,04 (2H, CH₃^a), 0,88 (6H, CH₃^c), 1,43 (18H, CH₃^b), 1,6-2,0 (13H, CH₂^g, CH₂^h, CH₂ⁱ, CH^o), 2,2 (6H, CH₃^d), 2,4 (8H, CH₂^j), 2,5 (4H, CH₂^k), 2,8 (2H, CH₂^p), 3,2 (4H, CH₂^l), 3,35 (1H, CHⁿ), 3,8 (8H, CH₂^m), 4,1 (2H, CH₂^e).

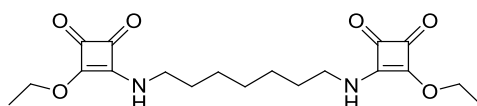


Oligoescuaramida-4(N-Leucina-TMSE) 36:



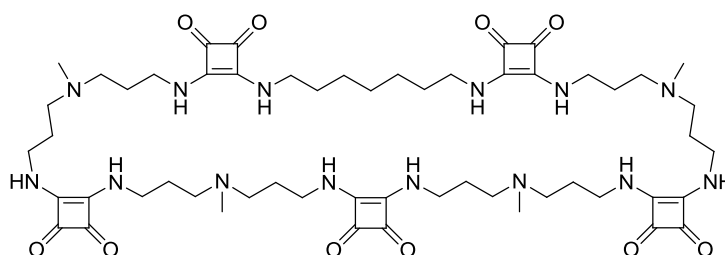
Se sintetiza siguiendo el procedimiento habitual de elongación de oligoescuaramidas utilizando como reactivo de partida la oligoescuaramida **35** (43 mg, 43 μ mol), HCl 5% (0,43 ml, 0,26 mmol) y el módulo de crecimiento **6** (39 mg, 0,1 mmol). Rdto: 33%

3,3'-(1,7-heptandiildiimino)bis[4-etoxi-3-ciclobuten-1,2-diona] (40):



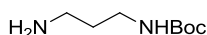
Se obtiene según el procedimiento descrito en la bibliografía.⁴⁸

C5(c₇) 41:



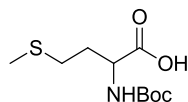
Se sintetiza siguiendo el procedimiento descrito para la oligoescuaramida cíclica **16**, utilizando como productos de partida la oligoescuaramida **9** (0,4 g, x 0,4 mmol) y el diéster **40** (0,15 g, 0,4 mmol). Rdto: 30%

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,27 (m, 6H, NHCH₂CH₂(CH₂)₃), 1,48 (m, 4H, NHCH₂CH₂(CH₂)₃), 1,64 (m, 16H, NCH₂CH₂CH₂N), 2,09 (s, 12H, NCH₃), 2,29 (m, 16H, CH₂NCH₂), 3,48 (m, 20H, CH₂NH(sq)), 7,47 (s, 10H, NH). ¹³C-RMN (75 MHz, D₂O-HCl): δ = 27,9, 32,6, 42,8, 43,9, 47,1, 55,9, 170,4, 170,7, 183,4, 184,1. HRMS (ESI) calc. para 1101,6568 (M+H⁺; C₅₅H₈₅N₁₄O₁₀⁺) encontrado: 1101,6580.

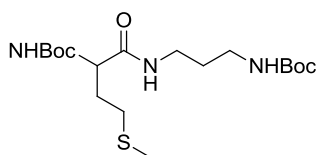
N-terc-butoxicarbonil-1,3-diaminopropano 43:

Se sintetiza según el procedimiento catalítico descrito para la obtención de la diamina monoprottegida con el grupo Boc **4**, utilizando como producto de partida la 1,3-propandiamina **42** (9,1 g, 122 mmol), anhídrido Boc **3** (5,4 g, 24,4 mmol) y ácido sulfámico (0,24 g, 2,4 mmol). Rdto: 90%

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,31$ (br, 2H, NH_2), 1,44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,61 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,76 (t, 2H, NH_2CH_2), 3,21 (q, 2H, CH_2NHBoc), 4,87 (br, 1H, NHBoc). $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 28,6, 33,4, 38,6, 39,8, 79,3, 156,3$.

N-terc-butoxicarbonilmetionina 45:

Sintetizado según el procedimiento descrito en la bibliografía.⁴⁹

2-([N-terc-butoxicarbonil]amino)-N-(3-[N-terc-butoxicarbonil]aminopropil)-4-(metiltio)-butanamida 46:

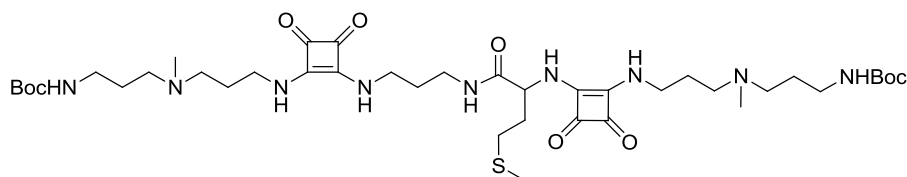
La condensación se ha realizado siguiendo las condiciones descritas para el producto **33**, utilizando como productos de partida el ácido **45** y la amina **43**.

Una disolución de 1,0 g de metionina protegida **45** (4,01 mmol), 0,7 g de diamina monoprottegida **43** (4,02 mmol) y 50 mg de DiMAP (0,41 mmol) disueltos en CH_2Cl_2 anhidro (30 ml) se añade gota a gota sobre otra disolución de 1,076 g de DCC (5,2 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (10 ml) a 0 °C en atmósfera de argón. La mezcla se mantiene a esa temperatura durante 2 horas y posteriormente 12 horas a temperatura ambiente. La solución se filtra y se evapora el disolvente a sequedad. El residuo se suspende en Et_2O (10 ml) y se filtra. La adición de hexano a la disolución de Et_2O resulta en la precipitación de **46** como un sólido blanco (1,138 g, 2,81 mmol). Rdto: 70%

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,44$ (s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,62 (m, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,92 (m, 1H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2,11 (m, 1H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 2,11 (s, 3H, SCH_3), 2,55 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOO}$), 3,15 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3,31 (m, 2H, $\text{CONHCH}_2\text{CH}_2$), 4,20 (m, 1H, NHCHCONH), 4,9 (s, 1H, NHCOO), 5,2 (s, 1H, NHCOO), 6,7 (s, 1H, CONH). $^{13}\text{C-RMN}$ (75

MHz, CDCl₃): δ = 15,4, 15,5, 28,5, 28,6, 30,4, 36,1, 37,1, 66,0, 77,4, 156,6, 157,2, 171,9.
HRMS (ESI) calc. para 428,2195 (M+Na⁺; C₁₈H₃₅N₃NaO₅S⁺) encontrado: 428,2198.

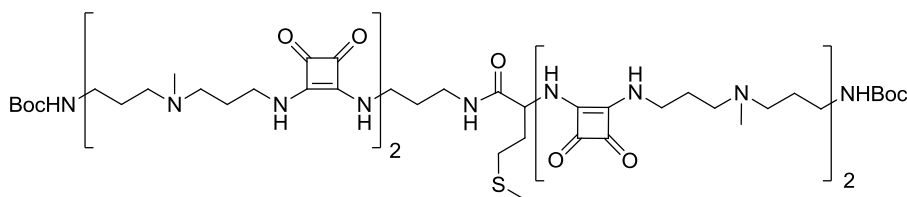
Oligoesquaramida-2(Met-c₃) **48**:



Se obtiene del mismo modo que el oligómero **8**, utilizando como productos de partida la diamina derivada de la metionina **46**, y el semiéster **6** como unidad de crecimiento.

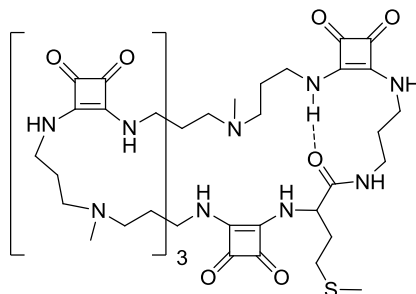
En primer lugar se desprotege la diamina **46**. Para ello, 1,117 g del compuesto **46** (2,05 mmol) se suspenden en una mezcla de H₂O (30 ml) y MeOH (20 ml). Se añade 6,6 ml de HCl 3M hasta la completa disolución del producto (19,8 mmol). La disolución se mantiene a 50 °C durante 2 horas y otras 12 a 40 °C. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se lleva lentamente a pH 9-10 mediante la adición de Na₂CO₃ sólido. El disolvente se concentra a sequedad y el residuo obtenido se disuelve en EtOH (10 ml) y se filtra. Esta disolución se adiciona gota a gota sobre una disolución del módulo de crecimiento **6** (1,59 g, 4,3 mmol) con Na₂CO₃ (2,12 g, 20 mmol) en EtOH (20 ml). La reacción se mantiene en agitación durante 16 horas y posteriormente se concentra el disolvente y el residuo se disuelve en CH₂Cl₂ (20 ml). Esta disolución se lava con H₂O (2 x 10 ml), una disolución acuosa saturada en NaCl (10 ml), y se seca sobre Na₂SO₄. El disolvente se concentra y el sólido resultante se suspende en Et₂O (3 x 20 ml) y se filtra obteniendo una vez acabado el proceso de purificación el oligómero **48** como un sólido amarillo pálido (1,473 g, 1,72 mmol). Rdto: 84%

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 1,42 (s, 18H, C(CH₃)₃), 1,64 (br, 4H, NCH₂CH₂CH₂N), 1,83 (br, 6H, NCH₂CH₂CH₂N), 2,08 (br, 5H, CH₂CH₂SMe + SCH₃), (m, 1H, CHCH₂CH₂S), 2,20 (s, 6H, NCH₃), 2,40-2,56 (br, 8H, CH₂NCH₃, CHCONHCH₂), 3,15 (br, 8H, CH₂NHCO, CH₂CH₂S), 3,71 (br, 6H, CH₂NHCOO), 4,70 (br, 1H, NHCHCONH), 4,9-5,4 (br, 3H, NHCOO), 7,9 (br, 4H, NHCO). ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 15,7, 27,3, 28,6, 30,1, 39,2, 41,9, 43,3, 55,2, 77,3, 156,5, 167,6, 182,6. HRMS (ESI) calc. para 852,5017 (M+H⁺; C₄₀H₇₀N₉O₉S⁺) encontrado: 852,5017.

Oligoescuaramida-4(Met-c₃) 49:

Se sintetiza del mismo modo que el oligómero **48** utilizando como reactivo de partida 1,0 g de la oligoescuaramida **48** (1,17 mmol) y 0,91 g del módulo de crecimiento **6** (2,46 mmol), usando 3,1 ml de HCl 3M (9,4 mmol) para la desprotección de los grupos amino. El producto **49** se obtiene como un sólido blanco (0,758 g, 0,59 mmol). Rdto: 50%

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,33 (s, 18H, C(CH₃)₃), 1,46 (br, 2H, CH₂CH₂S), 1,63 (br, 18H, NCH₂CH₂CH₂N), 2,00 (s, 3H, SCH₃), 2,08 (s, 6H, NCH₃), 2,08 (s, 6H, NCH₃), 2,2-2,3 (br, 20H, (CH₂)₂NCH₃, CH₂NHCOCH, CH₂S), 2,89 (m, 4H, CH₂NHCOO), 3,47 (br, 14H, CH₂NH(sq)), 4,63 (br, 1H, NHCHCONH), 6,76 (br, 3H, CHCONHCH₂ + NHCO), 7,50 (br, 8H, NH(sq)). ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 14,6, 27,0, 28,2, 28,5, 38,2, 41,6, 54,1, 54,1, 54,2, 54,2, 54,6, 77,3, 155,5, 167,8, 182,3. HRMS (ESI) calc. para 1320,747 (M+Na⁺; C₆₂H₁₀₃N₁₅NaO₁₃S⁺) encontrado: 1320,8105.

C5(Met-c₃) 50:

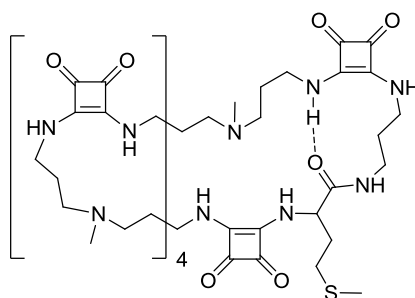
Se obtiene siguiendo el procedimiento descrito para la oligoescuaramida cíclica **16**, utilizando como productos de partida la oligoescuaramida **49** y escuarato de dietilo **1**.

0,314 g del oligómero **49** (0,24 mmol) se disuelve en H₂O (15 ml) con la ayuda de 1,0 ml de HCl 3M (3 mmol). La disolución se mantiene a 50 °C durante 12 horas. Posteriormente se enfría a temperatura ambiente y se lleva a pH 9-10 añadiendo Na₂CO₃ sólido. El disolvente se concentra a sequedad y el residuo se disuelve en EtOH (10 ml) y se filtra. A la disolución se le añaden 106 mg de Na₂CO₃ (1,0 mmol) y 45 mg de escuarato de dietilo **1** (0,26 mmol) disuelto en EtOH (1 ml). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 16 horas y posteriormente el disolvente se evapora a sequedad. El crudo se disuelve en HCl 3M (2 ml) y se añade a la disolución NaOH 1M hasta conseguir un pH 9. El precipitado obtenido se centrifuga, se seca y se lava con

CH_2Cl_2 (5 ml), obteniendo la oligoescuaramida **50** como un sólido de color amarillo pálido (0,1 g, 0,08 mmol). Rdto: 35%

^1H -RMN (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 1,62$ (m, 18+1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 + \text{CHCH}_a\text{H}_b\text{CH}_2\text{S}$), 2,00 (m, 3+1H, $\text{SCH}_3 + \text{CHCH}_a\text{H}_b\text{CH}_2\text{S}$), 2,07 (s, 12H, NCH_3), 2,30 (m, 16, CH_2N), 3,11 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3,48 (m, 18+2H, $\text{CH}_2\text{NH}(\text{sq}) + \text{CH}_2\text{NHCO}$), 4,60 (m, 1H, NHCHCONH), 8,12 (m, 6H, NH). ^{13}C -RMN (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 17,7, 31,6, 32,0, 33,9, 39,0, 44,6, 57,2, 58,0, 171,0, 185,3$. HRMS (ESI) calc. para 1198,6166 ($\text{M}+\text{Na}^+$; $\text{C}_{56}\text{H}_{85}\text{N}_{15}\text{NaO}_{11}\text{S}^+$) encontrado: 1198,6171.

C6(met-c3) **51**:



Se obtiene siguiendo el procedimiento descrito para la oligoescuaramida cíclica **50**, utilizando como productos de partida 0,4 g de la oligoescuaramida **49** (0,31 mmol) disuelta en MeOH, y 133 mg del diéster **5** (0,34 mmol). La purificación del sólido resultante se realiza lavándolo con THF (2 x 5 ml) y acetona (2 x 5 ml), obteniendo la oligoescuaramida **51** como un sólido amarillo pálido (0,176 g, 0,13 mmol). Rdto: 41%

^1H -RMN (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 1,63$ (m, 22+1H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2 + \text{CHCH}_a\text{H}_b\text{CH}_2\text{S}$), 1,99 (m, 3+1H, $\text{SCH}_3 + \text{CHCH}_a\text{H}_b\text{CH}_2\text{S}$), 2,09 (s, 15H, NCH_3), 2,29 (m, 20H, CH_2N), 3,12 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$), 3,48 (m, 22+2H, $\text{CH}_2\text{NH}(\text{sq}) + \text{CH}_2\text{NHCO}$), 4,61 (m, 1H, NHCHCONH), 7,42 (m, 13H, NH). ^{13}C -RMN (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}+\text{HCl}$): $\delta = 16,9, 28,0, 31,8, 39,2, 42,7, 43,8, 55,9, 170,7, 175,3, 184,3$. HRMS (ESI) calc. para 1399,7667 ($\text{M}+\text{H}^+$; $\text{C}_{67}\text{H}_{103}\text{N}_{18}\text{O}_{13}\text{S}^+$) encontrado: 1399,7673.

2.7.2 Tests de viabilidad

Los cultivos celulares de la línea Jeko-1 utilizados se mantienen en medio RPMI 1640, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor y 100 unidades/ml de penicilina/estreptomina. La suspensión celular al principio de los experimentos contiene aproximadamente 4×10^5 células/ml, realizando las diluciones oportunas cuando es necesario. Las condiciones estándar de incubación de las células son de una temperatura de 37 °C y un 5% de CO₂, utilizando para mantener estas condiciones un incubador automatizado.

Las pruebas de viabilidad se han realizado con las oligoescuaramidas cíclicas derivadas de la unidad escuaramida. Para todas ellas se prepararon disoluciones no inferiores a 100 mM en DMSO a las que se adicionó el mismo número de equivalentes de HCl como nitrógenos terciarios contiene la estructura. De esta forma se prepararon in situ las correspondientes sales amónicas de las oligoescuaramidas, lo que permite aumentar su solubilidad en medios acuosos. A partir de estas disoluciones se han realizado diluciones 1:10 en DMSO, obteniendo disoluciones a una concentración 10 mM. A partir de éstas, se ha tratado 1 ml de células en suspensión a una concentración 10 µM de oligoescuaramida cíclica (1 µl de disolución 10 mM). Todos los ensayos se han realizado por triplicado. Las células se incubaron con el compuesto evaluado durante 48 o 72 horas según el ensayo realizado. Una vez finalizado el periodo de incubación, la viabilidad celular de cada muestra se ha obtenido mediante ensayos de cuantificación de ATP, utilizando el kit kuminiscente Cell Titer-Glo (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Para ello se traspasan 100 µl de cada cultivo a una placa ELISA de 96 pozos por triplicado. En cada muestra se añaden 100 µl de la disolución de Promega y se realizan a continuación las medidas de luminiscencia por triplicado, asegurando de esta manera la estabilidad de la señal. Esta lectura se realiza mediante un lector de placas "Plate Chameleon™ 425-104 Multilabel Counter" de Hidex. Los valores de luminiscencia son referenciados respecto a las muestras sin tratar, obteniendo de esta forma un tanto por ciento que corresponde a la viabilidad.

En todos los ensayos realizados se ha introducido la menor cantidad de DMSO posible en los cultivos celulares, oscilando ésta entre un 0,05 y un 0,2%. Se ha comprobado que la incorporación de DMSO al medio celular no tiene ningún efecto tóxico para las células hasta una concentración superior al 1%, proporción que resulta dependiente de la línea celular utilizada. Para corroborar la ausencia de toxicidad de la matriz, se realizó un control donde se añadió al cultivo celular 1 µl de una disolución de DMSO (0,1% v/v) con una concentración de HCl 10 µM, resultando inocua para las células incubadas durante las 48 horas de realización de los ensayos de toxicidad.

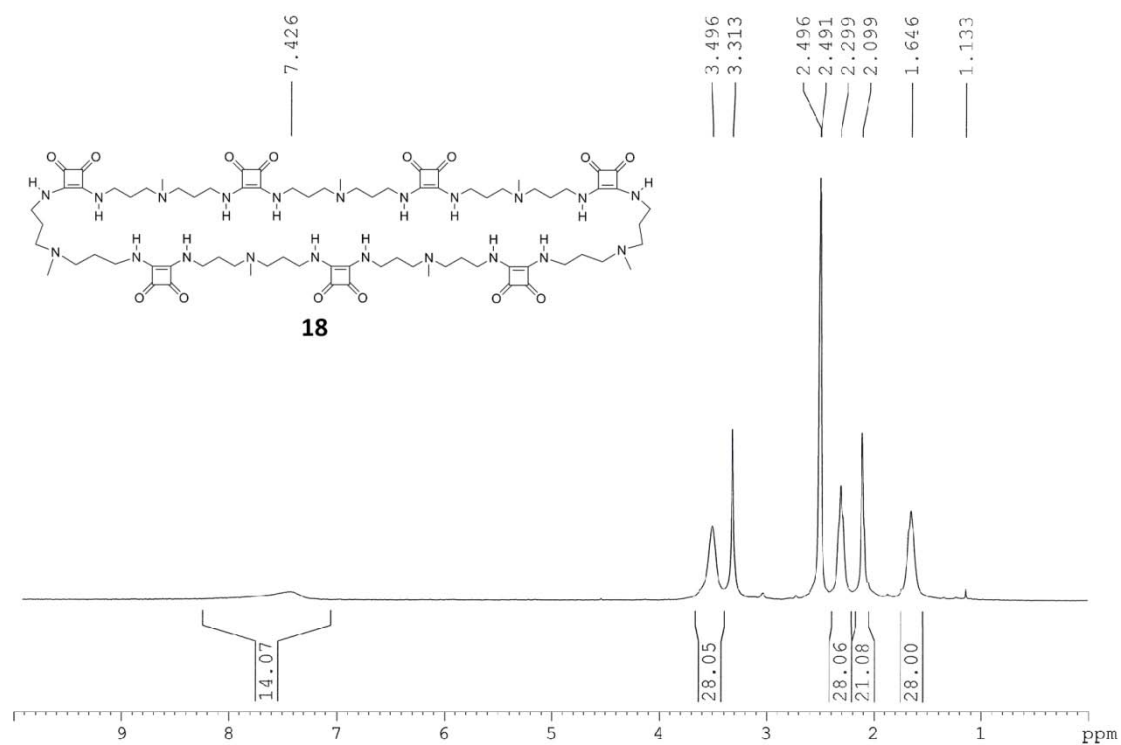
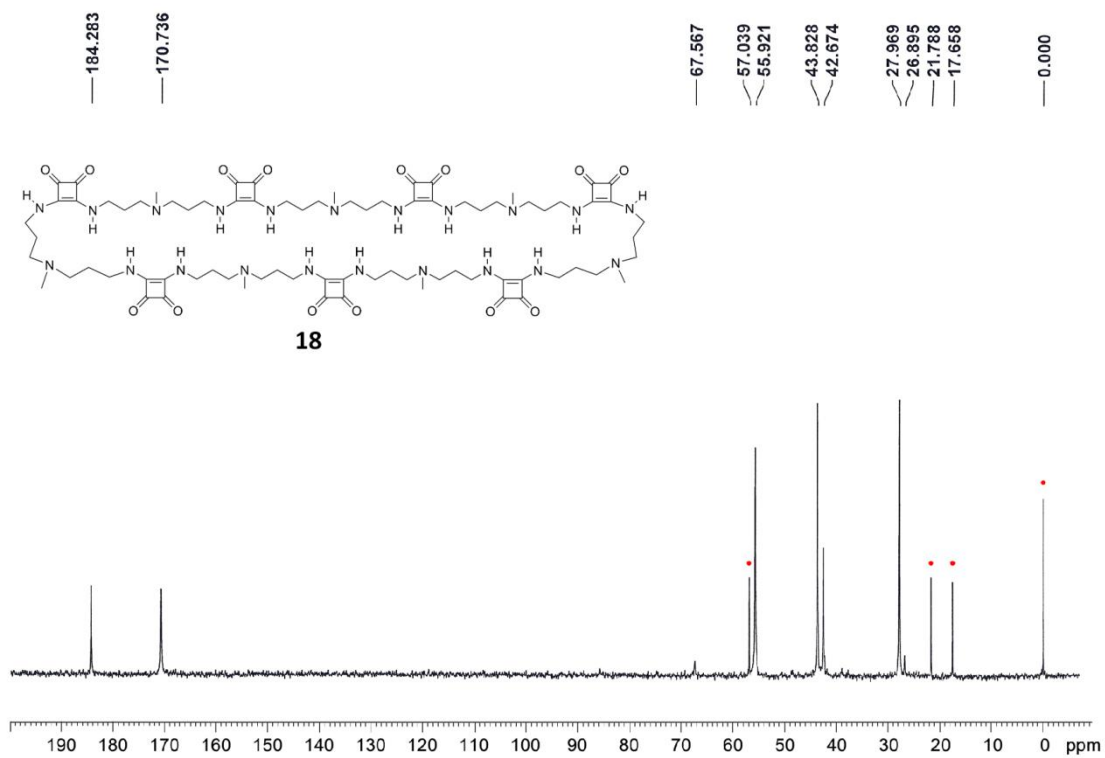
2.7.3 Ensayos de IC₅₀

A partir de las disoluciones madre obtenidas para realizar los tests de viabilidad se han realizado diluciones en DMSO para obtener disoluciones con concentración 10 mM, 2 mM, 0,2 mM y 0,02 mM.

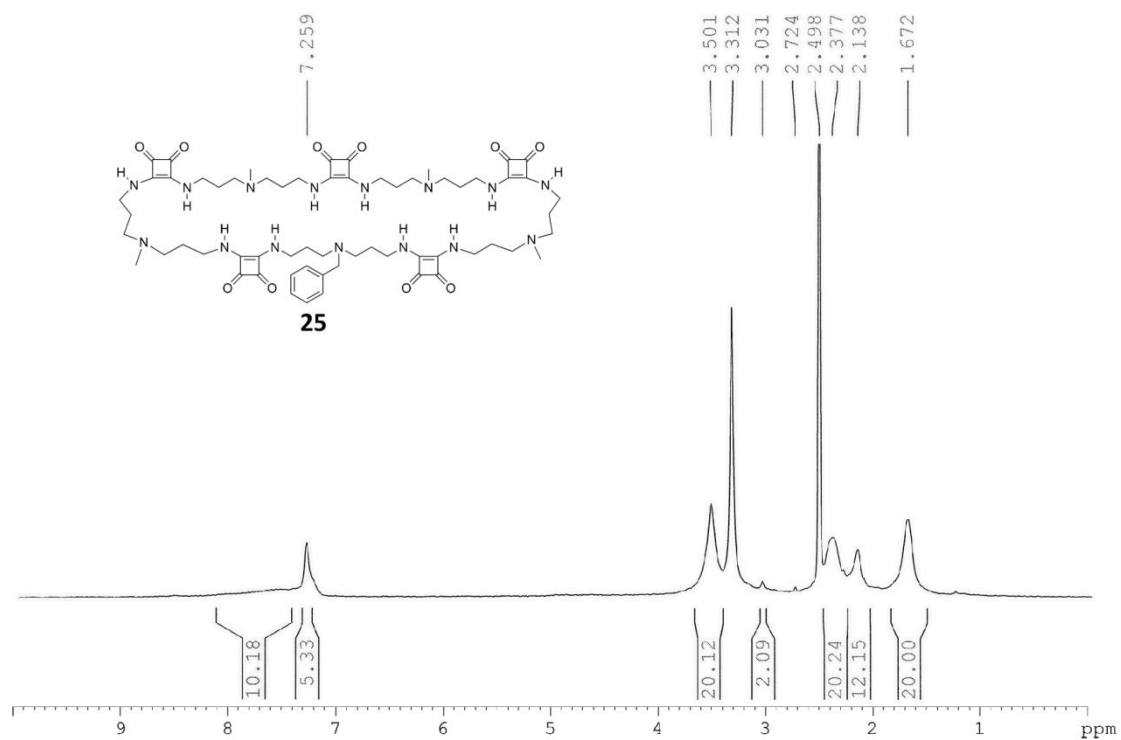
A partir de estas disoluciones se han tratado los cultivos celulares (1 ml, 4×10^5 células/ml) con las cantidades necesarias para obtener hasta diez condiciones diferentes en un rango de concentraciones comprendido entre 0,01 y 200 μ M de la oligoesquaramida correspondiente.

Después de una incubación durante 48 horas se ha procedido a la determinación de la viabilidad mediante el kit de cuantificación luminiscente Cell Titer-Glo según el procedimiento descrito para realizar los tests de viabilidad. El tratamiento de los datos se ha realizado con el software GraphPad Prism v.5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) utilizando un modelo de inhibición sigmoïdal de pendiente variable.

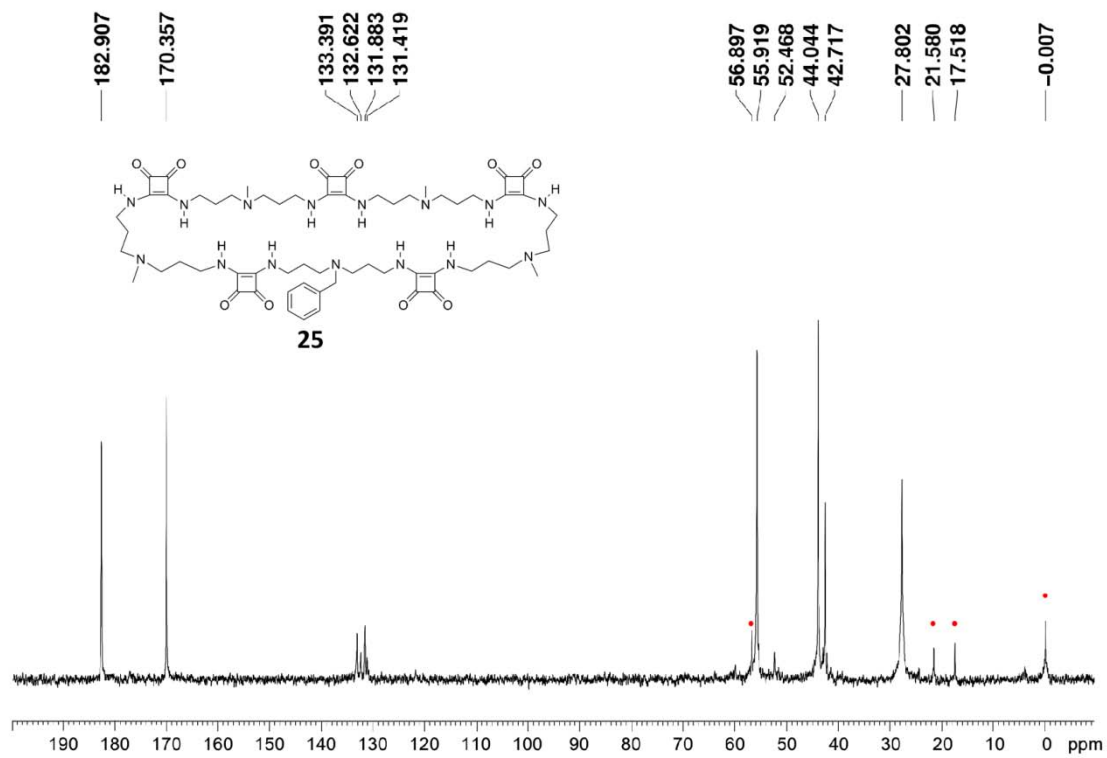
2.8 Colección de espectros de RMN de los productos relevantes

 ^1H -RMN **18** (DMSO- d_6) ^{13}C -RMN **18** (D $_2$ O-HCl + DSS •)

^1H -RMN **25** (DMSO- d_6)

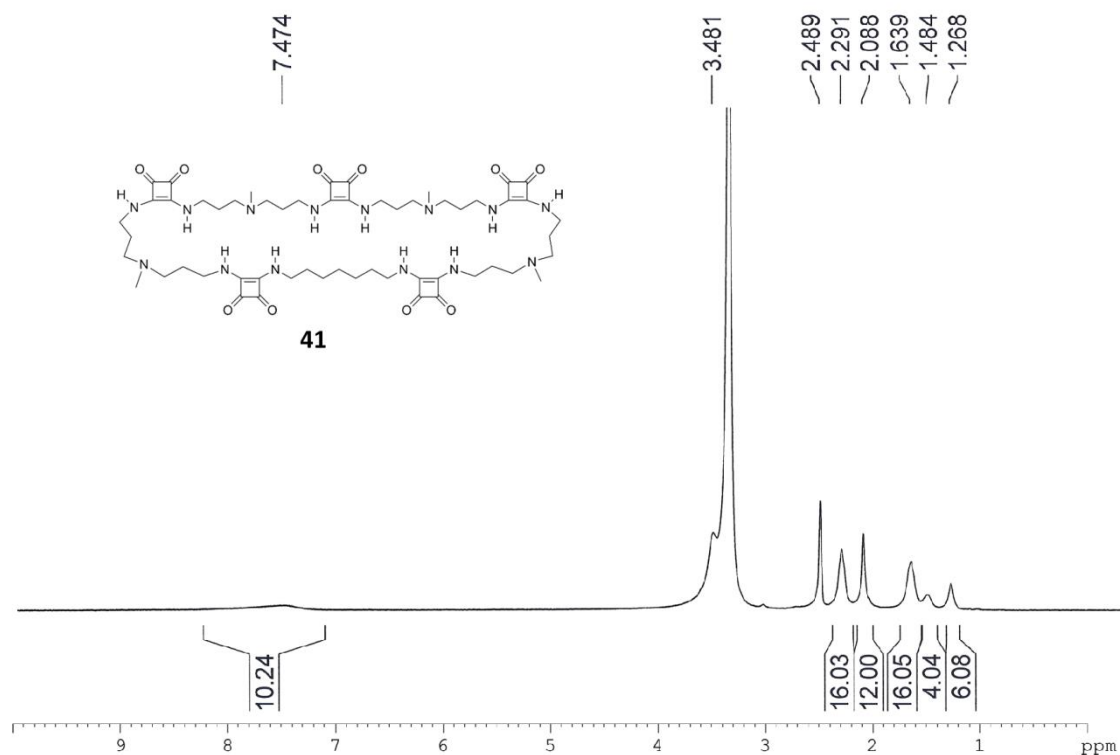


^{13}C -RMN **25** (D $_2$ O-HCl + DSS •)

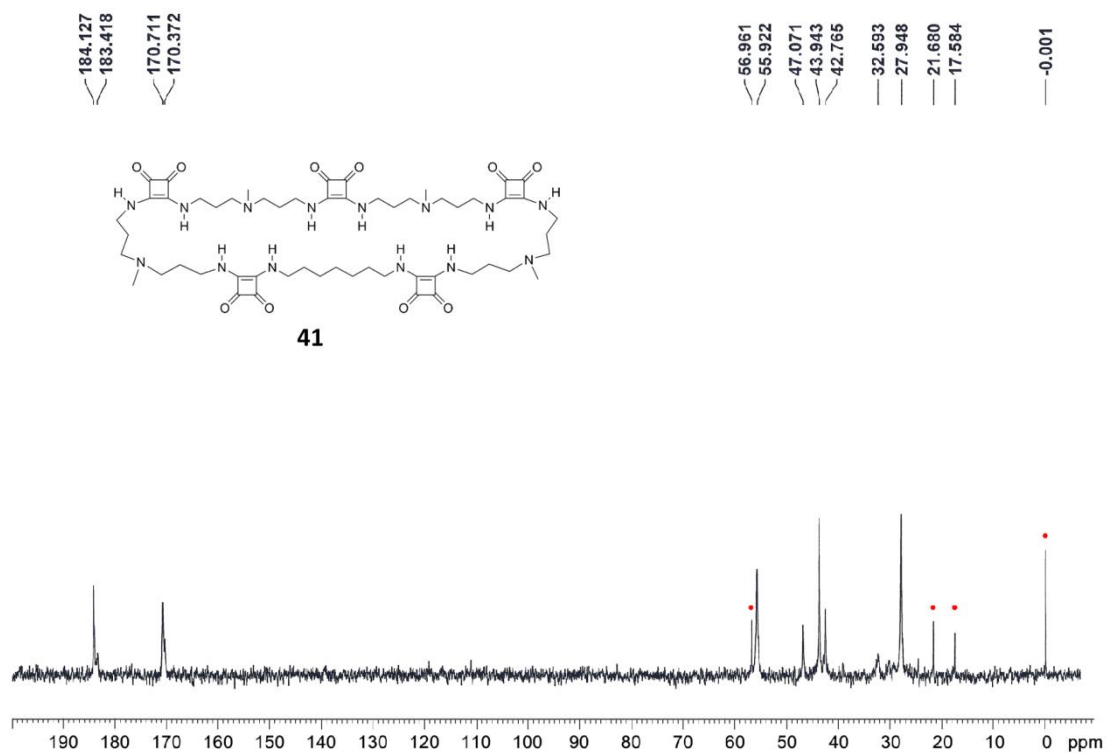


2. Diseño, síntesis y evaluación biológica de oligoescuaramidas cíclicas

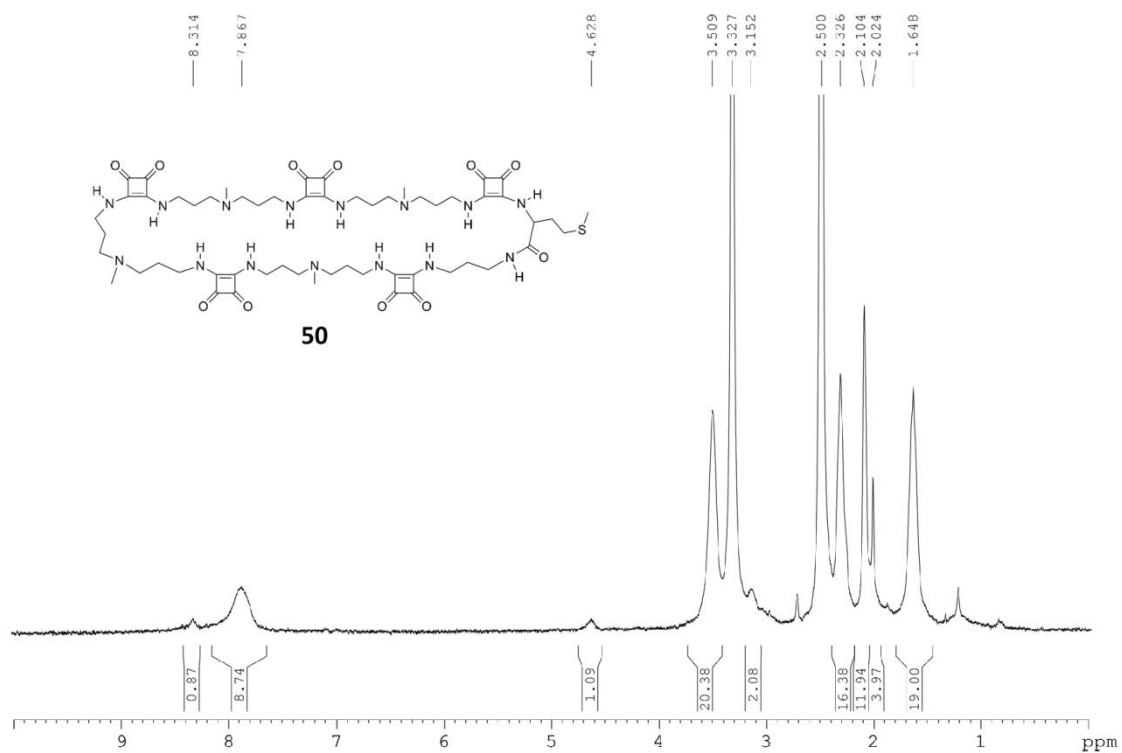
^1H -RMN **41** (DMSO- d_6)



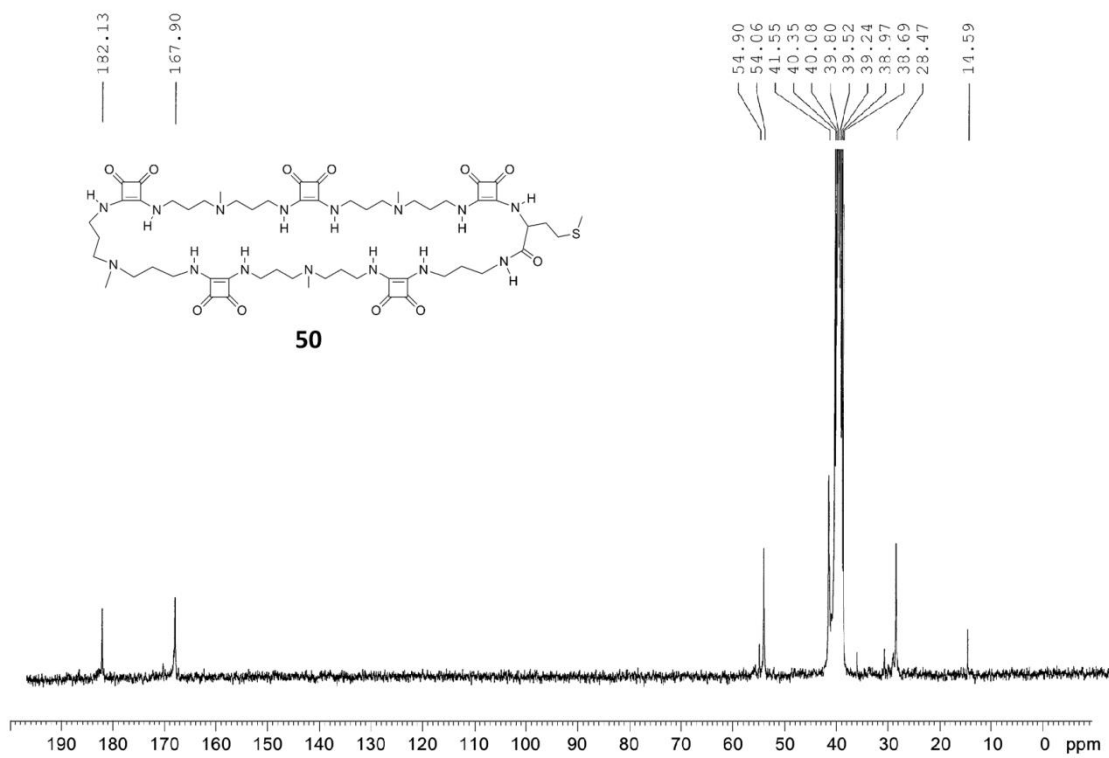
^{13}C -RMN **41** (D_2O -HCl + DSS •)



¹H-RMN **50** (DMSO-d₆)

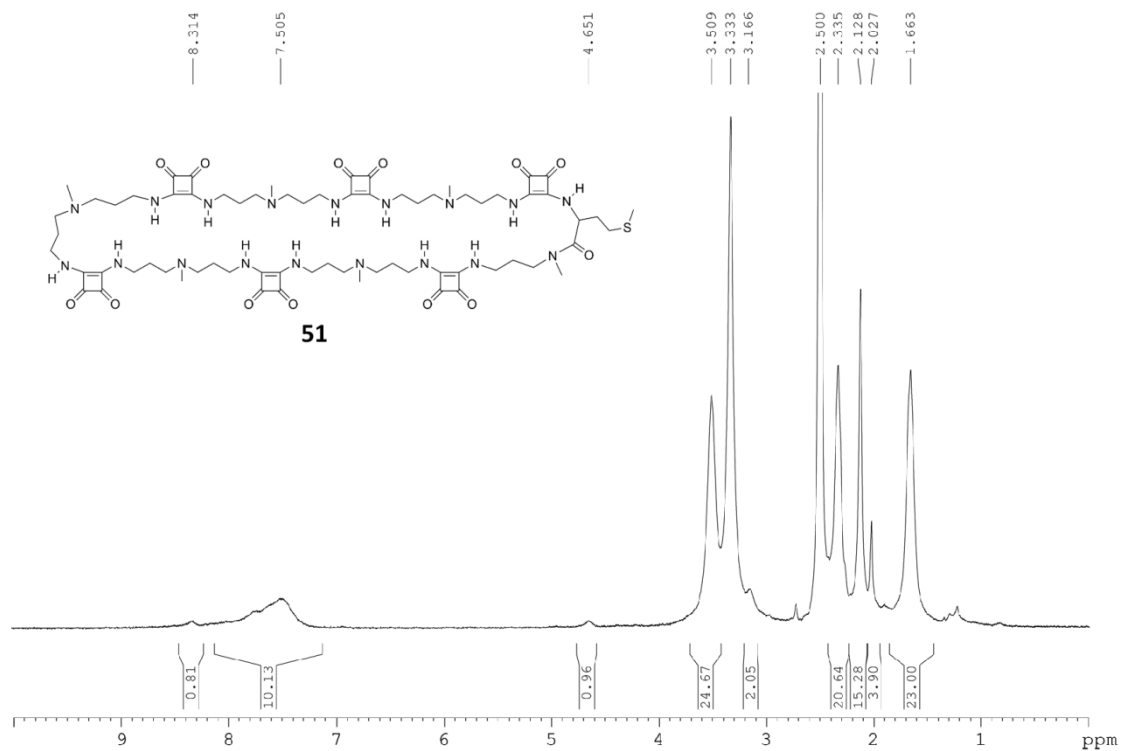


¹³C-RMN **50** (DMSO-d₆)

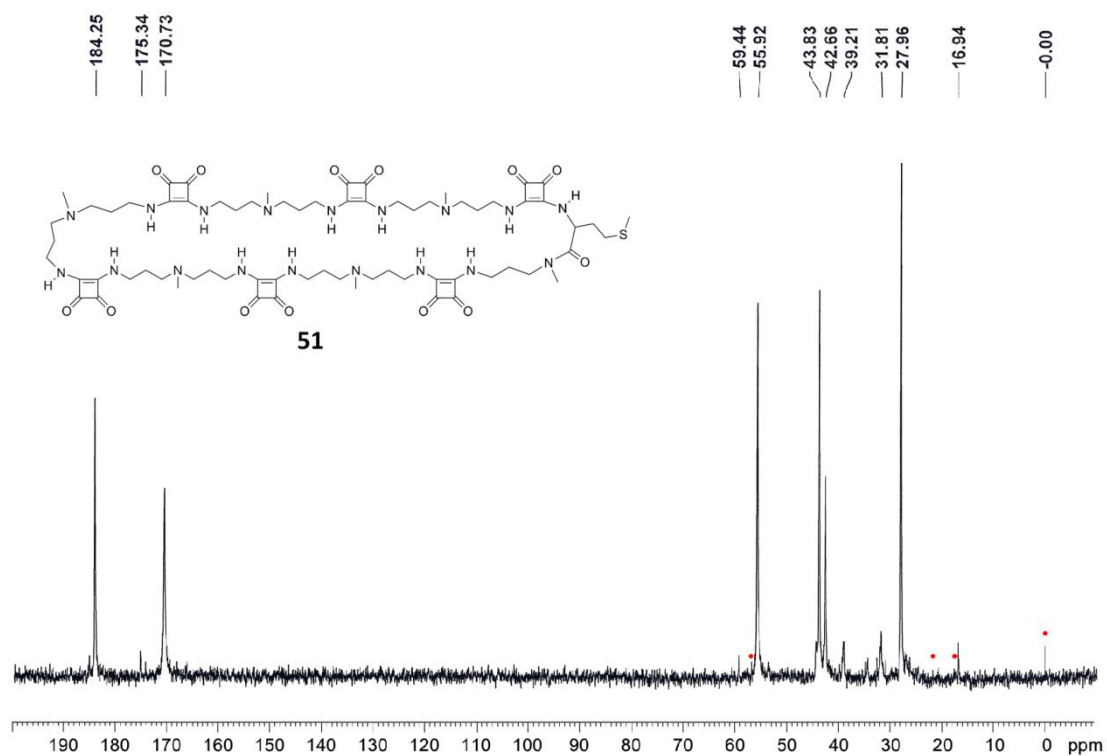


¹H-RMN **51** (DMSO-d₆)

2. Diseño, síntesis y evaluación biológica de oligoescuaramidas cíclicas



¹³C-RMN 51 (D₂O-HCl + DSS •)



Publicación derivada de este capítulo:

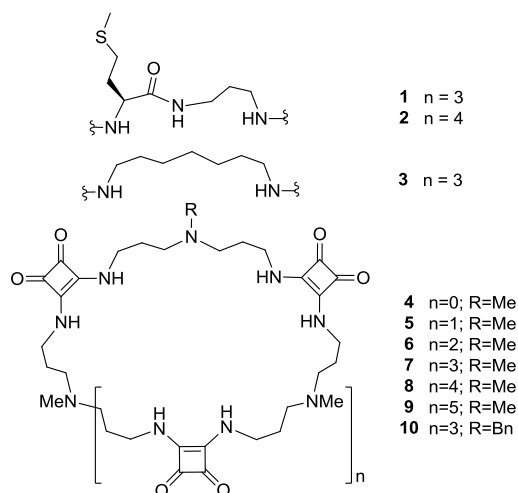
“Cyclosquaramides as Kinase Inhibitors with Anticancer Activity”

Priam Villalonga, Silvia Fernández de Mattos, Guillem Ramis, Antònia Obrador-Hevia, Angel Sampedro, Carmen Rotger, and Antoni Costa.

ChemMedChem **2007**, *7*, 1472-1480.

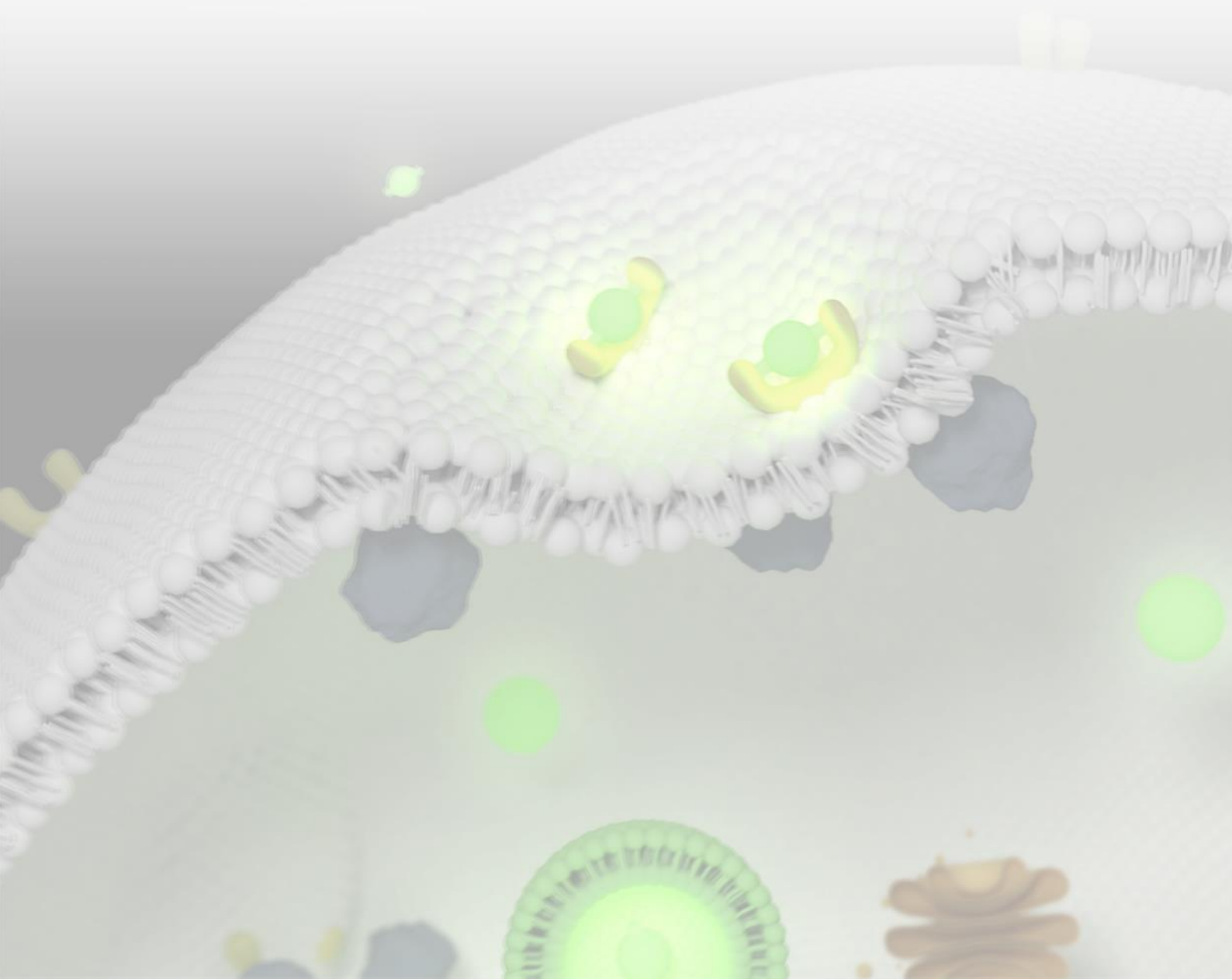
Abstract

We report the synthesis and biological evaluation of a new series of oligosquaramide-based macrocycles as anticancer agents. Compound **7**, considered as representative of this series, exhibited significant antiproliferative activity against the NCI-60 human tumor cell line panel, with IC_{50} values ranging from 1 to 10 μ M. The results show that sensitivity to cyclosquaramides is clearly dependent on cell type, underscoring a degree of biological selectivity. The observed antiproliferative effects appear to be related to deregulation of protein phosphorylation, as compounds **7** and **8** are effective inhibitors of several important kinases such as ABL1, CDK4, CHK1, PKC, c-MET, and FGFR, among others. The corresponding acyclic oligosquaramides and smaller cyclosquaramides did not show antitumor activity, suggesting that a macrocyclic structure with minimal molecular size plays a key role in the observed antitumor activity.



CAPÍTULO 3

SONDAS MOLECULARES FLUORESCENTES



3.1 Introducción

La elucidación de los diferentes procesos metabólicos y cambios estructurales que tienen lugar en las células ha sido objeto de investigación durante las últimas décadas. El conocimiento que aportan estos estudios permite, por ejemplo, el diseño de fármacos más específicos o la detección de desórdenes en el metabolismo.

Para llevar a cabo este tipo de estudios es necesario la localización espacial de determinados compuestos como pueden ser metabolitos, iones, proteínas o secuencias de nucleótidos. No menos importante es su cuantificación, estudio de su transporte o su evolución a lo largo del tiempo. Para ello, se recurre al uso de los llamados marcadores celulares o sondas. Generalmente, se trata de compuestos capaces de unirse de forma específica covalentemente o mediante interacciones supramoleculares a los compuestos objetivo y de emitir una señal para su detección, cuantificación y seguimiento. Dicha señal puede seguirse mediante diferentes técnicas instrumentales como la microscopía de fluorescencia o la autoradiografía, dependiendo del tipo de marcadores utilizados. En general podemos agrupar los marcadores más utilizados en dos categorías: luminiscentes y radioactivos.

3.2 Marcadores celulares

Los marcadores radioactivos se basan en el uso de radioisótopos como el ^3H (tritio)⁵⁶ o el ^{32}P . Esta técnica, desarrollada en la década de 1930 y que le valió el premio Nobel de Química a George de Hevesy en 1943, proporciona métodos robustos y reproducibles en aplicaciones que requieren mucha sensibilidad y/o resolución. La técnica aplicada a los estudios biológicos consiste primero en el dopaje con los marcadores radioactivos, como pueden ser el nucleósido ^3H -timidina o nucleótidos marcados con ^{32}P en el caso de marcadores de ADN/ARN. Posteriormente a su administración, las sondas se incorporan al metabolismo de la célula, pudiendo realizar una exposición de la señal sobre un film sensible a la señal radioactiva o bien sobre pantallas de fósforo, obteniendo la distribución del marcador en la célula. Sin embargo, a pesar de sus ventajas, su aplicación se está limitando, debido principalmente a las medidas de seguridad y el coste necesarios para su manipulación, así como para el deshecho de los residuos. Otro inconveniente a tener en cuenta es el breve tiempo de vida media de estos marcajes.⁵⁷

El segundo tipo de marcadores son los luminiscentes. La luminiscencia se consigue mediante la excitación electrónica a un estado excitado de un compuesto y su posterior relajación al estado fundamental, liberando en este proceso fotones. Se

⁵⁶ Koehler, J. K.; Mühlethaler, K.; Freywyssling, A.; An Improved Technique for Producing Thin Films and Its Application to ^3H -Thymidine-Labeled Maize Nuclei. *J. Cell Biol.*, **1963**, 16, 73-80.

⁵⁷ Osborn, J.; A review of radioactive and non-radioactive-based techniques used in life science applications – Part I: Blotting techniques. *Life Science News*, **2000**, 6, Amersham Biosciences, 1-4.

puede subclasificar la luminiscencia en función de la naturaleza de la energía que provoca la excitación, como la quimioluminiscencia⁵⁸ o la fotoluminiscencia entre muchas otras opciones.

La quimioluminiscencia consiste en una emisión de fotones generados a partir de una reacción química, donde uno de los productos se obtiene en un estado excitado que al relajarse provoca la emisión. Su principal ventaja es que presenta una muy buena sensibilidad. Habitualmente requiere de un catalizador o activador, dando una respuesta muy rápida y breve en el tiempo. Estas características hacen que la técnica sea muy adecuada para aplicaciones rápidas que requieren una alta sensibilidad, como por ejemplo los ensayos de viabilidad llevados a cabo en el capítulo anterior. Sin embargo, son totalmente desaconsejadas para aquellas donde se requiere precisamente que la respuesta sea estable en el tiempo, como por ejemplo la microscopía.⁵⁹

La fotoluminiscencia engloba aquellos procesos por los cuales la emisión de fotones se genera a partir de una excitación anterior, provocada también por fotones, pudiendo diferenciar la fluorescencia y la fosforescencia en función de la duración de la emisión.

De estas, la técnica fotoluminiscente que más está evolucionando en los últimos años para el marcaje en sistemas biológicos es la fluorescencia. El mayor avance en este campo ha sido, principalmente, la mejora en la calidad de la instrumentación, con más resolución espacial y mayor capacidad de manipulación y análisis.⁶⁰ Un ejemplo de este hecho es la concesión del premio Nobel de Química en el año 2014 a los investigadores E. Betzig, S. W. Hell y W. E. Moerner, por sus avances en el campo de la microscopía de fluorescencia. Esto ha permitido desarrollar aplicaciones como la detección de la interacción entre proteínas, acumulación de metabolitos específicos en determinados órganos o la localización espacial de diferentes orgánulos celulares mediante anticuerpos específicos.^{57,61} Además, nuevos procesos sintéticos, así como el uso de nuevos núcleos fluorescentes, permiten la modulación de las propiedades espectroscópicas de éstos para adaptarse a las condiciones particulares de cada aplicación.⁶²

Un último tipo de marcadores, aunque menos utilizados, son las sondas colorimétricas. Éstas acostumbran a aprovechar determinadas cualidades de las células para provocar cambios en el espectro de absorción de las sustancias, permitiendo cuantificar la

⁵⁸ CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay – Technical Bulletin. Promega Corporation.

⁵⁹ Dodeigne, C.; Thunus, L.; Lejeune, R.; Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta*, **2000**, 51, 415-439.

⁶⁰ Lukinavičius G.; Johnsson, K.; Fluorescence microscopy: Strategic blinking. *Nature Chem.*, **2014**, 6, 663-664.

⁶¹ Loudet, A.; Burgess, K.; BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties. *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 4891-4932.

⁶² Lavis, L. D.; Raines, R. T.; Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.*, **2008**, 3, 142-155.

sustancia que provoca la señal. Un ejemplo de este tipo de sondas es la publicada por W. Lu y colaboradores (Fig. 44).⁶³

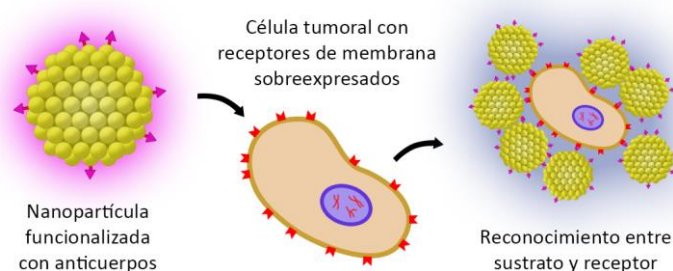
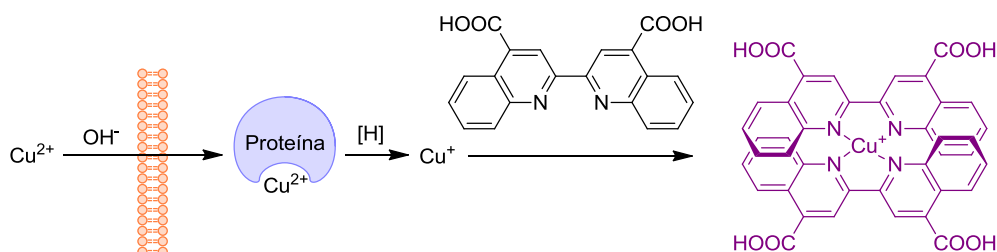


Figura 44 – Representación gráfica de las nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos específicos. La interacción resultante provoca un cambio en la coloración de la disolución de violeta a azul.⁶³

En este caso nanopartículas funcionalizadas con anticuerpos sobreexpresados en una línea tumoral específica permite detectar un cambio de intensidad del color al interaccionar la nanopartícula con el receptor de membrana.



Esquema 34 – Funcionamiento del kit de ensayo de proteínas BCA, mediante la adición de una disolución básica de Cu^{2+} y ácido bicinconónico.⁶⁴

Otra alternativa a este tipo de ensayos colorimétricos es la que proporciona el kit de ensayo de proteínas BCA (Ácido Bicinconónico) (Esquema 34).⁶⁴ En este caso una disolución básica de Cu^{2+} es internalizada en la célula formándose un complejo entre el Cu^{2+} y las proteínas, seguido de una reducción de este Cu^{2+} a Cu^+ por parte de determinados residuos de aminoácidos como cisteína, cistina, triptófano o tirosina. En estas condiciones el BCA forma un complejo de color morado con el Cu^+ , pudiendo detectar mediante colorimetría la cantidad de proteína presente en función de la intensidad de la señal.

Los ejemplos mencionados permiten detectar y, en ocasiones, cuantificar una determinada variable, células tumorales en un caso o proteína total en el segundo, sin embargo esta técnica no permite obtener una distribución espacial del analito marcado en la célula, por lo que no se pueden catalogar como sondas.

⁶³ Lu, W.; Arumugam, S. R.; Senapati, D.; Singh, A. K.; Arbnesi, T.; Afrin, S.; Yu, K. H.; Ray, P. C.; Multifunctional Oval Shape Gold Nanoparticle Based Selective Detection of Breast Cancer Cells Using Simple Colorimetric and Highly Sensitive Two-Photon Scattering Assay. *ACS Nano*, **2010**, 4, 1739-1749.

⁶⁴ B9643 Technical Bulletin. Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA.

3.3 Fluorescencia

Como se ha comentado anteriormente, la fluorescencia consiste en una emisión de fotones, del orden de milisegundos, provenientes de la energía desprendida por la transición de electrones de un estado excitado a un estado fundamental, consiguiendo este estado excitado mediante la absorción de fotones.

Desde un punto de vista electrónico la fluorescencia se representan en un diagrama de Jablonski (Fig. 45).

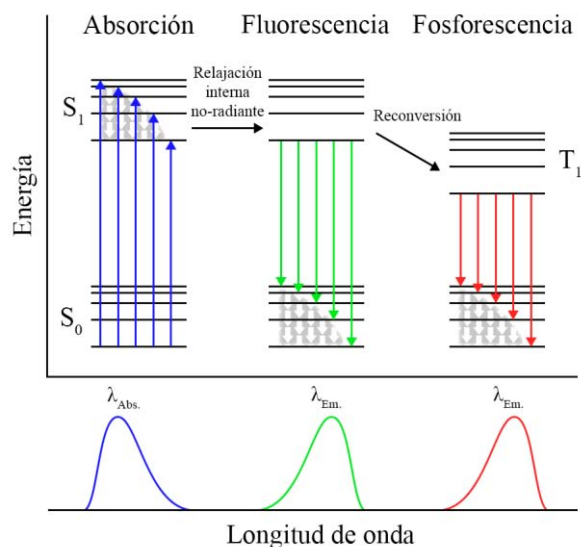


Figura 45 – Diagrama de Jablonski donde se representan las principales transiciones energéticas que dan lugar a la fluorescencia y fosforescencia.

Partiendo del estado fundamental singlete S_0 , y mediante la absorción de energía electromagnética, un electrón es excitado a un estado energético singlete, S_1 .

En casos favorables, el espín del electrón excitado es de sentido contrario al situado en el orbital S_0 . De este modo, la relajación del electrón se puede producir en cuestión de nanosegundos, liberando en este proceso un fotón de longitud de onda de energía igual a la diferencia energética entre ambos orbitales.

Un proceso relacionado con la fluorescencia es el proceso de fosforescencia. Comparten el principio físico y en muchas ocasiones coexisten. En este caso, el electrón excitado en S_1 sufre un proceso de conversión interna a un estado triplete T_1 , con la misma orientación de espín que S_0 . De esta forma la relajación rápida no está permitida, dando lugar a un proceso lento, que abarca desde milisegundos a varios segundos de duración, y liberando igualmente fotones en este proceso, de una longitud de onda aún menor que en el caso de la fluorescencia.

Como se puede observar en el diagrama anterior, la energía del proceso de excitación será mayor o en su caso extremo igual, a la del proceso de relajación, lo que se traduce

en una longitud de onda mayor para la emisión. Esta diferencia energética es lo que define el desplazamiento de Stokes, característico de cada fluoróforo y correspondiente a la diferencia entre los máximos de las bandas de absorción y emisión.

Existen procesos competitivos que pueden disminuir la población del nivel excitado, tales como “quenching”,⁶⁵ el efecto FRET (Förster Resonance Energy Transfer), o la fosforescencia sin ir más lejos, los cuales disminuyen o inhiben totalmente la fluorescencia.

3.3.1 Quenching

El término “quenching” define cualquier proceso que disminuye la intensidad de fluorescencia de una muestra. Se pueden diferenciar entre procesos dinámicos y estáticos (Fig. 46).

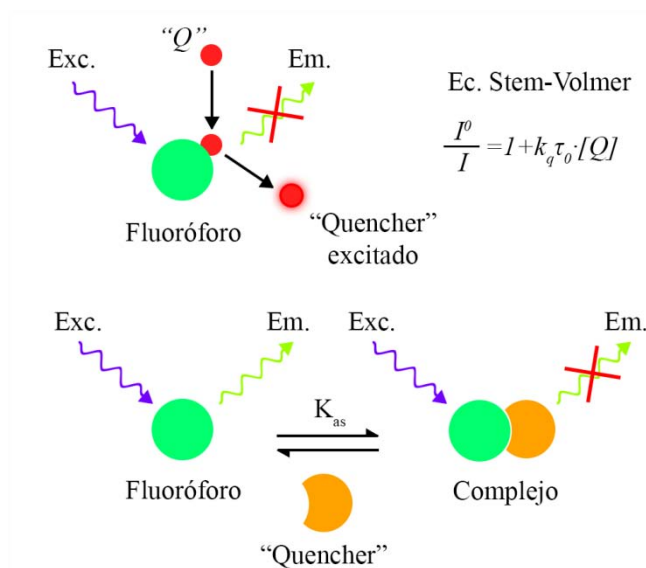


Figura 46 – Representación esquemática de los procesos de “quenching” dinámico y ecuación de Stem-Volmer (arriba) y “quenching” estático (abajo).

Los procesos dinámicos corresponden al “quenching” por colisión. Esto ocurre cuando un fluoróforo excitado colisiona contra un átomo o molécula que puede facilitar la transición al estado fundamental de una forma no radiante. Este efecto es proporcional a la concentración de “quencher” según la ecuación de Stem-Volmer, que relaciona el cociente entre la intensidad de fluorescencia en presencia (I) o ausencia (I^0) de “quencher”, el tiempo de vida de la emisión (τ_0), y el coeficiente de actividad (k_q)

⁶⁵ El término quenching, de origen inglés, se puede traducir al español como extinción o apagamiento. Sin embargo, con el fin de preservar el significado que ya tiene esta palabra en nuestro idioma y evitar confusión, se usará en su forma inglesa.

y concentración ($[Q]$) del “quencher”. Algunos ejemplos de sustancias que pueden provocar este efecto son el oxígeno (O_2), el ion yoduro (I^-) o la acrilamida.

Cuando en lugar de una colisión se establece un complejo entre dos moléculas en el cual el estado fundamental no es fluorescente se está hablando de “quenching” estático. La magnitud del efecto responde a la constante de asociación del complejo y lo que se produce es una disminución en el número de moléculas disponibles para el proceso de fluorescencia.

Además de estos procesos, existen otros factores que pueden derivar en un “quenching” aparente, denominados efectos de filtro interno y esquematizados en las figuras 47 y 48.⁶⁶

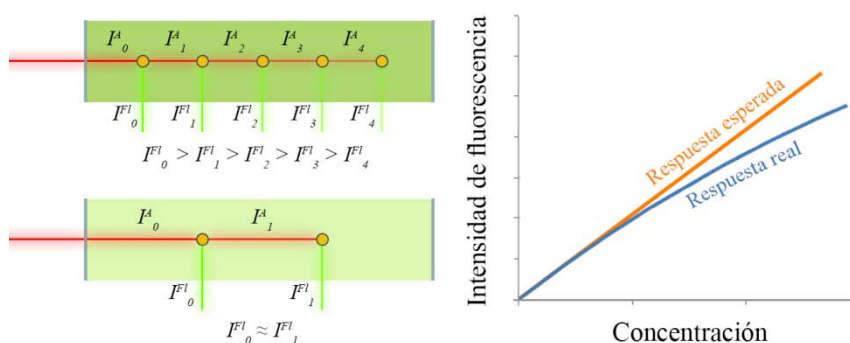


Figura 47 - Efectos de filtro interno debidos a la concentración de la muestra.

Los efectos de filtro interno pueden deberse a la concentración de forma que a medida que la radiación de excitación (señalada en rojo en la figura anterior) atraviesa una muestra concentrada, ésta va perdiendo intensidad debido a la absorción del propio fluoróforo, observándose una menor emisión en el punto más alejado de la fuente. Al utilizar disoluciones diluidas, esta disminución de la fluorescencia en función de la distancia a la fuente es mucho menor, observándose una respuesta prácticamente lineal.

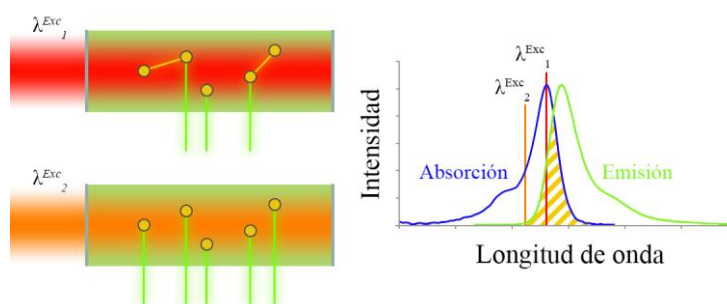


Figura 48 – Representación del efecto que produce un desplazamiento de Stokes muy pequeño.

⁶⁶ Parker, C. A.; Rees, W. T.; Correction of fluorescence spectra and measurement of fluorescence quantum efficiency. *Analyst*, **1960**, 85, 587-600.

Cuando se utilizan fluoróforos con un desplazamiento de Stokes muy pequeño puede darse otro efecto de filtro interno. En este caso, como se muestra en la figura 48, la excitación de la muestra a una longitud de onda 1 (rojo), y que se corresponde con el máximo de absorción, provoca la emisión de fotones con la particularidad de que en la banda de emisión está incluida la longitud de onda de excitación 1, debido al solapamiento de las bandas de excitación y emisión (zona rayada del espectro). En este caso la respuesta observada es, en la mayoría de los casos, menor a la esperada. Sin embargo, al excitar a una longitud de onda de excitación 2, de mayor energía que 1, y fuera de la zona de solapamiento, los fotones emitidos no corresponden a esta longitud de onda de excitación, provocando la señal esperada.

Los procesos de “quenching” implican una reducción de la intensidad de fluorescencia observada, sin embargo este efecto puede ser beneficioso. Las aplicaciones que ha tenido el proceso de transferencia de energía por resonancia de Förster, FRET (Förster Resonance Energy Transfer), es un ejemplo de ello (Fig. 49), permitiendo el estudio de interacciones supramoleculares temporal y espacialmente mediante el uso de un fluoróforo y un “quencher” estático o bien de dos fluoróforos.^{67, 68, 69}

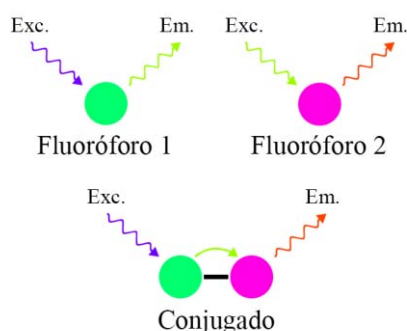


Figura 49 – Proceso FRET entre dos fluoróforos diferentes.

En el caso del proceso FRET entre dos fluoróforos, existe una transferencia de energía del estado excitado del fluoróforo 1 al fluoróforo 2, al coincidir la energía de la emisión del fluoróforo 1 con la de absorción del fluoróforo 2, provocando por tanto una emisión de este segundo fluoróforo. Este efecto depende en gran medida de la distancia entre los fluoróforos, que debe ser entre 2 y 9 nanómetros, por lo que deben estar unidos covalentemente o interaccionando con un mismo sustrato.

Un último tipo de “quenching” es la transferencia electrónica fotoinducida, PET (de sus siglas en inglés, Photoinduced Electron Transfer). En este proceso existe una

⁶⁷ Lakowicz, J. R.; Principles of Fluorescence Spectroscopy. Second Edition. Kluwer Academic/Plenum Publishers, **1999**.

⁶⁸ Berney, C.; Danuser, G.; FRET or No FRET: A Quantitative Comparison. *Biophys. J.*, **2003**, 84, 3992-4010.

⁶⁹ Hildebrandt, L. L.; Preus, S.; Zhang, Z.; Voigt, N. V.; Gothelf, K. V.; Birkedal, V.; Single Molecule FRET Analysis of the 11 Discrete Steps of a DNA Actuator. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 8957-8962.

transferencia de electrones de un donador a un aceptor, afectando a los niveles energéticos encargados de la fluorescencia. Este efecto es sensible a la distancia y es el que se puede observar en las escuaramidas. El anillo escuaramídico se comporta como donador, sobrepoblando los niveles energéticos del fluoróforo.⁷⁰

3.3.2 Rendimiento cuántico

Un parámetro importante de la fluorescencia es la efectividad del proceso, lo que se denomina rendimiento cuántico. Se representa por la letra griega phi mayúscula (Φ) y se define como la proporción entre el número de moléculas que emiten un fotón después de ser excitadas directamente por la fuente.⁷¹

Este parámetro, característico de cada fluoróforo en unas condiciones determinadas, puede utilizarse para la determinación de la sensibilidad de métodos de análisis fluorimétricos o la determinación de la pureza de una muestra entre otras aplicaciones.⁷¹ Actualmente, el rendimiento cuántico se usa como una medida de la eficiencia de procesos luminiscentes, bien sea en sondas fluorescentes, láseres,⁷² células fotovoltaicas⁷³ o puntos cuánticos.⁷⁴

El rendimiento cuántico abarca valores entre 0 y 1, asignándose el valor 0 cuando no se observa fluorescencia y 1 cuando cada fotón absorbido por una molécula se convierte en otro fotón.

El cálculo de este valor no es algo trivial y debido a las limitaciones técnicas de la instrumentación común, tales como la ausencia de una señal de referencia constante, se suele recurrir al cálculo mediante comparación con otra sustancia de rendimiento cuántico conocido, llamada estándar (Fig. 50).⁶⁶

⁷⁰ Prohens, R.; Martorell, G.; Ballester, P.; Costa, A.; A squaramide fluorescent ensemble for monitoring sulfate in water. *Chem. Commun.*, **2001**, 1456-1457.

⁷¹ Demas, J. N.; Crosby, G. A.; The measurement of Photoluminescence Quantum Yields. A review. *J. Phys. Chem.*, **1971**, 75, 991-1024.

⁷² Kumari, S.; Sahare, P. D.; Photoluminescence studies of stilbene laser dye incorporated mesoporous silica nanoparticle (MSN) with sulphur dioxide. *J. Porous Mater.*, **2014**, 21, 45-52.

⁷³ Park, S. H.; Roy, A.; Beaupré, S.; Cho, S.; Coates, N.; Moon, J. S.; Moses, D.; Leclerc, M.; Lee, K.; Heeger, A. J.; Bulk heterojunction solar cells with internal quantum efficiency approaching 100%. *Nature Photonics*, **2009**, 3, 297-302.

⁷⁴ Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. A.; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, A. M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S.; Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science*, **2005**, 307, 538-544.

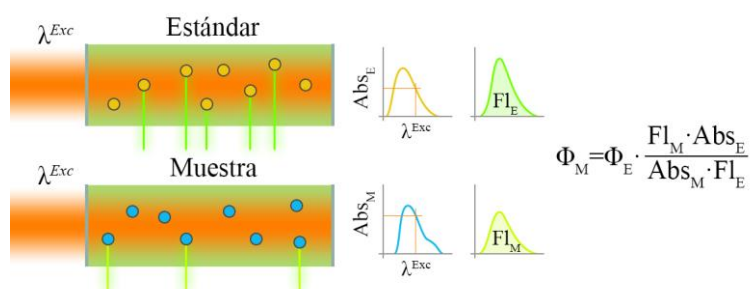


Figura 50 - Obtención del rendimiento cuántico por comparación con un estándar de valor conocido.

Para ello, el estándar, con un rendimiento cuántico conocido en unas condiciones determinadas, y la muestra, se excitan a una longitud de onda determinada, obteniendo los espectros de emisión. Al relacionar la energía absorbida por ambas sustancias y la energía emitida se puede obtener el rendimiento cuántico de la muestra.

El proceso de fluorescencia depende en gran medida de variables como el disolvente, la concentración o la temperatura, además de la longitud de onda de excitación, por tanto, para definir correctamente un rendimiento cuántico, esta información adicional debe estar indicada para poder caracterizar la sustancia.

3.3.3 Ventajas y aplicaciones de la fluorescencia en sistemas biológicos

Al haber descartado las técnicas radiológicas por motivos de coste y seguridad, se puede plantear la comparación entre la fluorescencia y la absorción de luz. La principal ventaja que presenta la primera sobre la segunda radica en la propia técnica. Mientras que la espectrometría de absorción mide la disminución en la intensidad de un haz de luz respecto a una referencia, la fluorescencia detecta la luz respecto a un fondo ausente de ésta, consiguiendo de esta forma un aumento notable en el límite de detección, pudiendo llegar en condiciones favorables de fluorescencia a concentraciones entre 10^{-8} y 10^{-10} M.⁶⁷

La cuantificación de la fluorescencia se debe realizar mediante la realización de rectas de calibrado ya que al contrario que la absorbancia, el valor absoluto obtenido depende únicamente del instrumento y de la lámpara utilizadas. De este modo, no se pueden fijar unos valores de fluorescencia específicos para una determinada sustancia a una concentración dada, haciendo necesario el término de rendimiento cuántico explicado anteriormente.

La fluorescencia ha ido ganando importancia en aplicaciones clínicas, biológicas o ambientales gracias a su capacidad para aportar protocolos rápidos y de bajo coste. Gracias a la fluorescencia, en la segunda mitad de la década de los 80 se desarrollaron

aplicaciones tan importantes en la biología como la secuenciación de ADN,⁷⁵ el marcaje de geles de electroforesis o inmunoensayos fluorescentes, también denominada inmunofluorescencia.⁷⁶

La combinación de técnicas de señalización específicas en sistemas biológicos y el aumento de sensibilidad que se puede conseguir con la fluorescencia, han impulsado el uso de técnicas como la microscopía confocal de fluorescencia. Esta técnica óptica es apropiada para incrementar la nitidez y contraste de una micrografía mediante el uso de un sistema de lentes y filtros que elimina de la imagen proyectada la zona fuera de foco. Si bien la técnica no es aplicable únicamente a fluorescencia, es con ésta con quien ha obtenido su mayor aplicación en el ámbito de la investigación.⁷⁷

3.4 Sondas moleculares fluorescentes

El término sonda fluorescente se refiere a una molécula que absorbe luz de una longitud de onda específica y que emite luz, típicamente a mayor longitud de onda, y que se utiliza para estudiar muestras biológicas. Los fluoróforos pueden enlazarse o conjugarse a otra molécula o resto molecular no fluorescente cuya misión es la de dirigir al fluoróforo hacia su destino en el caso de sondas biológicas, o bien la encargada del reconocimiento en el caso de sondas puramente analíticas.

Las sondas fluorescentes se pueden clasificar en función del núcleo fluorescente que contienen.

3.4.1 Clasificación de fluoróforos

Desde el punto de vista bioquímico, se puede establecer una primera clasificación general en fluoróforos intrínsecos y extrínsecos.

Los fluoróforos intrínsecos son aquellos que se encuentran naturalmente en los sistemas vivos, tales como cadenas laterales de aminoácidos (por ejemplo triptófano o fenilalanina), cofactores enzimáticos (flavinas o NADH), o las clorofilas entre otros (Fig. 51).

⁷⁵ Smith, L. M.; Sanders, J. Z.; Kaiser, R. J.; Hughes, P.; Dodd, C.; Connell, C. R.; Heiner, C.; Kent, S. B. H.; Hood, L. E.; Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, **1986**, 321, 674-679.

⁷⁶ Hicks, J. M.; Fluorescence immunoassay. *Hum. Pathol.*, **1984**, 15, 112-116.

⁷⁷ Boyde, A.; Bibliography on Confocal Microscopy and Its Applications. *Scanning*, **1994**, 16, 33-56.

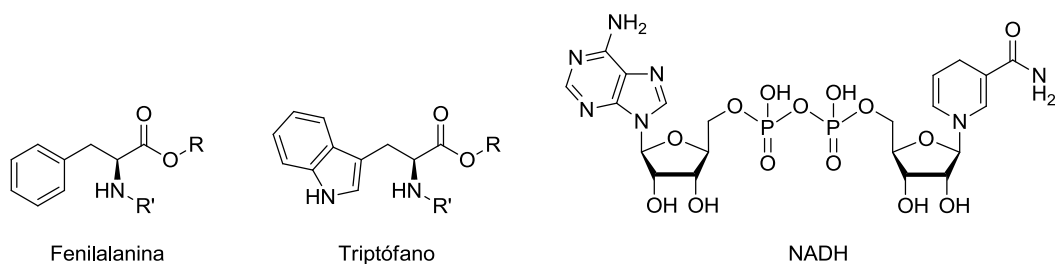


Figura 51 - Fluoróforos intrínsecos.

Los residuos de los aminoácidos de triptófano y tirosina son los principales responsables de la fluorescencia en las proteínas. Sin embargo, ésta se ve disminuida debido a la interacción con otras cadenas peptídicas. En cuanto a sus aplicaciones, la fluorescencia del triptófano se ha utilizado para identificar cambios conformacionales en proteínas⁷⁸ o la interacción con ligandos debido a la dependencia de ésta en función del medio en el que se encuentra.⁷⁹

El grupo de fluoróforos con más interés químico es el de los fluoróforos extrínsecos, aquellos que no están presentes de forma natural en los organismos, tales como fluoresceínas o BODIPYs entre otros. Estos permiten estudiar procesos o estructuras que no presentan fluorescencia intrínseca, como lípidos, o bien aquellos en los cuales la fluorescencia intrínseca no es adecuada, como el ADN, con un rendimiento cuántico extremadamente bajo.⁸⁰

La elección del núcleo fluorescente depende de las propiedades que se quieran observar, como por ejemplo la variación del pH, la longitud de onda de excitación-emisión, o las posibilidades de derivatización.

Para dar una idea de la diversidad existente en este aspecto, Molecular Probes ofrece un amplio catálogo con más de 3000 referencias de marcaje celular, donde se alternan tanto los fluoróforos como las diferentes estrategias de marcaje específicas para grupos funcionales, moléculas, proteínas u orgánulos celulares entre otros.⁸¹

⁷⁸ Hansen, S. B.; Radic, Z.; Talley, T. T.; Molles, B. E.; Deerinck, T.; Tsigelny, I.; Taylor, P.; Tryptophan Fluorescence Reveals Conformational Changes in the Acetylcholine Binding Protein. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 41299-41302.

⁷⁹ Bian, Q.; Liu, J.; Tian, J.; Hu, Z.; Binding of genistein to human serum albumin demonstrated using tryptophan fluorescence quenching. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2004**, 35, 333-337.

⁸⁰ Markovitsi, D.; Gustavsson, T.; Talbot, F.; Excited states and energy transfer among DNA bases in double helices. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2007**, 6, 717-724.

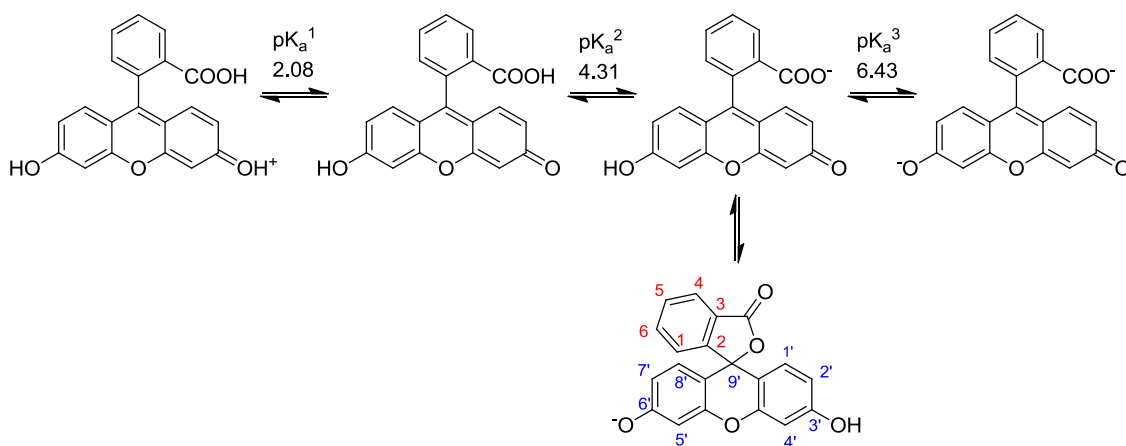
⁸¹ Johnson, I.; Spence, M. T. Z.; *The Molecular Probes® Handbook – A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. 11th Ed. Molecular Probes Inc., Eugene, OR. **2010**.

3.4.2 Derivatización de fluoróforos

Un fluoróforo requiere de ciertos grupos funcionales que le permitan unirse covalentemente a la molécula que se desea marcar de forma fluorescente. Por ello es necesario obtener derivados funcionalizados de los núcleos fluorescentes. Este proceso se denomina derivatización. La derivatización también permite modular sus propiedades para hacerlo más adecuado a la aplicación deseada. A continuación se describen, a modo de ejemplo, dos fluoróforos muy comunes y diferentes estrategias que se han seguido para obtener derivados.

3.4.2.1 Fluoresceína

El grupo de las fluoresceínas abarca multitud de compuestos que se caracterizan por poseer una estructura tipo xanteno, sustituida en las posiciones 3' y 6' por dos alcoholes y en la posición 9' por un grupo fenilo sustituido a su vez en la posición 3 por un ácido carboxílico capaz de formar una lactona con la posición 9' del xanteno. La fluoresceína presenta tres pK_a , 2,08, 4,31 y 6,43, que corresponden a cuatro estados de ionización diferentes, desde la forma dianiónica a la forma catiónica en función del pH del medio. El estado de ionización más importante desde el punto de vista fotoquímico es una estructura doblemente aniónica responsable de la fluorescencia característica (Esquema 35). En este estado, en medio NaOH 0,1 M, el coeficiente de extinción molar (ϵ) a 492 nm es de $76900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, y el rendimiento cuántico de 0,93.⁸²



Esquema 35 - Equilibrios ácido-base de la fluoresceína en función del pH y numeración de su estructura.

La fluoresceína presenta un máximo de absorción a 492 nm y su rendimiento cuántico es próximo a 1 a pH superiores a 8. El máximo de emisión se sitúa en los 517 nm y dado que el máximo de excitación/absorción está a 492 nm, el desplazamiento de Stokes es de 25 nm.

⁸² Sjöback, R.; Nygren, J.; Kubista, M.; Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim Acta A*, **1995**, 51, 7-21.

A pesar de sus cualidades fluorescentes la fluoresceína, presenta tres inconvenientes. (1) Experimenta una fotodegradación muy acusada; (2) es un fluoróforo cuyas propiedades espectroscópicas dependen del pH de la disolución. Con un pK_a de 6,4, a pH fisiológico existe una gran proporción de fluoresceína que se encuentra en su forma monoaniónica, con una fluorescencia mucho menor ($\Phi = 0,37$), restando sensibilidad a los ensayos. Por último (3), la conjugación del fluoróforo con proteínas conlleva un “quenching” notable respecto al fluoróforo libre, que se incrementa a medida que la relación proteína-fluoróforo aumenta.⁸³

A pesar de los inconvenientes mencionados, algunos derivados de la fluoresceína siguen siendo muy usados como reactivos de derivatización en citología e inmunofluorescencia. Desde un punto de vista químico la fluoresceína es particularmente apropiada para formar conjugados con péptidos, proteínas, nucleótidos, oligonucleótidos, drogas, hormonas, lípidos, y otras biomoléculas.^{84,81}

Las modificaciones más habituales que se suelen realizar en el anillo de fluoresceína se introducen ya en los reactivos previos a la obtención del anillo de xanteno. De esta forma, se obtienen principalmente derivados sustituidos en las posiciones 2', 7', 5 y 6. Las sustituciones en el anillo de xanteno acostumbran a modificar las propiedades espectroscópicas (Fig. 52), mientras que las realizadas en el anillo de benceno suelen deberse a fines de derivatización, usualmente obteniendo en esas posiciones un grupo carboxílico o su versión activada en forma de éster de succinimida, lo que da lugar a la 5(6)-carboxifluoresceína, o un residuo de isotiocianato, lo que generará la correspondiente tiourea al reaccionar con aminas libres.

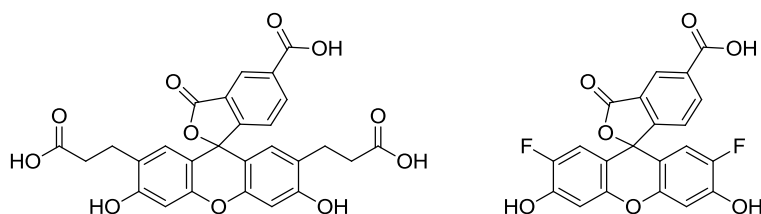


Figura 52 – Izquierda: BCECF. La longitud de onda de emisión de este fluoróforo depende del pH de la disolución, sin disminuir notablemente la fluorescencia en medios ácidos. La comparación con patrones externos permite obtener un valor de pH en función de su espectro de emisión. Derecha: Oregon Green 488. Presenta un pK_a de 4,8 para el grupo fenólico, lo que hace su fluorescencia insensible a los cambios de pH fisiológicos habituales. Presenta una gran resistencia a la fotodegradación.

En la bibliografía se pueden encontrar multitud de ejemplos del uso de sondas moleculares con núcleos de fluoresceína y sus derivados para muy diversas aplicaciones.⁸⁴

⁸³ Sun, W. C.; Gee, K. R.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P.; Synthesis of Fluorinated Fluoresceins. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 6469-6475.

⁸⁴ Haugland, R. P.; Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 6th Ed. Molecular Probes Inc., Eugene, OR. **1996**.

El primer ejemplo que se detalla es la monitorización de la dinámica del calcio citoplasmático.⁸⁵ Para ello un derivado de la fluoresceína, en concreto el fluoróforo 2-metil TokyoMagenta, se conjuga con un quelante específico de Ca^{2+} , BAPTA, obteniendo un conjugado fluorescente en presencia de Ca^{2+} , con una ratio de activación de 16:1. Esta sonda se ha utilizado para obtener un mapa del citoplasma celular donde queda reflejada la concentración de Ca^{2+} en función de la intensidad de fluorescencia (Fig. 53).

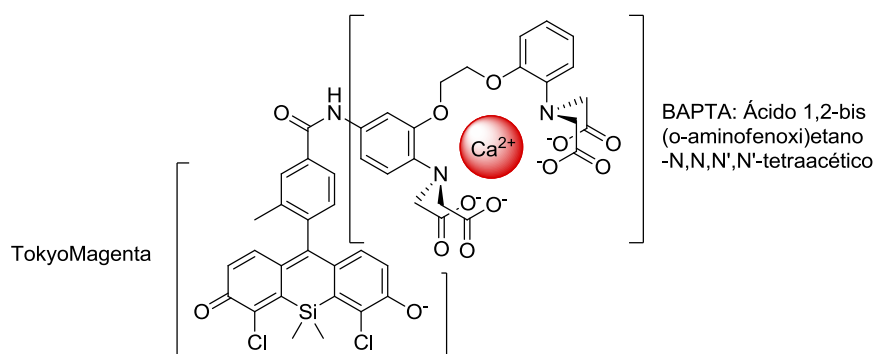


Figura 53 – Estructura de la sonda de Ca^{2+} obtenida por T. Egawa y colaboradores.⁸⁵

Otro ejemplo de aplicación de sondas fluorescentes en sistemas biológicos con núcleos de fluoresceína es el presentado por Nishijima y colaboradores al estudiar la permeabilización celular de poliamidas en función de su tamaño.⁸⁶ En este caso, a partir de la FITC (fluoresceína 5-isotiocianato), mediante el acoplamiento del grupo isotiocianato con un grupo amino de la poliamida se obtiene el polímero marcado. La intensidad de la fluorescencia intracelular medida mediante citometría de flujo permite valorar la efectividad de la internalización (Fig. 54).

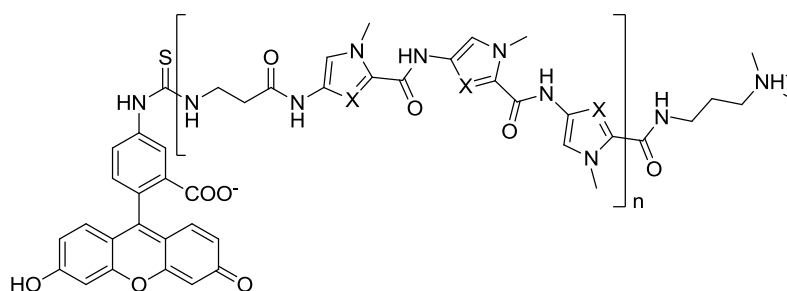


Figura 54 – Estructura modelo de las poliaminas utilizadas por S. Nishijima y colaboradores. X: CH, NH.⁸⁶

⁸⁵ Egawa, T.; Hirabayashi, K.; Koide, Y.; Kobayashi, C.; Takahashi, N.; Mineno, T.; Terai, T.; Ueno, T.; Komatsu, T.; Ikegaya, Y.; Matsuki, N.; Nagano, T.; Hanaoka, K.; Red Fluorescent Probe for Monitoring the Dynamics of Cytoplasmic Calcium Ions. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 1-5.

⁸⁶ Nishijima, S.; Shinohara, K.; Bando, T.; Minoshima, M.; Kashiwazaki, G.; Sugiyama, H.; Cell permeability of Py-Im polyamide-fluorescein conjugates: Influence of molecular size and Py/Im content. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 18, 978-983.

Por último se presenta un conjugado de fluoresceína y un compuesto antitumoral, la camptotecina.⁸⁷ La camptotecina es un fármaco que se enlaza específicamente al complejo formado por la topoisomerasa I y el ADN, induciendo un proceso apoptótico. La unión entre el fármaco y el fluoróforo aporta la ventaja de disponer de una sonda que permite seguir *in vivo* la localización del fármaco. Al ser éste específico se obtiene una representación de la distribución del receptor y por tanto de la acción localizada del fármaco (Fig. 55).

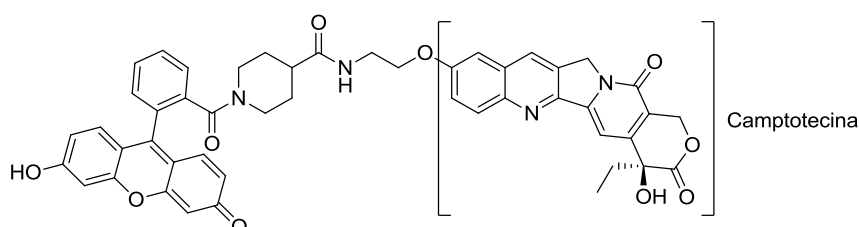


Figura 55 – Estructura del conjugado fármaco-fluoróforo obtenido por A. Chevalier y colaboradores.⁸⁷

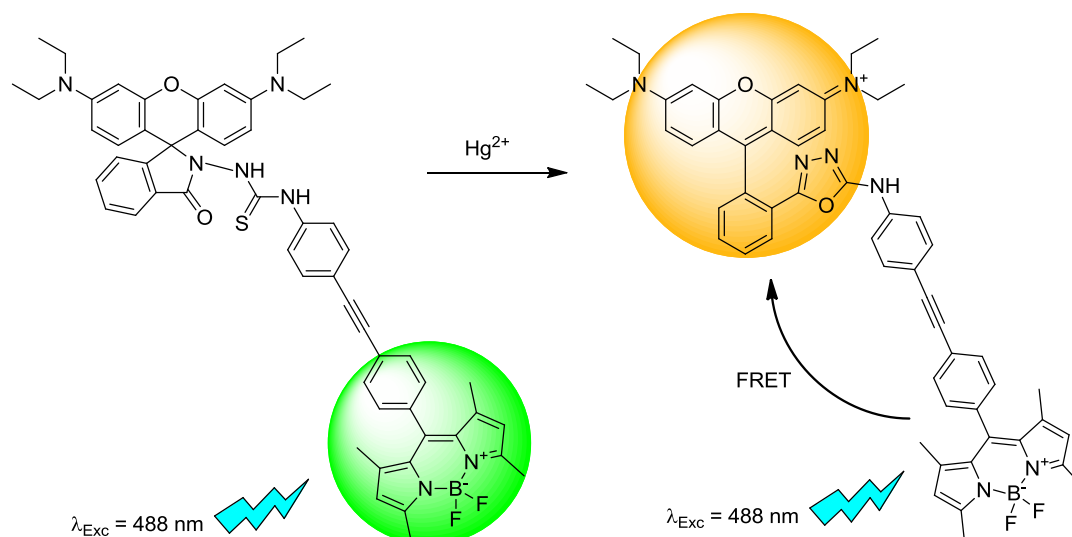
Cabe destacar en este punto, un grupo de fluoróforos muy habituales derivados de la estructura de xanteno. Es el caso de las rodaminas, con aminas diferentemente sustituidas en las posiciones 3' y 6'. Esta familia de fluoróforos tiene unas propiedades fotofísicas y una fotoestabilidad excelentes, lo que las hace muy recomendables para su aplicación en láseres, estándares de fluorescencia, así como cualquier ensayo con cultivos celulares. A pesar de sus propiedades, el principal inconveniente que presentan es el alto coste de los isómeros puros, o la necesidad de llevar a cabo reacciones de derivatización sobre los núcleos más económicos para permitir la conjugación con otras moléculas, aumentando de esta forma el número de pasos sintéticos a considerar a la hora de utilizarlos en sondas fluorescentes.⁸⁸

A modo de ejemplo, la sonda sintetizada por X. Zhang y colaboradores se sirve de dos fluoróforos, rodamina y BODIPY, para, mediante la excitación a una longitud de onda fija, provocar un efecto FRET en presencia de Hg^{2+} en células vivas (Esquema 36).⁸⁹

⁸⁷ Chevalier, A.; Dubois, M.; Le Joncour, V.; Dautrey, S.; Lecointre, C.; Romieu, A.; Renard, P. Y.; Castel, H.; Sabot, C.; Synthesis, Biological Evaluation, and *in Vivo* Imaging of the first Camptothecin-Fluorescein Conjugate. *Bioconjugate Chem.*, **2013**, 24, 1119-1133.

⁸⁸ Beija, M.; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G.; Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 2410-2433.

⁸⁹ Zhang, X.; Xiao, Y.; Qian, X.; A Ratiometric Fluorescent Probe Based on FRET for Imaging Hg^{2+} Ions in Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 8025-8029.



Esquema 36 – Estructura de la sonda fluorescente rodamina-BODIPY que experimenta una apertura y reorganización del anillo lactámico en presencia de Hg^{2+} .⁸⁹

3.4.2.2 BODIPY

Este fluoróforo fue descrito por primera vez en 1968 por Treibs y Kreuzer.⁹⁰ El nombre de BODIPY proviene de la abreviación de su nombre común, boro dipirrometeno, diferente a su nomenclatura IUPAC, 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno.

En cuanto a la numeración empleada en su anillo, según la IUPAC, esta difiere de la del anillo de dipirrometeno, lo que ha llevado a confusiones. Sin embargo, se pueden definir las posiciones alfa (3, 5), beta (1, 2, 6, 7) y meso (8) del anillo, equivalentes en ambas estructuras (Fig. 56).

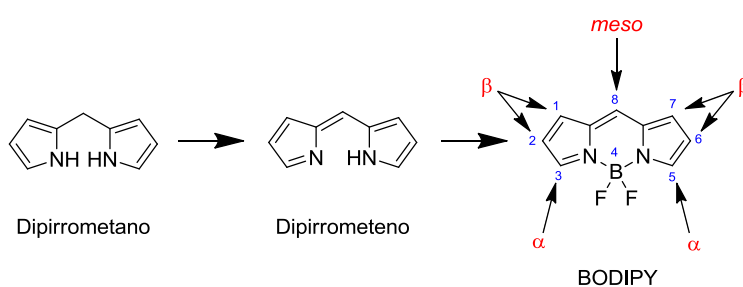


Figura 56 - Núcleo y nomenclatura del BODIPY.

La síntesis del núcleo sin sustituyentes no fue descrita hasta 2009, curiosamente de forma simultánea, por tres grupos independientes^{91, 92, 93} debido a la inestabilidad del predecesor de dipirrometeno.

⁹⁰ Treibs, A.; Kreuzer, F. H.; Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, 718, 208-223.

Las propiedades generales que presentan los fluoróforos derivados de la estructura de BODIPY son: elevados coeficientes de extinción molar, bandas de emisión muy estrechas y con gran intensidad, con una presencia insignificante del proceso de fosforescencia, lo que se traduce todo junto en rendimientos cuánticos muy elevados. Los fluoróforos derivados de BODIPY acostumbran a ser insensibles al pH o la polaridad del medio y son estables en condiciones fisiológicas, sin embargo presentan una limitada solubilidad en medios acuosos. Por el contrario son perfectamente solubles en la mayoría de disolventes orgánicos. La modulación de su fluorescencia se logra mediante funcionalización de los sustituyentes de las posiciones alfa y beta preferentemente, obteniendo una banda de emisión en el visible entre 500 y 700 nm con una gran fotoestabilidad y resistencia a la autoagregación.^{61,94}

Todos estos factores han popularizado el uso de este núcleo fluorescente en los últimos quince años en aplicaciones tan diversas como marcadores biológicos,⁸⁴ dispositivos electroluminiscentes,⁹⁵ láseres,⁹⁶ interruptores fluorescentes,⁹⁷ sensores,⁹⁸ células fotovoltaicas,⁹⁹ y un largo etcétera.

La síntesis del fluoróforo se suele realizar a partir de anillos pirrólicos con la sustitución deseada. Además también es posible derivatizarlos posteriormente en posiciones específicas, especialmente las posiciones 2 y 6 mediante sustitución electrofílica.

Este tipo de sustituciones permiten modular las frecuencias de emisión de modo que se obtiene una familia de fluoróforos con distintas propiedades y con emisiones que

⁹¹ Schmitt, A.; Hinkeldey, B.; Wild, M.; Jung, G.; Synthesis of the Core Compound of the BODIPY Dye Class: 4,4'-Difluoro-4-bora-(3a,4a)-diazas-indacene. *J. Fluoresc.*, **2009** (Published Online 7-Dec-2008), *19*, 755-758.

⁹² Tram, K.; Yan, H.; Jenkins, H. A.; Vassiliev, S.; Bruce, D.; The synthesis and cristal structure of unsubstituted 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diazas-indacene (BODIPY). *Dyes pigments*, **2009** (Published Online 10-Mar-2009), *82*, 392-395.

⁹³ Arroyo, I. J.; Hu, R.; Merino, G.; Tang, B. Z.; Peña-Cabrera, E.; The smallest and One of the Brightest. Efficient Preparation and Optical Description of the Parent Borondipyrromethene System. *J. Org. Chem.*, **2009** (Published Online 2-Jul-2009), *74*, 5719-5722.

⁹⁴ Boens, N.; Leen, V.; Dehaen, W.; Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 1130-1172.

⁹⁵ Nguyen, Q. P. B.; Hwang, H. M.; Song, M. S.; Song, H. J.; Kim, G. H.; Kwon, J. H.; Shim, N. Y.; Chai, K. Y.; Synthesis and Electroluminescent Properties of OLED Green Dopants Based on BODIPY Derivatives. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2014**, *35*, 1247-1250.

⁹⁶ López Arbeloa, T.; López Arbeloa, F.; López Arbeloa, I.; García-Moreno, I.; Costela, A.; Sastre, R.; Amat-Guerri, F.; Correlations between photophysics and lasing properties of dipyrromethene-BF₂ dyes in solution. *Chem. Phys. Lett.*, **1999**, *299*, 315-321.

⁹⁷ Golovkova, T. A.; Kozlov, D. V.; Neckers, D. C.; Synthesis and Properties of Novel Fluorescent Switches. *J. Org. Chem.*, **2005**, *71*, 5545-5549.

⁹⁸ Niu, L. Y.; Guan, Y. S.; Chen, Y. Z.; Wu, L. Z.; Tung, C. H.; Yang, Q. Z.; BODIPY-Based Ratiometric Fluorescent Sensor for Highly Selective Detection of Glutathione over Cysteine and Homocysteine. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 18928-18931.

⁹⁹ Hayashi, Y.; Obata, N.; Tamaru, M.; Yamaguchi, S.; Matsuo, Y.; Saeki, A.; Seki, S.; Kureishi, Y.; Saito, S.; Yamaguchi, S.; Shinokubo, H.; Facile Synthesis of Biphenyl-Fused BODIPY and Its Property. *Org. Lett.*, **2012**, *14*, 866-869.

abarcan desde los 500 a los 700 nm e incluso sondas con frecuencias de emisión en el infrarrojo cercano (Fig. 57).¹⁰⁰

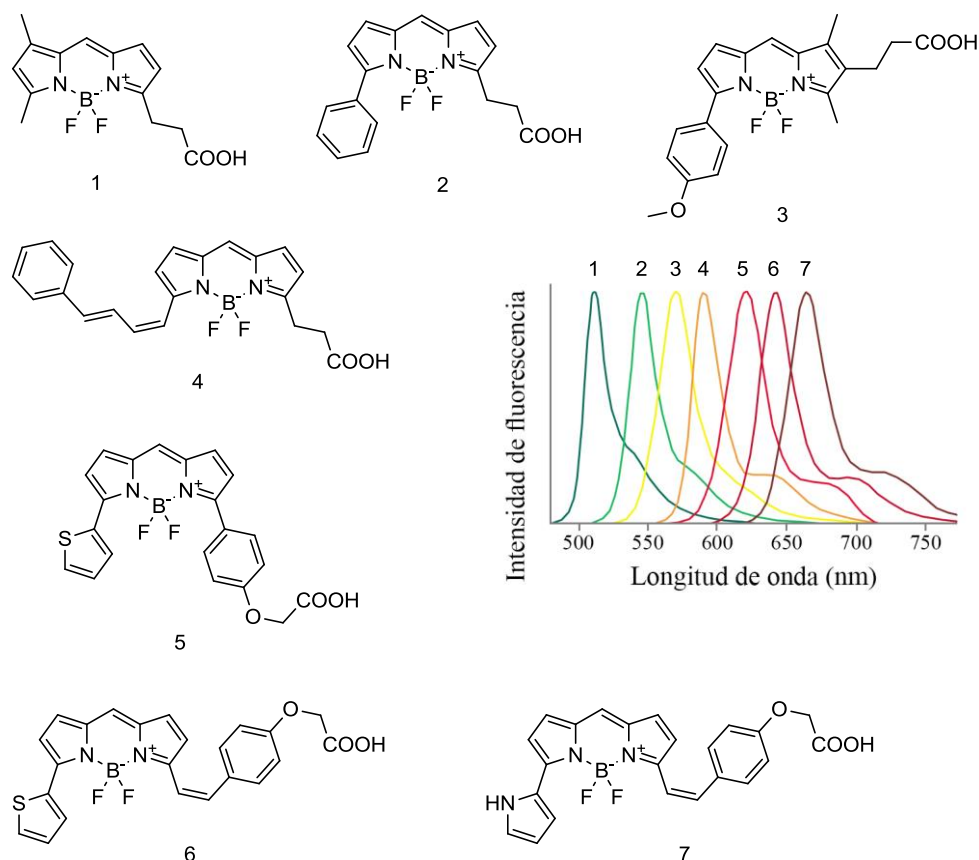


Figura 57 – Colección de estructuras BODIPY sustituidas en diferentes posiciones para modular la emisión de fluorescencia, y sus espectros de emisión correspondientes.

Una de las variantes más sencillas de obtener y con mejor rendimiento cuántico (0,97, CH_2Cl_2) es el 1,3,5,7-tetrametil BODIPY derivado con un metilo en la posición meso. Este compuesto se sintetiza siguiendo un protocolo rápido y efectivo con un 70% de rendimiento a partir de la condensación de 2,4-dimetilpirrol y cloruro de acetilo y posterior coordinación con el complejo de BF_3 (Esquema 37 a).¹⁰¹

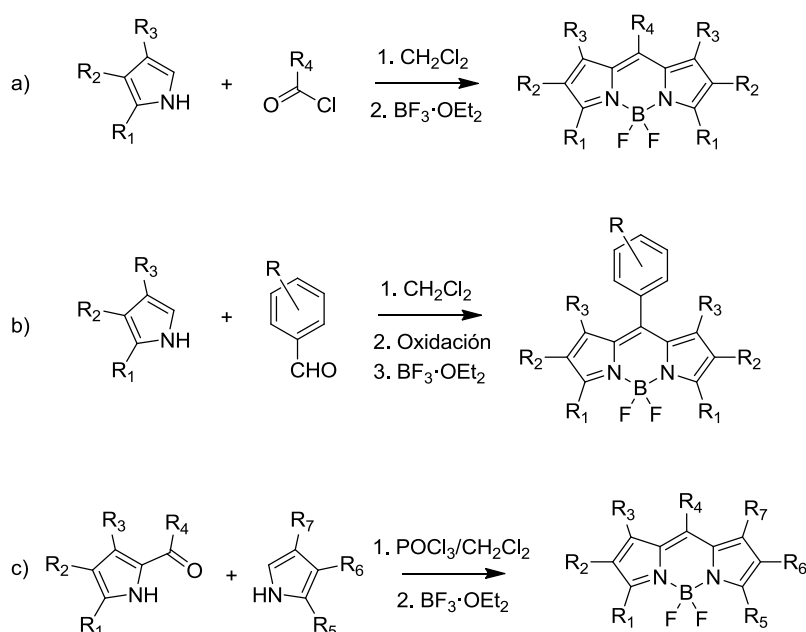
Sin embargo, es mucho más sencillo derivatizar el núcleo de BODIPY mediante la introducción de sustituyentes en la posición meso, lo que habilita la síntesis mediante el uso de aldehídos aromáticos funcionalizados y el uso de catalizadores ácidos. El inconveniente de esta metodología es la necesidad de utilizar reactivos de oxidación posteriores a la condensación, lo que provoca una disminución considerable del

¹⁰⁰ Ni, Y.; Wu, J.; Far-red and near infrared BODIPY dyes: synthesis and applications for fluorescent pH probes and bio-imaging. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 3774-3791.

¹⁰¹ Nepomnyashchii, A. B.; Bröring, M.; Ahrens, J.; Bard, A. J.; Synthesis, Photophysical, Electrochemical, and Electrogenerated Chemiluminescence Studies. Multiple Sequential Electron Transfers in BODIPY Monomers, Dimers, Trimers, and Polymer. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 8633-8645.

rendimiento (40%) debido a la formación de productos secundarios (Esquema 37 b).¹⁰² Los sustituyentes en la posición meso no modifican en exceso las bandas de absorción-emisión, pero para aquellos casos en los que se introducen sustituyentes aromáticos sí que se puede observar una disminución en el rendimiento cuántico. Este efecto, se reduce al bloquear la rotación libre del anillo aromático introduciendo sustituyentes voluminosos en las posiciones orto y meta preferentemente, evitando de esta forma la conjugación de los sistemas pi del fenilo y el BODIPY.

En los métodos de síntesis descritos anteriormente se obtienen núcleos de BODIPY simétricos en cuanto a la sustitución del anillo pirrólico. Una alternativa para obtener núcleos asimétricos es la de emplear cetopirroles, para posteriormente realizar una condensación catalizada por ácidos de Lewis con otros pirroles (Esquema 37 c).¹⁰³



Esquema 37 – Estrategias de síntesis para núcleos de BODIPY simétricos mediante el uso de cloruros de acilo (a) y aldehídos aromáticos (b), y para la obtención de núcleos asimétricos mediante el uso de cetopirroles (c).

A continuación se han seleccionado algunas aplicaciones recientes que utilizan derivados de BODIPY en el campo de la señalización molecular.

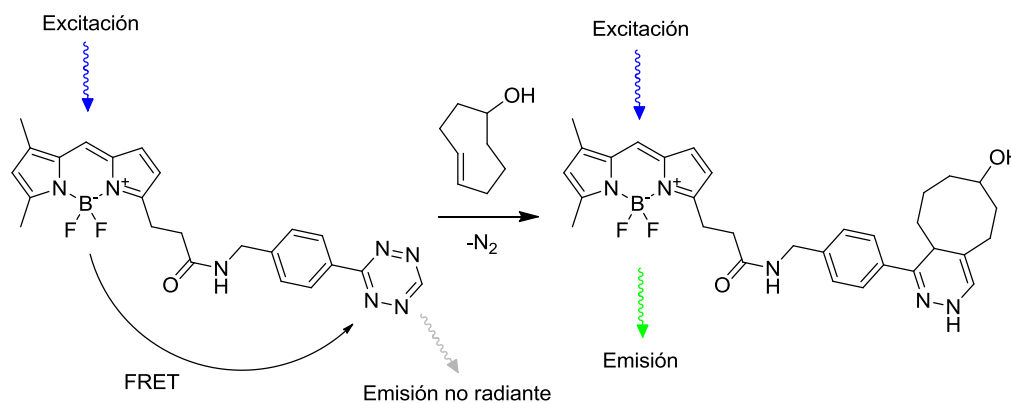
El primer ejemplo consiste en un conjugado con capacidad para detectar la presencia de dienófilos tensionados en entornos fisiológicos.¹⁰⁴ Para ello se ha aprovechado la

¹⁰² Li, J. S.; Wang, H.; Cao, L. W.; Zhang, H. S.; 8-Phenyl-(4-oxy-acetic acid N.hydroxysuccinimidyl ester)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene as a new highly fluorescent-derivatizing reagent for aliphatic amines in disease-related samples with high-performance liquid chromatography. *Talanta*, **2006**, 69, 1190-1199.

¹⁰³ Jiao, L.; Yu, C.; Liu, M.; Wu, Y.; Cong, K.; Meng, T.; Wang, Y.; Hao, E.; Synthesis and Functionalization of Asymmetrical Benzo-Fused BODIPY Dyes. *J. Org. Chem.*, **2010**, 75, 6035-6038.

¹⁰⁴ Devaraj, N. K.; Hilderbrand, S.; Upadhyay, R.; Mazitschek, R.; Weissleder, R.; Bioorthogonal Turn-On Probes for Imaging Small Molecules inside Living Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 2869-2872.

capacidad de los derivados de tetrazinas para provocar procesos FRET no radiantes con el BODIPY. Las tetrazinas reaccionan rápidamente con los dienófilos tensionados mediante cicloadiciones Diels-Alder modificando la estructura de la tetrazina y de este modo revirtiendo el proceso FRET. El aumento del rendimiento cuántico del BODIPY después de la reacción permite señalar la presencia de estos compuestos en el interior de las células vivas (Esquema 38).



Esquema 38 – Estructura y funcionamiento de la sonda específica para dienos obtenida por N. K. Devaraj.¹⁰⁴

En el siguiente ejemplo, un núcleo de BODIPY se conjuga a través de un espaciador a un sustrato específico de una β -glucosidasa (GBA1), asociada con diversas enfermedades, utilizando una metodología tipo “click chemistry”.¹⁰⁵ En este caso, la fluorescencia del BODIPY permanece siempre activa y permite detectar los lugares donde existe una mayor acumulación/deficiencia de esta enzima (Fig. 58).

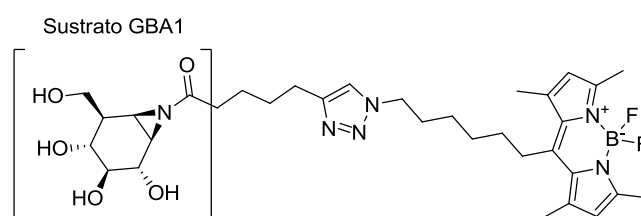


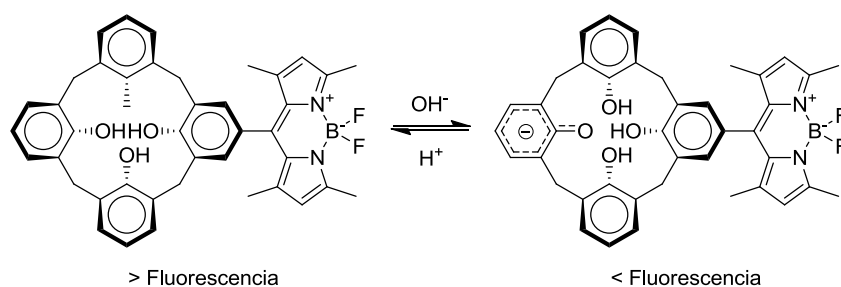
Figura 58 – Estructura de la sonda específica para GBA1 obtenida por W. W. Kallemeijn.¹⁰⁵

En un último ejemplo, el núcleo de BODIPY se ha usado para medir el pH intracelular a pesar de ser un fluoróforo insensible a los cambios de pH.¹⁰⁶ En este caso el núcleo de BODIPY se encuentra conjugado por la posición meso a un calix[4]areno. De esta forma, el conjugado experimenta una buena permeabilidad celular, buena retención y

¹⁰⁵ Kallemeijn, W. W.; Li, K. Y.; Witte, M. D.; Marques, A. R. A.; Aten, J.; Scheij, S.; Jiang, J.; Willems, L. I.; Voorn-Brouwer, T. M.; van Roomen, C. P. A. A.; Ottenhoff, R.; Boot, R. G.; van der Elst, H.; Walvoort, M. T. C.; Florea, B. I.; Codée, J. D. C.; van der Marel, G. A.; Aerts, J. M. F. G.; Overkleeft, H. S.; Novel Activity-Based Probes for Broad-Spectrum Profiling of Retaining β -Exoglucosidases In Situ and In Vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, 12529-12533.

¹⁰⁶ Han, F.; Xu, Y.; Jiang, D.; Qin, Y.; Chen, H.; A BODIPY-derived fluorescent probe for cellular pH measurements. *Anal. Biochem.*, **2013**, 435, 106-113.

escasa citotoxicidad. El hecho de que sea permeable a la membrana celular permite una homogénea distribución del compuesto por toda la célula, pudiendo establecer una relación entre el pH del medio y la fluorescencia observada. Puesto que el núcleo de BODIPY no responde a los cambios de pH, la desprotonación de los fenoles y consiguiente deslocalización del par de electrones resultante es la responsable de esta variación de la fluorescencia, disminuyendo ésta a medida que se incrementa la carga electrónica sobre el sistema (Esquema 39).



Esquema 39 – Estructura y funcionamiento de la sonda sensible al pH diseñada por F. Han.¹⁰⁶

Ninguna de estas sondas fluorescentes resulta de utilidad si no se internaliza de forma efectiva en la célula para poder interactuar con su receptor. Por este motivo adquiere una vital importancia el hecho del transporte a través de la membrana.

3.5 Transporte trans-membrana

Una de las funciones de la membrana celular es controlar qué sustancias acceden desde el exterior al interior de la celular y viceversa. Existen diferentes mecanismos de transporte dependiendo de las características de los compuestos transportados y de la dirección del transporte.

El transporte pasivo es aquel que no depende de fuentes energéticas externas y obedece únicamente al gradiente osmótico. Este tipo de transporte se da de tres modos diferentes. El primero, mediante proteínas que forman canales en la membrana, estrechos y altamente selectivos para iones como Na^+ , K^+ o Cl^- . En segundo lugar, mediante la difusión a través de la membrana. Esta forma de transporte es utilizado por moléculas pequeñas y apolares, como el O_2 o el CO_2 , o altamente hidrofóbicas, como son determinados esteroides. Por último, la difusión facilitada permite el paso de moléculas polares pequeñas tales como azúcares o aminoácidos mediante su reconocimiento.¹⁰⁷

El transporte activo requiere la intervención de proteínas transportadoras y una fuente de energía como el ATP. Un ejemplo de transporte activo primario es el que realiza la bomba de protones. El transporte activo puede ser secundario cuando se cotransporta

¹⁰⁷ Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; Molecular Biology of the Cell. 5th Ed. Garland Science. 2007.

una molécula a favor del gradiente, generando energía que se aprovecha para transportar en contra del gradiente otro compuesto.

Mediante transporte activo también se transportan macromoléculas (endocitosis), fluidos extracelulares (macropinocitosis) o incluso partículas sólidas de mayor tamaño (fagocitosis). Todos estos procesos se caracterizan por poseer diferentes receptores que los estimulan, dando lugar a vesículas intracelulares (Fig. 59):¹⁰⁸

- Fagocitosis: Especialidad de determinados tipos de células como macrófagos o neutrófilos.
- Endocitosis mediada por clatrina: Es el tipo más conocido de endocitosis y depende de la activación de unos receptores de membrana, las clatrininas, que provocan toda una cascada de eventos que invaginan la membrana hasta formar la prevesícula, que mediante unas GTPasas específicas, dinaminas, cierran completamente las vesículas. Éstas maduran en el citosol fundiéndose con endosomas tardíos y posteriormente, tras el proceso de maduración se transforman en lisosomas.
- Endocitosis mediante caveola: Se da en localizaciones específicas de la membrana con alta densidad de colesterol y esfingolípidos. En estos lugares existe una invaginación preexistente, donde se localizan las caveolinas. El proceso de formación de la vesícula es similar al explicado en el caso de las clatrininas. En cuanto a la evolución, actualmente existe un amplio debate al respecto de si evolucionan hacia lisosomas o no.^{109, 110}
- Macropinocitosis: Se considera un mecanismo por el que se incorpora gran cantidad de fluido y la activación del proceso se asocia más a señales secundarias que al propio cuerpo fagocitado.

¹⁰⁸ Xiang, S.; Tong, H.; Shi, Q.; Fernandes, J. C.; Jin, T.; Dai, K.; Zhang, X.; Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. *J. Control. Release*, **2012**, 158, 371-378.

¹⁰⁹ Bengali, Z.; Rea, J. C.; Shea, L. D.; Gene expression and internalization following vector adsorption to immobilized proteins: dependence on protein identity and density. *J. Gene Med.*, **2007**, 9, 668-678.

¹¹⁰ Kiss, A. L.; Botos, E.; Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation?. *J. Cell. Mol. Med.*, **2009**, 13, 1228-1237.

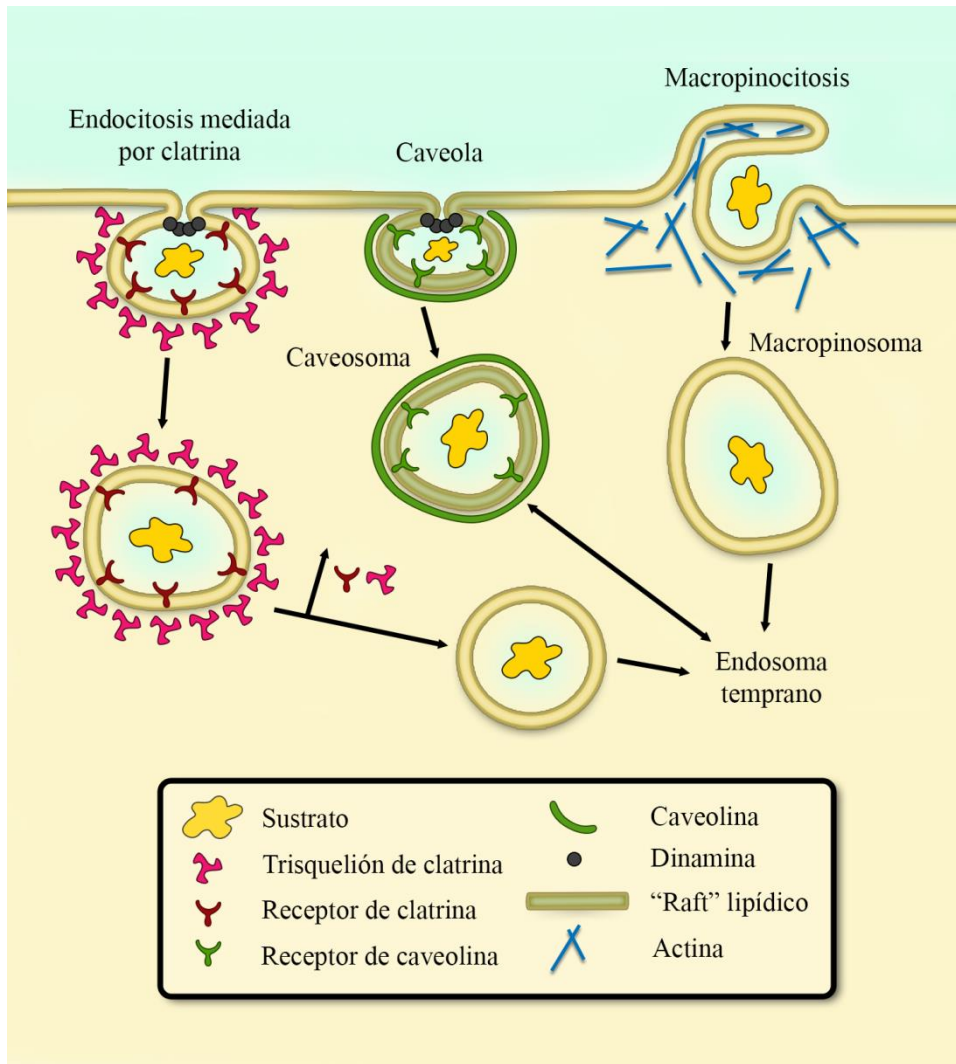


Figura 59 – Mecanismos de internalización mediante receptores de membrana.

Cuando se administra un compuesto exógeno a un cultivo celular, el primer paso para actuar sobre su diana es el reconocimiento por parte de los receptores implicados en conseguir que el fármaco llegue a la diana. Este primer reconocimiento puede darse extracelularmente o intracelularmente, pudiendo ser este primer reconocimiento el responsable de su actividad farmacológica (Fig. 60).

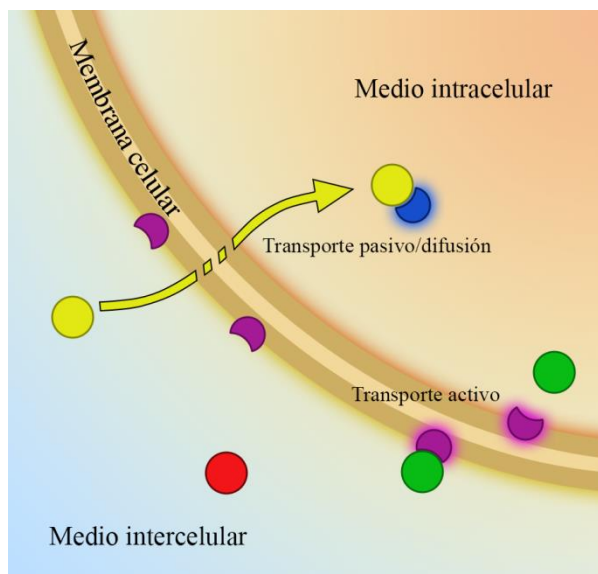


Figura 60 – Representación esquemática donde se representan los mecanismos de entrada básicos así como el reconocimiento intracelular (amarillo) o sobre membrana (verde). Otros analitos no pueden difundir a través de la membrana ni disponen de receptores específicos (rojo).

Tanto el transporte activo como el pasivo han evolucionado durante millones de años para incorporar a la célula compuestos naturales. Sin embargo, la mayoría de moléculas bioactivas usados en la actualidad son sintéticos o derivados de productos naturales que no se internalizan de forma eficaz mediante los mecanismos expuestos. La modificación de sus propiedades estructurales para facilitar la internalización a menudo conlleva una disminución del efecto biológico, por lo que se hace necesaria la planificación de estrategias adicionales para la internalización de los compuestos manteniendo su actividad.

3.5.1 Internalización selectiva

Para introducir compuestos no naturales en las células se utilizan técnicas invasivas, como microinyección,¹¹¹ permeabilización o electroporación.¹¹² Estos métodos sin embargo conllevan una complicada optimización, además de provocar una reducción significativa de la viabilidad celular.

Existen alternativas que imitan estrategias de internalización naturales, consiguiendo de esta forma que estos procesos sean biocompatibles. Un ejemplo es el uso de los péptidos de penetración celular o CPPs (de sus siglas en inglés, Cell Penetrating Peptide). Se trata de cadenas peptídicas presentes en ciertas proteínas, habitualmente factores de transcripción, que se encargan de facilitar el transporte de estos factores por el interior celular así como entre células.

¹¹¹ Zhang, Y.; Yu, L. C.; Microinjection as a tool of mechanical delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2008**, 19, 506-510.

¹¹² Cadossi, R.; Ronchetti, M.; Cadossi, M.; Locally enhanced chemotherapy by electroporation: clinical experiences and perspective of use of electrochemotherapy. *Future Oncol.*, **2014**, 10, 877-890.

El estudio de estos CPPs naturales ha llevado a identificar secuencias de no más de 30 aminoácidos y aprovechar sus propiedades como transportadores moleculares. Actualmente estas secuencias pueden derivar de secuencias naturales o completamente artificiales, buscando aumentar la estabilidad y eficiencia del transportador (Fig. 61).¹¹³

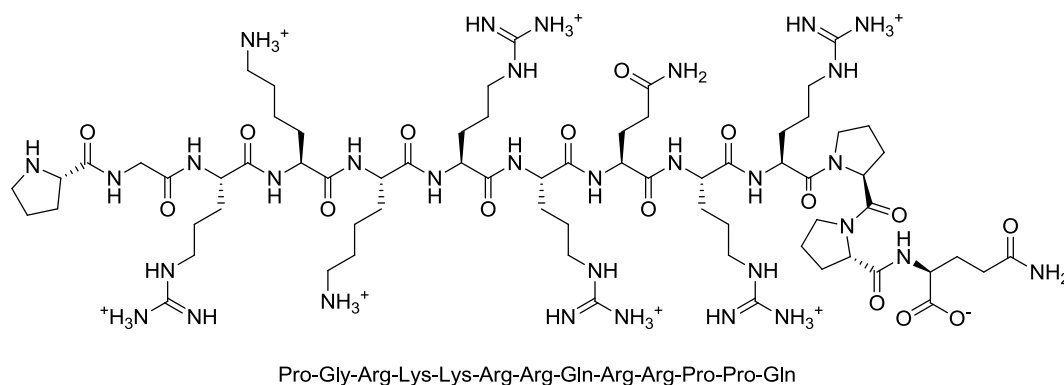


Figura 61 – Estructura del CPP Tat, obtenido de la proteína Tat del VIH. Este CPP permite la internalización de proteínas, péptidos, siRNA, liposomas o nanopartículas. Hay que destacar la proporción de aminoácidos básicos que presenta respecto a otros aminoácidos.

Los CPPs se han utilizado como vectores de transporte trans-membrana para “cargas” de diferente tamaño y naturaleza como plásmidos, péptidos, proteínas, liposomas, nanopartículas, puntos cuánticos, etc., mejorando el transporte transmembrana y el tráfico interno, facilitando de esta forma las interacciones con objetivo biológico.¹¹⁴

Existen multitud de referencias que asocian la entrada de estos transportadores vía endocitosis,¹¹⁵ así como otras tantas que indican lo contrario.¹¹⁶

Independientemente del proceso de internalización, su efectividad se ha atribuido a la presencia de numerosos residuos básicos, principalmente argininas y lisinas. Se piensa que los grupos guanidinio de las argininas interactúan electrostáticamente con grupos negativos presentes en la superficie de la membrana celular, activando de este modo las rutas de internalización.^{117, 118} Sin embargo, los CPPs, al tratarse de péptidos naturales, se degradan fácilmente en medios fisiológicos.¹¹⁹

¹¹³ Heitz, F.; Morris, M. C.; Divita, G.; Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Brit. J. Pharmacol.*, **2009**, *157*, 195-206.

¹¹⁴ Margus, H.; Padari, K.; Pooga, M.; Cell-penetrating Peptides as Versatile Vehicles for Oligonucleotide Delivery. *Mol. Ther.*, **2012**, *20*, 525-533.

¹¹⁵ Richard, J. P.; Melikov, K.; Brooks, H.; Prevot, P.; Lebleu, B.; Chernomordik, L. V.; Cellular Uptake of Unconjugated TAT Peptide Involves Clathrin-dependent Endocytosis and Heparan Sulfate Receptors. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 15300-15306.

¹¹⁶ Ter-Avetisyan, G.; Tünnemann, G.; Nowak, D.; Nitschke, M.; Herrmann, A.; Drab, M.; Cardoso, M. C.; Cell Entry of Arginine-rich Peptides Is Independent of Endocytosis. *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*, 3370-3378.

¹¹⁷ Wender, P. A.; Mitchell, D. J.; Pattabiraman, K.; Pelkey, E. T.; Steinman, L.; Rothbard, J. B.; The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable of enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2000**, *94*, 13003-13008.

A pesar de la polémica en torno al método de internalización de los CPPs, es evidente que existe una activación de determinados mecanismos de internalización mediante interacción electrostática con oxoaniones de la membrana, tales como fosfatos y sulfatos, además de enlaces de hidrógeno.

Además de los CPPs existen alternativas que dan lugar a una internalización. Dos de los agentes de internalización más habituales son la biotina y el ácido fólico, cuyos receptores están dispuestos sobre la membrana celular, y cuyas aplicaciones se describen en el siguiente capítulo.

En la bibliografía no existen antecedentes del estudio de la internalización de escuaramidas a excepción de los realizados con las oligoescuaramidas cíclicas sobre membranas artificiales, indicando una mayor penetrabilidad del compuesto C5.¹²⁰

Los estudios realizados sobre la inhibición de cinasas han demostrado que las oligoescuaramidas cíclicas presentan una buena internalización.¹²¹ En este sentido el comportamiento de las oligoescuaramidas se asemeja al de los CPPs. Las oligoescuaramidas cíclicas, al igual que los CPPs, se encuentran parcialmente protonadas a pH fisiológico (7,4) ya que los valores de pK_a para la oligoescuaramida C2 son de 7,9 y 8,6 (Fig. 62).

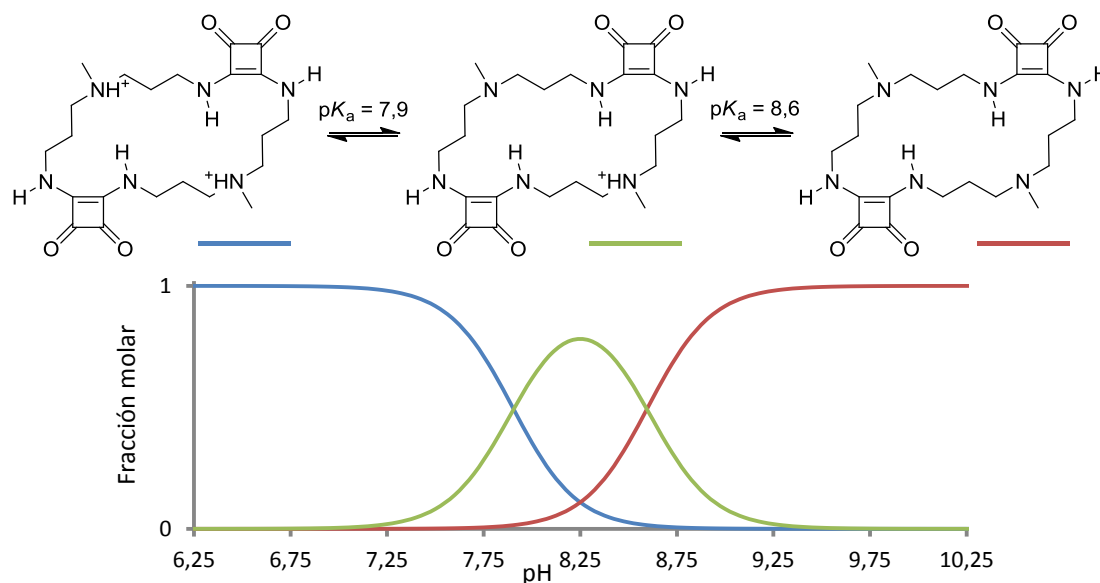


Figura 62 – Equilibrios de protonación de la oligoescuaramida C2 con sus respectivos pK_a y especiación simulada en función del pH.

¹¹⁸ Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, Kunihiro, Sugiura, Y.; Arginine-rich Peptides: An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.*, **2001**, 276, 5836-5840.

¹¹⁹ Holm, T.; Räägel, H.; El Andaloussi, S.; Hein, M.; Mäe, M.; Pooga, M.; Langel, Ü.; Retro-inversion of certain cell-penetrating peptides causes severe cellular toxicity. *BBA-Biomembranes*, **2011**, 1808, 1544-1551.

¹²⁰ Giner-Casares, J. J.; Keller, J.; Rotger, C.; Costa, A.; Brezesinski, G.; Mechanism of Action of Cyclic Oligosquaramides on DPPC Phospholipid Monolayers. *ChemPhysChem.*, **2012**, 13, 453-458.

¹²¹ Villalonga, P.; Fernández de Mattos, S.; Ramis, G.; Obrador-Hevia, A.; Sampedro, A.; Rotger, C.; Costa, A.; Cyclosquaramides as Kinase Inhibitors with Anticancer Activity. *ChemMedChem*, **2012**, 7, 1472-1480.

Debido a esta similitud entre las oligoescuaramidas y los CPPs, junto con los antecedentes de escuaramidas como receptores de aniones en medio acuoso tales como sulfato y fosfato,^{122,123,124} es interesante conocer las interacciones que puede establecer la oligoescuaramida cíclica con modelos de fosfatos de membrana (Fig. 63).

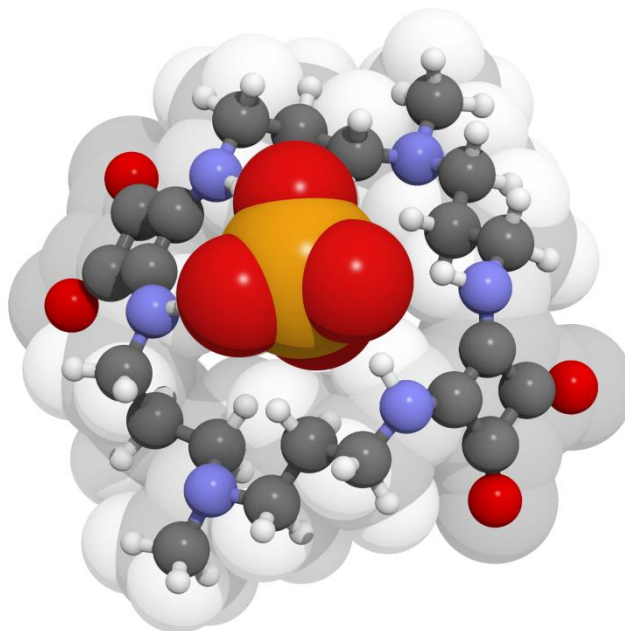


Figura 63 – Optimización computacional de la interacción entre la oligoescuaramida C2 y un grupo fosfato. La interacción se produce mediante enlaces de hidrógeno entre los NH escuaramídicos y los oxígenos del fosfato.

¹²² Piña, M. N.; Soberats, B.; Rotger, C.; Ballester, P.; Deyà, P. M.; Costa, A.; Selective sensing of competitive anions by non-selective host: The case of sulfate and phosphate in water. *New J. Chem.*, **2008**, 32, 1919-1923.

¹²³ Delgado-Pinar, E.; Rotger, C.; Costa, A.; Piña, M. N.; Jiménez, H. R.; Alarcón, J.; García-España, E.; Grafted squaramide monoamine nanoparticles as simple systems for sulfate recognition in pure water. *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 2609–2611.

¹²⁴ Jin, C.; Zhang, M.; Wu, L.; Guan, Y.; Pan, Y.; Jiang, J.; Lin, C.; Wang, L.; Squaramide-based tripodal receptors for selective recognition of sulfate anion. *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 2025-2027.

3.6 Objetivos

Los resultados obtenidos en el capítulo anterior sobre la actividad antitumoral de los compuestos oligoescuaramídicos cíclicos y los indicios de un posible reconocimiento sobre la membrana incitan a profundizar en el estudio de la internalización de estos compuestos. La fluorescencia ha sido la técnica seleccionada en este capítulo para realizar los estudios de distribución celular de las oligoescuaramidas, utilizando para ello un conjugado oligoescuaramida cíclica-fluoróforo. Este conjugado permitirá el estudio de la permeabilidad celular y el tráfico intracelular de las oligoescuaramidas mediante microscopía de fluorescencia y microscopía confocal.

Se fijan por tanto los siguientes objetivos para este capítulo:

- Sintetizar y caracterizar un conjugado oligoescuaramida cíclica-fluoróforo, estable en medio fisiológico.
- Determinar la capacidad de los conjugados oligoescuaramida cíclica-fluoróforo para atravesar la membrana celular y la evolución que experimentan mediante microscopía confocal de fluorescencia.
- Estudiar la interacción de las oligoescuaramidas cíclicas con modelos de fosfatos presentes en la membrana, permitiendo establecer una relación directa entre un posible reconocimiento y la interacción con compuestos fosforilados presentes sobre la membrana celular.

3.7 Resultados y discusión

Para la obtención del conjugado oligoescuaramida cíclica-fluoróforo se eligió el compuesto C2 **13**. Esta elección se debe, en primer lugar, a la facilidad de síntesis. En este caso las modificaciones estructurales necesarias para la derivatización del macrociclo no implican una elongación de los oligómeros, lo que incrementaría los pasos de síntesis y por tanto un menor rendimiento general. El segundo motivo, más importante para lograr el objetivo propuesto, es la despreciable citotoxicidad que presenta esta oligoescuaramida cíclica (Fig. 64).

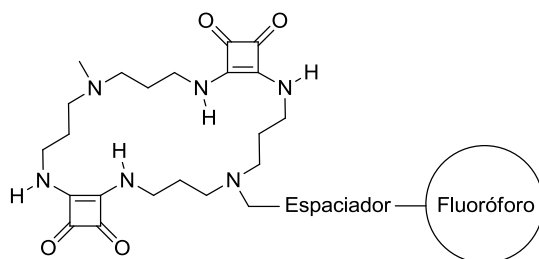


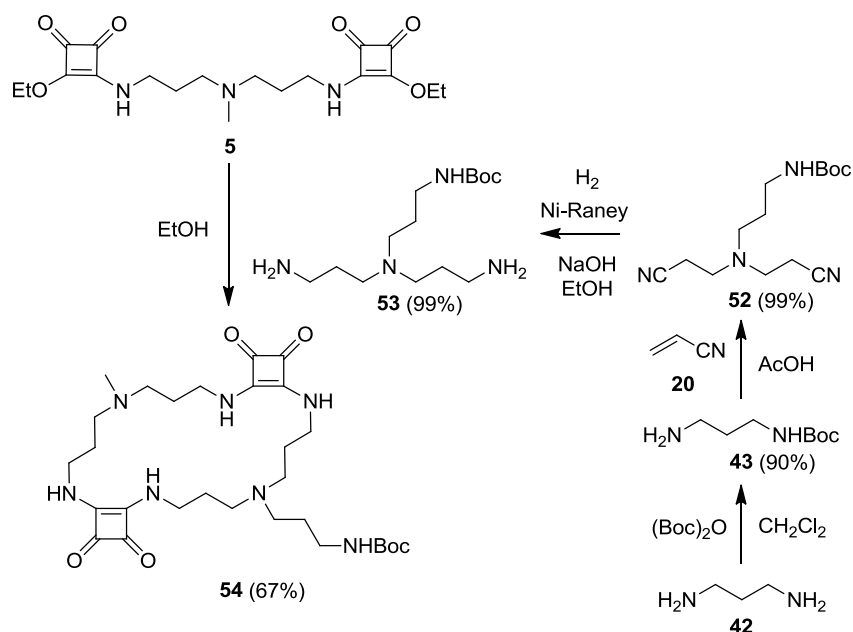
Figura 64 – Representación esquemática de las unidades que constituyen la sonda fluorescente oligoescuaramídica diseñada a partir de la oligoescuaramida cíclica C2.

No se puede confirmar que el mecanismo de acción de la oligoescuaramida C2 sea exactamente el mismo que el que presenta mayor citotoxicidad, C5 **16**. Sin embargo, la naturaleza oligomérica de estos compuestos hace prever una gran similitud ya que el tipo de interacciones supramoleculares que puedan darse son similares. En ambos casos se trata de interacciones que se originan en los nitrógenos terciarios parcialmente protonados y en las unidades escuaramídicas vía enlaces de hidrógeno.

3.7.1 Síntesis de las sondas fluorescentes

3.7.1.1 Síntesis de la oligoescuaramida cíclica apta para la conjugación con fluoróforos

Aprovechando la síntesis modular de las oligoescuaramidas se diseñó un módulo con una cadena adicional. Este nuevo módulo se ha incorporado a la estructura de la oligoescuaramida C2 obteniendo un macrociclo funcionalizable, común para diferentes sondas fluorescentes (Esquema 40).

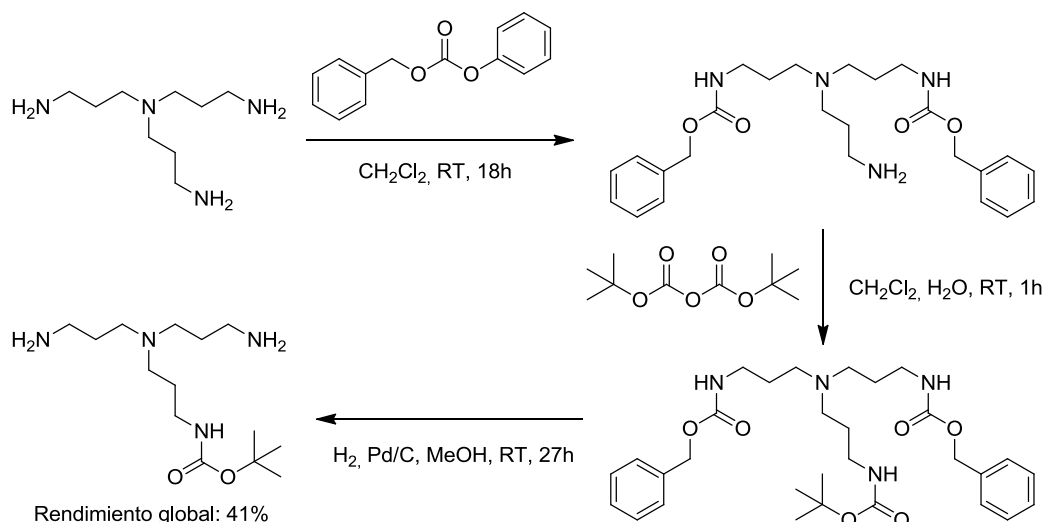


Esquema 40 – Síntesis de la oligoescuaramida **54**, seleccionada para la preparación de las sondas fluorescentes.

Tal y como se muestra en el esquema 40, uno de los dos grupos amino de la 1,3-propildiamina **42** se ha protegido con el grupo terc-butoxicarbonil (Boc). Seguidamente una doble adición tipo Michael de la diamina monoprotegida sobre el acrilonitrilo **20**, proporciona el intermedio **52** susceptible de ser reducido mediante hidrogenación catalítica con Ni-Raney en medio básico para obtener la triamina monoprotegida **53**. Esta triamina presenta la distancia adecuada y la misma capacidad de formar enlaces de hidrógeno que la amina utilizada como espaciador en el capítulo 2 para la síntesis de oligoescuaramidas cíclicas.

La metodología de síntesis desarrollada aquí resulta más eficaz que la estrategia lógica de realizar una monoprotección sobre la triamina tris(3-aminopropil)amina. Además de ser un producto costoso, la monoprotección de esta triamina está descrita en la bibliografía realizando primero una doble protección con bencilcarbamatos, monoprotección de la amina restante con el grupo Boc y posterior hidrogenación catalítica para eliminar los bencilcarbamatos, obteniendo un rendimiento global del 41% (Esquema 41).¹²⁵ El procedimiento descrito en esta Tesis permite obtener la triamina monoprotegida **53** con un rendimiento global del 88%, usando además para ello productos comerciales asequibles.

¹²⁵ Raymond, K. N.; Xu, J.; Pham, T. A.; *Macrocycles*, WO2013187971 A3.



Esquema 41 – Síntesis propuesta por K. N. Raymond para la obtención de la triamina monoprotegida con el grupo Boc **53**.¹²⁵

La oligoescuaramida **54** se obtiene finalmente mediante la condensación del diéster **5** con la diamina **53**. Esta nueva oligoescuaramida cíclicas está funcionalizada en uno de los nitrógenos terciarios con un espaciador y un grupo amino protegido con Boc. La desprotección de este grupo siguiendo el procedimiento general descrito (HCl/H₂O, 50 °C, 4h) permite obtener una amina primaria capaz de reaccionar con diferentes grupos funcionales, simplificando de este modo la conjugación de la oligoescuaramida con diferentes fluoróforos.

3.7.1.2 Elección y síntesis de los fluoróforos

Tal y como se ha comentado anteriormente, la sonda fluorescente que se pretende obtener consiste en una unidad de transporte, en este caso el derivado de la oligoescuaramida C2, y una unidad de señalización fluorescente. Para la señalización se ha planteado la utilización de tres fluoróforos diferentes como son: un derivado del BODIPY, una fluoresceína y el pireno (Fig. 65).

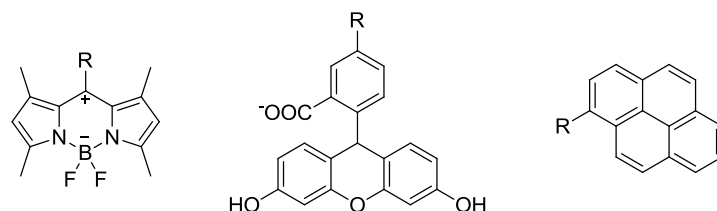


Figura 65 – Estructura de los fluoróforos BODIPY (izquierda), fluoresceína (centro) y pireno (derecha).

Cada uno de estos fluoróforos presenta unas propiedades fotofísicas particulares pero la principal razón para la elección de esta tríada ha sido su diferente carga eléctrica en medios acuosos. Así, el BODIPY es zwitteriónico, la fluoresceína aniónica a pH fisiológico, y el pireno neutro y totalmente apolar. La carga eléctrica del conjunto

transportador-fluoróforo es importante por cuanto afecta a su solubilidad en medios acuosos y modifica su capacidad de penetración celular. Mediante la comparación de las tres sondas fluorescentes se evaluará la capacidad de transporte de la unidad C2 y la capacidad de interacción con el entorno.

Las estructuras de los fluoróforos deben presentar un grupo funcional susceptible de conjugarse con una amina. La fluoresceína en su forma 5-isotiocianato (FITC) **56** es un reactivo muy habitual para el marcaje de proteínas, ya que reacciona con aminas primarias para dar tioureas. Para introducir el anillo de pireno se optó por utilizar el compuesto 1-pirenometilamina **57**, sin embargo, al contener éste un grupo amino, se planteó utilizar una unidad escuaramida a modo de puente entre los dos grupos amino (Fig. 66).

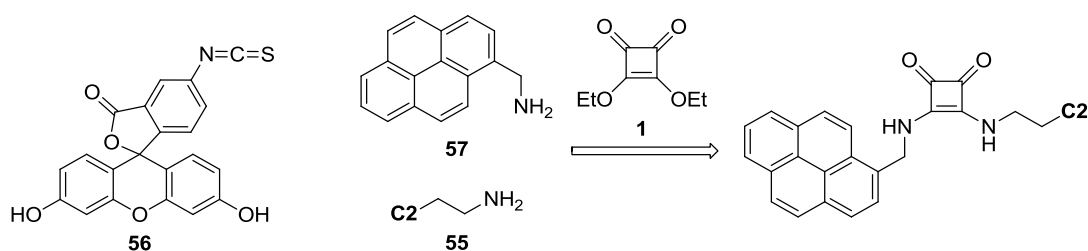
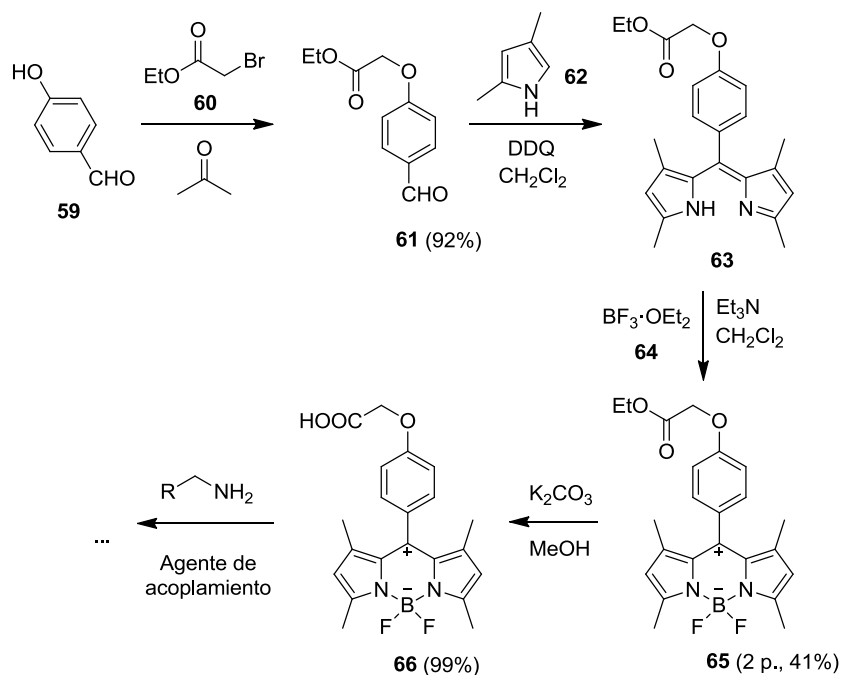


Figura 66 – Estructura de la fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) **56** (izquierda) y propuesta para la condensación de dos grupos amino mediante una unidad escuaramida (derecha).

En cuanto al BODIPY, se ha obtenido un derivado del 8-fenil-1,3,5,7-tetrametil BODIPY, descrito en la bibliografía.¹⁰² La elección de los sustituyentes del BODIPY se ha realizado buscando un elevado rendimiento tanto de síntesis como cuántico. Tal y como se ha descrito en la introducción, el derivado 1,3,5,7-tetrametilo es uno de los que proporciona un mayor rendimiento de síntesis al bloquear las posiciones del pirrol susceptibles de dar reacciones secundarias. En cuanto al uso del aldehído aromático, éste permite la funcionalización previa del anillo aromático, hecho que ayuda a reducir el número de reacciones posteriores a la obtención del fluoróforo.

Con la finalidad de incrementar la eficacia de la síntesis se han realizado una serie de modificaciones en el protocolo descrito, consiguiendo incrementar el rendimiento desde un 21% descrito en la bibliografía hasta un 41% (Esquema 42).

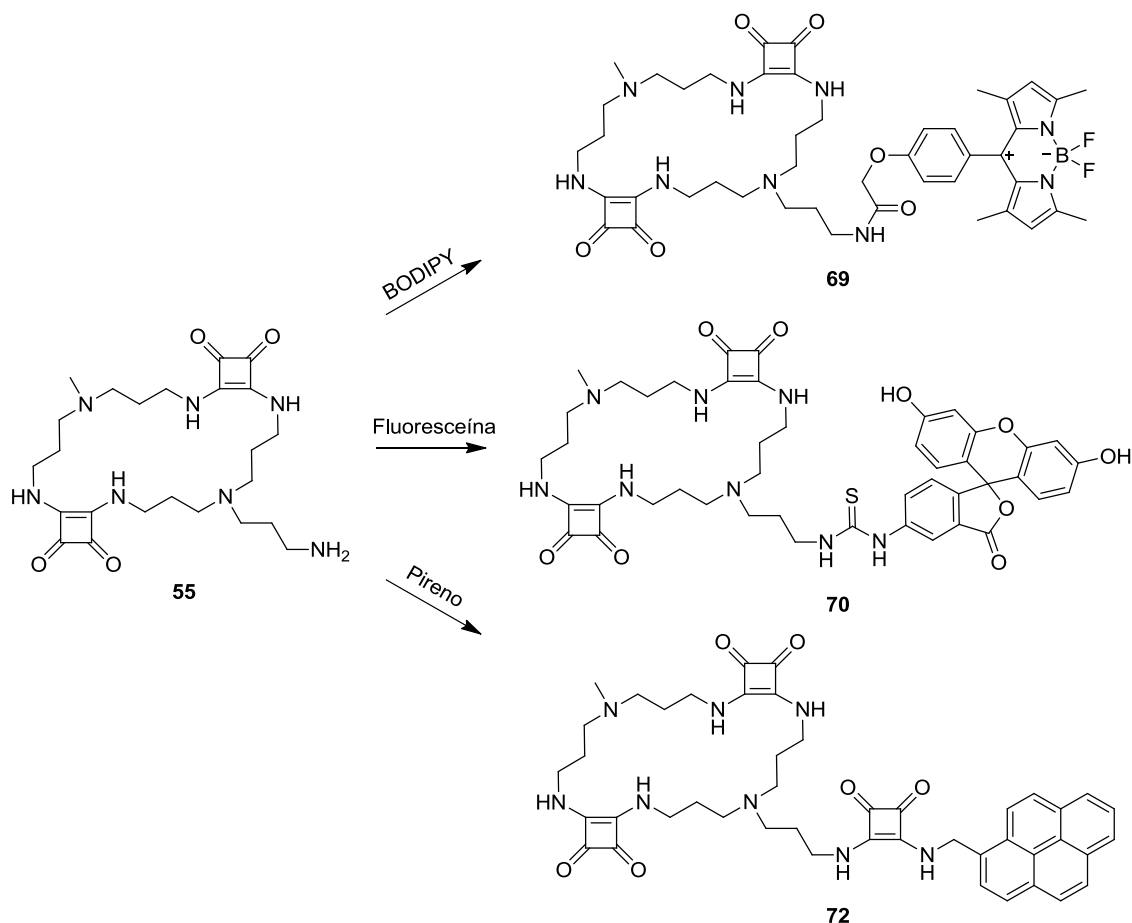


Esquema 42 – Síntesis de BODIPY **65** y desprotección del grupo carboxilato para reaccionar posteriormente con aminas mediante agentes de acoplamiento.

La síntesis comienza con una condensación Williamson entre el p-hidroxibenzaldehído **59** y el bromoacetato de etilo **60** obteniendo el benzaldehído funcionalizado **61** con un rendimiento del 92%. A continuación la condensación con 2,4-dimetilpirrol **62**, en presencia de TFA como catalizador seguida de oxidación con DDQ conduce al dipirrometeno pentasustituido **63**. Cabe resaltar que antes de iniciar la condensación del benzaldehído funcionalizado y el 2,4-dimetilpirrol, se añadió una pequeña cantidad de anhídrido acético al medio de reacción. Esta adición previa elimina cualquier traza de agua en el medio produciendo ácido acético que, junto con el TFA, actúa como catalizador ácido. El crudo de reacción resultante se ha disuelto en CH_2Cl_2 y se ha filtrado rápidamente sobre Florisil[®], un silicato magnésico que permite eliminar gran parte de los polímeros presentes en el crudo de reacción antes de purificarlo mediante cromatografía en columna. A continuación, el crudo obtenido se trata con un exceso de trifluoruro de boro **64**, para obtener el derivado BODIPY **65**. En cuanto a la elaboración, se ha comprobado que el rendimiento mejora realizando un lavado del crudo con agua, y posteriormente un tratamiento con un equivalente de K_2CO_3 en MeOH, con lo que se elimina cualquier resto del trifluoruro de boro restante. Finalmente una cromatografía en columna de sílica y recristalización en CH_2Cl_2 :hexano permite obtener el núcleo fluorescente de BODIPY **65** en forma de cristales naranjas con un rendimiento del 41%, que duplica el rendimiento del 21% descrito para este compuesto.¹⁰² El producto obtenido de este modo parece no degradarse con el tiempo ya que su espectro de RMN permanece invariable durante un período superior a los dos años almacenado en condiciones anhidras, protegido de la luz y a una temperatura entre 2 y 8 °C. La hidrólisis básica del éster con K_2CO_3 en exceso y en MeOH durante 60

horas a temperatura ambiente, conduce al correspondiente ácido **66** apto para su condensación con aminas.

Una vez obtenida la estructura macrocíclica **54**, su conjugación con los diferentes fluoróforos seleccionados para la obtención de las sondas fluorescentes se plantea en un único paso (Esquema 43).¹²⁶

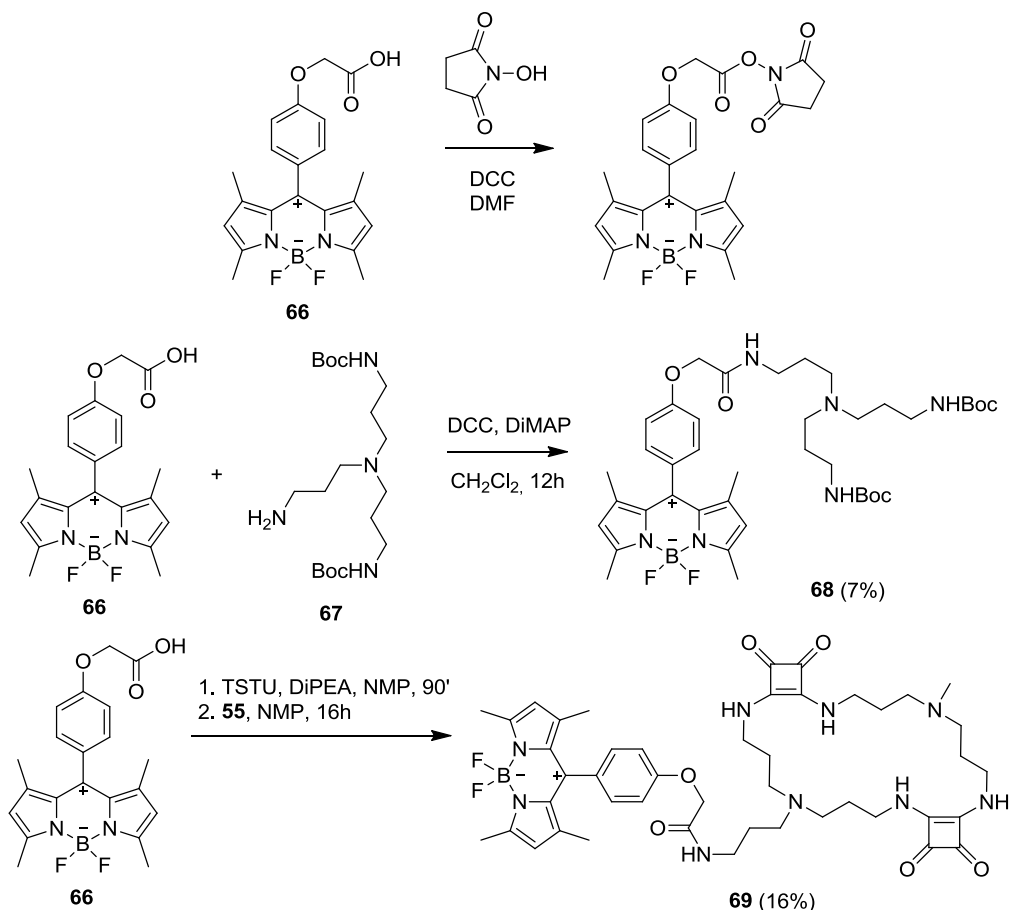


Esquema 43 – Obtención de las tres sondas fluorescentes oligoesquaramídicas **69**, **70** y **72** a partir de la oligoesquaramida cíclica ramificada **55**.

¹²⁶ De aquí en adelante se utilizará la nomenclatura C2-X para denominar a las tres sondas fluorescentes preparadas, donde C2, de acuerdo con lo indicado en el capítulo 2, se refiere a una estructura oligoesquaramídica cíclica formada por dos unidades escuaramida, y X a las siglas asignadas para denominar a la unidad fluorescente conjugada, BDP para el 1,3,5,7-tetrametil BODIPY, FITC para la fluoresceína 5-isotiocianato y Pyr para la 1-pirenometilamina. De esta forma se obtienen los acrónimos C2-BDP para la sonda **69**, C2-FITC para la **70**, y C2-Pyr para la **72**.

3.7.1.3 Síntesis de la sonda fluorescente C2-BDP **69**

Para la preparación de C2-BDP **69** es necesario realizar una condensación entre el grupo amino de la oligoescuaramida **55** y el ácido carboxílico del BODIPY **66** (Esquema 44).



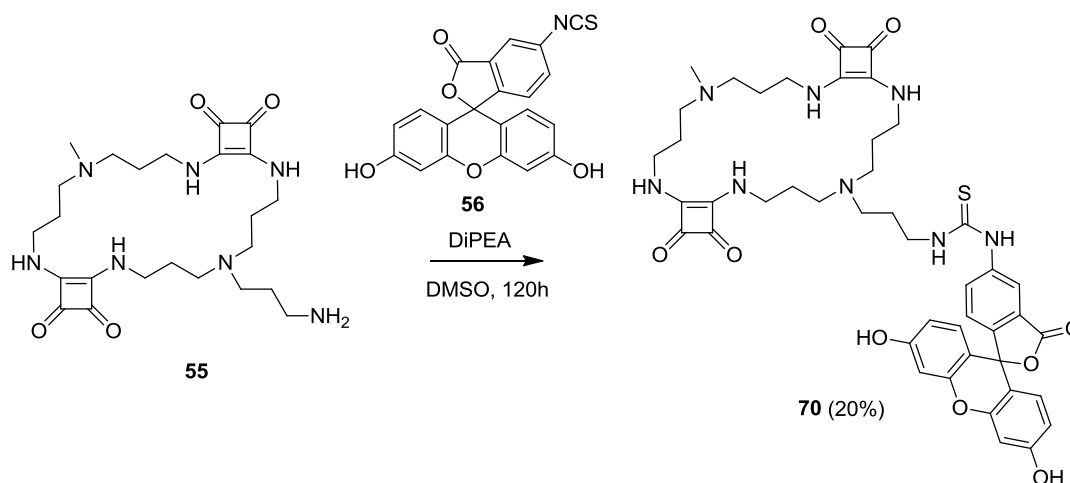
Esquema 44 – Diversas rutas de síntesis utilizadas para la obtención de la sonda fluorescente C2-BDP **69**.

Esta reacción se abordó en primer lugar mediante la activación del grupo ácido con N-hidroxisuccinimida para formar el correspondiente éster activado, utilizando como agente de acoplamiento DCC en DMF según el procedimiento descrito en la bibliografía.¹⁰² Estas condiciones de síntesis no dieron buenos resultados, observándose una alta tasa de degradación durante la purificación del producto. Como alternativa se realizó una condensación entre la triamina diprotectada **67**, obtenida según el procedimiento descrito en la bibliografía,¹²⁷ y el ácido carboxílico **66**, en condiciones anhidras y utilizando igualmente el agente de acoplamiento DCC. En este caso el producto deseado **68** se obtuvo con apenas un rendimiento del 7%. A pesar del bajo rendimiento, se intentaron desproteger los grupos amino para conseguir de este

¹²⁷ Malabarba, A.; Ciabatti, R.; Kettenring, J.; Scotti, R.; Candiani, G.; Pallanza, R.; Berti, M.; Goldstein, B. P.; Synthesis and Antibacterial Activity of a Series of Basic Amides of Teicoplanin and Deglucoteicoplanin with Polyamines. *J. Med. Chem.*, **1992**, 35, 4054-4060.

modo una diamina capaz de reaccionar con el diéster **5** para dar la reacción de macrociclación, sin embargo, las condiciones habituales de desprotección de los grupos amino en medio ácido provocó la degradación de la molécula, haciendo inviable esta ruta sintética. Puesto que la solubilidad de la oligoescuaramida **54** es muy limitada en las condiciones anhidras habituales para la formación de amidas, como última alternativa se ha activado el BODIPY **66** con TSTU (tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio) y DiPEA (diisopropiletilamina) en NMP (N-metil-2-pirrolidona), para posteriormente adicionar la oligoescuaramida cíclica desprotegida **55**, obteniendo de este modo unos resultados satisfactorios. El uso de NMP incrementa la solubilidad de los reactivos mientras que la efectividad de la activación con TSTU ha permitido poder realizar la reacción sin aislar el producto intermedio en una estrategia "one-pot". El crudo de reacción se ha purificado mediante HPLC de fase reversa, aislando una fracción del producto **69** con una pureza superior al 95% aunque con un rendimiento de solo el 16%.

3.7.1.4 Síntesis de la sonda fluorescente C2-FITC **70**

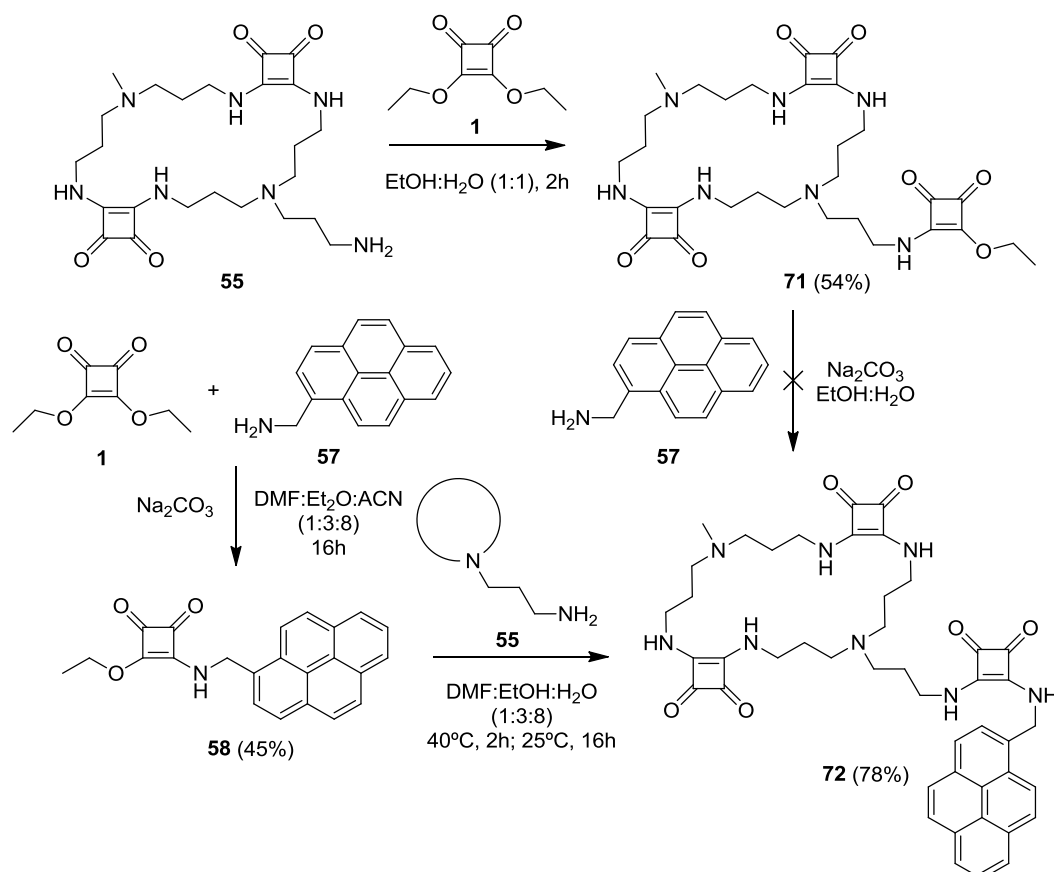


Esquema 45 – Síntesis de la sonda fluorescente C2-FITC **70**.

La obtención de la sonda C2-FITC **70** se ha llevado a cabo mediante la reacción directa de la oligoescuaramida cíclica desprotegida **55**, en presencia de DMSO y DiPEA, y la fluoresceína isotiocianato **56** en DMSO. En este caso la reacción progresa muy lentamente, por lo que se ha mantenido la reacción durante cinco días. La purificación del crudo se ha llevado a cabo igualmente mediante HPLC de fase reversa. En este caso se ha podido aislar una fracción del producto **70** con una pureza comprobada mediante inyección analítica de prácticamente el 100%, con un rendimiento final del 20% (Esquema 45).

3.7.1.5 Síntesis de la sonda fluorescente C2-Pyr **72**

La última de las sondas previstas, C2-Pyr **72**, se ha obtenido sin la necesidad del uso de agentes de acoplamiento ni activadores debido a la introducción de un espaciador escuaramídico en la estructura de la sonda. Como se ha comentado anteriormente, los ésteres escuaramídicos condensan directamente con aminas. La unidad escuaramida permite establecer dos alternativas para la síntesis de esta sonda fluorescente, bien sea realizando la condensación del escurato de etilo **1** sobre la oligoescuaramida **55**, y posteriormente sobre el fluoróforo **57**, o a la inversa (Esquema 46).



Esquema 46 – Rutas de síntesis utilizadas para la obtención de la sonda fluorescente C2-Pyr **72**.

La primera de las alternativas, realizando en primer lugar una condensación entre la oligoescuaramida desprotegida **55** y el escurato de dietilo **1**, permitió obtener una oligoescuaramida cíclica con un derivado éster funcionalizable **71**. Sin embargo la reacción posterior con la 1-pirenometilamina **57** no tiene lugar.¹²⁸ La ausencia del producto de reacción se asoció a la necesidad de tener un pH básico cercano a 9, condiciones en las que la oligoescuaramida cíclica **71** precipita impidiendo la entrada de la amina **57** sobre la semiescuaramida. Por este motivo, la síntesis de la sonda **72** se ha llevado a cabo a partir del derivado **58**. En este caso el semiéster se ha podido

¹²⁸ Wurm, F.; Steinbach, T.; Klok, H. A.; One-pot squaric acid diester mediated aqueous protein conjugation. *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 7815-7817.

conjugar en unas condiciones similares a las anteriores con la oligoescuaramida desprotegida **55**. La sonda derivada del pireno **72** se ha purificado mediante HPLC. El rendimiento global de la reacción de condensación es del 78%, demostrando la versatilidad que aporta la unidad escuaramida mediante la posibilidad de establecer dos rutas sintéticas alternativas.

3.7.2 Caracterización fotofísica de las sondas fluorescentes

Los espectros de RMN y la espectrometría de masas han confirmado las estructuras de las tres sondas por lo cual se ha procedido a su caracterización fotofísica en medio PBS (pH 7,4).

Para la caracterización fotofísica se ha trabajado con concentraciones en el intervalo comprendido entre $5,0 \times 10^{-5}$ M y 1×10^{-7} M en función del experimento. Debido a la moderada solubilidad de las sondas C2-BDP **69** y C2-FITC **70** en tampones acuosos, éstas requieren la adición de un 1% de DMSO, mientras que la sonda C2-Pyr **72** requiere un 5%. Este límite impuesto del 5% de DMSO responde a la intención de simular un entorno fisiológico, por tanto, aunque un 10% de DMSO permite incrementar la solubilidad del compuesto, estas condiciones no son biocompatibles, por lo que los resultados obtenidos no serían extrapolables al medio fisiológico.

3.7.2.1 Espectros de absorción-emisión

La sonda C2-BDP **69** presenta dos máximos de absorción a 288 y 500 nm ($\epsilon = 4,6 \times 10^5$ M⁻¹cm⁻¹), correspondientes a la unidad escuaramida y el fluoróforo respectivamente, y uno de emisión a 508 nm ($\lambda_{exc} = 465$ nm), lo que significa un desplazamiento de Stokes de tan solo 8 nm. Para evitar los posibles efectos de filtro interno debidos a este pequeño desplazamiento de Stokes en experimentos posteriores se ha utilizado una longitud de onda de excitación de 460 nm, inferior al máximo situado en 500 nm, lo cual implicará una pérdida de sensibilidad (Fig. 67).

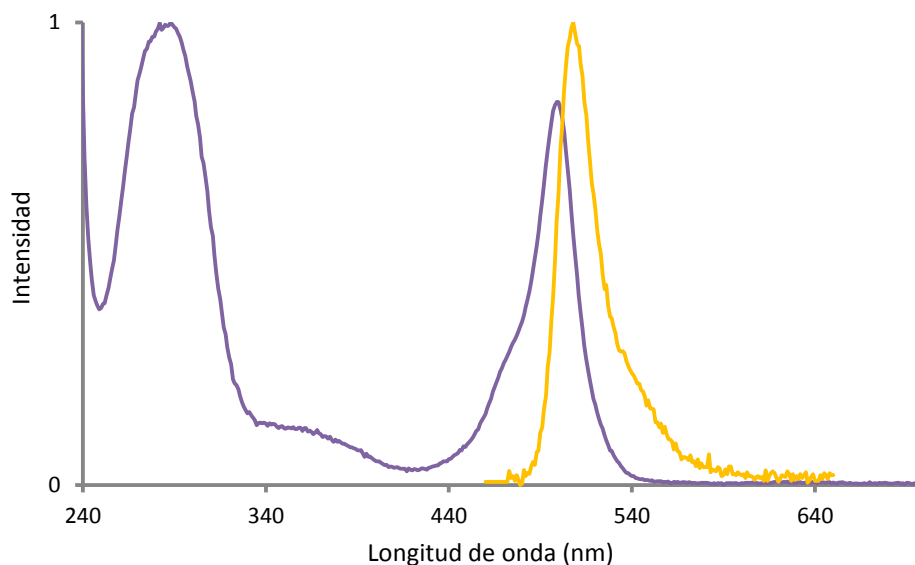


Figura 67 – Espectros normalizados de absorción (violeta) y emisión (naranja) del compuesto **69** C2-BDP. $\lambda_{\text{exc}} = 465 \text{ nm}$.

El compuesto C2-FITC **70** presenta dos máximos de absorción, uno a 278 nm, correspondiente a la banda escuaramídica, y otra de menor intensidad, correspondiente a la absorción de la fluoresceína a 485 nm ($\epsilon = 4,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). La banda de emisión presenta el máximo a 520 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$), mostrando en este caso un mayor desplazamiento de Stokes (Fig. 68).

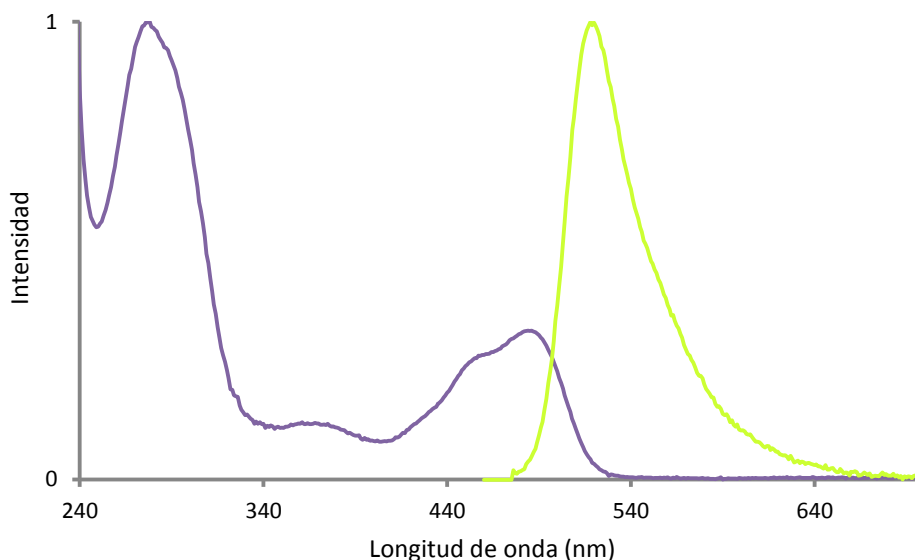


Figura 68 – Espectros normalizados de absorción (violeta) y emisión (verde) del compuesto **70** C2-FITC. $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$.

Por el mismo motivo que en el caso de la sonda C2-BDP **69**, la excitación en este caso se ha realizado por debajo del máximo de absorción.

La última de las sondas analizadas es la C2-Pyr **72**. En este caso el espectro ultravioleta-visible es más complejo, observándose el patrón correspondiente a las bandas vibrónicas del pireno que solapan con el cromóforo escuaramídico. El máximo absoluto situado a 275 nm corresponde a la absorción de la escuaramida. Por otra parte se pueden observar dos máximos relativos a 324 y 346 nm y dos hombros de mucha menor intensidad entre 380 y 395 nm. En cuanto a la banda de emisión situada a 470 nm, se consigue obtener una emisión fluorescente con una relación señal-ruido aceptable realizando la excitación a 370 nm, lejos de cualquier de los máximos de absorción del pireno. Cabe decir que la sonda con pireno presenta a igualdad de concentración la menor intensidad de fluorescencia de entre las tres consideradas (Fig. 69).

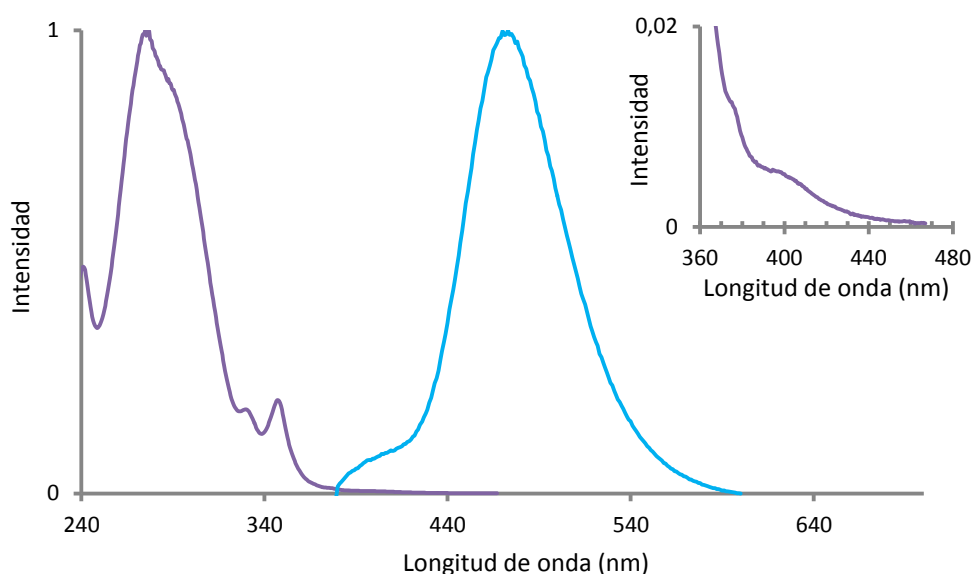


Figura 69 – Espectros normalizados de absorción (violeta) y emisión (azul) del compuesto **72** C2-Pyr. λ_{exc} = 370 nm. El recorte de la esquina superior derecha muestra los hombros de la banda del pireno a 380 y 395 nm.

Las escuaramidas poseen una capacidad de "quenching" o atenuación de la fluorescencia probablemente debido a la transferencia fotoelectrónica (PET) ligada a la existencia de nitrógenos con pares de electrones sin compartir. Debido a ello, cabe esperar que la fluorescencia de los fluoróforos conjugados con oligoescuaramidas cíclicas presenten intensidades de emisión inferiores a la de los correspondientes fluoróforos independientes. Además, los dos grupos amina terciaria presentes en la sonda, se comportan del mismo modo, obteniendo un segundo grupo funcional capaz de provocar un "quenching" tipo PET, en este caso únicamente en medio básico. Este efecto provocado por las aminas es fácilmente reversible en medio ácido, eliminando de esta forma el par de electrones libre de las aminas, lo que se traducirá en un incremento en la fluorescencia.

3.7.2.2 Variación de la fluorescencia en función del pH

En el caso de las sondas fluorescentes con aplicación biológica, resulta de gran importancia conocer el comportamiento de la emisión fluorescente en función del pH. Ello se debe a la existencia de diversos entornos intracelulares con valores de pH que oscilan entre 4,7 en los lisosomas hasta 7,2, el pH propio del citoplasma.¹²⁹

Con la finalidad de determinar el efecto provocado por el estado de protonación de las aminas terciarias de la oligoescuaramida cíclica, la intensidad de fluorescencia de las sondas C2-BDP **69** y C2-FITC **70** se ha determinado en función del pH de la disolución. Se ha omitido de este estudio la sonda C2-Pyr **72** por presentar una fluorescencia muy baja y especialmente por la insolubilidad del conjugado C2-Pyr **72**, especialmente en medios acuosos neutros en los que las aminas están desprotonadas.

Para realizar este estudio las sondas se han disueltas en DMSO y se han diluido en agua a una concentración final de $5,0 \times 10^{-6}$ M en H₂O con una concentración final de DMSO del 1%. Para cada una de las sondas se han preparado disoluciones cuyo pH oscila entre 3 y 11. La intensidad de fluorescencia se representa como la integral de la curva de emisión entre dos longitudes de onda determinadas (λ_0 y λ_f) según la ecuación 2.

$$I_{Fl} = \sum_{i=\lambda_0}^{\lambda_f} [I_{Fl}]_{i+1} \cdot (\lambda_{i+1} - \lambda_i) \quad (\text{Ec. 2})$$

La representación de las integrales de las curvas de emisión en función del pH proporciona los resultados de la figura 70.

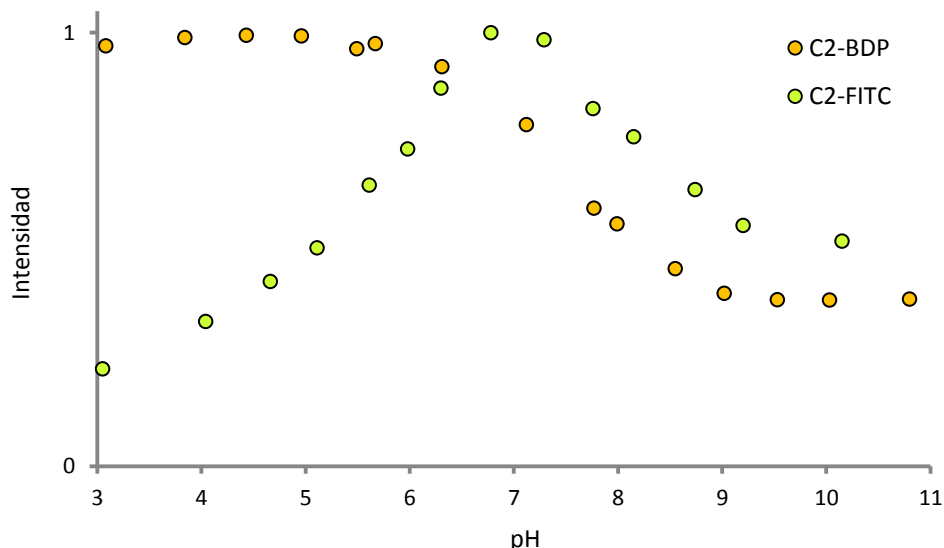


Figura 70 – Intensidad de fluorescencia normalizada en función del pH de la disolución para las sondas C2-BDP **69** y C2-FITC **70**, a una concentración $5,0 \times 10^{-6}$ M en medio H₂O/1% DMSO a 37 °C.

¹²⁹ Casey, J. R.; Grinstein, S.; Orlowski, J.; Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, **2010**, 11, 50-61.

Analizando las curvas se puede observar que en medios básicos ambas experimentan una reducción de la fluorescencia debido a la desprotonación de las aminas terciarias de la oligoescuaramida cíclica ($pK_a^1 = 7,9$; $pK_a^2 = 8,6$). Por otra parte, la mayor disminución de la fluorescencia en medio ácido de la sonda C2-FITC **70** se explica por la protonación de la fluoresceína y la pérdida habitual de fluorescencia que experimenta ésta en medio ácido. Dado que la sonda C2-BDP **69** no tiene otros grupos ionizables en medio ácido, su intensidad se mantiene estable en el intervalo de pH entre 3 y 6, lo que la hace muy adecuada para su utilización como marcador celular.

3.7.2.3 Cálculo de los rendimientos cuánticos

Para la completa caracterización de las sondas se ha procedido a calcular el rendimiento cuántico en condiciones fisiológicas, obtenido mediante comparación con un estándar por los motivos descritos en la introducción del capítulo. Para ello se hace uso de la ecuación 3.⁶⁶

$$\Phi_M^\lambda = \Phi_E \cdot \frac{Fl_M^\lambda \cdot Abs_E^\lambda}{Abs_M^\lambda \cdot Fl_E^\lambda} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde Φ es el rendimiento cuántico de la muestra (M) o del estándar (E). “Abs” es la absorbancia a una longitud de onda determinada (λ) y “Fl” el área integrada de la curva de fluorescencia excitando a esa longitud de onda (λ).

Uno de los factores más importantes a la hora de elegir un estándar es el grado de solapamiento de las bandas de absorción de ambos fluoróforos. Los rendimientos cuánticos de los estándares no varían apenas con la longitud de onda de excitación, sin embargo, es recomendable realizar las lecturas en los alrededores del máximo de absorción, obteniendo de esta forma mayor sensibilidad. Un factor más importante si cabe es que, al comparar estándar y muestra, la longitud de onda de absorción-excitación sea la misma, evitando de este modo tener que realizar las correcciones debidas a la diferente intensidad de la lámpara de fluorescencia a diferentes longitudes de onda. Esta última consideración pone de manifiesto la necesidad de usar estándares con perfiles similares de absorción-emisión que los de las muestras a analizar. El último factor a tener en cuenta es el índice de refracción del disolvente, un dato que en este caso se considera constante, y por tanto despreciable, al utilizar disoluciones acuosas con porcentajes de DMSO inferiores al 5%.¹³⁰

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, los estándares seleccionados para las sondas han sido Oregon Green 488 (OG), con un rendimiento cuántico de 0,97 en tampón borato 0,1 M a pH 9, para las sondas C2-BDP **69** y C2-FITC **70** y sulfato de quinina (QS) con un rendimiento cuántico de 0,60 en disolución de HClO₄ 0,1 M para la sonda C2-Pyr **72**.

¹³⁰ LeBel, R. G.; Goring, D. A. I.; Density, Viscosity, Refractive Index, and Hygroscopicity of Mixtures of Water and Dimethyl Sulfoxide. *J. Chem. Eng. Data*, **1962**, *7*, 100-101.

Los rendimientos cuánticos se han calculado a pH 7,4 y 5,5, utilizando para ello muestras de las sondas disueltas en tampón de PBS (pH 7,4) y cacodilato a una concentración 0,01 M (pH 5,5).

Los resultados obtenidos se muestran a continuación para las sondas C2-BDP **69** (Fig. 71), C2-FITC **70** (Fig. 72) y C2-Pyr **72** (Fig. 73).

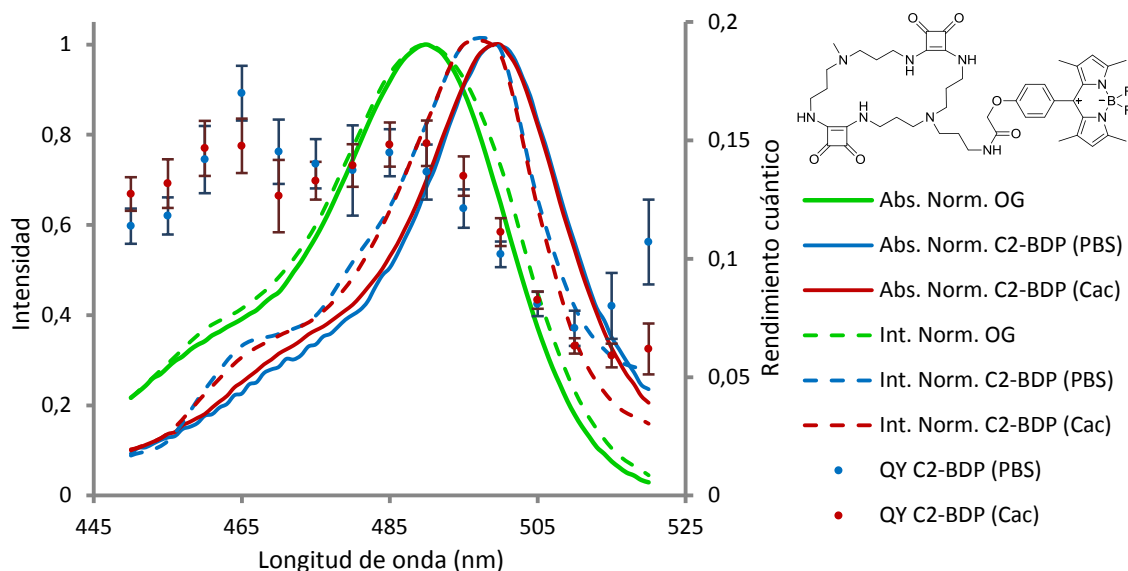


Figura 71 – Trazado continuo: Espectros de absorción UV-Vis normalizados de la sonda C2-BDP **69** en PBS (pH = 7,4) (azul) y tampón cacodilato (pH = 5,5) (rojo) y del estándar Oregon Green 488 (verde). Trazado discontinuo: Integrales normalizadas de los espectros de emisión en función de la longitud de onda de excitación para las mismas muestras. Puntos: Rendimiento cuántico en función de la longitud de onda (puntos azules para PBS y rojos para cacodilato) y desviación estándar.

La sonda C2-BDP **69** presenta una mayor intensidad de fluorescencia a pH ácido (Fig. 70) que no se traduce en una variación significativa del rendimiento cuántico, de $0,14 \pm 0,01$ en PBS y $0,15 \pm 0,01$ en tampón cacodilato a 490 nm.

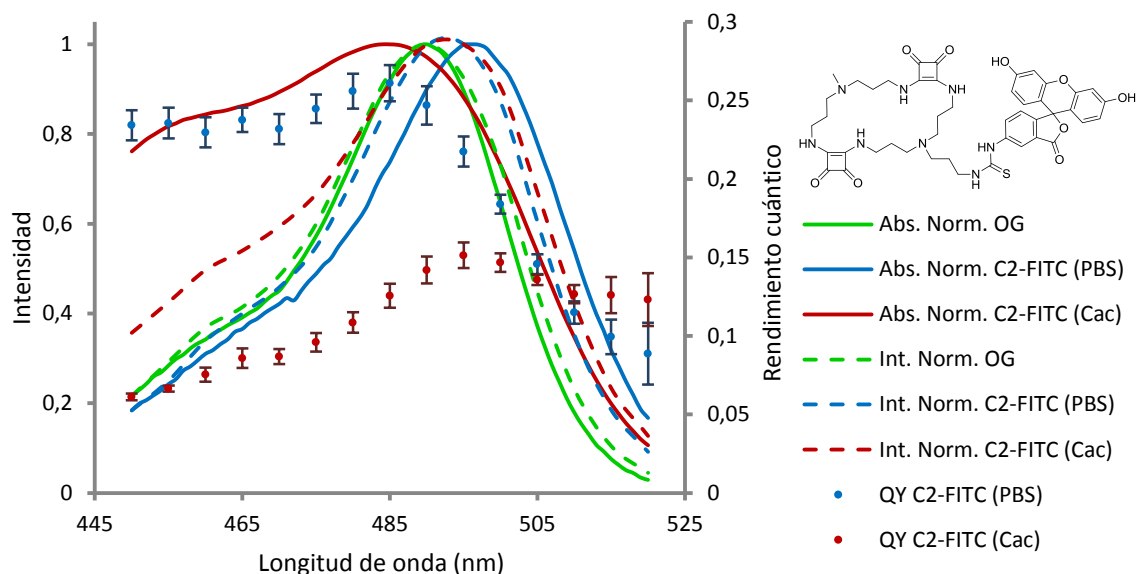


Figura 72 – Trazado continuo: Espectros de absorción UV-Vis normalizados de la sonda C2-FITC **70** en PBS (pH = 7,4) (azul) y tampón cacodilato (pH = 5,5) (rojo) y del estándar Oregon Green 488 (verde). Trazado discontinuo: Integrales normalizadas de los espectros de emisión en función de la longitud de onda de excitación para las mismas muestras. Puntos: Rendimiento cuántico en función de la longitud de onda (puntos azules para PBS y rojos para cacodilato) y desviación estándar.

En el caso de la sonda C2-FITC **70** se observa una disminución del rendimiento cuántico notable a pH ácido provocada por la propia naturaleza del fluoróforo. Dicha disminución es más acusada a longitudes de onda de excitación menores. Los valores exactos a 490 nm son de $0,25 \pm 0,01$ en PBS y $0,142 \pm 0,009$ en cacodilato.

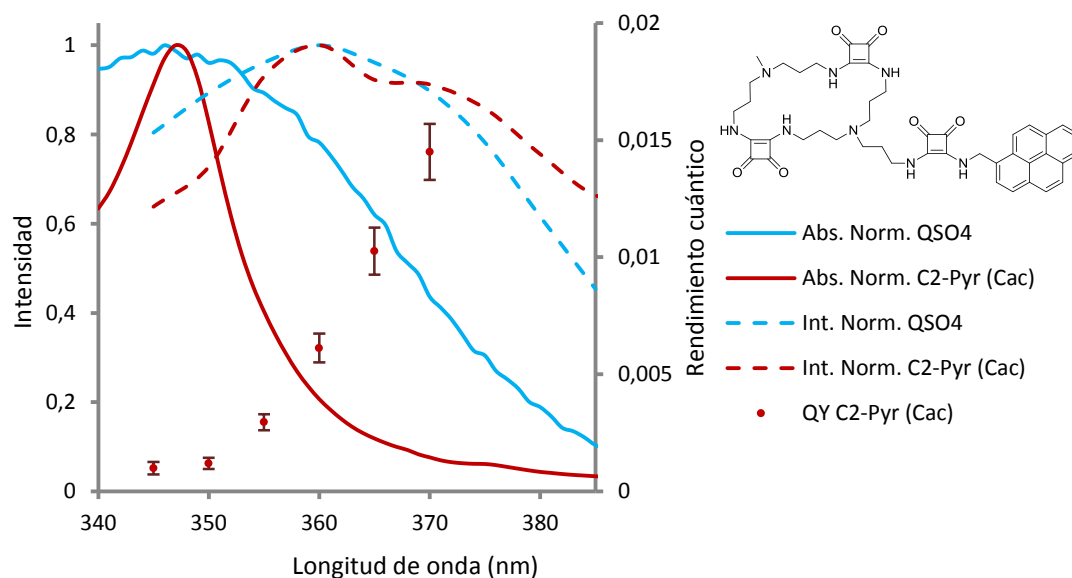


Figura 73 – Trazado continuo: Espectros de absorción UV-Vis normalizados de la sonda C2-Pyr **72** en PBS (pH = 7,4) (azul) y tampón cacodilato (pH = 5,5) (rojo) y del estándar Oregon Green 488 (verde). Trazado discontinuo: Integrales normalizadas de los espectros de emisión en función de la longitud de onda de excitación para las mismas muestras. Puntos: Rendimiento cuántico en función de la longitud de onda (puntos azules para PBS y rojos para cacodilato) y desviación estándar.

En el caso de la sonda C2-Pyr **72**, debido a su naturaleza apolar, no ha sido posible disolver completamente la muestra en PBS, impidiendo unas lecturas adecuadas de absorción y fluorescencia. En medio cacodilato la concentración máxima ha sido de

$5,0 \times 10^{-5}$ M, observándose la aparición de turbidez a concentraciones mayores. La elección del estándar permite cierto solapamiento entre las bandas de absorción, sin embargo este solapamiento no es tan óptimo para el C2-Pyr **72** y la quinina como el observado en el caso del Oregon Green 488 y las sondas C2-BDP **69** y C2-FITC **70**. Por este motivo se ha reducido el intervalo de longitudes de onda del estudio entre 345 y 370 nm. El valor del rendimiento cuántico obtenido a 360 nm es de $0,006 \pm 0,001$. Se puede observar en la figura 73 como a medida que aumenta la longitud de onda aumenta el valor del rendimiento cuántico hasta 0,014 a 370 nm. En cualquier caso, a nivel práctico, la fluorescencia observada a esas longitudes de onda de excitación es muy débil.

A excepción de la sonda C2-Pyr **72** los valores del rendimiento cuántico obtenidos son comparables a los publicados para sondas moleculares referibles. A menudo éstas experimentan una disminución del rendimiento cuántico, comparado al de los fluoróforos en estado libre, debido a la conjugación con otras moléculas encargadas de aportar la especificidad en la localización. En este caso debido principalmente al “quenching” provocado por la escuaramida, efecto particularmente notable en el caso de la sonda con pireno.

En la bibliografía se pueden encontrar diferentes ejemplos de moléculas fluorescentes que presentan unos rendimientos cuánticos discretos. Este es el caso por ejemplo de los fluoróforos derivados del BODIPY utilizados por S. Zhu y colaboradores con rendimientos cuánticos en PBS que oscilan entre 0,01 y 0,68.¹³¹ Lo mismo ocurre con una sonda celular de zinc obtenida por G. K. Walkup, con un rendimiento cuántico de 0,39 en ausencia de zinc que se incrementa a 0,87 en presencia de este catión metálico.¹³² Un último ejemplo es el de la sonda fluorescente BODIPY FL GTP comercializada por Life Technologies (Ref. G12411).¹³³ En este caso la conjugación con el nucleótido provoca que el rendimiento cuántico se reduzca hasta un 10% del valor que presenta el fluoróforo libre (Fig. 74).

¹³¹ Zhu, S.; Zhang, J.; Vegesna, G.; Luo, F.-T.; Green, S. A.; Liu, H.; Highly Water-Soluble Neutral BODIPY Dyes with Controllable Fluorescence Quantum Yields. *Org. Lett.*, **2011**, 13, 438-441.

¹³² Walkup, G. K.; Burdette, S. C.; Lippard, S. J.; Tsien, R. Y.; A New Cell-Permeable Fluorescent Probe for Zn^{2+} . *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 5644-5645.

¹³³ <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/G12411>

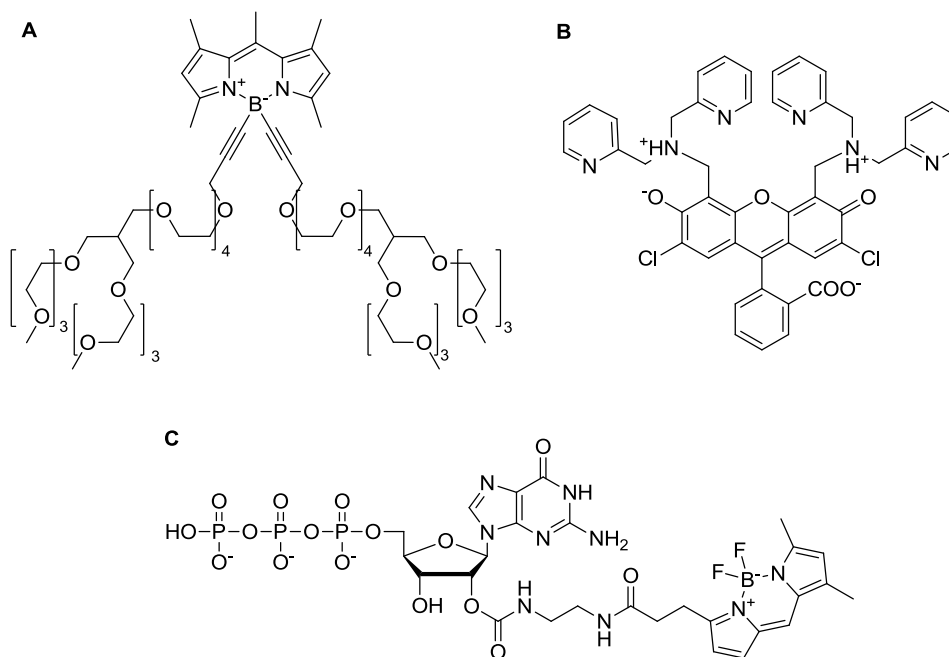


Figura 74 – Sondas moleculares fluorescentes derivadas de BODIPY y fluoresceína con rendimientos cuánticos en PBS de: A) 0,68, el derivado con el rendimiento cuántico en PBS más elevado de los presentados en el trabajo de S. Zhu.¹³¹ Y B) 0,39 en PBS, que se incrementa hasta 0,87 en presencia de Zn^{2+} (G. K. Walkup).¹³² C) Para la sonda fluorescentes de Life Technologies no se indica un valor concreto del rendimiento cuántico, si bien no es superior a 0,1.¹³³

3.7.3 Evaluación biológica de las sondas fluorescentes

La evaluación biológica de las tres sondas se ha realizado frente a dos líneas celulares diferentes, U87MG (células de glioma humano) y NIH3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón), mediante citometría de flujo y microscopía confocal de fluorescencia.¹³⁴

Los estudios realizados han demostrado la efectividad en la internalización de las oligoescuaramidas cíclicas, ya que las tres sondas atraviesan la membrana celular de forma efectiva y en un breve período de tiempo. Por el contrario cuando las células se han tratado con los fluoróforos sin conjugar (etil éster **65**, FITC **56** y 1-pirenometilamina **57**) no se ha observado fluorescencia en el interior celular.

En cuanto a la localización espacial de las sondas C2-BDP **69** y C2-FITC **70**, estas se acumulan en regiones muy definidas del citoplasma celular dando un patrón punteado y muy definido, lo cual indica que las sondas se almacenan en orgánulos específicos (Fig. 75).

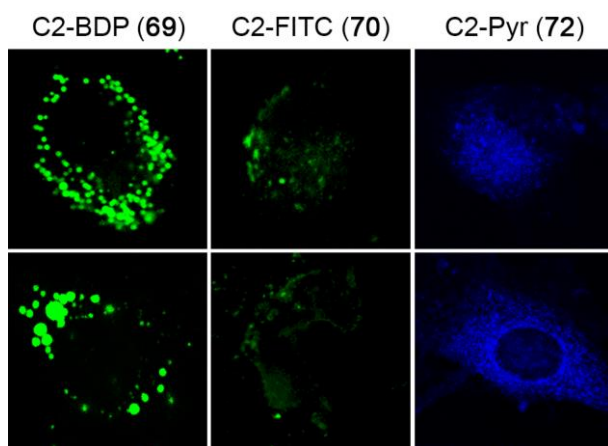


Figura 75 – Micrografías de microscopía confocal después del tratamiento de las líneas celulares U87MG (arriba) y NIH3T3 (abajo) con las tres sondas fluorescentes a una concentración 10 μ M durante 1 hora a 37 $^{\circ}$ C.

La sonda C2-FITC **70** sufre una rápida fotodegradación, ya que la intensidad de fluorescencia disminuye progresivamente a medida que se realizan observaciones sucesivas excitando a 488 nm mediante microscopía confocal. Este hecho está de acuerdo con la menor fotoestabilidad descrita para la fluoresceína,⁸³ lo que hace que el producto C2-FITC **72** no sea una sonda óptima. Por el contrario, en las mismas condiciones, la sonda C2-BDP **69** no muestra esta disminución de la fluorescencia. La fotoestabilidad de la sonda C2-BDP **69** se ha comprobado mediante fluorimetría, realizando “n” adquisiciones del espectro de emisión en intervalos de cinco minutos de una muestra a una concentración $5,0 \times 10^{-6}$ M en PBS/1% DMSO. La disminución máxima observada es aproximadamente de un 10%, confirmando su fotoestabilidad

¹³⁴ La evaluación se ha realizado en colaboración con el grupo de Biología Molecular del Cáncer. Los experimentos con cultivos celulares descritos en este capítulo han sido llevados a cabo por la Dra. Ruth Villalonga, miembro del grupo de Química Supramolecular.

(Fig. 76-A). Adicionalmente se ha comprobado mediante citometría de flujo que la intensidad de fluorescencia de C2-BDP **69** disminuye en función del tiempo de forma inversamente proporcional a la división celular, indicando con ello que la sonda no se degrada ni es metabolizada (Fig. 76-B).

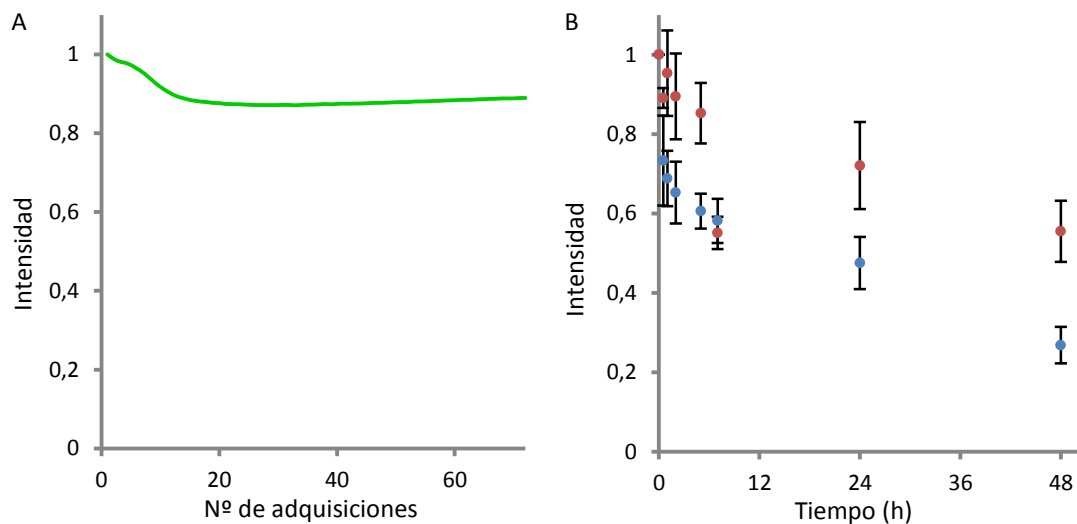


Figura 76 – A (Izquierda): Intensidad de fluorescencia normalizada obtenida mediante fluorimetría convencional de una muestra de C2-BDP **69** en PBS/1% DMSO a una concentración $5,0 \times 10^{-6}$ M realizando n adquisiciones del espectro de emisión en intervalos de 5 minutos. $\lambda_{exc} = 465$ nm. B (Derecha): Intensidad de fluorescencia obtenida mediante citometría de flujo en células U87MG (azul) y NIH3T3 (rojo) tratadas durante 1 hora con C2-BDP **69** a una concentración 10 μ M. La disminución de fluorescencia observada se asocia a la división celular y dilución correspondiente.

En cuanto a la distribución de la sonda C2-Pyr **72**, ésta muestra un patrón más difuso que el de las otras dos. Ello se debe por una parte a la baja fluorescencia que presenta y al consiguiente incremento necesario en la potencia del láser de excitación, lo cual incrementa mucho la relación señal-ruido. Por otra parte, el carácter hidrofóbico del pireno podría facilitar una internalización por difusión a través de la membrana celular o bien desde los propios orgánulos que provocan la internalización, dando este patrón de fluorescencia más disperso.

Así pues, debido al comportamiento de la sonda C2-Pyr **72** y a la poca fotoestabilidad del compuesto C2-FITC **70**, los estudios se prosiguieron con la sonda C2-BDP **69**.

3.7.3.1 Estudios de colocalización celular con la sonda C2-BDP **69**

Para determinar qué tipo de orgánulo está provocando esta acumulación observada por microscopia, se han realizado experimentos de colocalización con la sonda C2-BDP **69**. Esta sonda presenta un máximo de emisión a 508 nm, por lo que puede detectarse utilizando un filtro de adquisición verde (500-550 nm).

La colocalización en un cultivo celular se refiere a la presencia de dos o más sondas fluorescentes diferentes en una misma localización espacial. A nivel celular la

colocalización puede indicar que ambas moléculas ocupan el mismo entorno o receptor, mientras que en un contexto de imagen digital el término se refiere a que el color emitido por las dos sondas comparte el mismo pixel en esta imagen. Para llevar a cabo los estudios de colocalización se utilizan sondas fluorescentes cuya localización está bien establecida y que presentan una longitud de onda de excitación y de emisión bien diferenciada a la de la sonda que se pretende estudiar. Tratando los cultivos celulares con las dos sondas a la vez, ambas pueden localizarse utilizando dos láseres distintos para la excitación sobre el mismo cultivo celular. Concretamente, en estos experimentos se han utilizado como sondas de localización conocidas las denominadas sondas BacMam-RFP® (Life Technologies). Este tipo de sondas usan baculovirus como vehículo transportador de genes capaces de expresarse en forma de anticuerpos fluorescentes (Red Fluorescent Protein) específicos para los orgánulos en cuestión. En este caso se han utilizado sondas BacMan para endosomas tempranos, endosomas tardíos, lisosomas y para el complejo de Golgi, todos ellos con una emisión visible roja alrededor de los 650 nm. Una vez tratados los cultivos celulares con las sondas y fijados para microscopía confocal las imágenes se adquieren registrando consecutivamente la emisión obtenida con dos frecuencias de excitación distintas, 488 nm para la sonda C2-BDP **69** y 532 nm para las sondas BacMam. Después las imágenes obtenidas se visualizan, primero por separado, y después conjuntamente para analizar el grado de superposición o colocalización como medida de la coexistencia de ambas sondas en una misma zona.

Los resultados obtenidos han demostrado que existe una colocalización muy elevada en los endosomas tardíos como se puede observar al superponer las imágenes de los dos canales adquiridos, en verde para el C2-BDP **69** y en rojo para las sondas BacMam-RFP, obteniendo las áreas de solapamiento de color amarillo-naranja. La cuantificación de la colocalización se ha realizado mediante la determinación de los coeficientes de correlación de Pearson (P) y de solapamiento de Mander (M1 y M2) mediante el plugin Coloc2 de Fiji (Fig. 77).¹³⁵

¹³⁵ Schindelin, J.; Arganda-Carreras, L.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; Tinevez, J. Y.; White, D. J.; Hartenstein, V.; Eliceiri, K.; Tomancak, P.; Cardona, A.; Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*, **2012**, 9, 676-682.

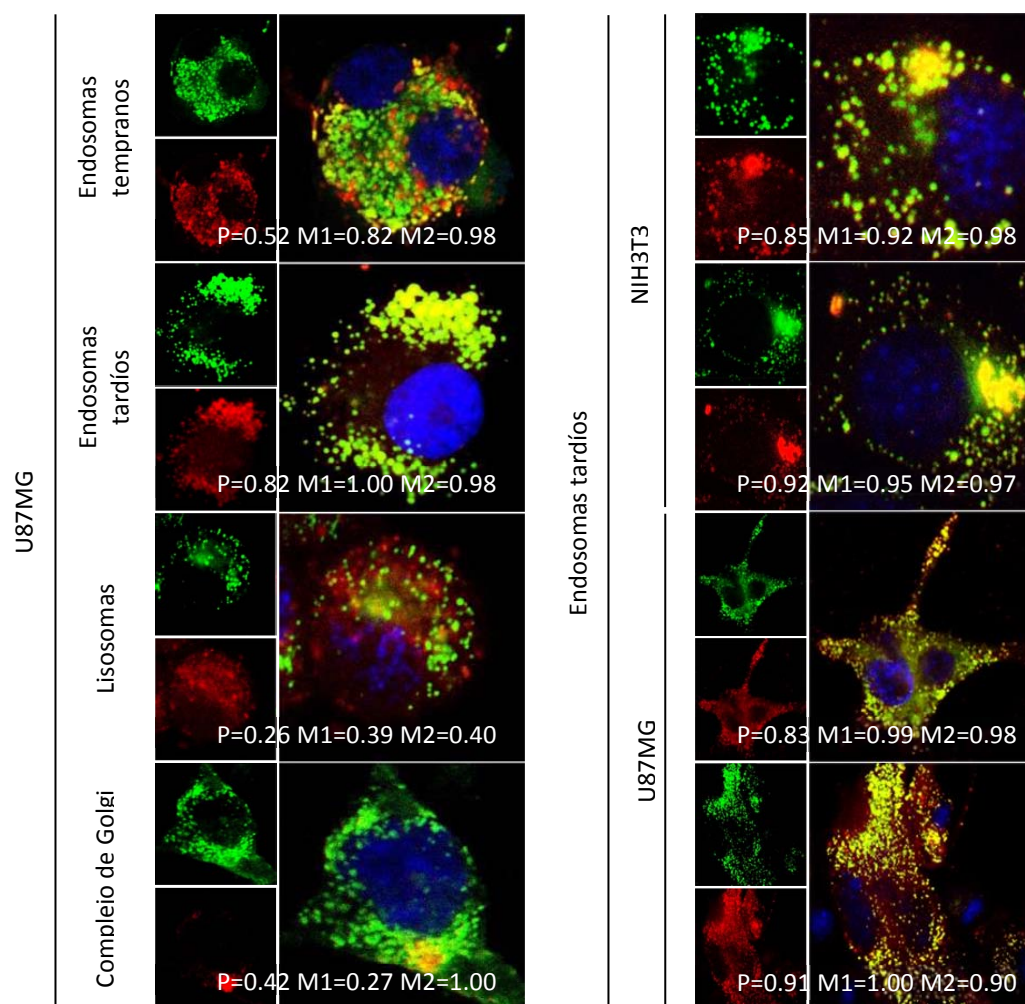


Figura 77 – Izquierda: Internalización de C2-BDP 69 (verde) y sondas BacMan-RFP® para diferentes orgánulos celulares (rojo) en la línea celular U87MG. Derecha: Internalización de C2-BDP 69 (verde) y la sonda BacMan-RFP® específica para endosomas tardíos (rojo) en líneas celulares NIH3T3 y U87MG. La superposición de ambos canales se representa por el color amarillo.

Tabla 4 – Coeficientes de correlación entre la sonda C2-BDP 69 y las sondas BacMam-RFP para diferentes orgánulos en la línea celular U87MG.

Orgánulo	P	M1	M2
End. tempranos	0,52	0,82	0,98
End. tardíos	0,82	1,00	0,98
Lisosomas	0,26	0,39	0,40
Complejo de Golgi	0,42	0,27	1,00

Tabla 5 – Coeficientes de correlación entre la sonda C2-BDP 69 y las sondas BacMam-RFP para los endosomas tardíos en dos líneas celulares diferentes, NIH3T3 y U87MG.

Línea celular	P	M1	M2
NIH3T3	0,85	0,92	0,98
NIH3T3	0,92	0,95	0,97
U87MG	0,83	0,99	0,98
U87MG	0,91	1,00	0,90

En las tablas **4** y **5** se muestran los coeficientes de correlación entre ambas sondas para diferentes orgánulos celulares y diferentes líneas celulares. El coeficiente de correlación de Pearson (P), mide la similitud entre ambos canales, mientras que los coeficientes de solapamiento de Mander (M1 y M2) cuantifican el solapamiento mutuo entre los dos canales (M1 sobre M2 y viceversa). Así se obtiene, por ejemplo, que al usar la sonda BacMam específica para Golgi existe un solapamiento del canal 2 con el canal 1 total (1,0), sin embargo el canal 1 no se encuentra totalmente solapado (0,27), dando un coeficiente de correlación bajo, 0,42. Para los lisosomas, se puede observar directamente en las imágenes que no hay grandes áreas de solapamiento, obteniendo zonas verdes y rojas claramente diferenciadas, hecho representado por los bajos coeficientes de Mander M1 y M2 (0,39 y 0,40 respectivamente). Además se ha comprobado que a tiempos de incubación mayores no se observa una evolución natural de los endosomas tardíos marcados a lisosomas, indicando que la presencia de la sonda inhibe la evolución natural. Para los endosomas tempranos parece existir un gran solapamiento entre ambos canales, tal y como indican los coeficientes de Mander, sin embargo el coeficiente de correlación es de tan solo 0,52. Diferente de todos los casos anteriores es el de los endosomas tardíos. En todos los casos donde se ha usado la sonda específica para estos orgánulos, existe una correlación superior a 0,8 y coeficientes de solapamiento mayores de 0,9, indicando una gran colocalización.

Estos datos indican que la sonda C2-BDP **69** se acumula en los endosomas tardíos y sugiere que se incorpora al interior celular mediante un proceso endocitótico ya que también se ha detectado su presencia parcial en los endosomas tempranos. Como se ha indicado en la introducción de este capítulo, la endocitosis comprende un conjunto de procesos de transporte activo en la célula y son energéticamente dependientes. Estos mecanismos endocitóticos se activan mediante una interacción a nivel de membrana con receptores específicos, por lo que resulta interesante conocer si la sonda C2-BDP **69** establece algún tipo de interacción supramolecular a nivel de receptores de membrana. Para estudiar el mecanismo de entrada de la sonda y con el objetivo de estudiar las interacciones supramoleculares de la sonda con la membrana se han realizado los experimentos detallados a continuación.

3.7.3.2 Experimentos de inhibición del transporte activo

Para determinar si la internalización tiene lugar mediante un transporte activo se han llevado a cabo dos tipos de experimentos. En un primer experimento más inespecífico, las líneas celulares se enfrían a 4 °C antes de tratarlas con la sonda C2-BDP **69**. A dicha temperatura la célula no puede obtener la energía necesaria para el proceso ya que se ralentizan las reacciones metabólicas, con lo cual se inhibe la internalización. En segundo lugar se han inhibido diversos procesos de internalización celular activos mediante el pretratamiento de las células con inhibidores específicos. En este caso se ha utilizado clorpromacina como inhibidor de endocitosis mediada por clatrina,

nistatina como inhibidor de endocitosis mediada por caveolina, y dinasore como inhibidor de la dinamina, una proteína implicada en la formación de vesículas de internalización (Fig. 78).

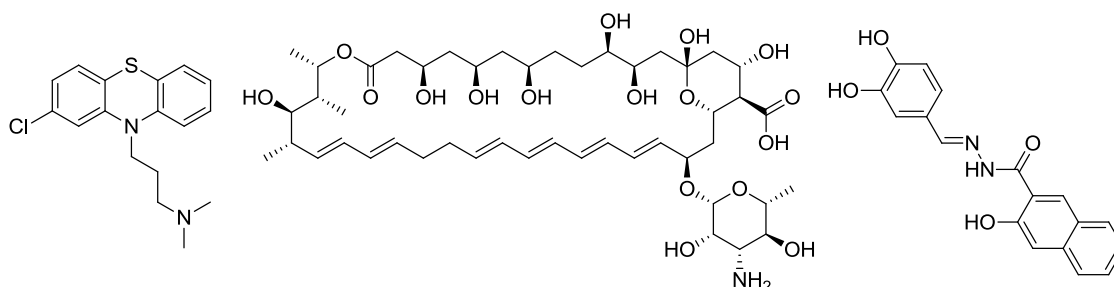


Figura 78 – Estructuras de clorpromacina (izquierda), nistatina (centro) y dinasore (derecha).

En los tres tipos de experimentos la entrada de la sonda fluorescente se evalúa cuantificando la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo (Fig. 79).

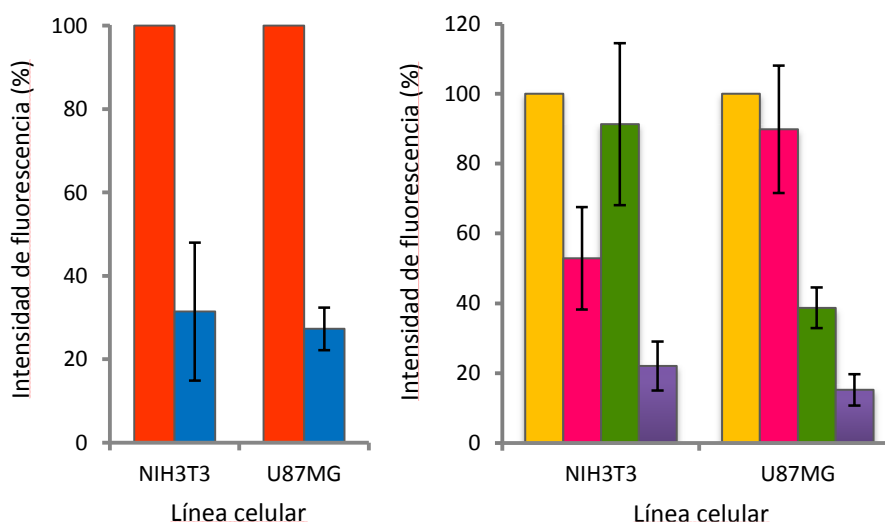


Figura 79 – Izquierda: Inhibición del transporte activo tratando las líneas celulares con una concentración 10 μM de C2-BDP **69** durante 1 hora a 4 $^{\circ}\text{C}$ (azul) en comparación con el tratamiento estándar a 37 $^{\circ}\text{C}$ (rojo). Derecha: Inhibición de la endocitosis pretratando los cultivos celulares con clorpromacina (magenta), nistatina (verde) o dinasore (morado) en las condiciones de inhibición específicas para cada uno y posteriormente con C2-BDP **69** 10 μM durante 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$. Los resultados se expresan como un porcentaje en relación al tratamiento con C2-BDP **69** 10 μM durante 1 hora a 37 $^{\circ}\text{C}$ (amarillo).

En todos los casos se detecta una reducción de la internalización de C2-BDP **69**. La inhibición selectiva demuestra que la sonda C2-BDP **69** se internaliza tanto por mecanismos dependientes de clatrina como de caveolina. Además se observa que la inhibición de los procesos específicos depende de la línea celular, obteniendo una inhibición mayor cuando se administra el inhibidor de ambos mecanismos. Estos resultados indican que existe un reconocimiento en la membrana de la sonda fluorescente C2-BDP **69** que activa un mecanismo de internalización de transporte activo, en concreto mediante endocitosis.

Para comprobar que la unidad oligoescuaramida es la responsable del reconocimiento molecular sobre la membrana celular se ha diseñado un experimento competitivo entre la sonda marcada C2-BDP **69** y la oligoescuaramida C2 **13**. Para ello las células se han incubado previamente con una alta concentración de la oligoescuaramida cíclica no marcada C2 **13** (50 μM) antes del tratamiento con C2-BDP **69**. La figura 80 demuestra que el pretratamiento con C2 **13** inhibe parcialmente la internalización de la sonda C2-BDP **69**, indicando que consigue saturar parcialmente los receptores de membrana implicados en el reconocimiento de las oligoescuaramidas cíclicas. Esta saturación de los receptores se representa en la figura como una disminución de la fluorescencia, respecto al mismo tratamiento de la sonda fluorescente sin el tratamiento previo con C2 **13**, en ambas líneas celulares.

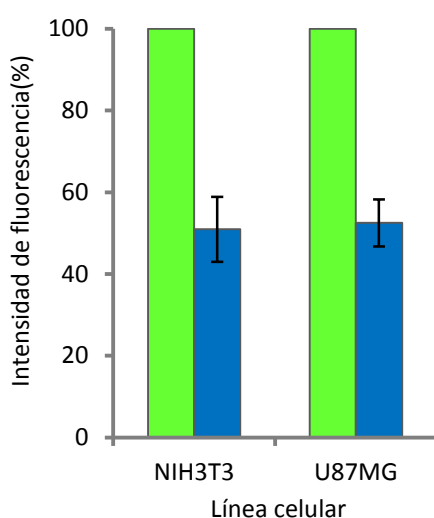


Figura 80 – Inhibición de la internalización mediante saturación de los receptores de membrana por pretratamiento con la oligoescuaramida C2 **13** (50 μM , 1 hora a 37 °C), seguido del tratamiento habitual con la sonda C2-BDP **69** (10 μM , 1 hora a 37 °C) (azul). Los resultados se referencian al tratamiento de C2-BDP **69** en las mismas condiciones sin realizar el tratamiento previo (verde).

3.7.4 Interacción de la oligoescuaramida cíclica **74** con grupos fosfato como modelos de componentes de membranas biológicas

La constatación experimental de la capacidad de las oligoescuaramidas cíclicas para interactuar con componentes de membranas a nivel biológico debe basarse en interacciones moleculares discretas. Dado que las membranas celulares externas e internas son ricas en fosfolípidos y otros componentes fosforilados, el estudio de la interacción de oligoescuaramidas cíclicas con moléculas fosforiladas constituye una hipótesis de partida atractiva para explicar la interacción oligoescuaramida cíclica-receptores de membrana.

En una primera aproximación para investigar el grado de interacción existente entre las oligoescuaramidas y receptores de membrana en medio acuoso, se han determinado las constantes de asociación de la oligoescuaramida cíclica y diferentes

modelos de fosfatos de membrana aniónicos en agua mediante valoración calorimétrica isotérmica, ITC (“Isothermal Titration Calorimetry”). Los modelos de fosfatos seleccionados han sido la adenosina-5'-monofosfato (AMP), la D-manosa-6-fosfato (M6P), la D-fructosa-1,6-bifosfato (FBP) y el cloruro de fosfocolina (PCh) (Fig. 81).

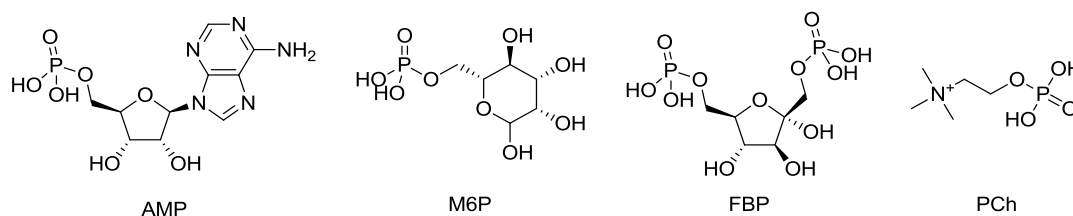
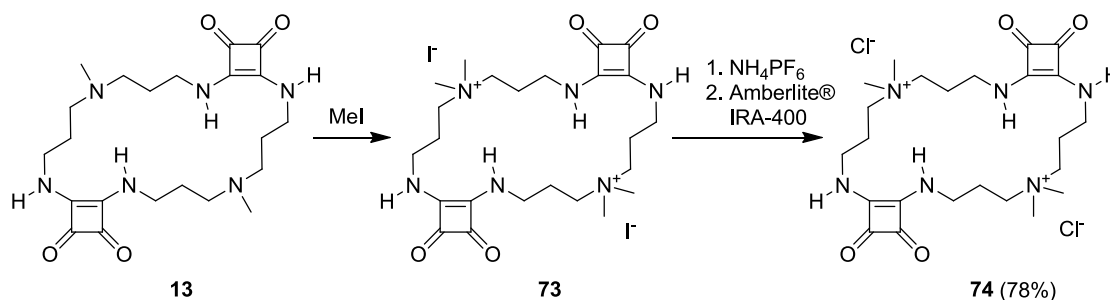


Figura 81 – Estructuras de los diferentes modelos de fosfato de membrana seleccionados para llevar a cabo los estudios de interacción oligoescuaramida cíclica-fosfato mediante ITC.

Para simplificar el análisis de los datos se ha decidido utilizar un modelo de oligoescuaramida cíclica simple donde las aminas terciarias se han cuaternizado por metilación exhaustiva con yoduro de metilo y posterior intercambio del contra-ión yoduro por cloruro (Esquema 47). Esta nueva oligoescuaramida **74** presenta los nitrógenos alifáticos cuaternizados, de forma que se mantiene la carga positiva neta independientemente del pH. La segunda ionización de la oligoescuaramida C2 ocurre a un pK_a de 7,9. Según este dato, a pH fisiológico 7,4 la proporción de oligoescuaramida doblemente protonada es aproximadamente del 90%, justificando la simplificación realizada.



Esquema 47 – Síntesis de la oligoescuaramida cíclica **74**.

Para evaluar la afinidad entre el receptor oligoescuaramídico y sustratos fosforilados en disoluciones acuosas debe considerarse que los fosfatos son moléculas ionizables que entrarán en equilibrio con el receptor. Por esta razón resulta imprescindible determinar las constantes de ionización de los fosfatos en las mismas condiciones experimentales previamente a los experimentos de complejación.

Las constantes de ionización de todos los fosfatos se han obtenido por valoración ácido-base mediante ITC. Los datos experimentales obtenidos se han ajustado a un modelo de doble o triple ionización, según el caso, mediante el software HypΔH 1.1.0

de Protonic Software,¹³⁶ obteniendo, una vez alcanzado un conjunto de valores químicamente significativos, las constantes globales de estabilidad (β) y las entalpías de formación (ΔH) de las diferentes especies en disolución. Las constantes, de ionización o de asociación en función del caso (K) y entropías (ΔS) se han obtenido posteriormente según las ecuaciones 4, 5 y 6.

$$K = 10^{(\text{Log}\beta(\text{especie final}) - \text{Log}\beta(\text{especies iniciales}))} \quad (\text{Ec. 4})$$

$$\Delta G = -\text{Ln}(K) \cdot RT \quad (\text{Ec. 5})$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (\text{Ec. 6})$$

En la figura 82 y la tabla 6, mostradas a continuación, se representan los datos experimentales obtenidos para el AMP junto con los valores calculados para un equilibrio ácido-base con dos constantes de ionización.

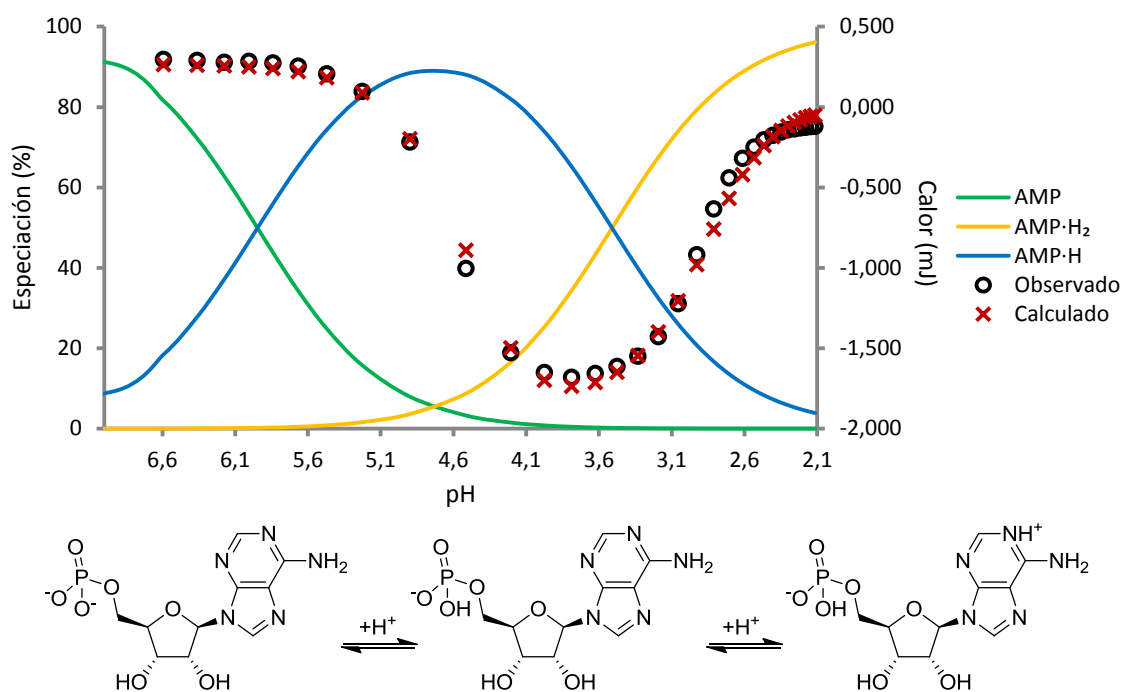


Figura 82 – Datos experimentales normalizados de la valoración ácido-base de AMP con HCl. Valores calculados, especiación y equilibrios químicos considerados.

Tabla 6 – Constantes termodinámicas obtenidas para los equilibrios de protonación del AMP.

Complejo	Equilibrio	Log β	K (M ⁻¹)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol)
AMP·H	$AMP + H \rightleftharpoons AMP \cdot H$	5,95	$8,9 \times 10^5$	$-2,70 \pm 0,2$	0,105
AMP·H ₂	$AMP \cdot H + H \rightleftharpoons AMP \cdot H_2$	9,46	$3,2 \times 10^3$	$16,37 \pm 0,03$	0,122

¹³⁶ Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A.; Simultaneous Calculation of Equilibrium Constants and Standard Formation Enthalpies from Calorimetric Data for Systems with Multiple Equilibria in Solution. *J. Solution Chem.*, **2008**, 37, 467-476.

A partir de las constantes globales (β) se obtienen los valores $pK_{a1} = 3,51$ y $pK_{a2} = 5,95$ para la primera y segunda ionización del AMP respectivamente, en las condiciones experimentales utilizadas. Estos valores resultan algo inferiores, aunque comparables, a los que aparecen en la bibliografía (3,99 y 6,74) para el AMP aunque en este caso obtenidos en condiciones diferentes.¹³⁷

De forma similar, se han obtenido los valores de las constantes de ionización para la manosa 6-fosfato (M6P), la fructosa-2,6-bifosfato (FBP) y la fosfocolina (PCh). Los valores obtenidos se muestran a continuación en las figuras 83-85 y las tablas 7-9.

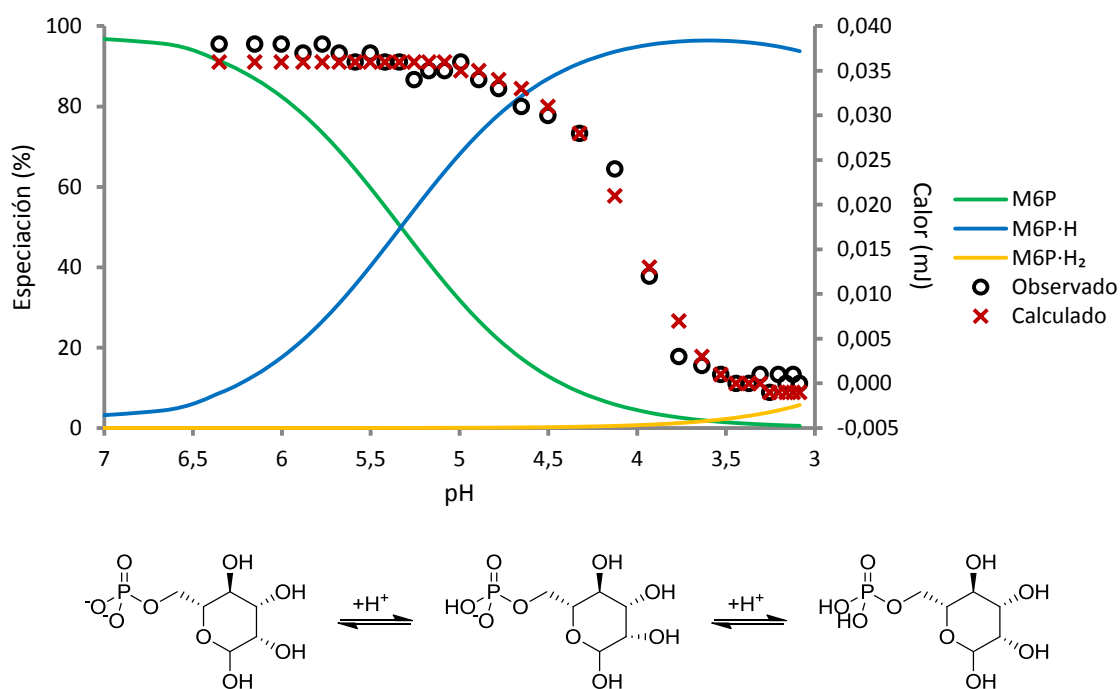


Figura 83 – Datos experimentales normalizados de la valoración de M6P con HCl. Valores calculados, especiación y equilibrios químicos considerados.

Tabla 7 – Constantes termodinámicas calculadas para los equilibrios de la M6P.

Complejo	Equilibrio	Log β	K (M ⁻¹)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol)
M6P·H	$M6P + H \rightleftharpoons M6P \cdot H$	5,33	$2,1 \times 10^5$	$-2,71 \pm 0,03$	0,093
M6P·H ₂	$M6P \cdot H + H \rightleftharpoons M6P \cdot H_2$	7,2	$7,4 \times 10^1$	$-1,5 \pm 0,4$	0,031

¹³⁷ Ould-Moulaye, C. B.; Dussap, C. G.; Gros, J. B.; A consistent set of formation properties of nucleic acid compounds: Nucleosides, nucleotides and nucleotide-phosphates in aqueous solution. *Thermochim. Acta*, **2002**, 387, 1-15.

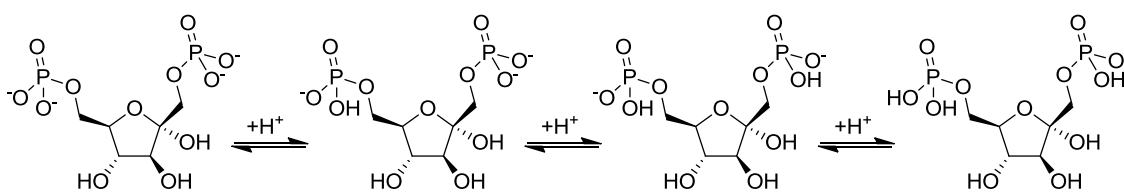
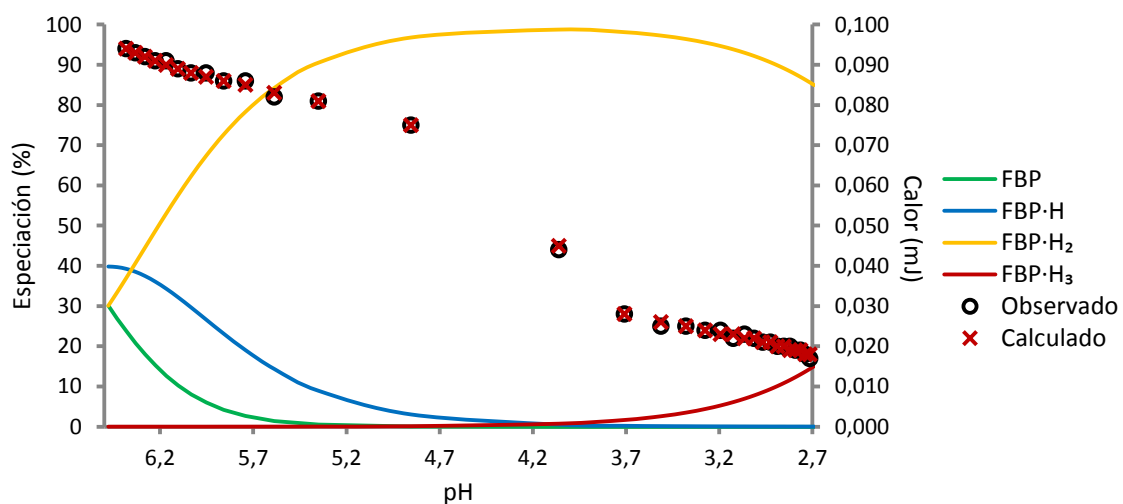


Figura 84 – Datos experimentales normalizados de la valoración de FBP con HCl. Valores calculados, especiación y equilibrios químicos considerados.

Tabla 8 – Constantes termodinámicas obtenidas para los equilibrios de la FBP.

Complejo	Equilibrio	Log β	K (M ⁻¹)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol)
FBP·H	$FBP + H \rightleftharpoons FBP \cdot H$	6,6	$4,0 \times 10^6$	$-5,08 \pm 0,03$	0,109
FBP·H ₂	$FBP \cdot H + H \rightleftharpoons FBP \cdot H_2$	12,96	$2,3 \times 10^6$	$-8,52 \pm 0,02$	0,093
FBP·H ₃	$FBP \cdot H_2 + H \rightleftharpoons FBP \cdot H_3$	14,89	$8,5 \times 10^1$	$-17,47 \pm 0,05$	-0,022

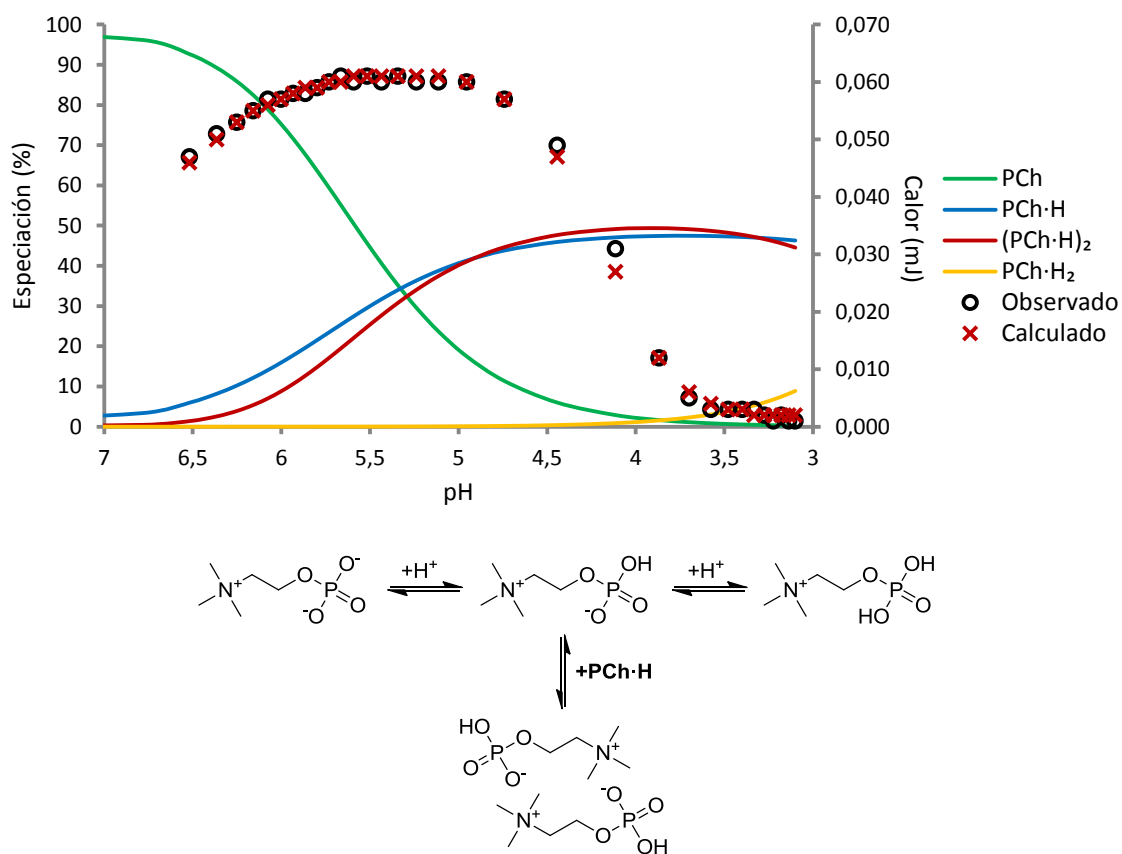


Figura 85 – Datos experimentales normalizados de la valoración de PCh con HCl. Valores calculados, especiación y equilibrios químicos considerados.

Tabla 9 – Constantes termodinámicas obtenidas para los equilibrios del PCh.

Complejo	Equilibrio	Log β	K (M ⁻¹)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol)
PCh·H	$PCh + H \rightleftharpoons PCh \cdot H$	5,33	$2,1 \times 10^5$	$-2,1 \pm 0,1$	0,095
(PCh·H) ₂	$PCh \cdot H + PCh \cdot H \rightleftharpoons (PCh \cdot H)_2$	13,99	$2,1 \times 10^3$	$-10,6 \pm 0,1$	0,028
PCh·H ₂	$PCh \cdot H + H \rightleftharpoons PCh \cdot H_2$	7,71	$2,4 \times 10^2$	-6 ± 2	0,025

Los valores de las constantes de ionización y de las entalpías de formación para los equilibrios de ionización de los diferentes fosfatos utilizados se han introducido como constantes al plantear un modelo completo de equilibrio frente a la oligoescuaramida **74**. En todos los casos, los modelos de equilibrio planteados requieren evaluar entre 5 y 7 equilibrios y el hecho de fijar 2 o 3 de éstos según el caso, disminuye la complejidad del sistema y permite alcanzar resultados con sentido químico. Para realizar estos experimentos en presencia de la oligoescuaramida, se ha obtenido en primer lugar una disolución de la sal básica del fosfato y la oligoescuaramida cíclica, para posteriormente realizar una valoración ácido-base mediante la adición de HCl, protonando así los fosfatos y permitiendo la disociación de los complejos, lo que permite calcular los valores termodinámicos.

La figura 86 y la tabla 10, muestran el análisis de los datos experimentales en el intervalo de pH estudiado mediante un modelo en el que la oligoescuaramida **74** forma complejos 1:1 con el AMP monobásico y dibásico, y un complejo 1:2 con la forma monobásica.

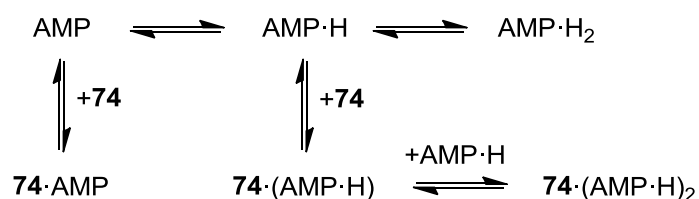
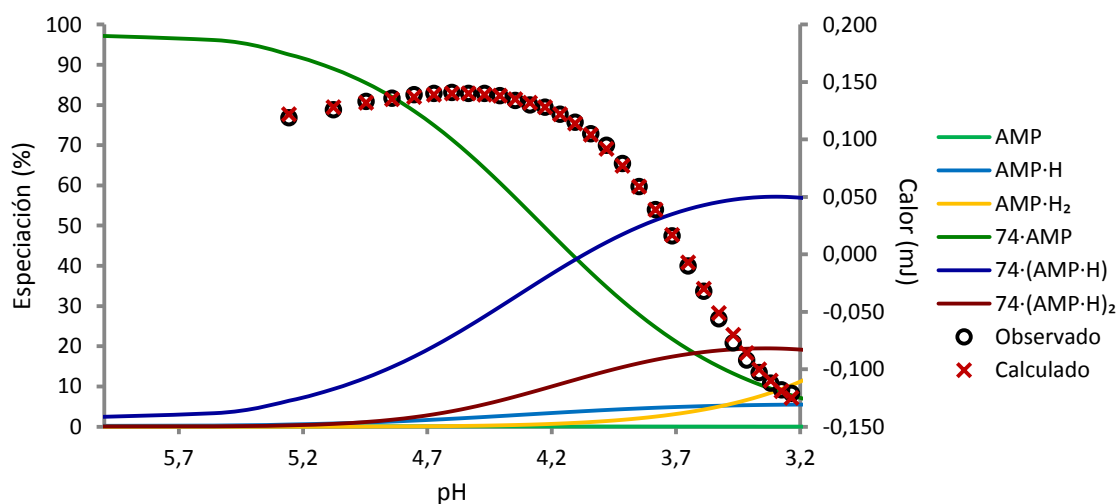
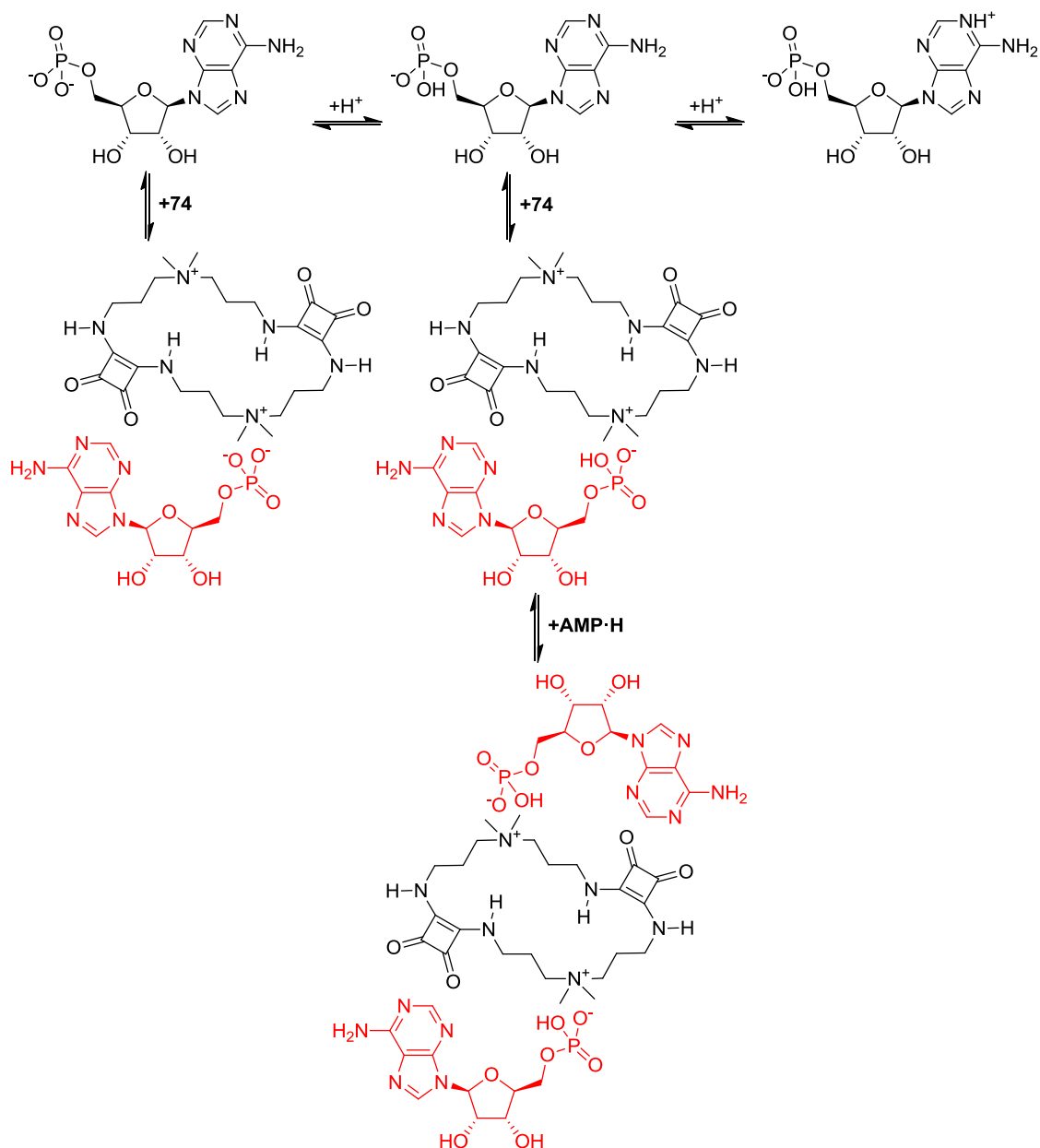


Figura 86 – Datos experimentales y calculados normalizados de la valoración de 74 + AMP con HCl.

Tabla 10 – Constantes termodinámicas obtenidas para los equilibrios de AMP y los complejos formados con 74. ^a Equilibrios cuyas constantes se mantienen como variables. ^b Equilibrios de ionización cuyas constantes se mantienen invariables.

Complejo	Equilibrio	Logβ	K (M ⁻¹)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol)
AMP·H	$\text{AMP} + \text{H} \rightleftharpoons \text{AMP}\cdot\text{H}$ ^b	5,95	$8,9 \times 10^5$	$-2,7 \pm 0,2$	0,105
AMP·H ₂	$\text{AMP}\cdot\text{H} + \text{H} \rightleftharpoons \text{AMP}\cdot\text{H}_2$ ^b	9,46	$3,2 \times 10^3$	$16,37 \pm 0,03$	0,122
74·AMP	$74 + \text{AMP} \rightleftharpoons 74\cdot\text{AMP}$ ^a	5,32	$2,1 \times 10^5$	$16,4 \pm 0,6$	0,157
74·[AMP·H]	$74 + \text{AMP}\cdot\text{H} \rightleftharpoons 74\cdot[\text{AMP}\cdot\text{H}]$ ^a	9,42	$1,3 \times 10^4$	$-41,8 \pm 0,6$	-0,062
74·[AMP·H] ₂	$74\cdot[\text{AMP}\cdot\text{H}] + \text{AMP}\cdot\text{H} \rightleftharpoons 74\cdot[\text{AMP}\cdot\text{H}]_2$ ^a	19,05	$4,8 \times 10^3$	$-54,0 \pm 0,2$	-0,111



Esquema 47 – Equilibrios de asociación calculados para la valoración ácido-base de la mezcla **74** + AMP.

El sistema de equilibrios permite evaluar las constantes de asociación para los complejos 1:1, siendo $2,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ y $1,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ para los complejos **[74·AMP]** y **[74·AMPH]**, respectivamente. Estos valores son lógicos ya que la afinidad de la oligoscuaramida cíclica **74**, con dos cargas positivas netas, frente al AMP dibásico, con dos cargas negativas netas, es diez veces superior a la correspondiente al AMP monobásico. Además la especiación muestra que, para valores de pH superiores a 5, el complejo **[74·AMP]** es la especie predominante (>90%). Estos valores son muy notables ya que se han obtenido en disolución por lo que cabe esperar que el reconocimiento

de componentes fosfatos sobre membranas celulares ocurra con mucha mayor afinidad.¹³⁸

Los resultados obtenidos con el resto de los fosfatos se muestran en las figuras 87 a 89 y las tablas 11 a 13.

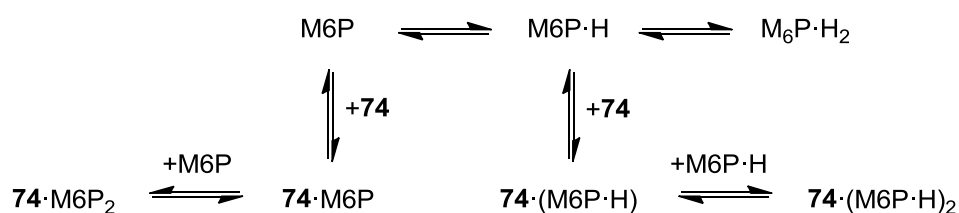
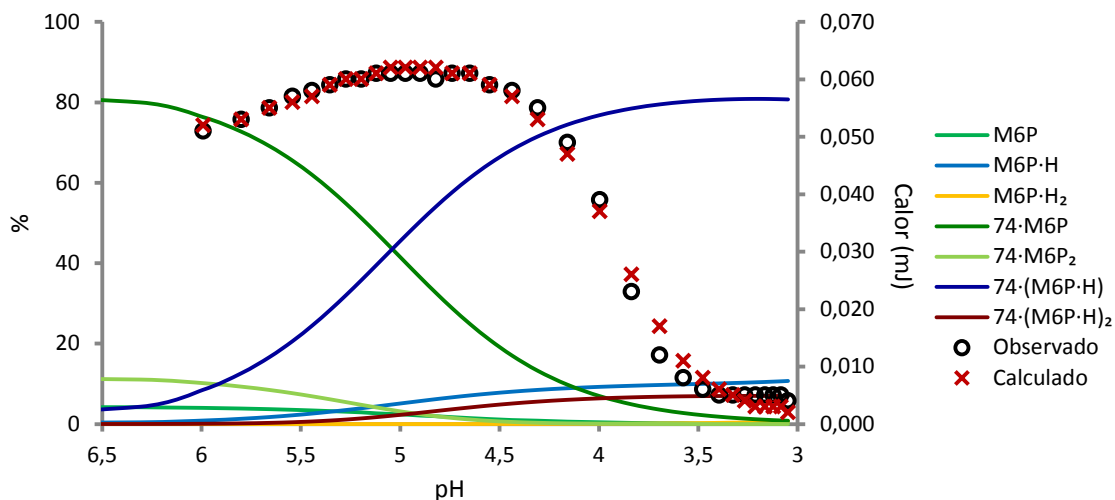
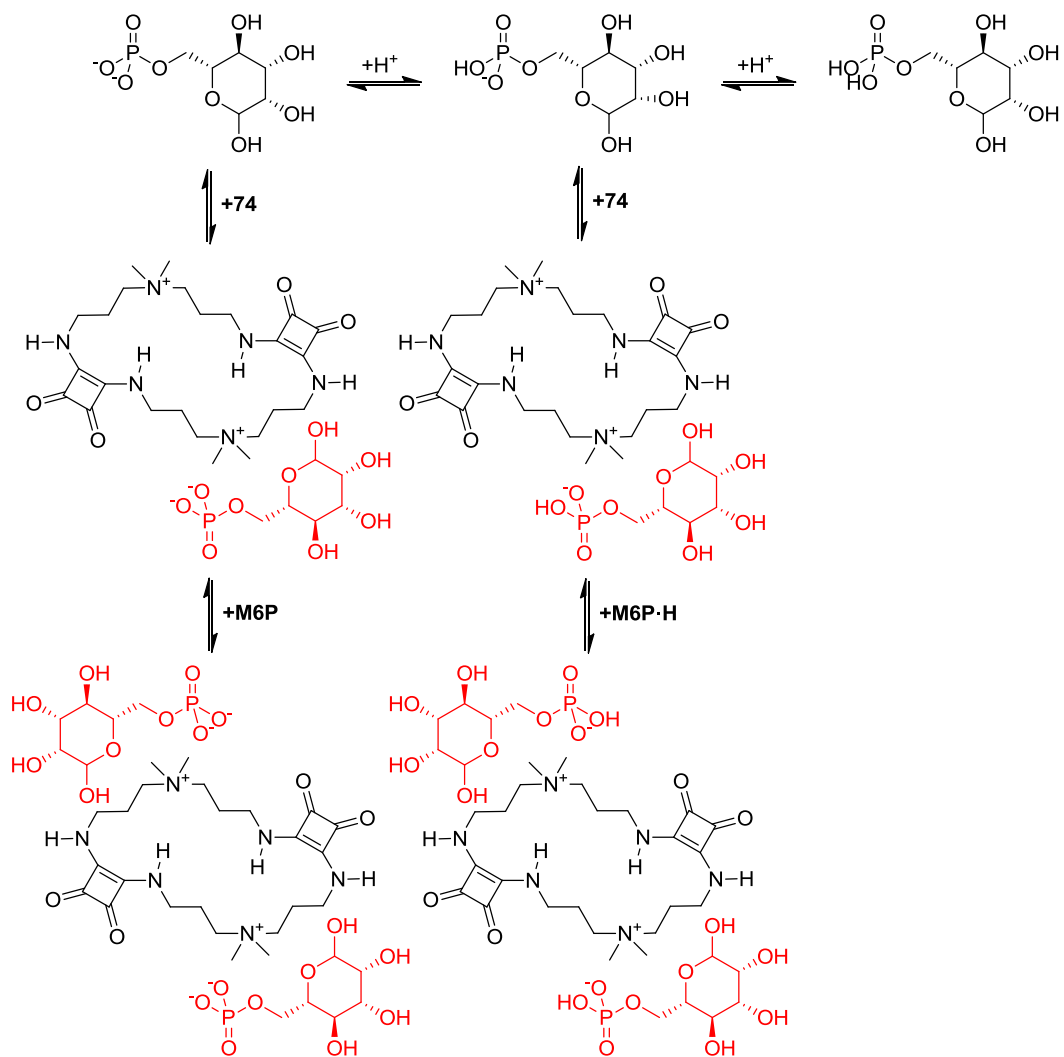


Figura 87 – Datos experimentales y calculados normalizados de la valoración de 74 + M6P con HCl.

Tabla 11 – Constantes termodinámicas obtenidas para los equilibrios de M6P y los complejos formados con 74. ^a Equilibrios cuyas constantes se mantienen como variables. ^b Equilibrios de ionización cuyas constantes se mantienen invariables.

Complejo	Equilibrio	Logβ	K (M ⁻¹)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol)
M6P·H	$M6P + H \rightleftharpoons M6P \cdot H^b$	5,33	$2,1 \times 10^5$	$-2,7 \pm 0,3$	0,093
M6P·H ₂	$M6P \cdot H + H \rightleftharpoons M6P \cdot H_2^b$	7,2	$7,4 \times 10^1$	$-1,5 \pm 0,4$	0,031
74·M6P	$74 + M6P \rightleftharpoons 74 \cdot M6P^a$	3,64	$4,4 \times 10^3$	17 ± 6	0,127
74·M6P ₂	$74 \cdot M6P + M6P \rightleftharpoons 74 \cdot M6P_2^a$	6,95	$2,0 \times 10^3$	41 ± 11	0,201
74·[M6P·H]	$74 + M6P \cdot H \rightleftharpoons 74 \cdot [M6P \cdot H]^a$	8,68	$1,1 \times 10^5$	16 ± 6	0,150
74·[M6P·H] ₂	$74 \cdot [M6P \cdot H] + M6P \cdot H \rightleftharpoons 74 \cdot [M6P \cdot H]_2^a$	16,81	$6,3 \times 10^2$	7 ± 10	0,077

¹³⁸ Ma, M.; Paredes, A.; Bong, D.; Intra- and Intermembrane Pairwise Molecular Recognition between Synthetic Hydrogen-Bonding Phospholipids. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, 14456-14458.



Esquema 48 – Equilibrios de asociación calculados para la valoración ácido-base de la mezcla 74 + M6P.

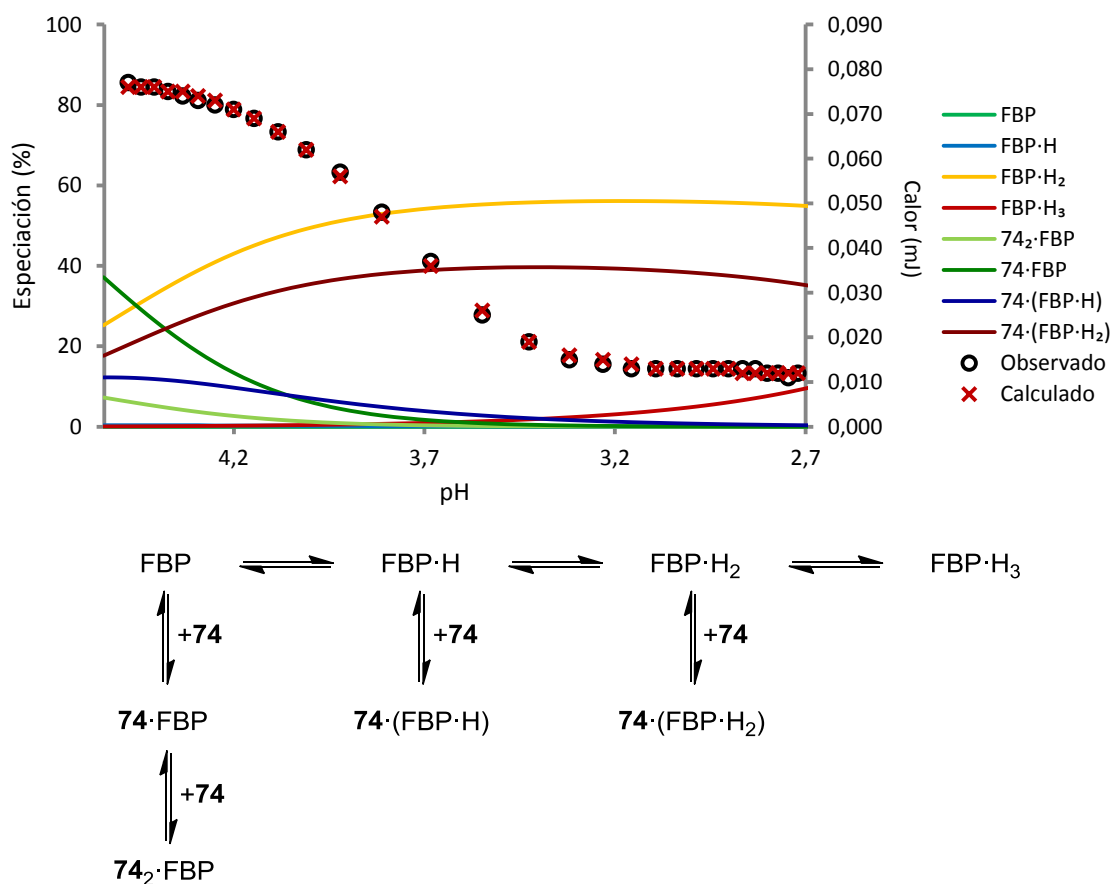
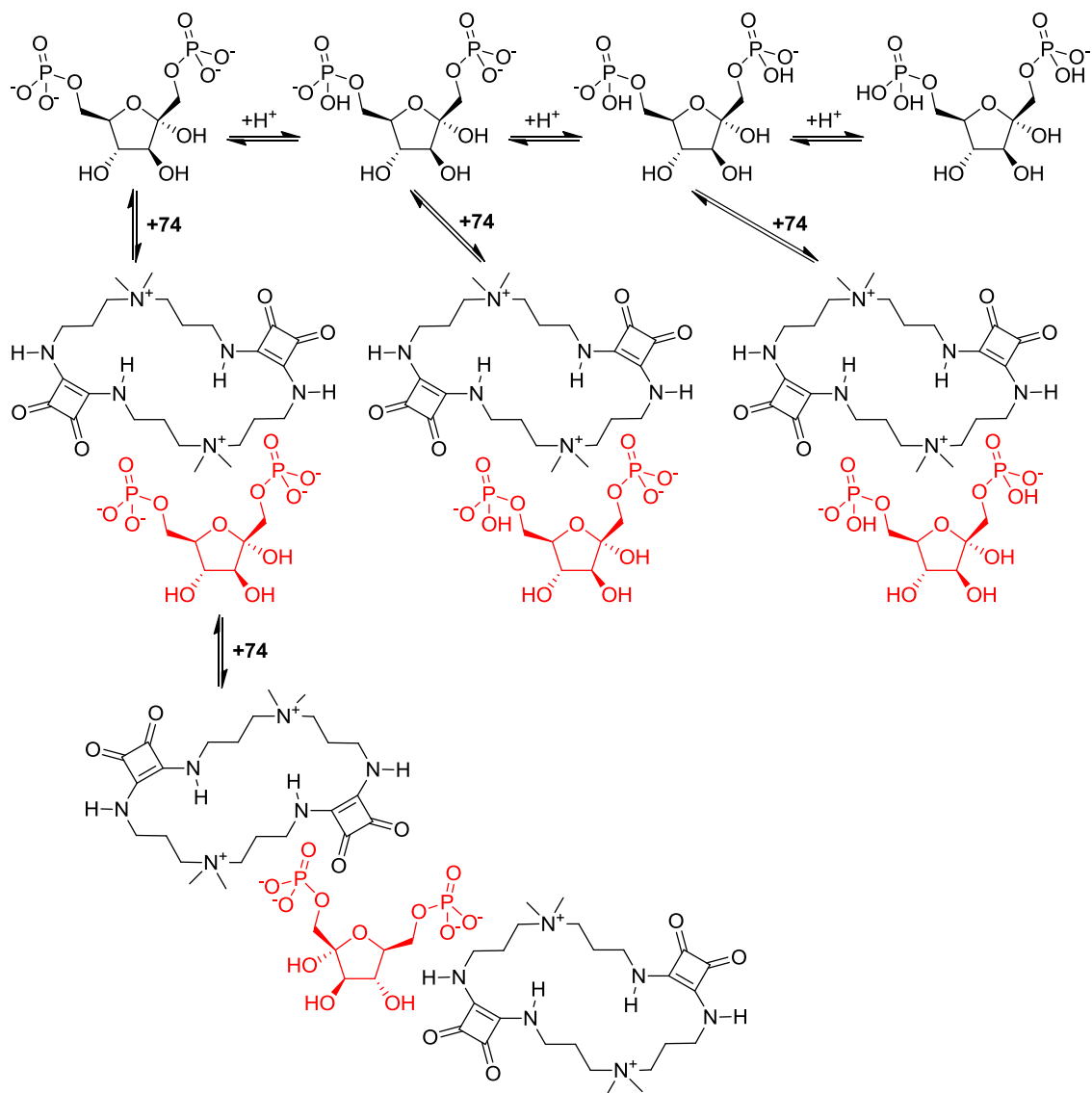


Figura 88 – Datos experimentales y calculados normalizados de la valoración de 74 + FBP con HCl.

Tabla 12 – Constantes termodinámicas obtenidas para los equilibrios de FBP y los complejos formados con 74. ^a Equilibrios cuyas constantes se mantienen como variables. ^b Equilibrios de ionización cuyas constantes se mantienen invariables.

Complejo	Equilibrio	Log β	K (M ⁻¹)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol)
FBP·H	$\text{FBP} + \text{H} \rightleftharpoons \text{FBP}\cdot\text{H}^b$	6,6	$4,0 \times 10^6$	$-5,08 \pm 0,03$	0,109
FBP·H ₂	$\text{FBP}\cdot\text{H} + \text{H} \rightleftharpoons \text{FBP}\cdot\text{H}_2^b$	12,96	$2,3 \times 10^6$	$-8,52 \pm 0,02$	0,093
FBP·H ₃	$\text{FBP}\cdot\text{H}_2 + \text{H} \rightleftharpoons \text{FBP}\cdot\text{H}_3^b$	14,89	$8,5 \times 10^1$	$-17,47 \pm 0,05$	-0,022
74·FBP	$74 + \text{FBP} \rightleftharpoons 74\cdot\text{FBP}^a$	6,4	$2,5 \times 10^6$	$-10,1 \pm 0,8$	0,089
74 ₂ ·FBP	$74\cdot\text{FBP} + 74 \rightleftharpoons 74_2\cdot\text{FBP}^a$	8,05	$4,5 \times 10^1$	-8 ± 5	0,005
74·[FBP·H]	$74 + \text{FBP}\cdot\text{H} \rightleftharpoons 74\cdot[\text{FBP}\cdot\text{H}]^a$	10,46	$1,1 \times 10^4$	$41,4 \pm 0,1$	0,217
74·[FBP·H ₂]	$74\cdot[\text{FBP}\cdot\text{H}] + \text{H} \rightleftharpoons 74\cdot[\text{FBP}\cdot\text{H}_2]^a$	15,16	$5,0 \times 10^4$	$-17,5 \pm 0,3$	0,031



Esquema 49 – Equilibrios de asociación calculados para la valoración ácido-base de la mezcla **74** + FBP.

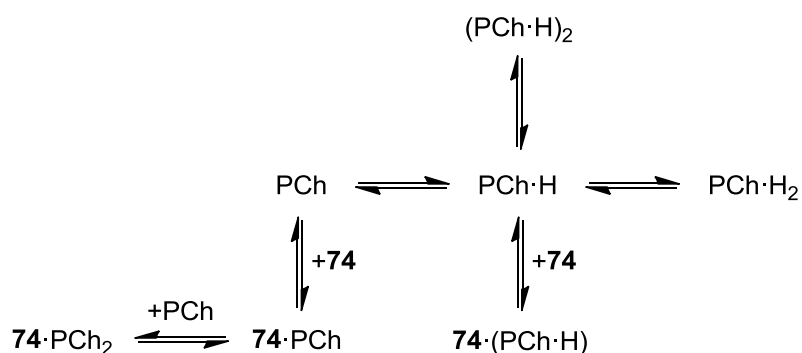
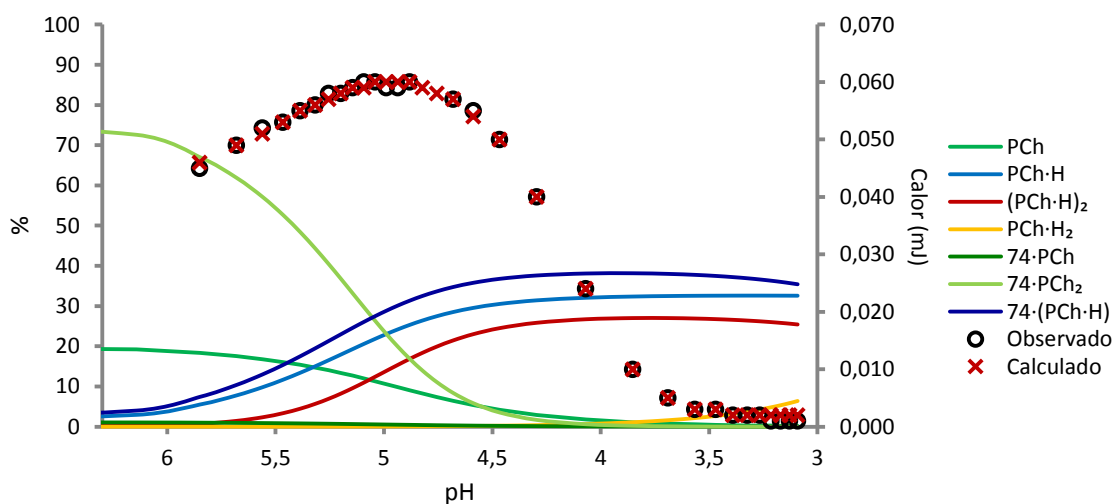
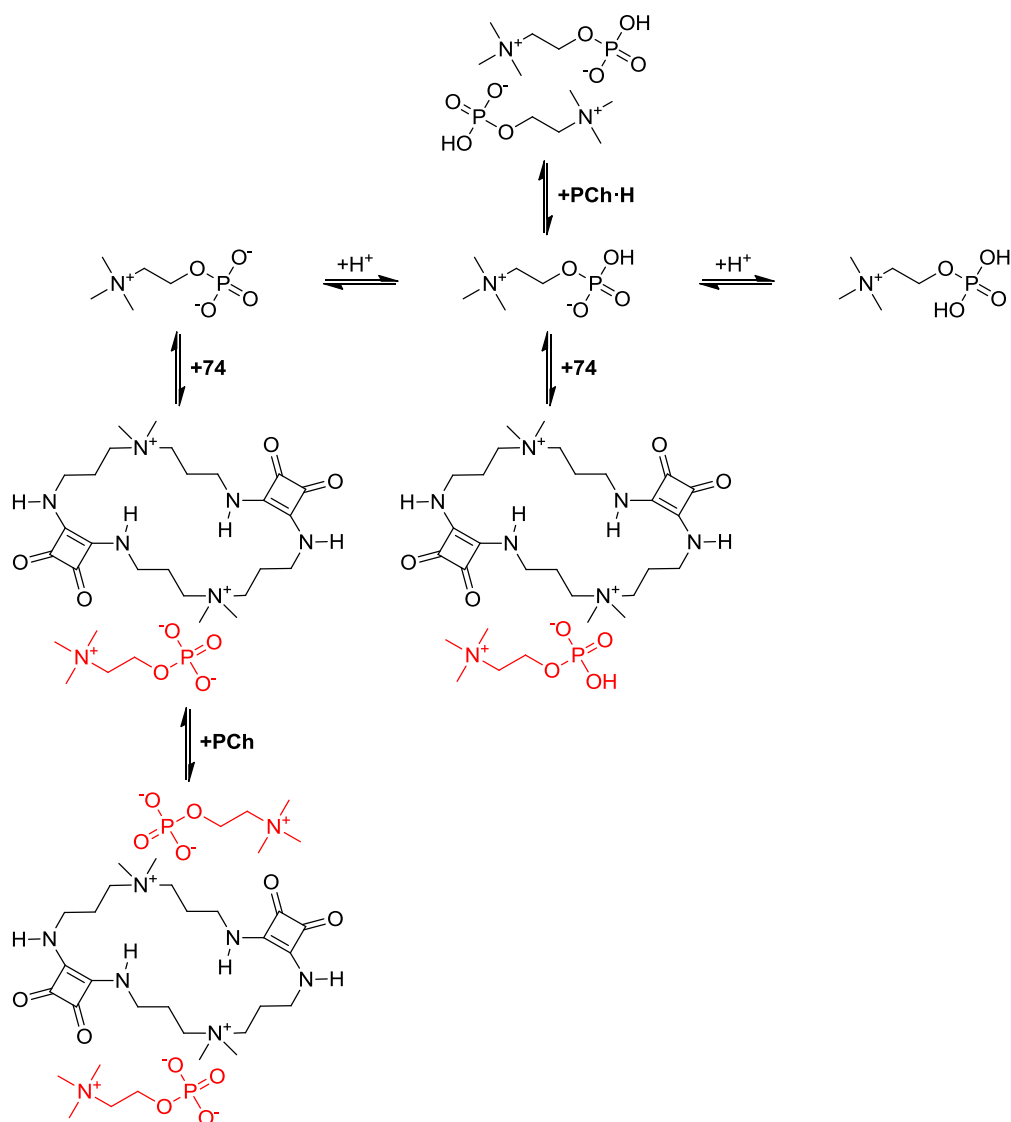


Figura 89 – Datos experimentales y calculados normalizados de la valoración de 74 + PCh con HCl.

Tabla 13 – Constantes termodinámicas obtenidas para los equilibrios de PCh y los complejos formados con 74. ^a Equilibrios cuyas constantes se mantienen como variables. ^b Equilibrios de ionización cuyas constantes se mantienen invariables.

Complejo	Equilibrio	Logβ	K (M ⁻¹)	ΔH (kJ/mol)	ΔS (kJ/mol)
PCh·H	$PCh + H \rightleftharpoons PCh \cdot H^b$	5,33	$2,1 \times 10^5$	$-2,1 \pm 0,1$	0,095
PCh·H ₂	$PCh \cdot H + H \rightleftharpoons PCh \cdot H_2^b$	12,96	$2,4 \times 10^2$	-6 ± 2	0,025
[PCh·H] ₂	$PCh \cdot H + PCh \cdot H \rightleftharpoons [PCh \cdot H]_2^b$	14,89	$2,1 \times 10^3$	$-10,6 \pm 0,1$	0,028
74·PCh	$74 + PCh \rightleftharpoons 74 \cdot PCh^a$	1,03	$1,1 \times 10^1$	-10 ± 4	-0,014
74·PCh ₂	$74 \cdot PCh + PCh \rightleftharpoons 74 \cdot PCh_2^a$	6,56	$3,4 \times 10^5$	$3,1 \pm 0,1$	0,116
74·[PCh·H]	$74 + PCh \cdot H \rightleftharpoons 74 \cdot [PCh \cdot H]^a$	7,75	$2,6 \times 10^2$	$-1,6 \pm 0,2$	0,041



Esquema 50 – Equilibrios de asociación calculados para la valoración ácido-base de la mezcla 74 + PCh.

Es destacable la presencia de complejos $[74 \cdot RPO_4^{2-}]$ a valores de pH superior a 6 en el caso de AMP (>95%) y M6P (>80%). En el caso de la fructosa se observa ya a pH 4,5 complejo $[74 \cdot FBP]$ en un 40%, con una tendencia ascendente para valores de pH más básicos, a la vez que disminuye la proporción de $[FBP \cdot H_2]$ y $[74 \cdot FBP \cdot H_2]$. Esta diferencia en el comportamiento es debida a los dos grupos fosfato presentes en la FBP.

El caso de la fosfocolina es especial al presentar ésta un grupo tetraalquilamonio catiónico, hecho que hace que el complejo 1:1 no esté favorecido electrostáticamente. En este caso existe una mayor proporción de complejo $[74 \cdot PCh_2]$, un complejo neutro, a pH 6,5 (>70%), con una presencia de $[74 \cdot PCh]$ (complejo catiónico) prácticamente nula.

Tabla 14 – Resumen de las constantes de asociación de los complejos supuestamente predominantes a pH fisiológico.

Complejo	Equilibrio	K (M ⁻¹)
74·AMP	$74 + AMP \rightleftharpoons 74 \cdot AMP$	$2,1 \times 10^5$
74·M6P	$74 + M6P \rightleftharpoons 74 \cdot M6P$	$4,4 \times 10^3$
74·FBP	$74 + FBP \rightleftharpoons 74 \cdot FBP$	$2,5 \times 10^6$
74·PCh ₂	$74 \cdot PCh + PCh \rightleftharpoons 74 \cdot PCh_2$	$3,4 \times 10^5$

A modo de resumen, en la tabla 14 se muestran las constantes de asociación para los complejos que resultan ser los predominantes a pH fisiológico (7,4). Los complejos formados en los tres primeros casos presentan constantes de asociación de diversa magnitud. La afinidad menor se obtiene para la M6P y se puede explicar por la presencia de complejos 2:1 con los fosfatos dianiónicos, con constantes de asociación similares, que compiten con el complejo 1:1. En el caso de la FBP la presencia de dos grupos fosfato permite explicar la elevada afinidad del complejo.

Los estudios realizados por ITC han permitido establecer que existe una gran afinidad entre la oligoescuaramida cíclica y diversos compuestos fosforilados como modelos de fosfatos de membrana, hecho que podría relacionarse a nivel químico con la internalización observada en la sonda C2-BDP **69** al activarse mediante este reconocimiento los mecanismos de endocitosis propuestos.

3.8 Conclusiones

1. Se ha obtenido un derivado de la oligoescuaramida cíclica **C2** con un grupo amino capaz de reaccionar con otros grupos funcionales, permitiendo la obtención de conjugados de esta oligoescuaramida cíclica en un solo paso sintético.
2. Mediante el uso de la oligoescuaramida cíclica derivatizable **54** se han obtenido tres sondas fluorescentes con diferentes propiedades fotofísicas, de las cuales una de ellas ha permitido la visualización de la interacción entre las líneas celulares NIH3T3 y U87MG, y la oligoescuaramida **C2**.
3. La sonda fluorescente **C2-BDP 69** ha permitido elucidar los procesos que se dan durante la interacción con las células, estableciendo que existe una internalización mediante un transporte activo, en concreto la endocitosis, gracias a un reconocimiento de la oligoescuaramida sobre la membrana. Posteriormente la sonda fluorescente permanece sin ser degradada en los endosomas tardíos, impidiendo la evolución de éstos a lisosomas.
4. Los estudios llevados a cabo mediante ITC con la oligoescuaramida cíclica cuaternizada y los diferentes fosfatos, como modelos de compuestos fosforilados de la membrana celular, han permitido confirmar que existe una gran afinidad de la oligoescuaramida cíclica por los grupos fosfato dianiónicos, estableciendo mayormente complejos 1:1 en disolución acuosa.

3.9 Métodos experimentales

Todos los disolventes utilizados han sido adquiridos a Scharlau y Sigma-Aldrich. Cuando ha sido necesario, estos disolventes se han secado y destilado según los procedimientos indicados en la bibliografía.¹³⁹ El agua utilizada en los procesos de síntesis, elaboración o preparación de muestras se ha purificado por electroósmosis con un equipo ELIX10 (Millipore) y, posteriormente, por tratamiento a través de un equipo MilliQ (Millipore) consiguiendo una resistividad máxima de 18,2 MΩ.

Los disolventes deuterados utilizados en los experimentos de RMN se han adquirido con calidad espectroscópica para RMN con una riqueza del 99,98% siendo utilizados sin tratamiento previo.

Todos los reactivos y sales utilizados han sido adquiridos a través de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Panreac o TCI Chemicals. Se han utilizado sin purificación previa a no ser que se indique lo contrario.

El sistema RF-HPLC utilizado para la purificación de los productos ha sido un sistema Gilson, equipado con bombas modelo 321 y un módulo detector UV-Vis-152.

Los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) se han registrado en un instrumento Bruker AVANCE-300 o bien mediante un instrumento Bruker AVANCE 600 MHz. Los desplazamientos químicos indicados en ppm están referenciados a la señal residual del disolvente utilizado en el caso de DMSO y CDCl_3 . En el caso de los espectros realizados en D_2O , se ha utilizado la sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfónico como patrón interno. Los espectros de masas se han registrado con un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) Micromass AutoSpec 3000, provisto de un sistema de entrada de la muestra mediante electrospray (ESI) o bien mediante un sistema Bruker Autoflex MALDI-TOF.

La obtención de los espectros UV-Vis se ha realizado mediante un espectrómetro UV-Vis modelo Varian Cary 300 Bio de doble haz. Para los espectros de emisión de fluorescencia se ha utilizado un espectrofotómetro Varian Cary Eclipse.

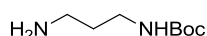
Para la cuantificación de la fluorescencia celular se ha utilizado un citómetro de flujo modelo Beckman Coulter Epics XL-MLC. El microscopio confocal utilizado para la visualización y obtención de microfotografías ha sido el modelo Confocal Scanner TCS SP2 Leica, de Leica Microsystem, Heidelberg.

Los experimentos de ITC se han llevado a cabo en un NanoITC III de TA Instruments.

¹³⁹ Armarego, W. L. F.; Chai, C.; Purification of Laboratory Chemicals, 6th Ed., 2009, Butterworth Heinemann, Elsevier. Oxford, UK.

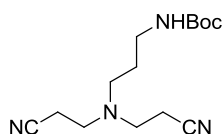
3.9.1 Síntesis

N-terc-butoxicarbonil-1,3-diaminopropano **43**:



Su síntesis se ha descrito en el capítulo 2.

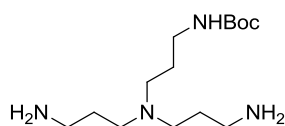
Terc-butil (3-(bis(2-cianoetil)amino)propil)carbamato **52**:



La diamina monoprotendida **43** (1,57 g, 9,0 mmol) disuelta en acrilonitrilo (45 ml) y ácido acético (1,03 ml, 18 mmol) se lleva a reflujo durante 16 horas. Posteriormente el disolvente se concentra a presión reducida, el residuo se disuelve en CHCl_3 (30 ml) y se vierte sobre NH_3 concentrado (10 ml). La fase orgánica se lava con H_2O (3 x 30 ml), se seca sobre Na_2SO_4 y se concentra a sequedad obteniendo un líquido incoloro que se purifica mediante cromatografía en columna (Al_2O_3 , CHCl_3 :MeOH (2%)) para obtener el producto **52** en forma de aceite incoloro (2,48 g, 8,86 mmol). Rdto: 99%

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 1,44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,67 (m, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,49 (t, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,6 Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$), 2,59 (t, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,9 Hz, 2H, NCH_2), 2,86 (t, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,6 Hz, 4H, CH_2CN), 3,20 (q, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,9 Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{NH-Boc}$), 4,73 (br, 1H, NH-Boc). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ = 17,1, 28,1, 28,5, 38,6, 49,8, 51,1, 79,4, 118,7, 156,2. HRMS (ESI) calc. para 303,1797 ($\text{M}+\text{Na}^+$; $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{NaO}_2^+$) encontrado: 303,1791.

Terc-butil (3-(bis(2-aminopropil)amino)propil)carbamato **53**:

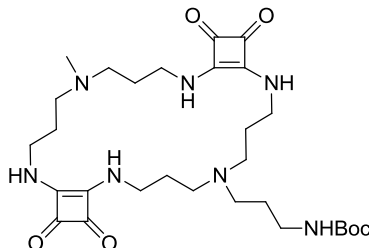


El dinitrilo **52** preparado anteriormente (2,48 g, 8,86 mmol) se disuelve en NaOH :EtOH (50 ml, 1.4 M) y se introduce en un frasco hidrogenador que contiene el catalizador Ni-Raney (0,94 g). La mezcla se purga con hidrógeno y se hidrogena a 45 psi durante 16 horas. Se filtra el catalizador a través de Celita® 521 y se lava con suficiente EtOH acuoso al 95%. El filtrado se diluye con H_2O (5 ml) y se elimina a presión reducida el EtOH. El resto acuoso se lava con CH_2Cl_2 (3 x 30 ml) extrayendo el producto en las fases orgánicas, que se secan sobre Na_2SO_4 y se concentran obteniendo la diamina **53** como un líquido incoloro (2,53 g, 8,75 mmol). Rdto: 99%

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 1,44 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,59 (m, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,9 Hz, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,44 (m, 6H, NCH_2), 2,72 (t, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,9 Hz, 4H, CH_2NH_2), 3,17 (br, 2H,

CH_2NHBoc), 4,47 (br, 1H, NHBoc). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 27,0, 28,6, 30,9, 39,9, 40,7, 51,9, 52,7, 78,9, 156,2$. HRMS (ESI) calc. para 289,2604 ($\text{M}+\text{H}^+$; $\text{C}_{14}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_2^+$) encontrado: 289,2598.

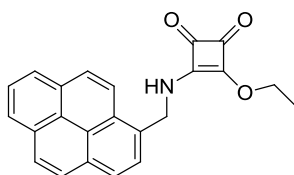
C2-Boc 54:



El diéster **5** (1,8 g, 4,58 mmol) se calienta en EtOH a 50 °C hasta su completa disolución. Sobre esta se añade gota a gota una disolución de la triamina monoprotectada **53** (1,32 g, 4,58 mmol) disuelta en EtOH (20 ml). La mezcla se agita durante 16 horas a temperatura ambiente y en atmósfera de argón. El precipitado formado se filtra y se lava con EtOH (4 x 10 ml) y Et_2O (2 x 10 ml) obteniendo un sólido amarillo. Éste se lava con acetona a reflujo (3 x 20 ml) y se seca a vacío obteniendo un sólido amarillo pálido (1,82 g, 3,09 mmol). Rdto: 67%

^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 1,37$ (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,47 (br, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHBoc}$), 1,64 (br, 8H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,11 (s, 3H, NCH_3), 2,33 (br, 10H, NCH_2), 2,91 (br, 2H, CH_2NHBoc), 3,50 (br, 8H, $\text{CH}_2\text{NH}(\text{Sq})$), 6,75 (br, 1H, NHBoc), 7,40 (br, 4H, $\text{NH}(\text{Sq})$). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 26,7, 28,0, 28,2, 38,0, 41,7, 50,4, 54,2, 77,3, 155,6, 167,8, 182,3$. HRMS (ESI) calc. para 612,3486 ($\text{M}+\text{Na}^+$; $\text{C}_{29}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{NaO}_6^+$) encontrado: 612,3480.

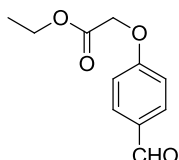
3-etoxi-4-((pirenilmetil)amino)-3-ciclobuten-1,2-diona **58**:



1-pirenometilamina **57** (0,207 g, 0,77 mmol) y DiPEA (269 μl , 1,55 mmol) se suspenden en una mezcla compuesta por DMF (1 ml), Et_2O (2 ml) y acetonitrilo (8 ml). A esta suspensión se añade escuarato de dietilo **1** (229 μl , 1,55 mmol) disuelto en Et_2O (1 ml), y se agita la mezcla resultante durante 16 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminan los disolventes y se disuelve el residuo en CHCl_3 (25 ml). La disolución se lava con H_2O (2 x 20 ml), una disolución saturada de NaCl (20 ml) y se seca sobre Na_2SO_4 . El disolvente se evapora obteniendo un sólido blanco. Éste se recrystaliza en mezclas CH_2Cl_2 :hexano obteniendo el producto **58** (125 mg, 0,352 mmol) como un sólido blanco. Rdto: 45%

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,34 (m, 3H, CH_2CH_3), 4,67 (m, 2H, CH_2CH_3), 5,25 (d, $^3J(\text{H,H}) = 5,7$ Hz, 1H, $\text{NHCH}_2^{\text{a}}(\text{pyr})$), 5,46 (d, $^3J(\text{H,H}) = 5,7$ Hz, 1H, $\text{NHCH}_2^{\text{b}}(\text{pyr})$), 8,0-8,4 (m, 9H, pyr), 9,31 (br, 0,5H, NH^{a}), 9,54 (br, 0,5H, NH^{b}). 140 ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ = 16,0, 46,8, 70,0, 122,0, 124,8, 125,1, 125,2, 125,8, 126,0, 126,5, 127,4, 128,2, 128,9, 130,7, 131,4, 131,8, 172,4, 177,7, 183,5, 188,9. HRMS (ESI) calc. para $711,2495$ ($2\text{M}+\text{H}^+$; $\text{C}_{46}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_6^+$) encontrado: 711,2472.

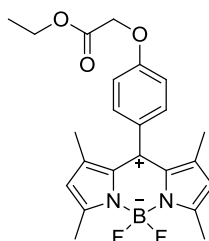
2-(4-formilfenoxi) acetato de etilo 61:



4-hidroxibenzaldehído **59** (5,62 g, 46 mmol) y K_2CO_3 (14,65 g, 106 mmol) disueltos en acetona (70 ml) se agitan durante 15 minutos en atmósfera de argón. Posteriormente se añade bromoacetato de etilo **60** (5,10 ml, 46 mmol) a la mezcla y se agita a reflujo durante 2 horas. La disolución se vierte sobre H_2O fría (160 ml) y se extrae con CH_2Cl_2 (2 x 65 ml). Los extractos orgánicos se combinan y se lavan con una disolución concentrada de NaCl (30 ml). La disolución se seca sobre Na_2SO_4 y se concentra el disolvente a presión reducida obteniendo el producto como un líquido denso amarillo (8,48 g, 40,7 mmol). Rdto: 92%

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 1,30 (t, $^3J(\text{H,H}) = 6,9$ Hz, 3H, CH_2CH_3), 4,28 (q, $^3J(\text{H,H}) = 6,9$ Hz, 2H, CH_2CH_3), 4,70 (s, 2H, CH_2OAr), 7,01 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,7$ Hz, 2H, Ar), 7,85 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,7$ Hz, 2H, Ar), 9,90 (s, 1H, CHO). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): δ = 14,2, 61,7, 65,3, 115,0, 130,9, 132,0, 162,7, 168,1, 190,8.

8-(4-(2-etoxi-2-oxoetoxi)fenil)-1,3,5,7-tetrametil BODIPY 65:



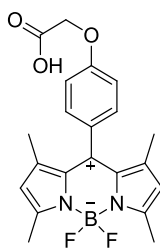
El aldehído **61** (1,55 g, 7,43 mmol) y 2,4-dimetilpirrol **62** (1,53 ml, 14,87 mmol) se disuelven en CH_2Cl_2 anhidro (1000 ml) mientras el recipiente es purgado con argón. A continuación, se añade anhídrido acético (0,6 ml, 6,5 mmol) y TFA (15 μl). La mezcla de reacción se cubre con papel de aluminio y se mantiene en agitación con atmósfera de argón durante 80 minutos a temperatura ambiente. Después, 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona (2,03 g, 8,92 mmol) disuelta en una mezcla de CH_2Cl_2 anhidro (20 ml)

¹⁴⁰ Los superíndices ^a y ^b hacen referencia a las dos conformaciones diferenciables en el espectro.

y THF anhidro (5 ml) se añade al crudo de reacción y se agita durante 15 minutos adicionales. La disolución se lava con H₂O (3 x 250 ml), una disolución concentrada de NaCl (250 ml), se seca sobre Na₂SO₄ y se concentra a sequedad manteniendo el baño del rotavapor a temperatura inferior a 34 °C. El polvo rojo-verde obtenido corresponde al producto **63**. Se elabora brevemente mediante disolución en CH₂Cl₂ (40 ml) y filtración a través de Florisil® (20 g). Posteriormente la disolución se diluye hasta los 190 ml en un matraz de fondo redondo cubierto con papel de aluminio, y se añade Et₃N (14,3 ml, 103 mmol). Se agita durante 10 minutos y se añade BF₃·OEt₂ **64** (17,5 ml, 142 mmol) para posteriormente agitar durante otros 45 minutos. Transcurrido el tiempo, la disolución se lava con H₂O (3 x 70 ml) y una disolución concentrada de NaCl (50 ml). El disolvente se elimina a presión reducida y el residuo obtenido se disuelve en MeOH (60 ml) con K₂CO₃ (2,49 g, 18 mmol). La solución se agita durante 40 minutos y entonces se concentra a un volumen final de aproximadamente 5 ml. Se diluye con H₂O (150 ml) y se extrae el producto con CHCl₃ (3 x 50 ml). Los extractos orgánicos se secan sobre Na₂SO₄ y el disolvente se concentra obteniendo un sólido que se purifica mediante cromatografía en columna (SiO₂, CH₂Cl₂:hexano, de 3:1 a 9:1). El producto se recrystaliza con CH₂Cl₂ y hexano para obtener cristales de color naranja (1,297 g, 3,04 mmol). Rdto: 41%

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 1,29 (t, ³J(H,H) = 7,2 Hz, 3H; CH₂CH₃), 1,33 (s, 6H, 1,7-CH₃(BDP)), 2,34 (s, 6H, 3,5-CH₃(BDP)), 4,28 (q, ³J(H,H) = 7,2 Hz, 2H, CH₂CH₃), 4,68 (s, 2H, CH₂O(Ar)), 5,88 (s, 2H, 2,6-H(BDP)), 6,97 (d, ³J(H,H) = 8,7 Hz, 2H, m-H(Ar)), 7,21 (d, ³J(H,H) = 8,7 Hz, 2H, o-H(Ar)). ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = 14,3, 14,7, 61,6, 65,6, 115,5, 121,3, 128,3, 129,5, 131,9, 141,5, 143,2, 155,6, 158,5, 168,7. HRMS (MALDI-TOF) calc. para 407,1942 (M-F⁻; C₂₃H₂₅BFN₂O₃⁻) encontrado: 407,1940.

8-(4-(carboximetoxi)fenil)-1,3,5,7-tetrametil BODIPY **66**:



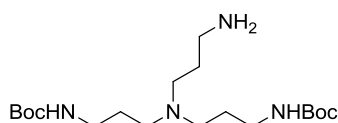
La hidrólisis del éster **65** se realiza mediante la disolución de éste (98 mg, 0,23 mmol) en MeOH (20 ml) junto con K₂CO₃ (249 mg, 1,8 mmol), con agitación en un matraz protegido de la luz y con atmósfera de argón durante 60 horas.

Posteriormente se elimina el disolvente a presión reducida obteniendo un resto que se diluye con H₂O (50 ml). La disolución básica obtenida se lava con CHCl₃ (3 x 30 ml) y se acidifica con HCl 1N hasta obtener un pH 3. Entonces se extrae el producto con CH₂Cl₂ (3 x 30 ml), se secan las fases orgánicas sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente para

obtener un sólido naranja de producto (91 mg, 0,23 mmol) que se usa inmediatamente sin más purificación. Rdto: 99%

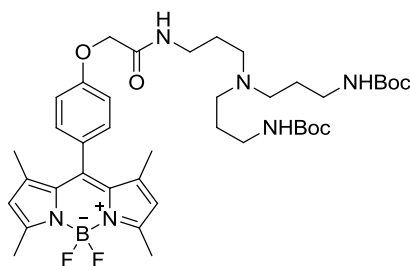
^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,39 (s, 6H, 1,7- $\text{CH}_3(\text{BDP})$), 2,44 (s, 6H, 3,5- $\text{CH}_3(\text{BDP})$), 4,75 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{O}(\text{Ar})$), 6,17 (s, 2H, 2,6- $\text{H}(\text{BDP})$), 7,08 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8,7$ Hz, 2H, m- $\text{H}(\text{Ar})$), 7,25 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8,7$ Hz, 2H, o- $\text{H}(\text{Ar})$), 13,04 (br, 1H, COOH). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 14,1, 14,2, 64,6, 115,3, 121,3, 126,4, 129,1, 131,1, 142,0, 142,8, 154,7, 158,4, 169,9. HRMS (ESI) calc. para 795,3148 (2M-H^+ ; $\text{C}_{42}\text{H}_{41}\text{B}_2\text{F}_4\text{N}_4\text{O}_6^-$) encontrado: 795,3130.

N^3, N^3 -Di-[3-[(terc-butiloxicarbonil)amino]propyl]-1,3-di-aminopropano **67**:



Sintetizada según el procedimiento descrito en la bibliografía.¹²⁷

BODIPY-Diamina(Boc)₂ **68**:



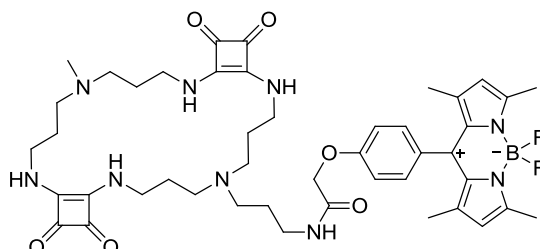
Una disolución del ácido de BODIPY **66** (0,175 g, 0,44 mmol), la amina **67** (0,171 g, 0,44 mmol) y DiMAP (5 mg, 0,04 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (13 ml) se añade gota a gota sobre otra disolución de DCC (0,118 g, 0,57 mmol) en CH_2Cl_2 (2 ml) a 0 °C. La reacción se mantiene a dicha temperatura durante 2 horas y a temperatura ambiente durante 12 horas adicionales.

Se elimina el disolvente y el residuo obtenido se lava con Et_2O . El sólido naranja resultante se purifica mediante HPLC de fase reversa, utilizando una columna XBridge™ Prep C18 OBD™ 5 μm , 19x150 mm, de Waters. La fase móvil utilizada ha sido acetonitrilo y H_2O , con una proporción inicial 80:20 y final a los 8 minutos de 95:5. Los extractos se concentran parcialmente a 40 °C y 100 mbar de presión y se liofilizan obteniendo el producto **68** como un sólido naranja (25 mg, 0,03 mmol). Rdto: 7%

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): δ = 1,41 (s, 6H, 1,7- $\text{CH}_3(\text{BDP})$), 1,43 (s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1,68 (t, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6,8$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOO}$), 1,71 (t, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6,8$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 2,44 (t, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6,3$ Hz, 6H (N CH_2), 2,55 (s, 6H, 3,5- $\text{CH}_3(\text{BDP})$), 3,17 (q, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6,3$ Hz, 4H, CH_2NHCOO), 3,43 (q, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 6,3$ Hz, 2H, CH_2NHCO), 4,54 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{O}(\text{Ar})$), 5,08 (br, 2H, NHCOO), 5,98 (s, 2H, 2,6- $\text{H}(\text{BDP})$), 7,05 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8,7$ Hz, 2H, m- $\text{H}(\text{Ar})$), 7,15 (br,

^1H , CH_2CONH), 7,22 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8,7$ Hz, 2H, *o*-H(Ar)). ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 14,7, 27,1, 28,6, 29,9, 37,8, 39,3, 51,7, 51,9, 67,5, 79,3, 115,5, 121,4, 128,7, 129,8, 131,8, 141,2, 143,1, 155,7, 156,2, 157,9, 167,8$. HRMS (ESI) calc. para $769,4635$ ($\text{M}+\text{H}^+$; $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{BF}_2\text{N}_6\text{O}_6^-$) encontrado: 769,4636.

C2-BDP 69:



La oligoesquaramida cíclica **54** (0,32 g, 0,55 mmol) se trata con 10 ml de HCl 3M (4,4 mmol) y se agita durante 16 horas a 50 °C. Después la solución se basicifica con una disolución saturada de Na_2CO_3 hasta pH 9 y se elimina el disolvente, obteniendo la correspondiente amina como un sólido amarillo, que se usa sin más purificación en el siguiente paso. La desprotección total del grupo Boc se verifica mediante ^1H -RMN.

La amina obtenida se disuelve en NMP (1-metil-2-pirrolidona) (2 ml) con 193 μl de DiPEA (1,11 mmol), y se filtra la solución para eliminar sales inorgánicas. Por otro lado, el ácido del BODIPY **66** (121 mg, 0,3 mmol) y DiPEA (71,4 μl , 0,41 mmol) se disuelven en NMP (4 ml). Sobre esta última disolución se añade una disolución de TSTU (tetrafluoroborato de N,N,N',N'-Tetrametil-O-(N-succinimidil)uronio) (92 mg, 0,3 mmol) en NMP (2 ml) y se mantiene la mezcla a temperatura ambiente, en atmósfera de argón y protegida de la luz durante 90 minutos. Después se añade la disolución de la amina desprotegida y se agita durante 16 horas en las mismas condiciones. La disolución naranja se filtra y se añade Et_2O frío (15 ml), separándose un líquido oscuro que se decanta y lava con Et_2O (15 ml) y pentano (10 ml), obteniendo un sólido naranja. Este crudo se purifica mediante HPLC de fase reversa obteniendo el producto **69** como un sólido naranja (42 mg, 0,048 mmol). Pureza determinada por HPLC: 95% Rdto: 16%

Procedimiento para la purificación mediante HPLC:

Columna: Atlantis® Prep T3 OBDM 5 μm , 19 x 150 mm, de Waters.

Fase móvil: Eluyente A (H_2O , 10 mM AcONH_4 , pH 4,5). Eluyente B (Acetonitrilo).

Perfil de elución preparativo: 0'-2' (25% B); 2'-40' (25-60% B); 40'-43' (60% B); 43'-54' (60-25%); 54'-59' (25% B). 17 ml/min.

Tiempo de elución: 16,6'.

Longitud de onda de detección: 495 nm.

Procedimiento para la determinación de la pureza mediante HPLC:

Columna: Atlantis® T3 5 μm , 4,6 x 150 mm, de Waters.

Fase móvil: Eluyente A (H_2O , 10 mM AcONH_4 , pH 4,5). Eluyente B (Acetonitrilo).

Perfil de elución: 0'-0.5' (25% B); 0.5'-55' (25-60% B); 55'-60' (60% B); 60'-72' (60-25%); 72'-75' (25% B). 1,0 ml/min.

Tiempo de elución: 21,0'.

Longitud de onda de detección: 495 nm.

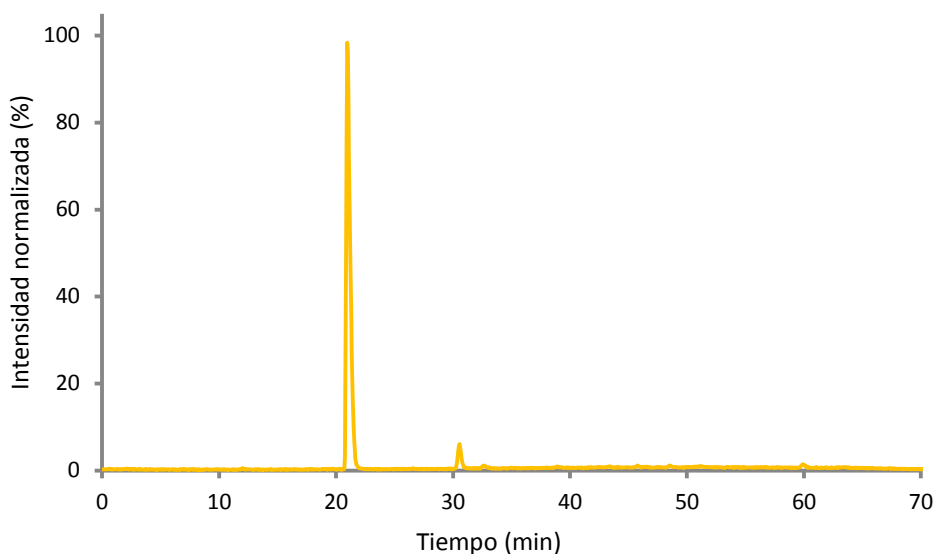
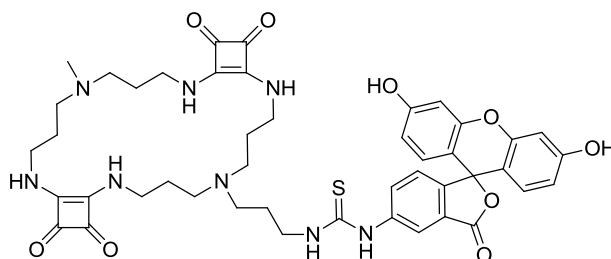


Figura 90 – Traza de HPLC de la sonda C2-BDP **69** purificada mediante HPLC. Área de la señal principal: 95%.

^1H RMN (600 MHz, DMSO-d_6): δ = 1,38 (s, 6H, $\text{CH}_3(\text{py})$), 1,57 (m, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,9 Hz, 2H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCO}$), 1,62 (br, 8H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{Sq})$), 2,08 (s, 3H, CH_3N), 2,3-2,5 (br, 10H, CH_2N), 2,44 (s, 6H, $\text{CH}_3(\text{py})$), 3,17 (q, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,4 Hz, 2H, CH_2NHCO), 3,50 (br, 8H, $\text{CH}_2\text{NH}(\text{Sq})$), 4,53 (s, 2H, CH_2OAr), 6,16 (s, 2H, $\text{CH}(\text{py})$), 7,13 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 8,6 Hz, 2H, Ar), 7,28 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 8,6 Hz, 2H, Ar), 7,4-8,0 (br, 4H, $\text{NH}(\text{Sq})$), 8,22 (br, 1H, NHCO). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO-d_6) δ = 13,9, 14,2, 21,7, 25,2, 33,5, 49,7, 52,7, 67,0, 79,2, 115,5, 121,3, 126,6, 129,2, 131,0, 141,9, 142,7, 154,7, 158,2, 167,5, 167,9, 172,8, 182,4. HRMS (ESI) calc. para 892,4469 ($\text{M}+\text{Na}^+$; $\text{C}_{45}\text{H}_{58}\text{BF}_2\text{N}_9\text{NaO}_6^+$) encontrado: 892,4452.

C2-FITC 70:

La desprotección del grupo amino de la oligoescuaramida **54** (400 mg, 0,68 mmol) se prepara como se describe para el compuesto **69**. Después se disuelve en DMSO (1 ml) junto con 240 μ l de DiPEA (1,38 mmol). A esta disolución se le añade otra disolución de FITC (Fluoresceína 5-isotiocianato) **56** (266 mg, 0,68 mmol) y se mantiene la mezcla con agitación durante 120 horas bajo una atmósfera de argón y protegido de la luz. La disolución se filtra y se purifica mediante HPLC de fase reversa, obteniendo el producto **70** como un sólido naranja (118 mg, 0,13 mmol). Pureza determinada por HPLC: 99% Rdto: 20%

Procedimiento para la purificación mediante HPLC:

Columna: XBridgeTM Prep C18 OBDTM 5 μ m, 19 x 150 mm, de Waters.

Fase móvil: Eluyente A (H₂O, 10 mM AcONH₄, pH 9,0). Eluyente B (Acetonitrilo).

Perfil de elución preparativo: 0'-2,5' (5% B); 2,5'-17,5' (5-37% B); 17,5'-19,5' (37% B); 19,5'-22,5' (37-5%); 22,5'-24,5' (5% B). 17 ml/min.

Tiempo de elución: 11,2'.

Longitud de onda de detección: 290 nm.

Procedimiento para la determinación de la pureza mediante HPLC:

Columna: XBridgeTM C18 5 μ m, 4,6 x 150 mm, de Waters.

Fase móvil: Eluyente A (H₂O, 10 mM AcONH₄, pH 9,0). Eluyente B (Acetonitrilo).

Perfil de elución: 0'-2,5' (5% B); 2,5'-17,5' (5-37% B); 17,5'-19,5' (37% B); 19,5'-22,5' (37-5%); 22,5'-24,5' (5% B). 1,0 ml/min.

Tiempo de elución: 12,2'.

Longitud de onda de detección: 290 nm.

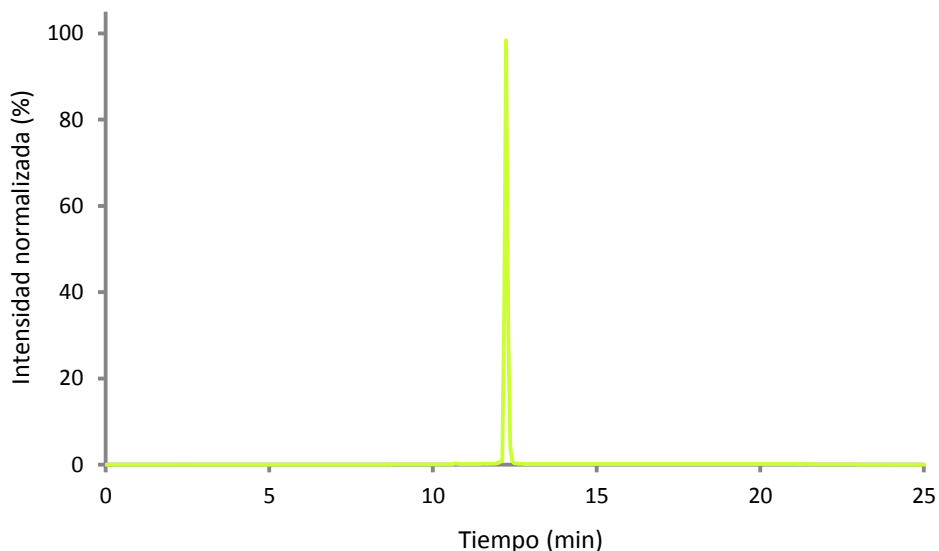
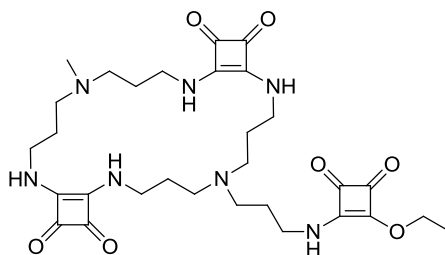


Figura 91 – Traza de HPLC de la sonda C2-FITC **70** purificada mediante HPLC. Área de la señal principal: 99%.

^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,67-1,74 (br, 10H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,16 (br, 3H, NCH_3), 2,39-2,50 (br, 10H, NCH_2), 3,54 (br, 10H, $\text{CH}_2\text{NH}(\text{Sq})+\text{CH}_2\text{NHCS}$), 6,57-6,68 (m, 7H, FITC), 7,18 (d, $^3J(\text{H,H}) = 8,2$ Hz, 1H, FITC), 7,52-7,76 (br, 2H, NH), 8,15-8,24 (br, 2H, NH), 9,97 (br, 1H, NH), 10,13 (br, 2H, OH). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6) δ = 25,5, 27,3, 27,7, 49,9, 50,3, 53,6, 83,4, 102,4, 110,2, 110,4, 113,1, 113,8, 117,0, 118,4, 124,9, 128,8, 129,4, 136,7, 141,1, 141,3, 152,5, 160,3, 161,1, 167,9, 168,8, 173,0, 80,3, 182,2. HRMS (ESI) calc. para 879,3500 ($\text{M}+\text{H}^+$; $\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{N}_8\text{O}_9\text{S}^+$) encontrado: 879,3503.

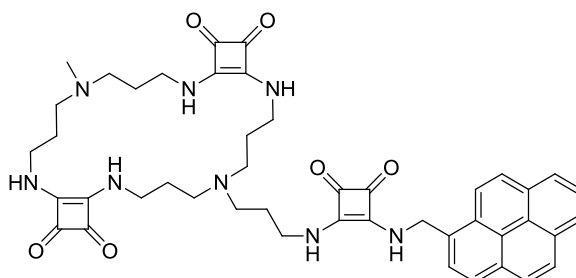
C2-c₃-Sq **71**:



La oligoescuaramida **54** (202 mg, 0,34 mmol) se desprotege tal y como se describe para el compuesto **69**. Una vez finalizada la reacción de desprotección se basicifica igualmente con Na_2CO_3 sólido hasta pH 8, para diluir posteriormente la disolución con EtOH (10 ml). A esta disolución se añaden 51 μl de escuarato de dietilo **1** (0,34 mmol) y se mantiene en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se reduce el volumen de la disolución a 40 °C y 90 mbar hasta obtener un volumen aproximado de 5 ml. La disolución se diluye con H_2O (10 ml) y se enfría en un baño de agua-hielo, separando el precipitado resultante por centrifugación. El sólido se lava después con EtOH (2 x 10 ml) y se seca, obteniendo el producto **71** como un sólido amarillo pálido (112 mg, 0,18 mmol). Rdto: 54%

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,36 (t, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,3 Hz, 3H, CH_2CH_3), 1,64 (br, 10H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2,11 (s, 3H, NCH_3), 2,34-2,45 (br, 10H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3,50 (br, 10H, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4,63 (q, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,3 Hz, 2H, CH_2CH_3), 7,38 (br, 4H, NHCCNH), 8,59 (br, 0,5H, NH^aCCO), 8,79 (br, 0,5H, NH^bCCO). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6 -HCl) δ = 15,9, 24,4, 24,8, 25,1, 25,5, 40,9, 49,7, 50,1, 52,7, 69,2, 168,1, 174,0, 182,5, 184,4, 184,8. HRMS (MALDI-TOF) calc. para 614,3297 ($\text{M}+\text{H}^+$; $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_7\text{O}_7^+$) encontrado: 614,3320.

C2-Pyr 72:



La obtención de la amina libre a partir de la oligoesquaramida cíclica **54** (50 mg, 0,085 mmol) se realiza del mismo modo que se ha descrito para el producto **69**. Al crudo de reacción de la desprotección se añade EtOH (1,9 ml) y se basifica con una disolución de Na_2CO_3 saturada hasta pH 8,4. A esta disolución se añade después DiPEA (44 μl , 0,25 mmol) y se mantiene en agitación durante unos minutos. Posteriormente se añade el éster derivado del pireno **58** (33 mg, 0,093 mmol) disuelto en una mezcla EtOH:DMF (1,8 ml y 0,5 ml respectivamente). Esta mezcla de reacción se agita a 40 °C durante 2 horas y posteriormente 60 horas a temperatura ambiente. El precipitado se filtra y se lava con EtOH (7 ml), una mezcla EtOH:H $_2$ O (1:1, 7 ml) y acetona (7 ml). El crudo se purifica mediante HPLC de fase reversa, obteniendo el producto **72** como un sólido blanco (53 mg, 0,066 mmol). Pureza determinada por HPLC: 65% Rdto: 78%

Procedimiento para la purificación mediante HPLC:

Columna: XBridgeTM Prep C18 OBDTM 5 μm , 19 x 150 mm, de Waters.

Fase móvil: Eluyente A (H_2O , 10 mM AcONH_4 , pH 4,5). Eluyente B (Acetonitrilo).

Perfil de elución preparativo: 0' (10% B); 0'-20' (10-50% B); 20'-22' (50% B); 22'-24' (50-10%); 24'-27' (10% B). 17 ml/min.

Tiempo de elución: 14,0'.

Longitud de onda de detección: 290 nm.

Procedimiento para la determinación de la pureza mediante HPLC:

Columna: XBridgeTM C18 5 μm , 4,6 x 150 mm, de Waters.

Fase móvil: Eluyente A (H_2O , 10 mM AcONH_4 , pH 4,5). Eluyente B (Acetonitrilo).

Perfil de elución: 0' (10% B); 0'-20' (10-50% B); 20'-22' (50% B); 22'-24' (50-10%); 24'-27' (10% B). 1,0 ml/min.

Tiempo de elución: 14,3'.

Longitud de onda de detección: 290 nm.

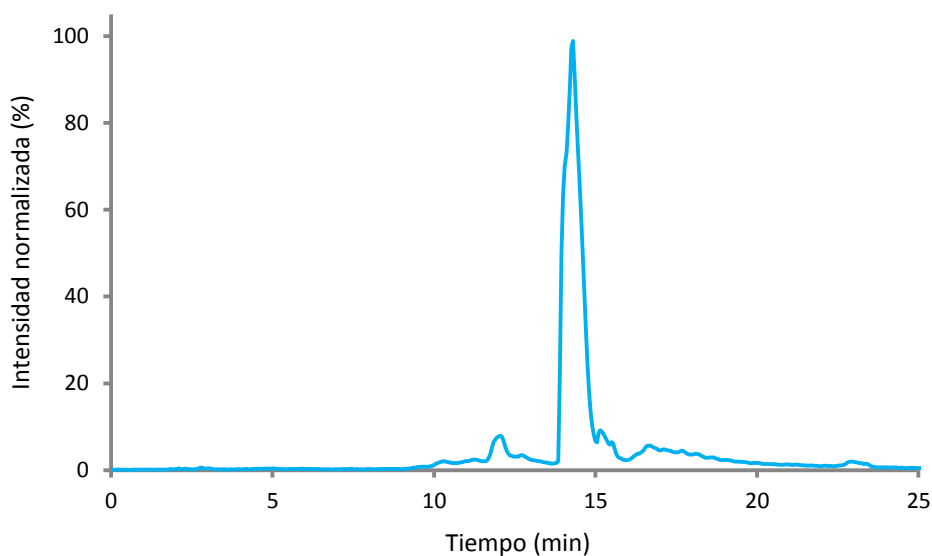
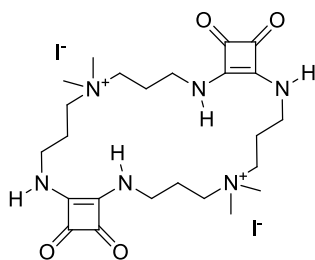


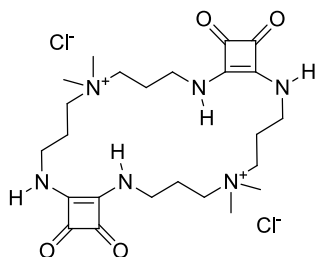
Figura 92 – Traza de HPLC de la sonda C2-Pyr **72** purificada mediante HPLC. Área de la señal principal: 65%.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,60 (br, 10H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,09 (br, 3H, NCH_3), 2,34 (br, 10H, NCH_2), 3,47 (br, 10H, $\text{CH}_2\text{NH}(\text{Sq})$), 5,50 (br, 2H, $\text{NHCH}_2(\text{pyr})$), 7,33 (br, 3H, NH), 8,0-8,5 (m, 10H, pyr+ NH). ^{13}C RMN (75 MHz, DMSO- d_6 + HCl) δ = 25,0, 25,4, 40,8, 44,9, 49,7, 52,6, 123,0, 124,0, 124,2, 125,2, 125,4, 125,6, 126,5, 126,7, 127,5, 128,1, 130,4, 130,6, 130,9, 132,3, 167,8, 168,0, 182,4, 182,6. HRMS (MALDI-TOF) calc. para 799,3926 ($\text{M}+\text{H}^+$; $\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{N}_8\text{O}_6^+$) encontrado: 799,3900.

[C2-Me₂] \cdot [I₂] **73:**



Sintetizado según se describe en la bibliografía.⁷⁰

[C2-Me₂]-[Cl₂] 74:

La sal de yodo **73** (204 mg, 0,28 mmol) se disuelve en H₂O (15 ml) y la solución se filtra para eliminar restos insolubles. Se añade una disolución acuosa de NH₄PF₆ (0,4 ml, 1,2M) obteniendo un precipitado amarillo que se filtra y lava con H₂O (5 ml). El precipitado se suspende en agua destilada (10 ml) y se añade una resina de intercambio iónico en su forma cloruro (Amberlite® IRA-400, 0,5 g). La mezcla se agita suavemente durante 24 horas, se filtra y la disolución acuosa se liofiliza para obtener el producto **74** como un sólido blanco (120 mg, 0,22 mmol). Rdto: 78%

3.9.2 Obtención de espectros de absorción-emisión

Para la caracterización y evaluación de las sondas fluorescentes sintetizadas se utilizan las alícuotas purificadas mediante HPLC según los procedimientos descritos.

Los compuestos C2-BDP **69**, C2-FITC **70** y C2-Pyr **72** se disuelven en DMSO para obtener disoluciones a una concentración $1,0 \times 10^{-3}$ M. Las disoluciones de las sondas C2-BDP **69** y C2-FITC **70** se diluyen posteriormente hasta una concentración de $1,0 \times 10^{-5}$ M y $5,0 \times 10^{-6}$ M en PBS a pH 7,4, añadiendo DMSO si es necesario para mantener su proporción en un 1%. En el caso de la sonda C2-Pyr **72** se diluye la disolución inicial a una única concentración 5×10^{-5} M en PBS a pH 7,4 manteniendo en este caso la proporción de DMSO al 5%.

De la muestra más concentrada de cada producto se obtiene su espectro ultravioleta-visible en el intervalo entre 240 y 750 nm, determinando los máximos de absorción absolutos y relativos.

Con las muestras más diluidas se obtienen los espectros de emisión fluorescente, adquiriendo dichos espectros en el intervalo comprendido entre 20 nm menos que la longitud de onda de excitación y 750 nm. Las longitudes de onda de excitación utilizadas para cada sonda han sido de 465 nm para la sonda C2-BDP **69**, 470 nm para la sonda C2-FITC **70** y 370 nm para la sonda C2-Pyr **72**.

3.9.3 Variación de la fluorescencia en función del pH

Se disuelven los compuestos C2-BDP **69** y C2-FITC **70** en DMSO para obtener disoluciones $1,0 \times 10^{-3}$ M. Éstas se diluyen en DMSO hasta una concentración $5,0 \times 10^{-4}$ M.

Por otra parte se preparan disoluciones acuosas en el intervalo de pH entre 3 y 11. Para ello se diferencian tres condiciones en función del pH deseado. Para obtener disoluciones con un pH inferior a 4 se adicionan, a 20 ml de una disolución acuosa 0,1 M de NaCl, 500 μ l de AcOH glacial. Posteriormente se ajusta el pH mediante la adición de alícuotas de HCl 0,1 M. Para las disoluciones con un pH comprendido entre 4 y 10, se adicionan 500 μ l de AcOH glacial o de una disolución de NH_3 al 32% en función del pH deseado y se ajusta finalmente con la adición de alícuotas de NH_3 o AcOH según corresponda. Finalmente para las disoluciones con pH mayor a 10, se adicionan 500 μ l de una disolución de NH_3 al 32% y se ajusta el pH con la adición de una disolución de NaOH 0,1 M.

Posteriormente se trasvasan 3960 μ l de las disoluciones preparadas junto con 40 μ l de la disolución de la sonda fluorescente en DMSO, obteniendo una concentración final de $5,0 \times 10^{-6}$ M, con un 1% de DMSO.

Las muestras recién preparadas se mantienen durante 5 minutos a una temperatura de 37 °C protegidas de la luz. Los espectros correspondientes se registran por triplicado para asegurar la fiabilidad de la lectura. La excitación se realiza a 465 nm en el caso de la sonda C2-BDP **69** y a 470 nm para la sonda C2-FITC **70**.

La intensidad de fluorescencia se calcula como la integral de la curva de emisión en el intervalo de longitudes de onda de dicha curva según la fórmula:

$$I_{Fl} = \sum_{i=\lambda_0}^{\lambda_f} [I_{Fl}]_{i+1} \cdot (\lambda_{i+1} - \lambda_i) \quad (\text{Ec. 2})$$

3.9.4 Cálculo de los rendimientos cuánticos

El cálculo del rendimiento cuántico se lleva a cabo obteniendo en primer lugar espectros absorción mediante espectrometría UV-Vis y espectros de emisión mediante fluorimetría. Las disoluciones utilizadas en ambas técnicas son las mismas.

La ecuación para calcular el rendimiento cuántico (Φ) mediante comparación con un estándar es la siguiente:

$$\Phi_M^\lambda = \Phi_E \cdot \frac{Fl_M^\lambda}{Fl_E^\lambda} \cdot \frac{Abs_E^\lambda}{Abs_M^\lambda} \cdot \frac{\lambda_{exE}}{\lambda_{exM}} \cdot \frac{\eta_M^2}{\eta_E^2} \quad (\text{Ec. 7})$$

Siendo Fl^λ el área integrada de la banda de emisión de la muestra (M) y el estándar (E), a una longitud de onda λ determinada. Abs^λ corresponde a la absorbancia a esa

longitud de onda, λ_{ex} se refiere a la intensidad de la lámpara de excitación, y η es el índice de refracción del disolvente.

Sin embargo, los términos que hacen referencia a la intensidad de la lámpara y el índice de refracción son fácilmente despreciables al comparar valores obtenidos a la misma longitud de onda de excitación y utilizar disoluciones acuosas, como en este caso. Por lo que se obtiene la ecuación 3.

$$\Phi_M^\lambda = \Phi_E \cdot \frac{Fl_M^\lambda \cdot Abs_E^\lambda}{Abs_M^\lambda \cdot Fl_E^\lambda} \quad (\text{Ec. 3})$$

La determinación del rendimiento cuántico se ha llevado a cabo en dos condiciones diferentes de pH, por una parte a 7,4 utilizando PBS, y por otra parte a pH 5,5 utilizando un tampón de cacodilato sódico a una concentración 0,01 M.

Las disoluciones de los estándares se preparan según las condiciones específicas para cada fluoróforo, ajustando las concentraciones de muestreo experimentalmente para obtener lecturas de absorbancia inferiores a 0,1 en el intervalo de longitudes de onda estudiadas, evitando de este modo los efectos de filtro interno debidos a la concentración. Las sondas fluorescentes sintetizadas se diluyen igualmente en las dos condiciones propuestas, a una concentración a la cual su absorbancia en el intervalo de longitudes de onda de interés para el cálculo del rendimiento cuántico sea inferior a 0,1. En el caso de las sondas C2-BDP **69** y C2-FITC **70** se utiliza un 1% de DMSO, mientras que para la sonda C2-Pyr **72** se incrementa hasta el 5%. Para todos los productos se obtienen tres concentraciones diferentes excepto para las muestras C2-FITC y C2-Pyr en el tampón cacodilato, donde se obtienen únicamente dos.

En la tabla 15 se resumen las concentraciones usadas para obtener los espectros de absorción y emisión.

Tabla 15 – Concentraciones de los estándares y las sondas sintetizadas utilizadas para la obtención de los rendimientos cuánticos.

Fluoróforo	Disolvente	Conc. 1 (M)	Conc. 2 (M)	Conc. 3 (M)
Oregon Green 488	0,1 M T. borato, pH 9	$3,0 \times 10^{-7}$	$7,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$
C2-BDP 69	PBS, pH 7,4	$3,0 \times 10^{-7}$	$7,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$
C2-BDP 69	T. cacodilato, pH 5,5	$3,0 \times 10^{-7}$	$7,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$
C2-FITC 70	PBS, pH 7,4	$3,0 \times 10^{-7}$	$7,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-6}$
C2-FITC 70	T. cacodilato, pH 5,5	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-5}$	-
Sulfato de quinina	HClO ₄ , 0,1 M	$1,0 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-5}$
C2-Pyr 72	T. cacodilato, pH 5,5	$3,0 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$	-

Los espectros de emisión de los estándares y las muestras se obtienen con longitudes de excitación cercanas a los máximos de absorción de los productos a intervalos de 5 nm, obteniendo en el caso de la sonda C2-BDP **69** lecturas entre 450 y 520 nm, el

mismo intervalo que en el caso de la sonda C2-FITC **70**, y entre 345 y 370 nm en el caso de la sonda C2-Pyr **72**.

Una vez registrados los espectros de emisión se obtiene la intensidad de fluorescencia calculando la integral de la banda de emisión según la ecuación 3 descrita anteriormente y se comparan los pares de valores de la muestra y el estándar correspondiente a una longitud de onda determinada.

Las múltiples concentraciones obtenidas permiten asegurar la exactitud de los valores obteniendo de este modo hasta nueve valores del rendimiento cuántico para cada longitud de onda, para cada muestra y cada condición.

3.9.5 Fotoestabilidad de la sonda C2-BDP 69 en PBS

Para comprobar la fotoestabilidad de la sonda C2-BDP **69**, se adquiere el espectro de emisión de la sonda a una concentración $5,0 \times 10^{-6}$ M en PBS/1% DMSO a 25 °C. El registro del espectro se realiza en intervalos de 1 nm con un tiempo de lectura de 0,2 segundos/nm. La longitud de onda de excitación es de 460 nm y el voltaje del fotomultiplicador (PMT) se fija a 600 V. Se realizan adquisiciones sucesivas cada cinco minutos hasta obtener un tiempo acumulado de 6 horas.

3.9.6 Obtención de las constantes termodinámicas de los compuestos fosforilados

Las constantes termodinámicas por ITC de los fosfatos modelo se obtienen, a una temperatura de 298 K, mediante la adición de una disolución de HCl a una disolución acuosa del fosfato estudiado. Las disoluciones de fosfatos se obtienen a partir de las diferentes sales sódicas de los fosfatos, disódicas en el caso de AMP y M6P, y trisódica en el caso de la FBP, mediante disolución en agua recién destilada. La fosfocolina se usa como sal de calcio. Las condiciones definitivas utilizadas se resumen en la tabla 16.

Tabla 16 – Concentraciones de fosfato y de HCl utilizadas para las valoraciones mediante ITC.

Fosfato	[Fosfato] mM	[HCl] mM
AMP	6,6	69,3
M6P	1,82	9,0
FBP	2,0	15,0
PCh	1,84	9,0

Previo al inicio de la valoración, las muestras se desgasifican durante cinco minutos al vacío.

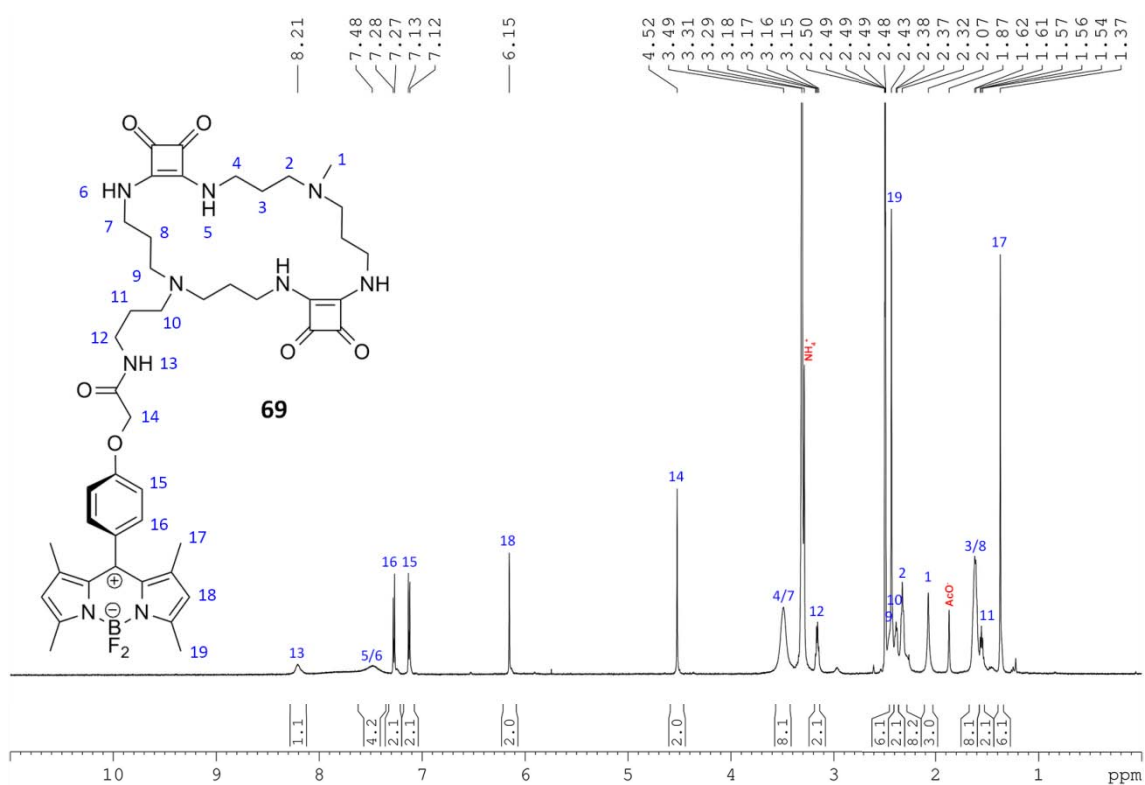
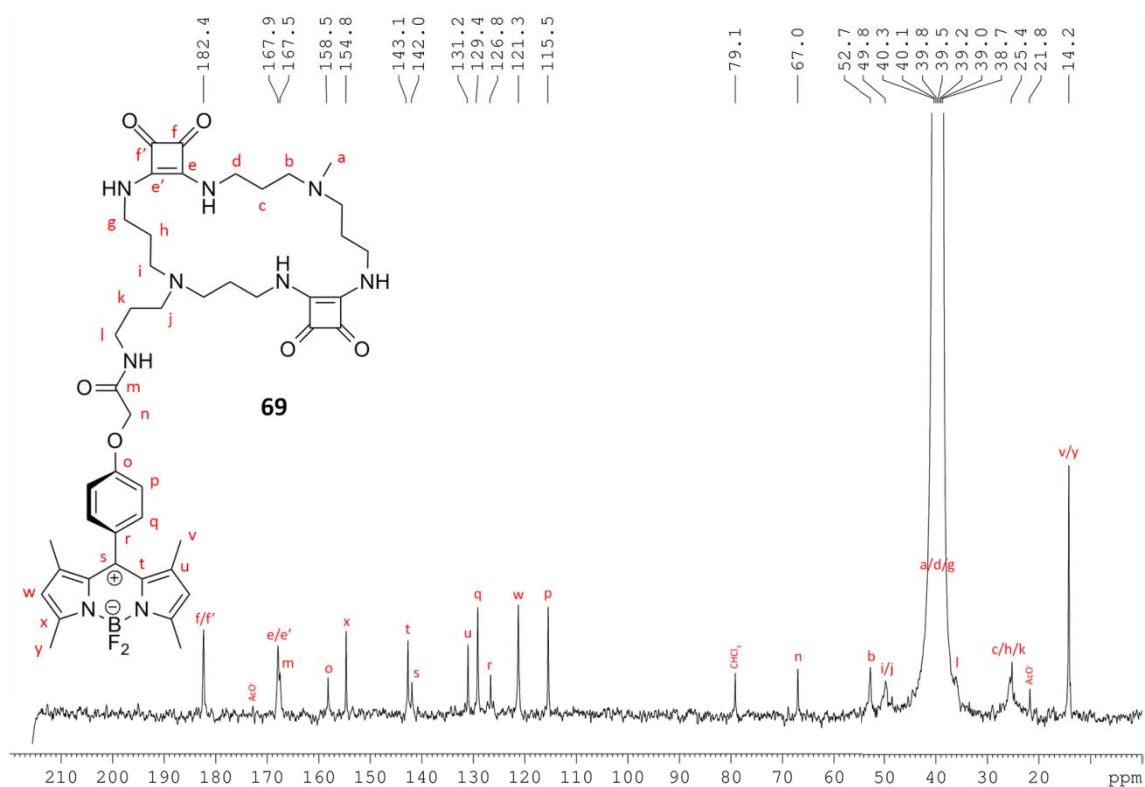
3.9.7 Obtención de las constantes termodinámicas de los complejos **74**·Fosfato

Del mismo modo se realiza la valoración de una mezcla de la oligoescuaramida **74** y los fosfatos en diferente proporción en disolución acuosa, a 298 K, y utilizando las concentraciones que se indican en la tabla 17.

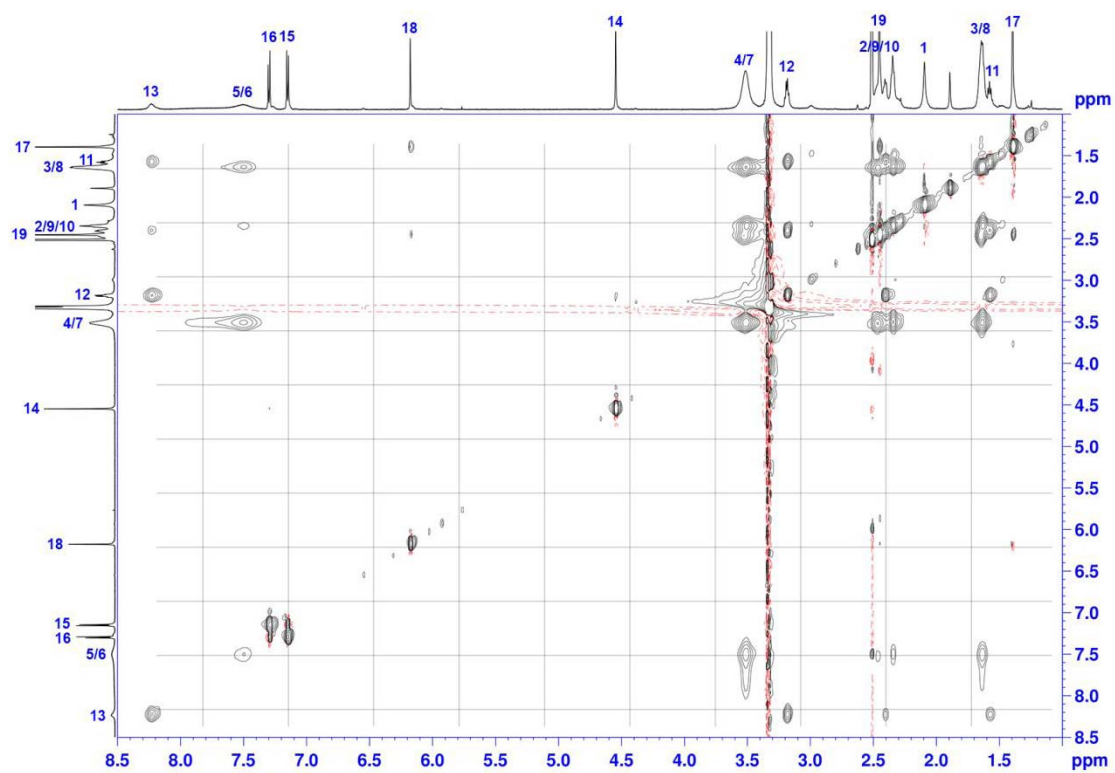
Tabla 17 – Concentraciones de oligoescuaramida cíclica (receptor), fosfato (huésped) y HCl utilizadas para realizar las valoraciones mediante ITC.

Receptor	[Receptor] mM	Huésped	[Huésped] mM	[74]:[PO ₄ ²⁻]	[HCl] mM
74	6,0	AMP	2,0	3:1	9,0
74	6,0	M6P	1,8	3,3:1	9,0
74	6,0	FBP	2,0	3:1	15,0
74	6,0	PCh	1,8	3,3:1	9,0

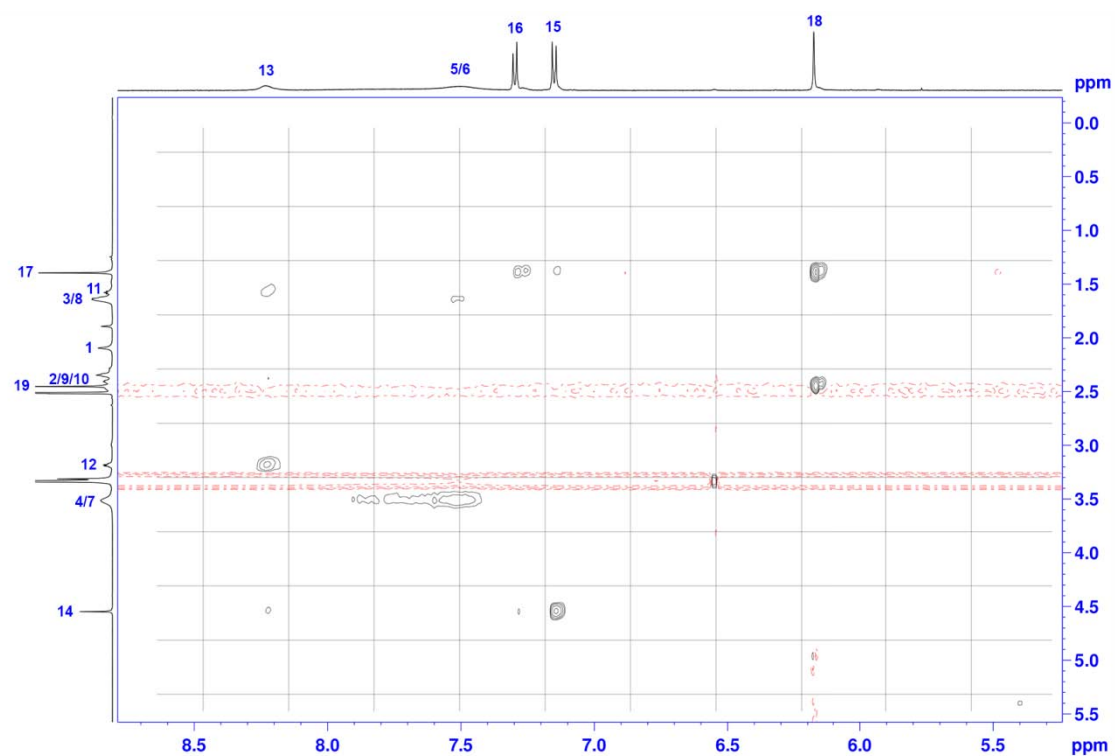
3.10 Colección de espectros de RMN de los productos relevantes

 ^1H -RMN **69** (DMSO- d_6) ^{13}C -RMN **69** (DMSO- d_6)

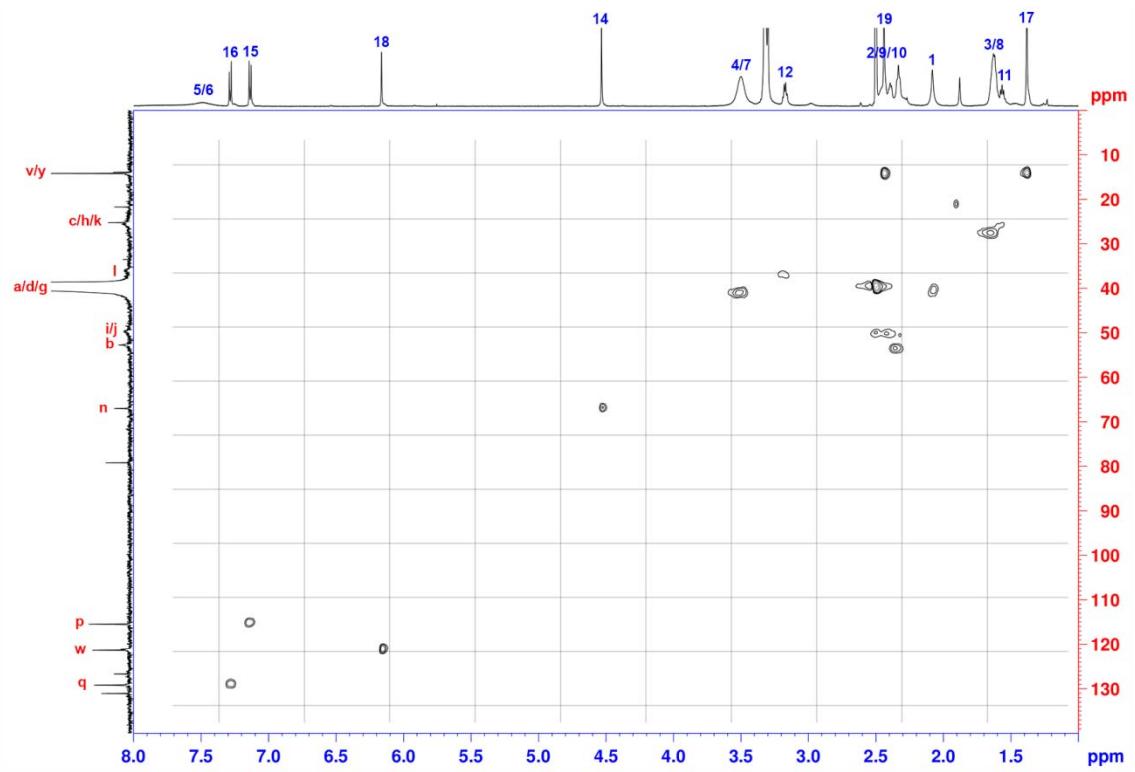
^1H - ^1H TOCSY 2D RMN (DMSO- d_6)



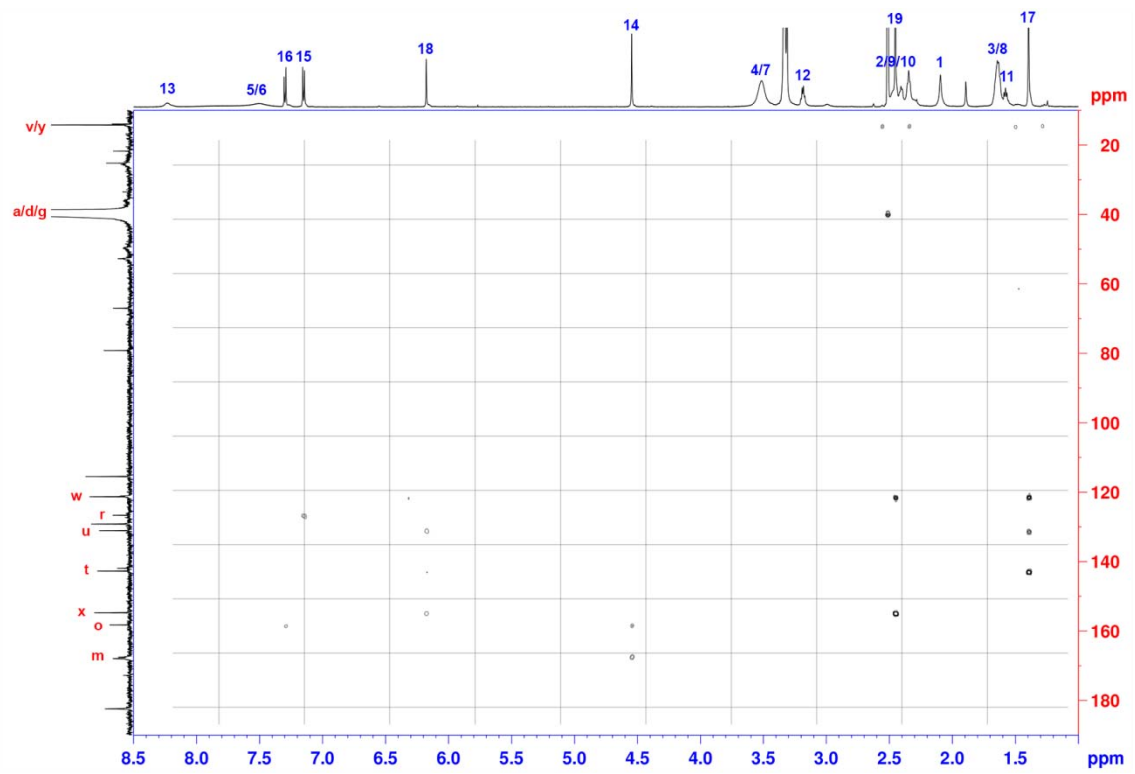
^1H - ^1H NOESY 2D RMN (DMSO- d_6)



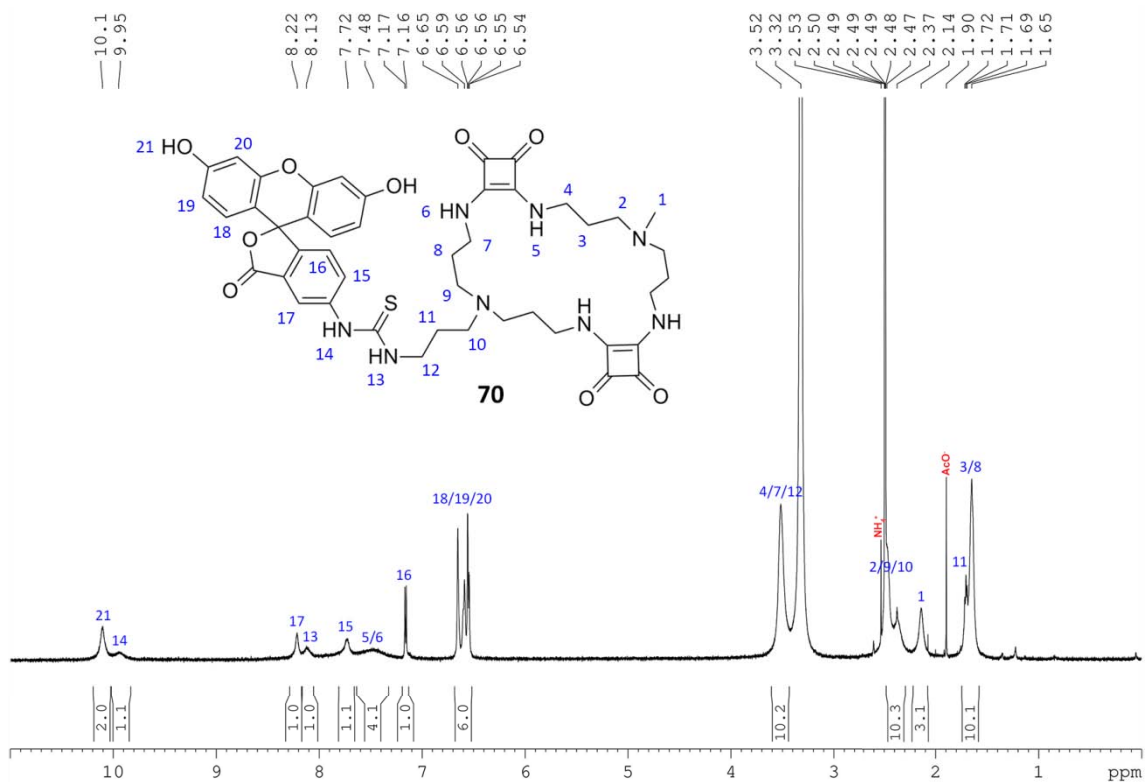
^1H - ^{13}C HSQC 2D RMN (DMSO- d_6)



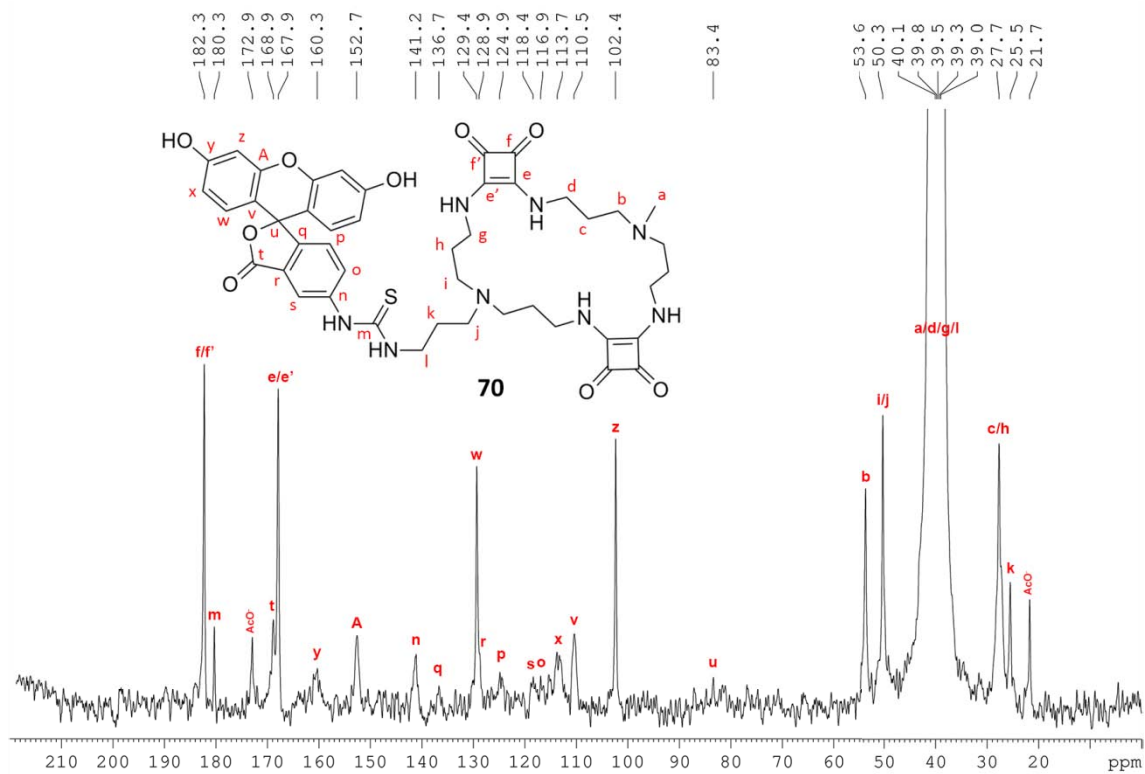
^1H - ^{13}C HMBC 2D RMN (DMSO- d_6)

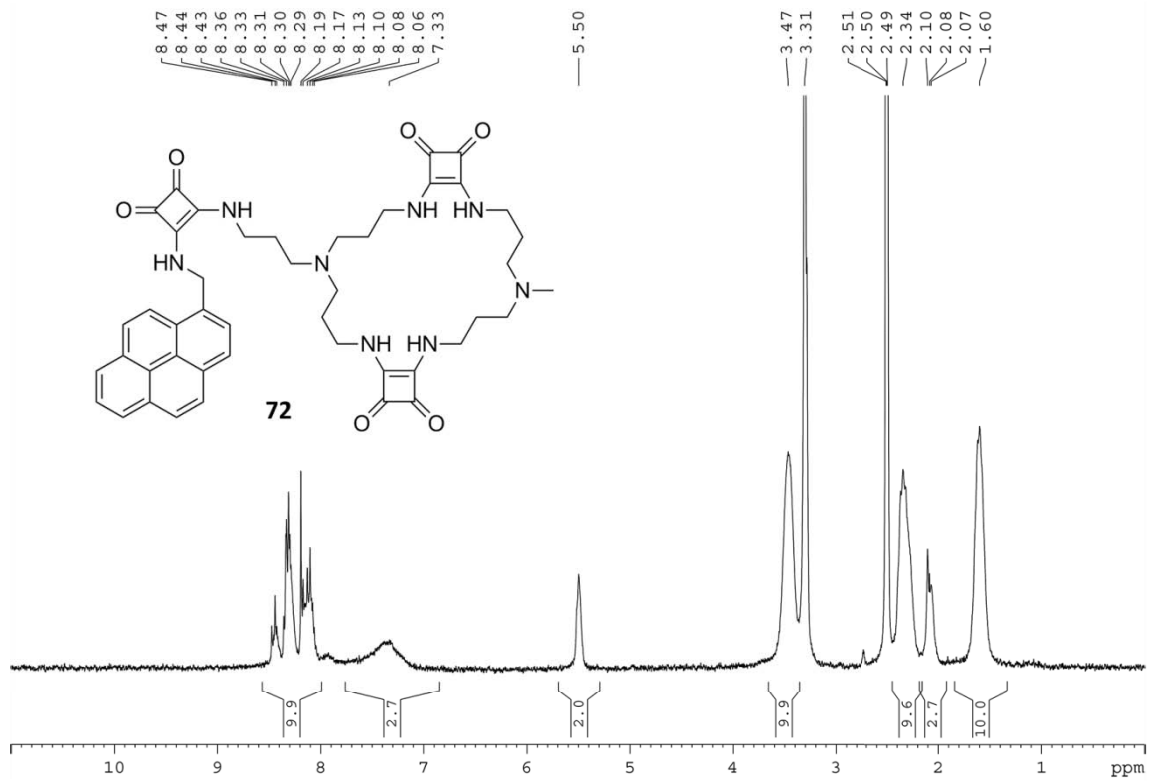
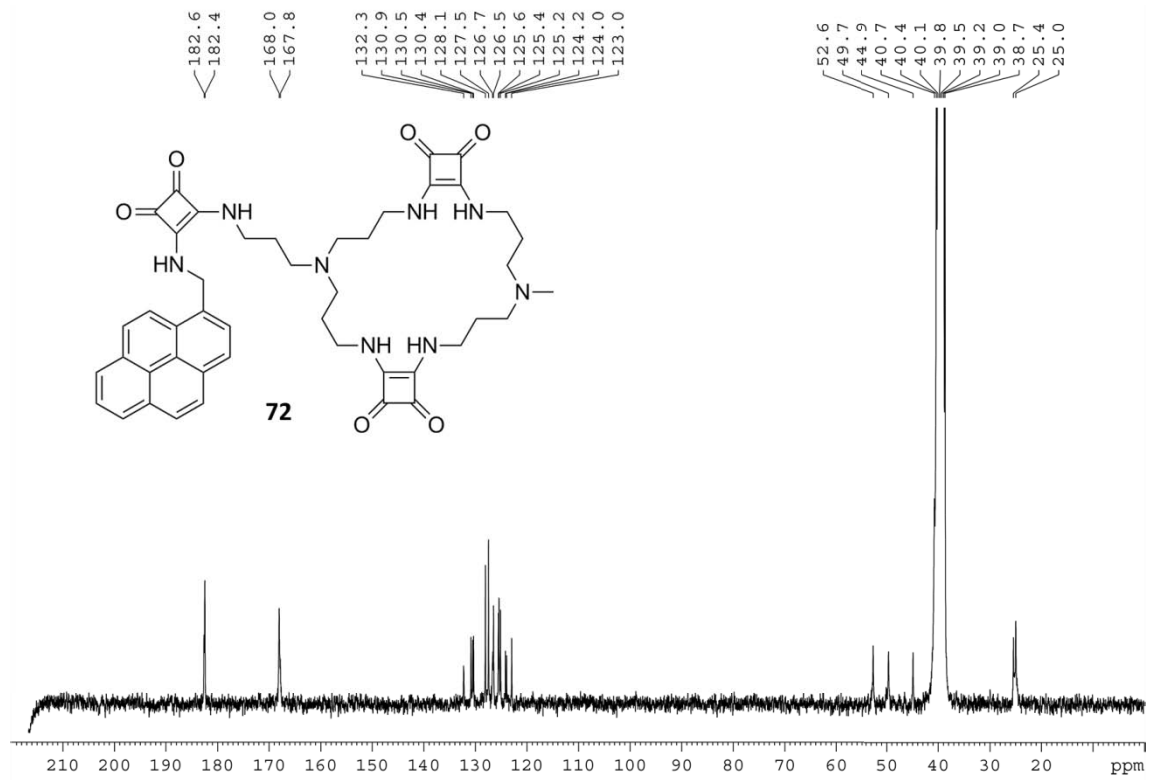


¹H-RMN **70** (DMSO-d₆)



¹³C-RMN **70** (DMSO-d₆)



^1H -RMN 72 (DMSO- d_6) ^{13}C -RMN 72 (DMSO- d_6)

Publicación derivada de este capítulo:

“Cell Uptake and Localization Studies of Squaramide Based Fluorescent Probes”

Angel Sampedro, Ruth Villalonga-Planells, Manuel Vega, Guillem Ramis, Silvia Fernández de Mattos, Priam Villalonga, Antoni Costa and Carmen Rotger

Bioconjugate Chem. **2014**, 25, 1537-1546.

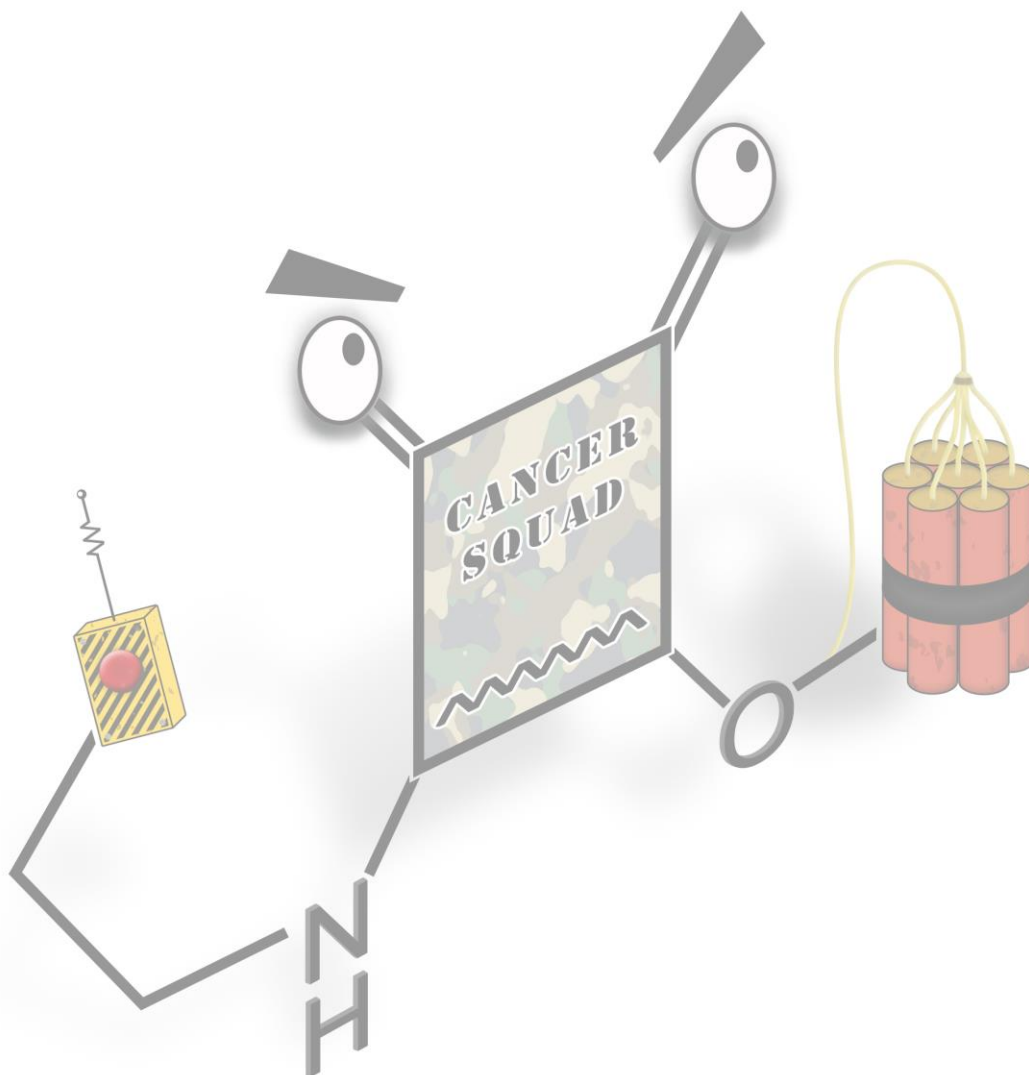
Abstract

Cell internalization is a major issue in drug design. Although squaramide-based compounds are receiving much attention because of their interesting bioactivity, cell uptake and trafficking within cells of this type of compounds are still unknown. In order to monitor the cell internalization process of cyclosquaramide compounds we have prepared two fluorescent probes by covalently linking a fluorescent dye (BODIPY derivative or fluorescein) to a noncytotoxic cyclosquaramide framework. These two probes (C2-BDP and C2-FITC) rapidly internalize across live cell membranes through endocytic receptor-mediated mechanisms. Due to its higher fluorescence and photochemical stability, C2-BDP is a superior dye than C2-FITC. C2-BDP remains sequestered in late endosomes allowing their fast and selective imaging in various live cell types. Cyclosquaramide–cell membrane interactions facilitate cell uptake and have been investigated by binding studies in solution as well as in live cells. Cyclosquaramide 1 (C2-BDP) can be used as a highly fluorescent probe for the rapid and selective imaging of late endosomes in live cells.



CAPÍTULO 4

ESPACIADORES AUTOINMOLATIVOS



4.1 Motivación del capítulo

En el capítulo anterior se ha demostrado que la oligoescuaramida cíclica marcada C2-BDP **69** se internaliza en las células atravesando de forma rápida la membrana citoplasmática y se acumula en los endosomas tardíos con un bajo nivel de toxicidad (Fig. 93).¹⁴¹

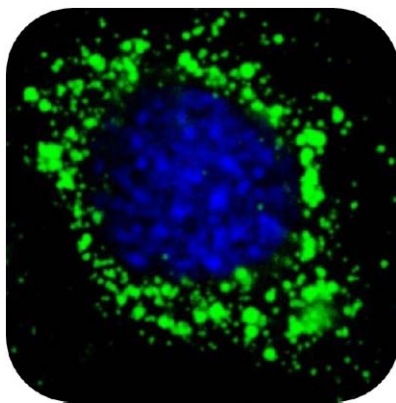


Figura 93 – Internalización de la oligoescuaramida cíclica C2-BDP (verde).

La oligoescuaramida cíclica, por tanto, realiza una función transportadora de los grupos fluoróforos conjugados, similar a la que realizan otros sistemas como son por ejemplo los péptidos de penetración celular (CPPs), las nanopartículas o los liposomas, con capacidad para la internalización de fármacos. En muchas ocasiones, cuando se utilizan sistemas de transporte para la administración y distribución de fármacos, es necesario liberar el fármaco de su unión con el transportador, ya que ligado, su actividad se ve inhibida o reducida en gran medida. Debido a ello, es necesario que se produzca la rotura selectiva de la unión entre el transportador y el fármaco una vez alcanzada la diana terapéutica. Para alcanzar este objetivo, se pueden seguir diversas estrategias, pero el uso de espaciadores autoinmolativos constituye una alternativa muy efectiva a la hora de desarrollar sistemas con enlaces lábiles que permitan la liberación de moléculas de forma controlada.

En esta introducción se describen inicialmente las estrategias seguidas para la internalización de fármacos evitando diversos inconvenientes como degradación prematura, baja internalización, o la búsqueda de mayor especificidad mediante el uso de receptores específicos de membrana. A continuación, la introducción se orienta hacia los sistemas autoinmolativos, responsables de la liberación, bajo estímulos selectivos, de las cargas, describiendo las diferentes estructuras que componen estos sistemas, incluyendo en este caso los transportadores.

¹⁴¹ Sampedro, A.; Villalonga-Planells, R.; Vega, M.; Ramis, G.; Fernández de Mattos, S.; Villalonga, P.; Costa, A.; Rotger, C.; Cell Uptake and Localization Studies of Squaramide Based Fluorescent Probes. *Bioconjugate Chem.*, **2014**, 25, 1537-1546.

Posteriormente, ya en la discusión de resultados, se describe el diseño, síntesis y optimización de un nuevo sistema autoinmolativo basado en la unidad escuaramida. Además se evalúa la eficacia del nuevo espaciador en diferentes condiciones, teniendo siempre presente la aplicabilidad del sistema en entornos biológicos (Fig. 94).

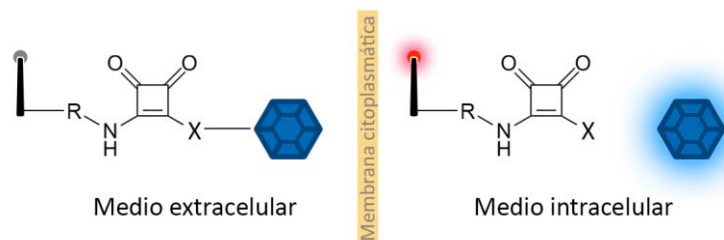


Figura 94 – Diseño general de un sistema autoinmolativo escuaramídico. La escuaramida se encuentra unida por una parte a la carga y por la otra a un sensor capaz de detectar unas determinadas condiciones propias de un entorno intracelular. De esta forma, al detectar esta activación, se libera la carga mediante un proceso autoinmolativo.

Tal y como se ejemplifica en la figura anterior, este sistema debe ser estable en unas condiciones similares a las que se encuentran en un medio extracelular, mientras que las condiciones intracelulares deben provocar la liberación y activación de la carga.

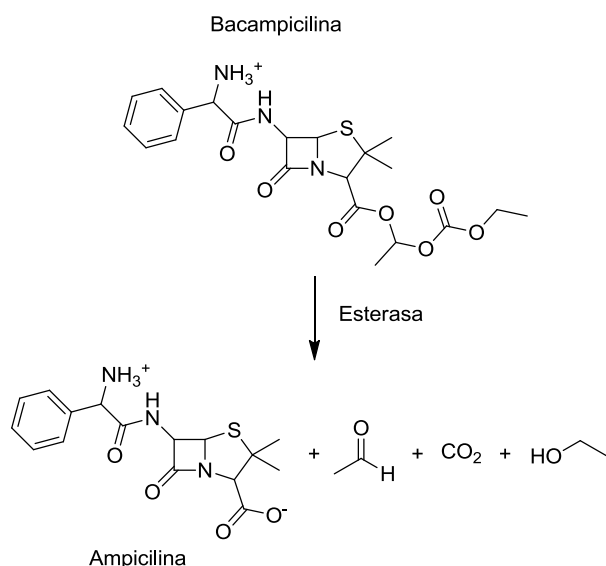
4.2 Introducción

Muchos fármacos presentan problemas relacionados con su administración tales como limitada solubilidad, la imposibilidad de atravesar la membrana celular, poca especificidad o la acción de determinados enzimas que pueden inutilizar el fármaco y reducir su biodisponibilidad, es decir, una farmacocinética inadecuada.^{142,143}

Para evitar estos inconvenientes los fármacos se administran como derivados o conjugados, que presentan unas propiedades metabólicas, farmacológicas, o farmacocinéticas diferentes a las del fármaco en sí mismo. Cuando estas estructuras alcanzan su diana terapéutica sufren una transformación, bien sea mediante enzimas específicas o mediante estímulos concretos, como por ejemplo un pH determinado o el potencial redox, transformando el compuesto administrado en el fármaco con actividad terapéutica. Al fármaco modificado estructuralmente y que no presenta las mismas propiedades que éste, capaz además de generar in situ el fármaco en cuestión, se le denomina profármaco (Esquema 51).

¹⁴² Wong, A. D.; DeWit, M. A.; Gillies, E. R.; Amplified release through the stimulus triggered degradation of self-immolative oligomers, dendrimers, and linear polymers. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2012**, 64, 1031-1045.

¹⁴³ Stella, V. J.; Charman, W. N. A.; Naringrekar, V. H.; Prodrugs: Do they have Advantages in Clinical Practice?. *Drugs*, **1985**, 29, 455-473.



Esquema 51 – Estrategia seguida para aumentar la biodisponibilidad de la ampicilina mediante su administración como profármaco. Una vez en el organismo las esterases del organismo provocan una degradación de la estructura adquiriendo su actividad terapéutica.

Por ejemplo, la bacampicilina mostrada en la figura anterior es un profármaco de la ampicilina, un antibiótico betalactámico derivado de la penicilina. El profármaco administrado oralmente experimenta una mayor tasa de absorción que el propio fármaco, hidrolizándose posteriormente por la acción de esterases y aumentando por tanto su acción antibiótica.¹⁴⁴

En ocasiones, para modificar las propiedades del fármaco, éste se combina con una molécula con capacidad para atravesar las barreras biológicas y a la que se denomina transportador. La unión de ambas estructuras se realiza con el objetivo de que el conjugado fármaco-transportador atraviese la membrana citoplasmática sin dificultad mediante un proceso de transporte transmembrana facilitado. Al igual que en el caso general, la actividad del fármaco puede verse anulada por el transportador, considerándose también en este caso un profármaco (Fig. 95).

¹⁴⁴ Bodin, N. O.; Ekström, B.; Forsgren, U.; Jalar, L. P.; Magni, L.; Ramsay, C. H.; Sjöberg, B.; Bacampicillin, a New Orally Well-Absorbed Derivative of Ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1975**, 8, 518-525.

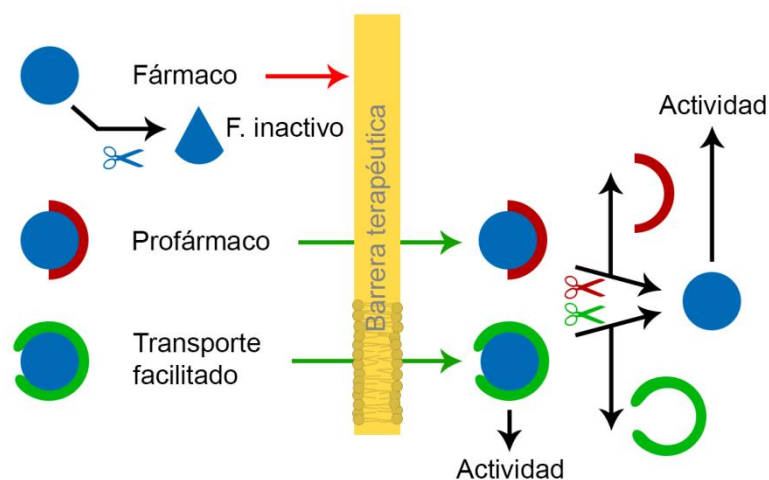


Figura 95 – Representación de un fármaco y los beneficios que aporta la estructura del profármaco. En el caso que la barrera terapéutica corresponda a la membrana celular se habla de transporte facilitado, pudiendo ser también un profármaco o no en función del transportador.

En cualquiera de los casos estos sistemas permiten superar las limitaciones farmacológicas o farmacocinéticas que experimentan los fármacos por sí solos, y mencionados anteriormente.

Los fármacos administrados como profármacos, requieren de la acción de un estímulo específico para presentar su actividad. En el caso de la bacampicilina, mostrada anteriormente, el éster carbónico se encuentra cerca del núcleo β -lactámico. Si bien en este caso concreto esto no supone un problema para la acción de las esterasas implicadas en su hidrólisis. Sin embargo, en otros casos es necesaria la inclusión de un espaciador entre el grupo funcional susceptible de sufrir el estímulo y la carga proactiva. Una vez activado el sistema, estos espaciadores evolucionan de forma autónoma liberando al fármaco. Estos espaciadores se denominan autoinmolativos.

4.3 Sistemas autoinmolativos

Un sistema autoinmolativo es aquel que, después de ser activado por un estímulo externo, desencadena una cascada de reacciones intramoleculares que provocan la liberación de una carga. El grupo sensible de sufrir la activación del sistema es lo que se denomina gatillo (Fig. 96).

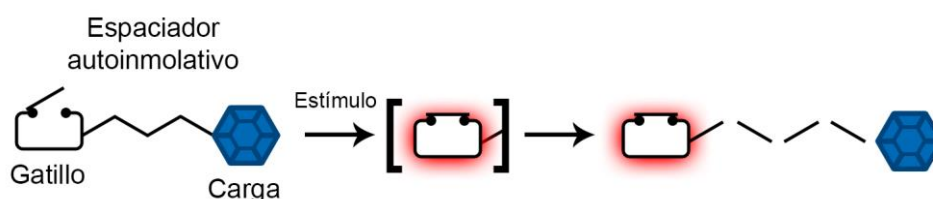


Figura 96 – Representación de un sistema autoinmolativo activado mediante un estímulo externo, que activa el gatillo, y éste a su vez la liberación de la carga.

La presencia de un transportador no es un componente intrínseco de un sistema autoinmolativo, sin embargo, los transportadores permiten facilitar la internalización de los fármacos.

A continuación se describen las características y se exponen ejemplos bibliográficos de las diferentes secciones que componen un sistema compuesto por un transportador y un espaciador autoinmolativo.

4.3.1 Transportadores

En un sistema transportador-espaciador-carga, el transportador es la porción molecular responsable de la internalización celular, aportando también en muchos casos la especificidad hacia la diana terapéutica. Se pueden clasificar los transportadores en función de si presentan una especificidad hacia determinados receptores o bien si únicamente facilitan la internalización ya sea por sus propias características estructurales o por las posibilidades de funcionalización que presentan, como ocurre por ejemplo con determinados nanomateriales como los nanotubos o las nanopartículas metálicas.

4.3.1.1 Transportadores no específicos o funcionalizables: nanomateriales

Los dendrímeros, nanotubos, liposomas, nanopartículas metálicas o incluso las proteínas pueden considerarse nanomateriales. Estos sistemas, en función de sus propiedades superficiales y tamaño pueden activar mecanismos de internalización no selectivos o simplemente actuar como transportadores de la carga, acumulándose en determinados lugares.

Este tipo de estructuras han demostrado que pueden solventar los problemas asociados a los fármacos habituales, tales como mejorar su solubilidad, prolongar el tiempo de permanencia en el organismo, mejorar su biodistribución y evitar respuestas inmunes por parte del receptor. Estas propiedades son fruto de la posibilidad de funcionalizar su superficie con diferentes sustancias tales como pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc. que estimulan el reconocimiento por parte de receptores específicos. Por otra parte también pueden funcionalizarse con diferentes fármacos o agentes de diagnóstico, tales como agentes de contraste, lo que habilita la terapia de combinación, útil para evitar la resistencia a determinados fármacos, o la evaluación a tiempo real de la eficacia del tratamiento (Fig. 97).¹⁴⁵

¹⁴⁵ Sun, T.; Zhang, Y. S.; Pang, B.; Hyun, D. C.; Yang, M.; Xia, Y.; Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2014**, 53, 12320-12364.

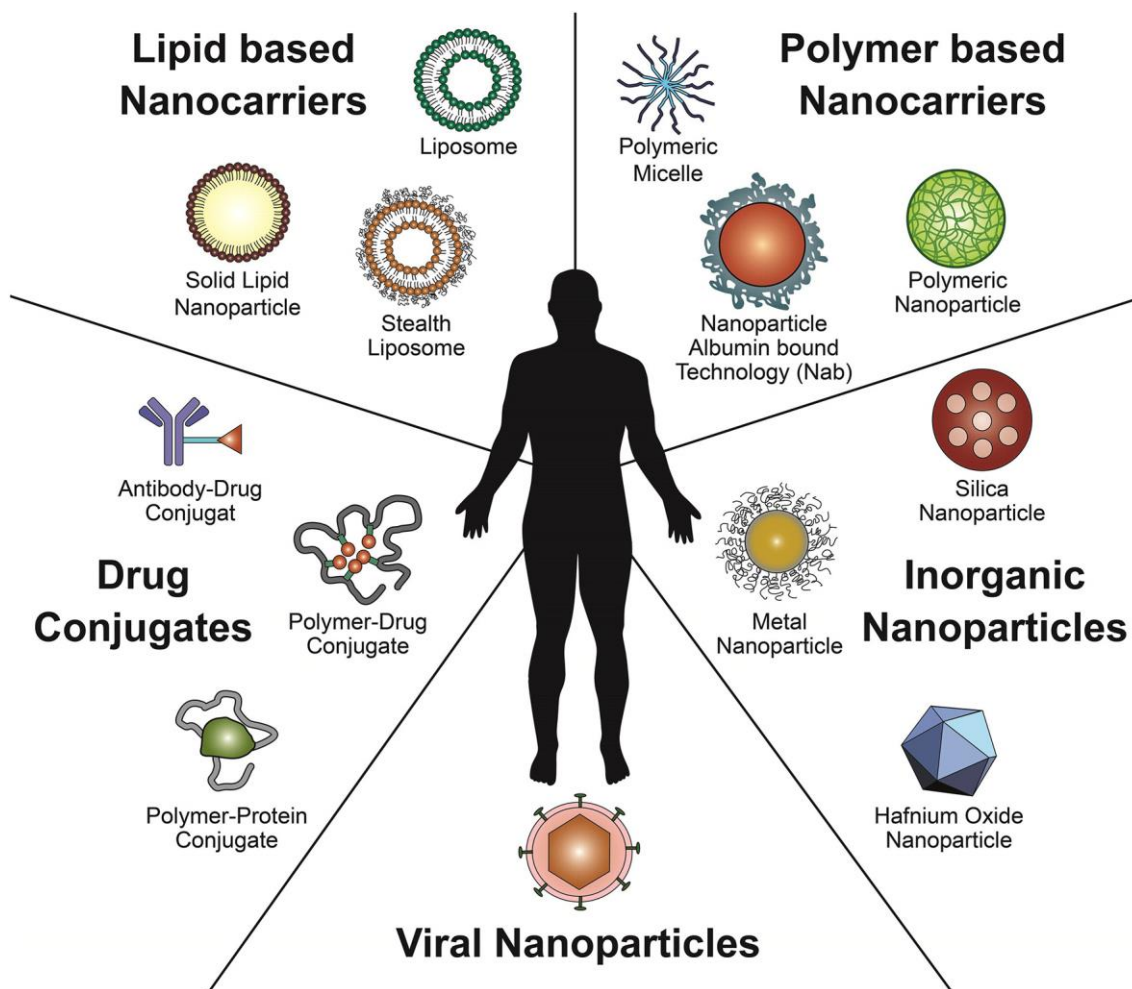


Figura 97 – Representación esquemática de diferentes nanoestructuras con aplicaciones terapéuticas. Imagen reproducida de J. Control. Release, Vol. 200, Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications, Pag. 138-157, Copyright 2015, con permiso de Elsevier.

Las propiedades de funcionalización de las nanopartículas permiten establecer un nexo de unión entre la unidad encargada del reconocimiento, y el sistema autoinmunitario, lo que en la práctica lleva, por ejemplo, a la internalización efectiva de múltiples drogas para un tratamiento más eficaz de enfermedades como el cáncer, VIH o infecciones bacterianas.¹⁴⁶

Un ejemplo de un sistema de transporte inespecífico, capaz de provocar una liberación controlada y de forma prolongada es el descrito por K. Cheng y colaboradores. En este caso usan una nanopartícula inorgánica hueca, con poros de entre 2 y 4 nm de diámetro. El fármaco utilizado es el cisplatino, un antitumoral inespecífico de células tumorales. La carga de la nanopartícula se realiza mediante su dispersión en una disolución concentrada de cisplatino, favoreciendo de esta forma la incorporación del fármaco a la nanopartícula por difusión. Una vez se administra la nanopartícula a un

¹⁴⁶ Wang, A. Z.; Gu, F.; Zhang, L.; Chan, J. M.; Radovic-Moreno, A.; Shaikh, M. R.; Farokhzad, O. C.; Biofunctionalized targeted nanoparticles for therapeutic applications. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **2008**, 8, 1063-1070.

organismo, el cisplatino fluye a través de los poros lentamente con un tiempo medio de difusión de 16 horas en medios básicos o neutros, acelerando el proceso en medios ácidos. Aprovechando la capacidad de funcionalización de estas nanopartículas, se han conjugado con Herceptina, un anticuerpo específico de HER2, un receptor sobreexpresado en la superficie de algunas líneas tumorales. De esta forma se consigue un reconocimiento de la nanopartícula por un receptor específico sobreexpresado en una línea tumoral, liberando el fármaco de forma prolongada en ese lugar concreto (Fig. 98).¹⁴⁷

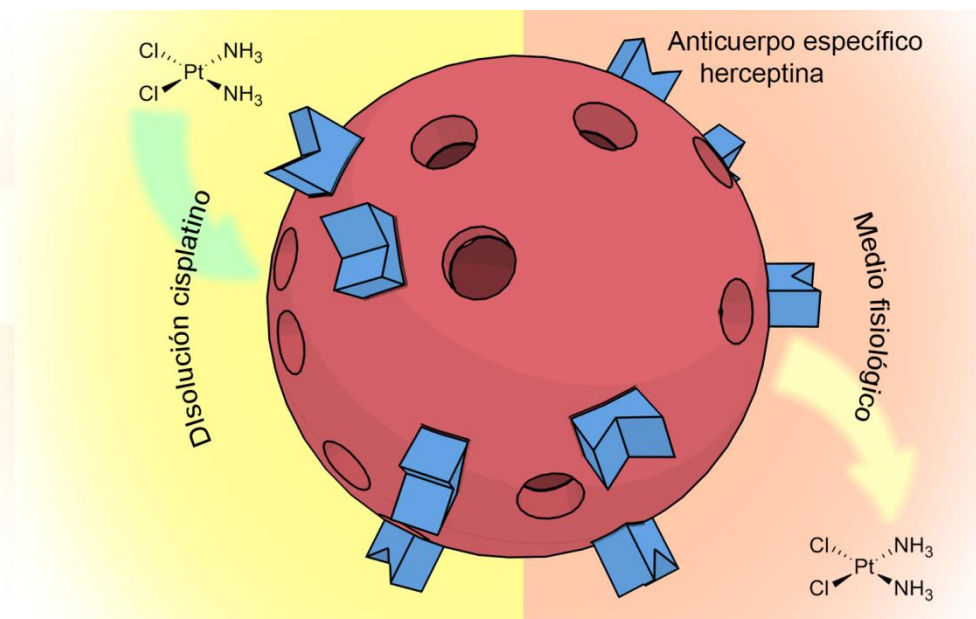


Figura 98 – Representación de la nanopartícula porosa de acción prolongada para el tratamiento selectivo con cisplatino.¹⁴⁷

Los niveles de toxicidad de los nanomateriales, en especial de las nanopartículas metálicas, además de su dificultad y elevado coste de síntesis, son los principales inconvenientes a los que se enfrentan estos compuestos y lo que ha motivado la búsqueda de otras alternativas.^{148, 149}

4.3.1.2 Transportadores específicos

En los últimos años la terapia contra el cáncer se orienta hacia la dotación de una selectividad específica hacia determinados receptores de membrana sobreexpresados en las células tumorales, como método para evitar la falta de especificidad de la quimioterapia tradicional. Ésta parte del principio general según el cual es más

¹⁴⁷ Cheng, K.; Peng, S.; Xu, C.; Sun, S.; Porous Hollow Fe₃O₄ Nanoparticles for Targeted Delivery and Controlled Release of Cisplatin. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 10637-10644.

¹⁴⁸ Buzea, C.; Pacheco Blandino, I. I.; Robbie, K.; Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, **2007**, 2, MR17-MR172.

¹⁴⁹ Yah, C. S.; Simate, G. S.; Iyuke, S. E.; Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Pak. J. Pharm. Sci.*, **2012**, 25, 477-491.

probable eliminar células cancerígenas, que proliferan más rápidamente y carecen de los sistemas de control oportunos, que las células sanas. De este modo, los agentes citotóxicos clásicos carecen de especificidad y causan importantes efectos secundarios como resultado de la acción sobre células sanas, especialmente sobre aquellas que se dividen rápidamente como células hematopoyéticas, epiteliales e intestinales.

Para dotar de selectividad a los agentes terapéuticos se recurre en muchos casos al uso de ligandos naturales cuyos receptores se hallan sobreexpresados en las membranas de las células tumorales. Dos de los ejemplos más representativos son el ácido fólico^{150,151,152} y la biotina (Fig. 99).^{153,154,155} En el primer caso el receptor folato se encuentra sobreexpresado en una mayoría de tejidos cancerosos mientras que su expresión es más limitada en células de tejidos sanos,¹⁵⁶ de forma que, la interacción ácido fólico-receptor folato puede utilizarse para el reconocimiento selectivo de células cancerosas.

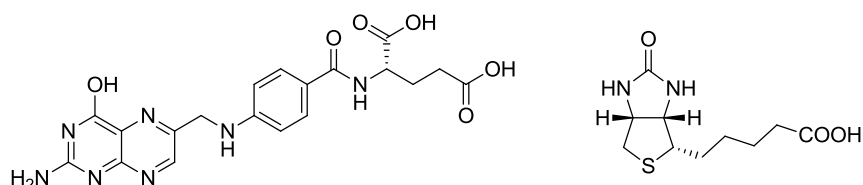


Figura 99 – Estructuras del ácido fólico (izquierda) y la biotina (derecha).

En un ejemplo concreto, de R. I. Pinhassi y colaboradores, se ha conjugado un polisacárido, que actúa como transportador, con ácido fólico y metotrexato, un inhibidor competitivo de ácido fólico. Además se ha incluido en la estructura un compuesto citotóxico para poder cuantificar la internalización del conjugado. Para el estudio se ha utilizado una línea celular que no sobreexpresa el receptor de folato por sí misma, junto con la misma línea celular a la que le ha sido transfectado la información genética para expresar dicho receptor. De esta forma, el tratamiento de ambas versiones de la línea celular con el conjugado sintetizado ha demostrado un incremento en la actividad antiproliferativa de más de seis veces en el caso de la línea

¹⁵⁰ Henne, W. A.; Doorneweerd, D. D.; Hilgenbrink, A. R.; Kularatne, S. A.; Low, P. S.; Synthesis and activity of a folate peptide camptothecin prodrug. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 5350-5355.

¹⁵¹ Liang, X. H.; Sun, Y.; Liu, L. S.; Zha, Y. Y.; Hu, X. Y.; Fan, J.; Regioselective synthesis and initial evaluation of a folate receptor targeted rhaponticin prodrug. *Chin. Chem. Lett.*, **2012**, 1133-1136.

¹⁵² Yang, J. J.; Kularatne, S. A.; Chen, X.; Low, P. S.; Wang, E.; Characterization of in Vivo Disulfide-Reduction Mediated Drug Release in Mouse Kidneys. *Mol. Pharmaceutics*, **2012**, 9, 310-317.

¹⁵³ Marchand-Brynaert, J.; Bouchet, M.; Touillaux, R.; Beauve, C.; Fastrez, J.; Design and Synthesis of a Bifunctional Label for Selection of β -Lactamase displayed on Filamentous Bacteriophage by Catalytic Activity. *Tetrahedron*, **1996**, 52, 5591-5606.

¹⁵⁴ Ojima, I.; Guided Molecular Missiles for Tumor-Targeting Chemotherapy-Case Studies Using the Second-Generation Taxoids as Warheads. *Accounts Chem. Res.*, **2008**, 41, 108-119.

¹⁵⁵ Yang, W.; Cheng, Y.; Xu, T.; Wang, X.; Wen, L.; Targeting cancer cells with biotin-dendrimer conjugates. *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 44, 862-868.

¹⁵⁶ Yoo, H. S.; Park, T. G.; Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate. *J. Control. Release*, **2004**, 100, 247-256.

celular que expresa el receptor de folato respecto a la línea sin el receptor, demostrando así el beneficio de la internalización selectiva mediante receptores de membrana (Fig. 100).¹⁵⁷

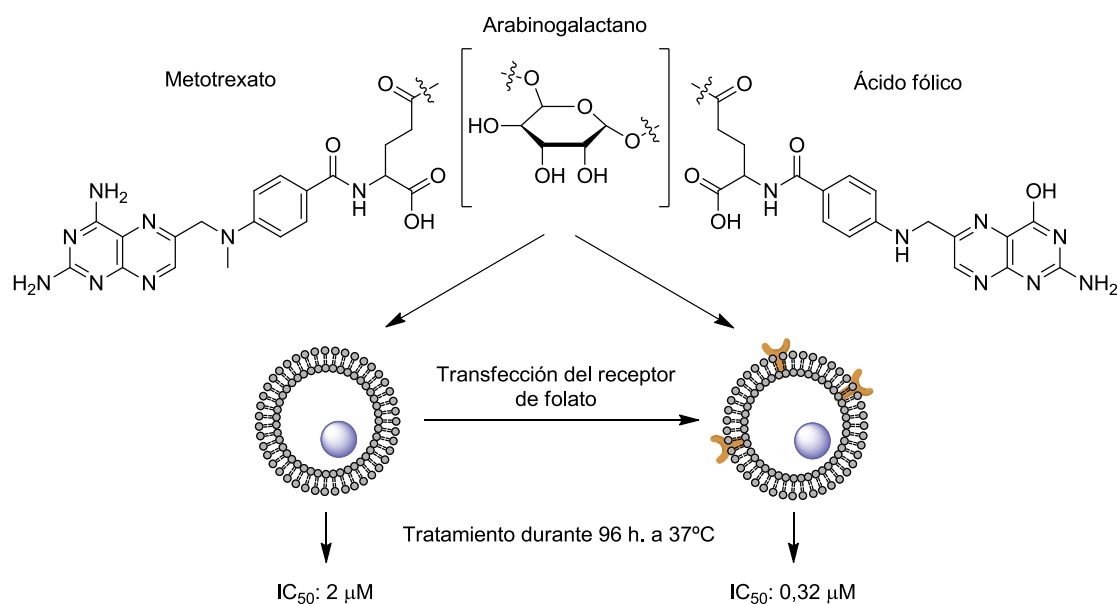


Figura 100 – Estructura del conjugado de metotrexato y ácido fólico donde se indican los valores de IC₅₀ obtenidos en presencia o ausencia del receptor de folato. Se ha omitido en la representación la estructura del compuesto citotóxico y del sistema de liberación por claridad.¹⁵⁷

Un ejemplo del uso de la biotina como ligando específico es el del conjugado sintetizado por I. Ojima,¹⁵⁴ formado por una unidad de biotina unida a un grupo fluoróforo, la fluoresceína, mediante un espaciador. Este compuesto es capaz de reconocer específicamente una línea celular con una sobreexpresión de los receptores para la biotina. La internalización del conjugado se detecta mediante la observación de su señal de fluorescencia. La internalización de este conjugado se inhibe mediante el tratamiento a 4 °C o bien mediante la saturación previa con biotina, como ligando competitivo. En dichas condiciones se observa una clara disminución de la señal de fluorescencia en el interior celular (Fig. 101)

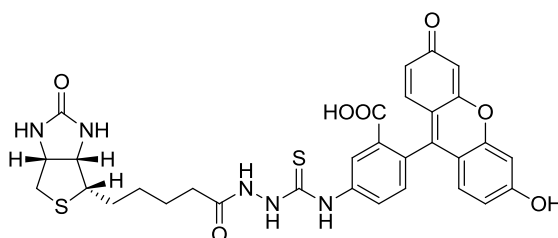


Figura 101 – Estructura del conjugado biotina-fluoresceína, internalizado mediante un proceso endocítico en líneas celulares que presentan una sobreexpresión de los receptores de bitoina.¹⁵⁴

¹⁵⁷ Pinhassi, R. I.; Assaraf, Y. G.; Farber, S.; Stark, M.; Ickowicz, D.; Drori, S.; Domb, A. J.; Livney, Y. D.; Arabinogalactan-Folic Acid-Drug Conjugate for Targeted Delivery and Target-Activated Release of Anticancer Drugs to Folate Receptor-Overexpressing Cells. *Biomacromolecules*, **2010**, 11, 294-303.

Además del ácido fólico y la biotina se han utilizado otros ligandos con capacidades para interactuar con receptores de membrana específicos como determinados azúcares,¹⁵⁸ anticuerpos¹⁵⁹ o péptidos como las secuencias RGD (arginina-glicina-aspartato),¹⁶⁰ o los CPPs ya mencionados en el capítulo anterior.

En general, la idoneidad de un determinado sustrato de reconocimiento para diseñar un sistema específico viene determinada por la propia línea celular donde ha de actuar ya que los receptores sobreexpresados dependen de las características de la propia línea celular. Por ejemplo, los receptores de ácido fólico están sobreexpresados principalmente en células epiteliales de ovario, tejido nervioso, riñón, mama, colon y pulmón.¹⁵⁷

4.3.2 Gatillos

En un conjunto gatillo-espaciador autoinmolativo-carga, el gatillo es la parte de la estructura susceptible de experimentar una transformación causada por un estímulo externo (cambio de pH, enzima, etc.). Un gatillo debe aportar al conjunto del sistema autoinmolativo estabilidad química en medios fisiológicos y una respuesta selectiva frente a un determinado estímulo.

Se pueden diferenciar dos grupos principales de gatillos, aquellos que responden a estímulos enzimáticos, que denominaremos gatillos enzimáticos, y los que responden a condiciones del medio o determinadas moléculas pequeñas, denominados gatillos no enzimáticos.

4.3.2.1 Gatillos enzimáticos

La variabilidad en esta categoría podría ser tan amplia como enzimas hay en un organismo. A modo de ejemplo, el anticuerpo catalítico 38C2 actúa sobre un derivado de doxorubicina conteniendo el residuo aldólico específico para este anticuerpo, que interactúa con éste para dar, mediante reacciones de tipo retro-aldólica y retro-Michael la molécula de doxorubicina libre y productos de degradación que no presentan toxicidad significativa (Esquema 52).^{161,162}

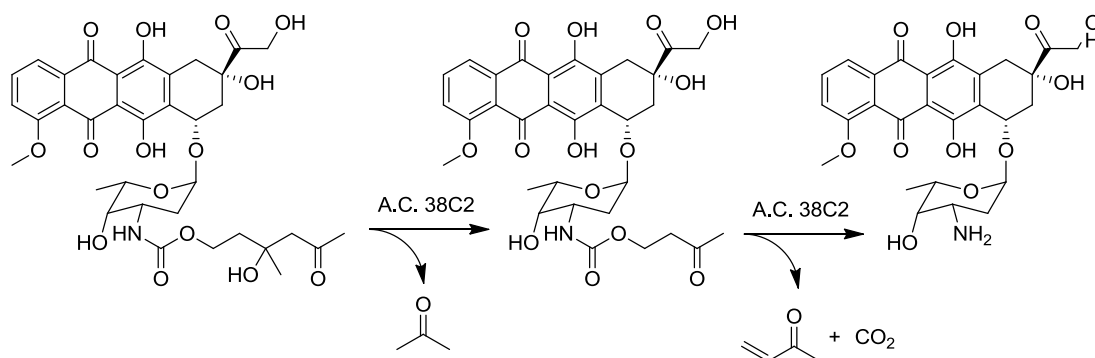
¹⁵⁸ Bhadram D.; Yadav, A. K.; Bhadra, S.; Jain, N. K.; Glycodendrimeric nanoparticulate carriers of primaquine phosphate for liver targeting. *Int. J. Pharm.*, **2005**, 295, 221-233.

¹⁵⁹ Shukla, R.; Thomas, T. P.; Peters, J. L.; Desai, A. M.; Kukowska-Latallo, J.; Patri, A. K.; Kotlyar, A.; Baker, J. R., Jr.; HER2 Specific Tumor Targeting with Dendrimer Conjugated Anti-HER2 mAb. *Bioconjugate Chem.*, **2006**, 17, 1109-1115.

¹⁶⁰ Schraa, A. J.; Kok, R. J.; Berendsen, A. D.; Moorlag, H. E.; Bos, E. J.; Meijer, D. K. F.; de Leij, L. F. M. H.; Molema, G.; Endothelial cells internalize and degrade RGD-modified proteins developed for tumor vasculature targeting. *J. Control. Release*, **2002**, 83, 241-251.

¹⁶¹ Córdova, A.; Janda, K. D.; Synthesis and Catalytic Antibody Functionalization of Dendrimers. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 8248-8259.

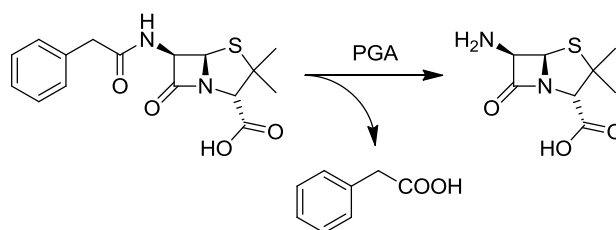
¹⁶² Amir, R. J.; Popkov, M.; Lerner, R. A.; Barbas III, C. F.; Shabat, D.; Prodrug Activation Gated by a Molecular "OR" Logic Trigger. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 4378-4381.



Esquema 52 – Activación de un sistema autoinmolativo de tipo retroaldólico mediante la acción del anticuerpo 38C2, liberando el fármaco antitumoral doxorubicina.

Para que este sistema resulte efectivo, en la práctica se administra tanto el sistema autoinmolativo como el anticuerpo catalítico, que no se produce de forma natural por el organismo.¹⁶³ Con el uso de anticuerpos se consigue una inmejorable selectividad ya que únicamente se obtiene la respuesta del gatillo ante la presencia de este estímulo. Además, debido a la naturaleza proteica del anticuerpo, su biocompatibilidad está asegurada.¹⁶⁴ El principal inconveniente al que se enfrenta esta metodología es la obtención de los anticuerpos humanizados, un proceso costoso que en el caso del 38C2 se realiza mediante inmunización reactiva en ratones.

Una segunda aproximación al uso de activadores enzimáticos para la activación del gatillo más extendida es el uso de derivados del ácido fenilacético como sustratos de la penicilina-G-amidasa (PGA) (Esquema 53).



Esquema 53 – Sustrato natural de la penicilina-G-amidasa y productos derivados de su acción.

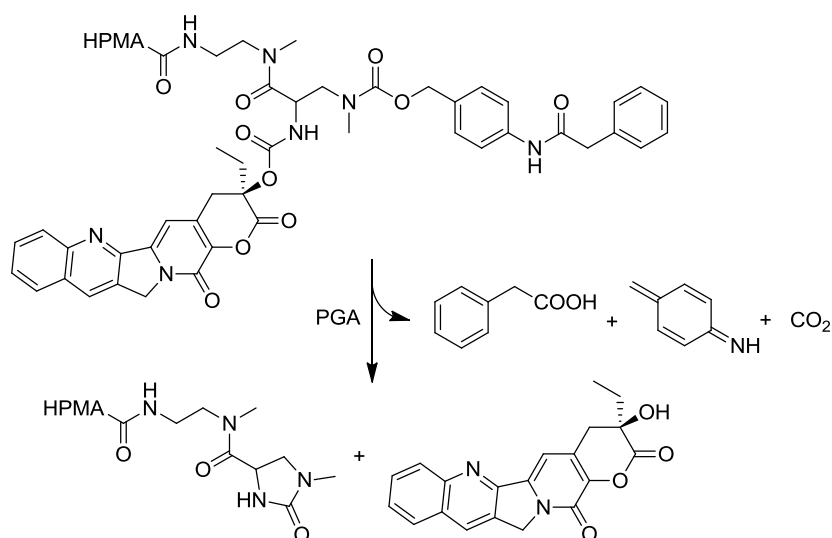
Esta enzima proviene de *Escherichia coli* y por tanto no se encuentra naturalmente en mamíferos por lo que su uso se limita al estudio de modelos de actividad autoinmolativa. En este caso la cinética de liberación del fármaco no depende de la

¹⁶³ Shabat, D.; Lode, H. N.; Pertl, U.; Reisfeld, R. A.; Rader, C.; Lerner, R. A.; Barbas III, C. F.; *In vivo* activity in a catalytic antibody-prodrug system: Antibody catalyzed etoposide prodrug activation for selective chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2001**, 98, 7528-7533.

¹⁶⁴ Sinha, S. C.; Li, L. S.; Miller, G. P.; Dutta, S.; Rader, C.; Lerner, R. A.; Prodrugs of dynemicin analogs for selective chemotherapy mediated by an aldolase catalytic Ab. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**, 101, 3095-3099.

actividad enzimática en si misma si no que puede relacionarse con la cascada de reacciones que siguen a la activación.^{165,166,167}

Un ejemplo del uso de este gatillo es el desarrollado por A. Gopin y colaboradores,¹⁶⁸ donde, mediante el uso del ácido fenilacético y la enzima PGA, se libera camptotecina de un copolímero sintético, demostrando de este modo la aplicabilidad del sistema autoinmolativo y su posible aplicación a una variedad de fármacos o sistemas de marcaje específicos (Esquema 54).



Esquema 54 – Estructura y mecanismo de liberación del fármaco mediante la acción de la enzima PGA.¹⁶⁸

En otros casos se utilizan restos de aminoácidos; por ej. leucina para la activación específica mediante una leucil peptidasa,¹⁶⁹ secuencias específicas de aminoácidos para aumentar la selectividad,¹⁷⁰ o grupos amida y/o ésteres susceptibles de ser hidrolizados mediante enzimas endógenas inespecíficas, obteniendo de esta forma una liberación localizada en función de la distribución natural de la enzima.

¹⁶⁵ Weinstain, R.; Sagi, A.; Karton, N.; Shabat, D.; Self-Immolative Comb-Polymers: Multiple-Release of Side-Reporters by a Single Stimulus Event. *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 6857-6861.

¹⁶⁶ Jin, H.; Lu, J.; Wu, X.; Development of a new enzyme-responsive self-immolative spacer conjugate applicable to the controlled drug release. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 3465-3469.

¹⁶⁷ Redy, O.; Shabat, D.; Modular theranostic prodrug based on a FRET-activated self-immolative linker. *J. Control. Release*, **2012**, *164*, 276-282.

¹⁶⁸ Gopin, A.; Rader, C.; Shabat, D.; New chemical adaptor unit designed to release a drug from a tumor targeting device by enzymatic triggering. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 1853-1858.

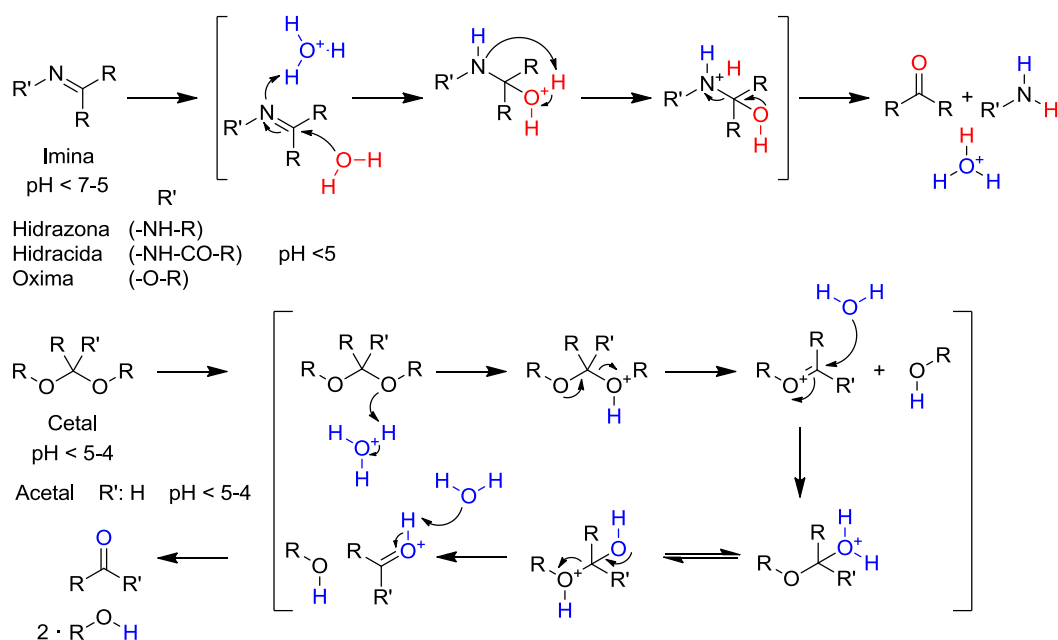
¹⁶⁹ Zhang, X.; Waibel, M.; Hasserodt, J.; An Autoimmolative Spacer Allows First-Time Incorporation of a Unique Solid-State Fluorophore into a Detection Probe for Acyl Hydrolases. *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 792-795.

¹⁷⁰ Richard, J. A.; Meyer, Y.; Jolivel, V.; Massonneau, M.; Dumeunier, R.; Vaudry, D.; Vaudry, H.; Renard, P. Y.; Romieu, A.; Latent Fluorophores Based on a Self-Immolative Linker Strategy And Suitable for Protease Sensing. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 1707-1718.

4.3.2.2 Gatillos no enzimáticos

En cuanto a los activadores no enzimáticos, hay multitud de estímulos que pueden provocar la activación del gatillo, siendo los más típicos los cambios de pH, de potencial redox o de temperatura, o la radiación ultravioleta, entre otros.¹⁷¹

Un sistema autoinmolativo ideal provoca la liberación del fármaco mediante un estímulo interno al organismo y localizado, consiguiendo una respuesta autónoma y específica. Dadas estas limitaciones no son muchas las estrategias que se usan con finalidades terapéuticas. Los grupos funcionales sensibles al pH, tales como iminas, hidracinas o acetales entre otros, provocan una activación del gatillo en función del valor del pH del medio. Sin embargo los sistemas biológicos se caracterizan por un control exhaustivo de la acidez del medio, necesitando cambios bruscos de este valor para observar una respuesta localizada y significativa. (Esquema 55).



Esquema 55 – Grupos funcionales aptos para formar "gatillos" sensibles al pH y mecanismos de hidrólisis. Los valores de pH indican a partir de qué valor se produce la hidrólisis.

Por ejemplo, Y. Jin y colaboradores han descrito un sistema autoinmolativo con gatillo de tipo oxima, formado por terminales hidrofílicos de unidades polietilenglicol (PEG) unidos por un centro hidrofóbico de policaprolactonas (PCL) y unidas a su vez mediante oximas.¹⁷² Esta molécula se agrega espontáneamente en medios acuosos formando micelas capaces de almacenar moléculas de doxorubicina. En estado agregado el conjunto se internaliza mediante endocitosis hasta que la disminución del

¹⁷¹ Fleige, E.; Quadir, M. A.; Haag, R.; Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: Concepts and applications. *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2012**, 64, 866-884.

¹⁷² Jin, Y.; Song, L.; Su, Y.; Zhu, L.; Pang, Y.; Qiu, F.; Tong, G.; Yan, D.; Zhu, B.; Zhu, X.; Oxime Linkage: A Robust Tool for the Design of pH-Sensitive Polymeric Drug Carriers. *Biomacromolecules*, **2011**, 12, 3460-3468.

pH medio en los lisosomas ($\text{pH} \approx 5$) y la consiguiente hidrólisis de los grupos oxima liberan el fármaco de forma controlada. Los estudios realizados a diferentes valores de pH muestran que a pH 7,4 se produce una liberación de la carga correspondiente al 20% del total durante las primeras 24 horas, mientras que a pH 5,0 la liberación aumenta hasta casi un 60% en 24 horas, y a un 80% en 96 horas (Fig. 102).

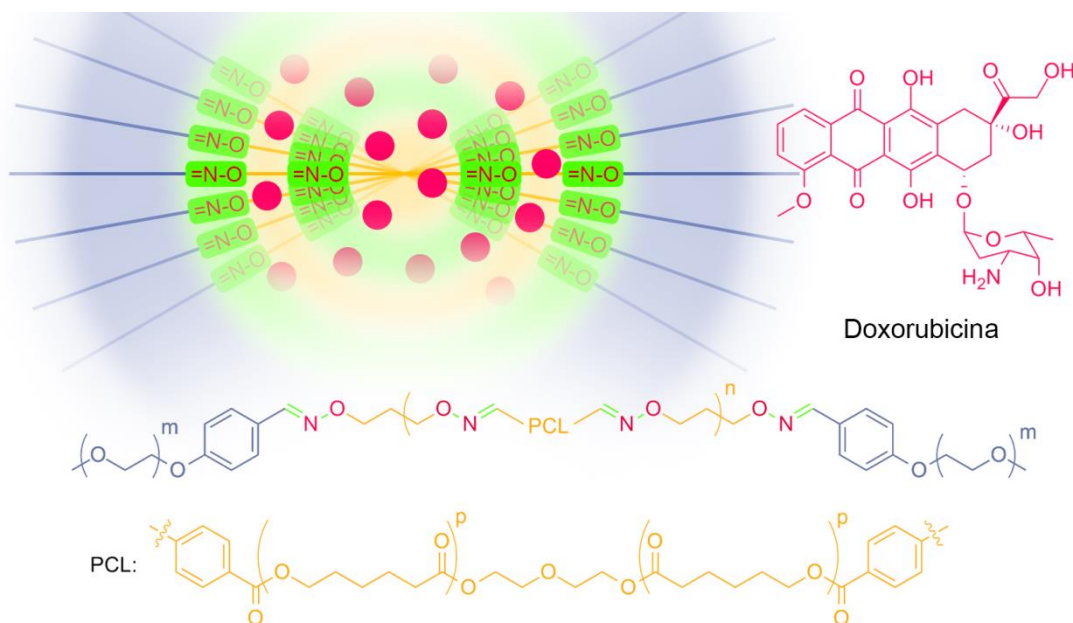


Figura 102 – Estructura del copolímero y el fármaco, y representación de la formación de la micela, conteniendo la doxorubicina en su interior.¹⁷²

Una alternativa al uso de gatillos sensibles al pH son los puentes de disulfuro. En la bibliografía se han descrito numerosos ejemplos en los que se utiliza este grupo funcional como gatillos en sistemas autoinmolativos.

La energía de los enlaces S–S en cadenas alquílicas es del orden de las 70 kcal/mol.¹⁷³ Se trata de enlaces fuertes, aunque más débiles que los enlaces C–C (83 kcal/mol) o C–H (99 kcal/mol). Los disulfuros son relativamente estables en condiciones habituales de sistemas biológicos.

Los puentes disulfuro se usan con frecuencia en sistemas autoinmolativos debido a su reactividad frente a nucleófilos y en especial frente a otros tioles, como la glutatona (GSH). La glutatona es un tripéptido natural compuesto por ácido glutámico, cisteína y glicina (Fig. 103) abundante en el citoplasma (1-10mM) y que tiene un importante papel como antioxidante natural frente a especies reactivas de oxígeno (ROS) entre otras funciones.¹⁷⁴

¹⁷³ Oae, S. (Ed); Organic chemistry of sulfur. Springer-Verlag US, 1977.

¹⁷⁴ Balendiran, G. K.; Dabur, R.; Fraser, D.; The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct.*, 2004, 22, 343-352.

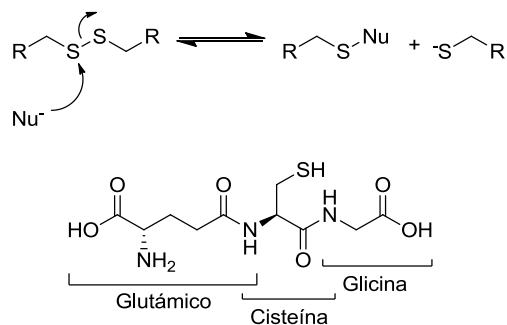


Figura 103 – Reactividad de disulfuros frente a nucleófilos (arriba) y estructura del tripéptido glutatona (abajo).

La alta concentración celular de GSH facilita su uso como estímulo en sistemas autoinmolativos actuando como nucleófilo frente a "gatillos" disulfuro. En este caso la ventaja de los gatillos formados por puentes de disulfuro radica en la gran diferencia que existe en la concentración de GSH entre el citoplasma y el medio extracelular ya que la concentración extracelular de GSH está entre 1 y 2 μM . Además el medio extracelular es ligeramente oxidante, lo que se traduce en una gran bioestabilidad de los puentes disulfuro en medios extracelulares.¹⁷⁵ En la bibliografía se describen multitud de ejemplos de sistemas autoinmolativos que se activan mediante la rotura de un enlace disulfuro.^{176,177} Adicionalmente al GSH, la rotura de enlaces disulfuro en sistemas biológicos puede originarse por oxidoreductasas como la tioredoxina, por la proteína disulfuro-isomerasa (PDI) o por otros mecanismos (Fig. 104).¹⁷⁸

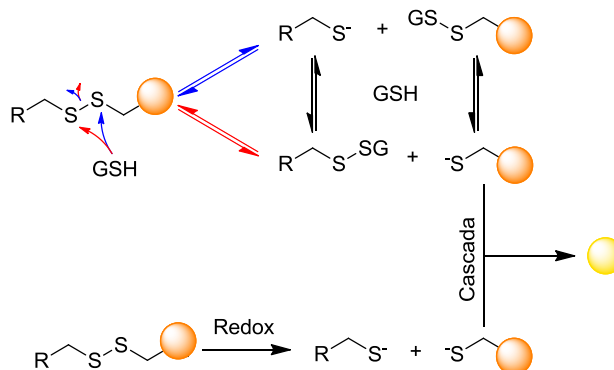


Figura 104 – Comparación entre un sistema de escisión de enlaces disulfuro mediante nucleófilos, como por ejemplo GSH (arriba) o un sistema redox (abajo). R corresponde a un sistema transportador.

¹⁷⁵ Yuan, L.; Chen, W.; Hu, J.; Zhang, J. Z.; Yang, D.; Mechanistic Study of the Covalent Loading of Paclitaxel via Disulfide Linkers for Controlled Drug Release. *Langmuir*, **2013**, 29, 734-743.

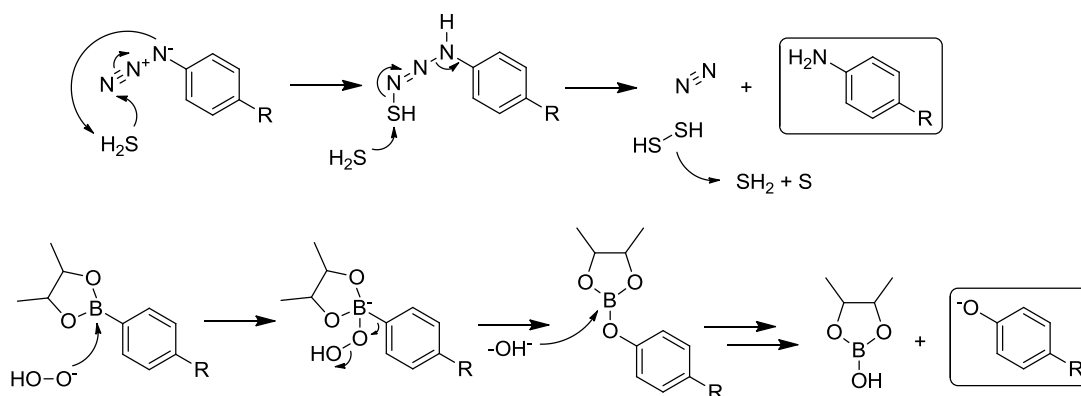
¹⁷⁶ Vlahov, I. R.; Santhapuram, H. K. R.; Kleindl, P. J.; Howard, S. J.; Stanford, K. M.; Leamon, C. P.; Design and regioselective synthesis of a new generation of targeted chemotherapeutics. Part 1: EC145, a folic acid conjugate of desacetylvinblastine monohydrazone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 5093-5096.

¹⁷⁷ Santra, S.; Kaittanis, C.; Santiesteban, O. J.; Perez, J. M.; Cell-Specific, Activatable, and Theranostic Prodrug for Dual-Targeted Cancer Imaging and Therapy. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 16680-16688.

¹⁷⁸ Yang, J.; Chen, H.; Vlahov, I. R.; Cheng, J. X.; Low, P. S.; Evaluation of disulfide reduction during receptor-mediated endocytosis by using FRET imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2006**, 103, 13872-13877.

En un sistema autoinmolativo transportador de profármacos, la escisión de un enlace disulfuro, que actúa como gatillo, por medio de un mecanismo redox permite obtener de forma directa el resto que contiene el tiol libre. Dicha forma es la diseñada para que mediante la cascada de reacciones prevista el espaciador autoinmolativo evolucione y libere el fármaco en su forma activa. Por el contrario, cuando se lleva a cabo un ataque nucleófilo con un tiol sobre el enlace de disulfuro existen dos alternativas de ataque. El intercambio de tioles que se produce da lugar únicamente en una de las alternativas a la formación del resto que contiene el profármaco como tiol libre. Esto da lugar a la liberación parcial del fármaco según el proceso autoinmolativo. El resto del profármaco se halla aun en forma de enlace de disulfuro y se mantiene en equilibrio dinámico con otros tioles, lo que permite obtener también el profármaco en su forma de tiol libre y al final, la liberación total del fármaco (figura 104). De este modo, mediante el uso de tioles se consigue una liberación más lenta del fármaco que mediante un sistema reductor pero igualmente eficaz a largo plazo. Debido a la necesidad de un entorno reductor para la existencia de tioles en un medio fisiológico, el uso de disulfuros como gatillo permite la identificación de estos entornos, no observando la evolución del proceso autoinmolativo en medios oxidantes donde los tioles que actuarían como activadores también se encuentran como disulfuros.

Un último ejemplo de gatillos no enzimáticos es el uso de azidas como sondas de sulfuro de hidrógeno a nivel celular,¹⁷⁹ o de ésteres de ácidos arilborónicos para la detección de peróxidos (Esquema 56).^{180,181}



Esquema 56 – Gatillos no enzimáticos específicos para la detección de ácido sulfhídrico (arriba)¹⁷⁹ y peróxido de hidrógeno (abajo).¹⁸⁰

¹⁷⁹ Chen, B.; Wang, P.; Jin, Q.; Tang, X.; Chemoselective reduction and self-immolation based FRET probes for detecting hydrogen sulfide in solution and in cells. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, 12, 5629-5633.

¹⁸⁰ Lo, L. C.; Chu, C. Y.; Development of highly selective and sensitive probes for hydrogen peroxide. *Chem. Commun.*, **2003**, 2728-2729.

¹⁸¹ Sun, X.; Xu, Q.; Kim, G.; Flower, S. E.; Lowe, J. P.; Yoon, J.; Fossey, J. S.; Qian, X.; Bull, S. D.; James, T. D.; A water-soluble boronate-based fluorescent probe for the selective detection of peroxyntirite and imaging in live cells. *Chem. Sci.*, **2014**, 5, 3368-3373.

En los ejemplos propuestos en el esquema anterior, la activación de ambas sondas moleculares da lugar a especies que evolucionan de manera espontánea provocando en última instancia una señal cuantificable, como por ejemplo la fluorescencia.

En ocasiones la combinación de un profármaco y un profluoróforo en un mismo sistema autoinmolativo permite obtener información acerca del lugar de acción del fármaco mediante la emisión de fluorescencia, ya que ambos se liberan a partir del mismo estímulo. Esto es lo que se denomina un tratamiento teranóstico.^{167,177} Un ejemplo de esta estrategia es el publicado por R. Kumar y colaboradores.¹⁸² En este caso el sistema consiste en una unidad de reconocimiento como la biotina, un gatillo derivado del ácido arilborónico, un profármaco como la 5'-desoxi-5-fluorouridina, y un fluoróforo intercalante como el etidio. Este sistema resulta sensible en un medio rico en ROS como el existente en las mitocondrias de células tumorales.

Al internalizarse el conjugado gracias a los receptores de biotina, se activa el gatillo mediante las especies ROS del medio y se libera in situ la 5'-desoxi-5-fluorouridina, que mediante la acción de la timidina fosforilasa, un enzima presente en una alta concentración en las células tumorales, convierte este profármaco a 5-fluorouracilo, un potente agente citotóxico. Por otra parte, los espaciadores autoinmolativos del conjugado evolucionan liberando el etidio que incrementa su intensidad de fluorescencia al intercalarse en el ADN de la célula. En conjunto se consigue, además de un tratamiento selectivo de las células tumorales que sobreexpresan el receptor de biotina, una señalización in situ del lugar de acción del fármaco (Fig. 105).

¹⁸² Kumar, R.; Han, J.; Lim, H. J.; Ren, W. X.; Lim, J. Y.; Kim, J. H.; Kim, J. S.; Mitochondrial Induced and Self-Monitored Intrinsic Apoptosis by Antitumor Theranostic Prodrug: *In Vivo* Imaging and Precise Cancer Treatment. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 17836-17843.

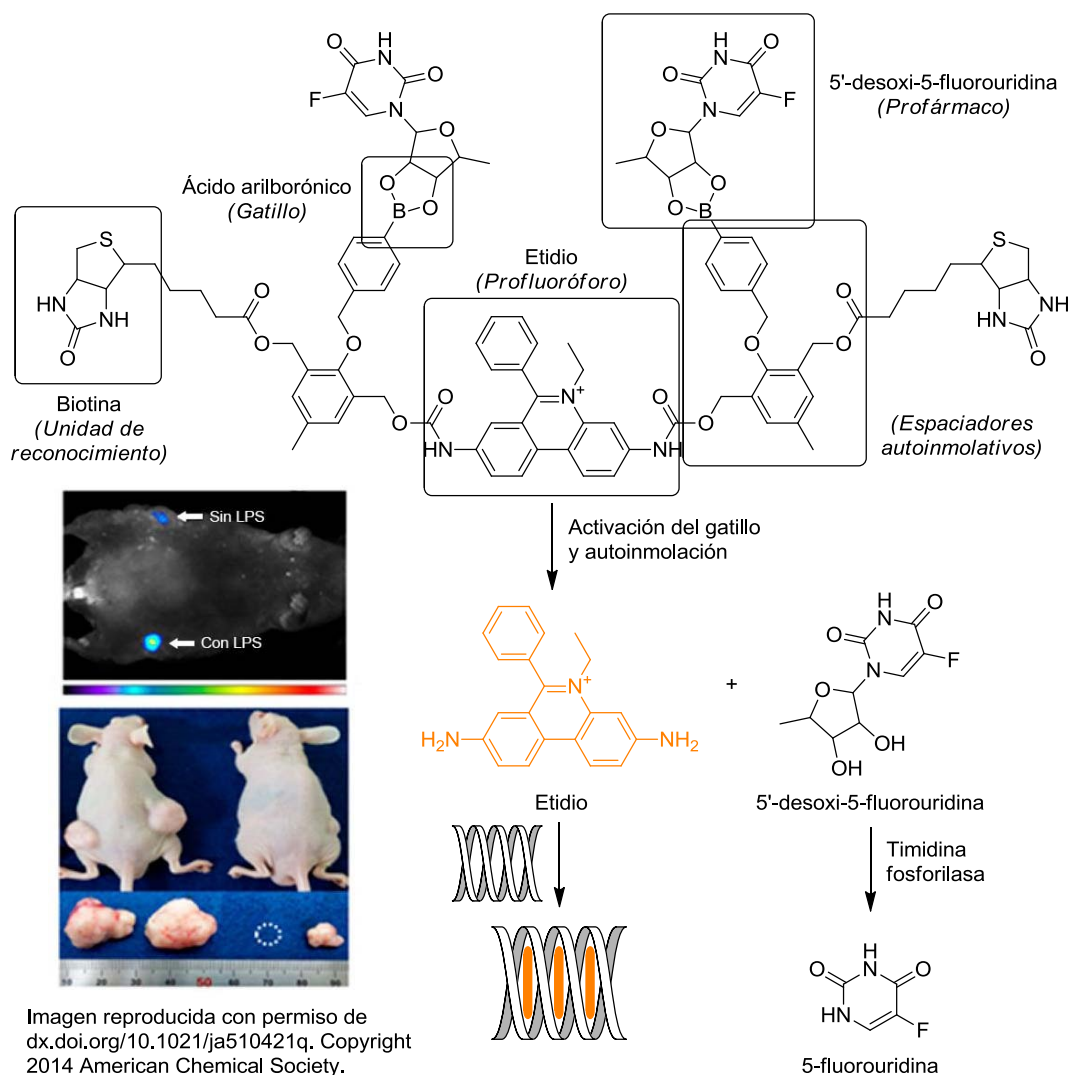


Figura 105 – Estructura del sistema terapéutico y productos activos liberados como resultado de la autoinmolación. La fotografía reproducida muestra en la parte superior la imagen de fluorescencia in vivo de un ratón xenógrafo con un tumor inoculado 4 semanas antes. La fluorescencia observada corresponde al etidio intercalado 4,5 horas después de la inyección del terapéutico por vía intravenosa. En la parte inferior se muestran dos ratones, el derecho tratado con el terapéutico y el izquierdo como control, donde se observa la disminución del tamaño del tumor después de nueve semanas de tratamiento.¹⁸²

4.3.3 Espaciadores autoinmolativos

Los espaciadores autoinmolativos son la parte de la molécula responsable de la liberación de la carga y por ello son sensibles a la activación del gatillo. El uso de espaciadores autoinmolativos se ha introducido mayoritariamente y con éxito en conjugados con gatillos activados por enzimas, incrementando notablemente la eficacia de éstos gracias a la mayor distancia que existe entre la estructura que mimetiza el sustrato natural de la enzima y el profármaco, habitualmente de mayor tamaño y que puede ocasionar un mal reconocimiento por parte de la enzima.¹⁸³ Otro

¹⁸³ Dubowchik, G. M.; Firestone, R. A.; Padilla, L.; Willner, D.; Hofstead, S. J.; Mosure, K.; Knipe, J. O.; Lasch, S. J.; Trail, P. A.; Cathepsin B-Labile Dipeptide Linkers for Lysosomal Release of Doxorubicin from

beneficio que aportan los espaciadores autoinmolativos es la posibilidad de actuar como estructuras adecuadas para la derivatización de estos sistemas permitiendo aumentar sus funciones; como por ejemplo dotarlo con propiedades teranósticas o múltiples cargas y conseguir una respuesta amplificada. Más adelante se detalla la estructura y la actuación de uno de estos sistemas de amplificación.

De forma simplificada, y sin pretender ofrecer una lista exhaustiva de los espaciadores autoinmolativos descritos en la bibliografía, se puede establecer una clasificación de los espaciadores autoinmolativos en función de si su mecanismo de evolución es de eliminación o de ciclación, sin que aparentemente existan beneficios de unos frente a los otros en cuanto a sus aplicaciones.

En el caso de los espaciadores que evolucionan mediante eliminación, estos lo hacen de forma espontánea e irreversible mediante una cascada de procesos electrónicos. Este proceso se caracteriza por un incremento en la entropía del sistema así como por la formación de productos termodinámicamente estables, como por ejemplo dióxido de carbono. Habitualmente estos están formados por especies aromáticas polisustituidas ricas en electrones gracias a un sustituyente donador, como un grupo amino o hidroxilo, conjugado con un grupo saliente en posición bencílica. Estos sistemas son inestables en condiciones fisiológicas, lo que asegura una rápida liberación después de la activación del gatillo (Fig. 106).^{184,185}

Internalizing Immunoconjugates: Model Studies of Enzymatic Drug Release and Antigen-Specific In Vitro Anticancer Activity. *Bioconjugate Chem.*, **2002**, 13, 855-869.

¹⁸⁴ Blencowe, C. A.; Russell, A. T.; Greco, F.; Hayes, W.; Thornthwaite, D. W.; Self-inmulative linkers in polymeric delivery systems. *Polym. Chem.*, **2011**, 2, 773-790.

¹⁸⁵ Kratz, F.; Müller, I. A.; Ryppa, C.; Warnecke, A.; Prodrug Strategies in Anticancer Chemotherapy. *ChemMedChem*, **2008**, 3, 20-53.

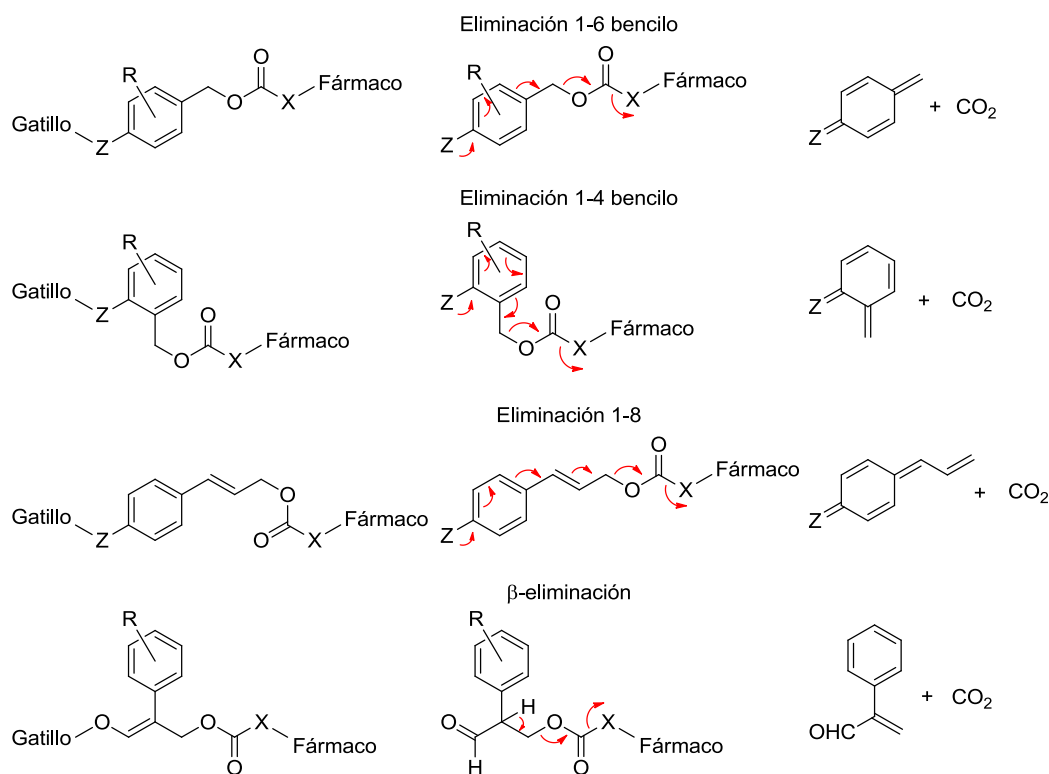


Figura 106 - Espacedores autoinmolativos que evolucionan mediante eliminación (izquierda), mecanismo de evolución (centro) y productos resultantes del proceso (derecha). Z, X: N, O.

Los sistemas de amplificación habitualmente utilizan esta estrategia de eliminación, como se puede comprobar en el ejemplo expuesto más adelante, mediante la adición de múltiples sustituyentes en las posiciones orto y para del sistema aromático.

En el caso de los sistemas de ciclación, de forma general se caracterizan por la liberación, resultado de la activación del gatillo, de un nucleófilo latente que actúa sobre un grupo éster, amida o carbamato, el cual contiene el profármaco enlazado. De un modo similar al anterior, este proceso de ciclación implica la formación de fragmentos termodinámicamente estables junto con un incremento de la entropía. Adicionalmente, los procesos de ciclación implican transferencias de protones, por lo cual se ven fuertemente influenciados por el pH del medio. Los fragmentos más habituales para la liberación mediante ciclación son derivados de ésteres de 4-aminobutanoil o etilendiaminas, debido a la mayor nucleofilia del nitrógeno, sin embargo es común en la bibliografía el uso de los correspondientes alcoholes o tioles (Fig. 107).^{184,185}

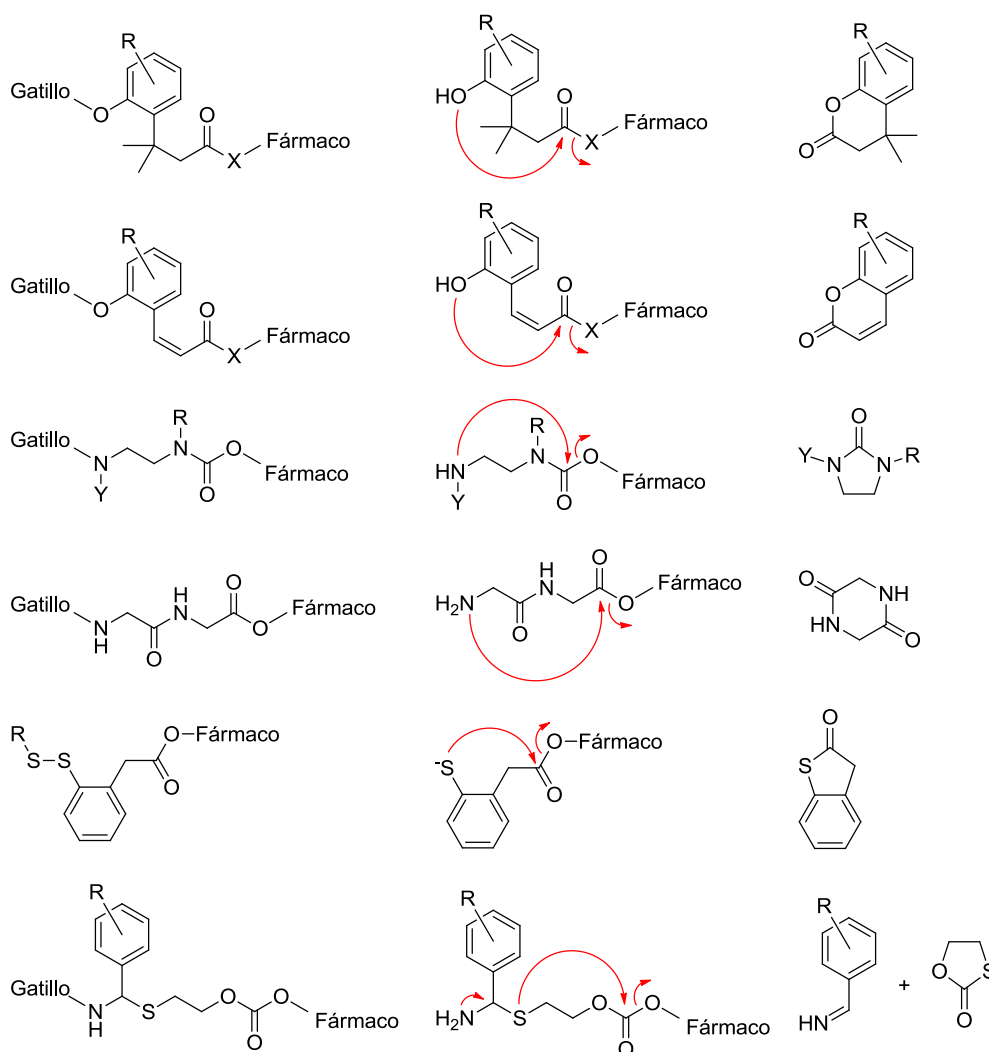
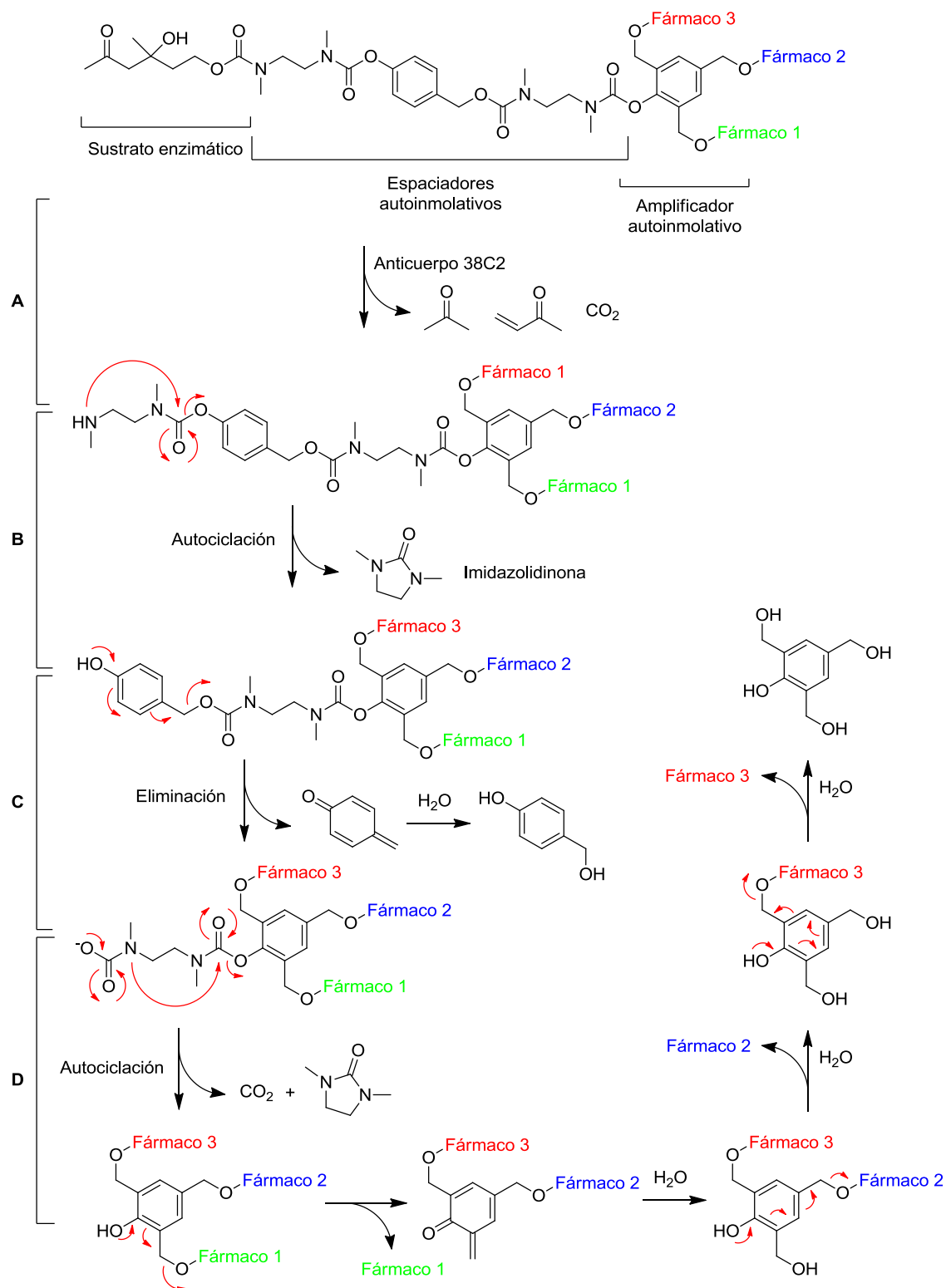


Figura 107 - Espaciadores autoinmolativos que evolucionan mediante ciclación (izquierda), mecanismo de evolución (centro) y productos resultantes del proceso (derecha). X: N, O. Y: C, H.

La combinación de diferentes espaciadores permite obtener sistemas más largos o con diferentes posibilidades de funcionalización. A modo de ejemplo, el policarbamato publicado por K. Haba,¹⁸⁶ presenta una combinación de cuatro espaciadores, unidos consecutivamente con la intención de facilitar la acción del anticuerpo 38C2. Además, el fragmento final de la secuencia de espaciadores permite la amplificación de la señal. Esto se ha conseguido situando en el extremo del espaciador autoinmolativo una unidad de 2,4,6-tris(hidroximetil)fenol al que se han unido tres fármacos distintos (Esquema 57).

¹⁸⁶ Haba, K.; Popkov, M.; Shamis, M.; Lerner, R. A.; Barbas III, C. F.; Shabat, D.; Single-Triggered Trimeric Prodrugs. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 716-720.

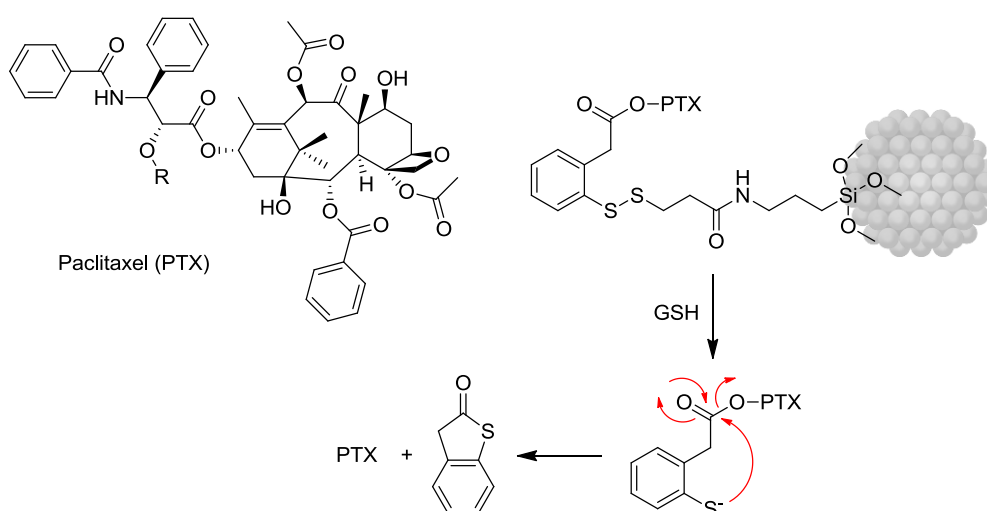


Esquema 57 - Sistema autoinmolativo activado mediante un anticuerpo catalítico y diseñado para dar lugar a una amplificación de la señal.¹⁸⁶

En este caso, una vez activado el gatillo por parte del anticuerpo catalítico 38C2, se degrada el fragmento aldólico, como ya se ha explicado anteriormente, y se libera un residuo de etilendiamina, responsable del inicio de la cascada de reacciones de autoinmolación (Esquema 57-A). En primer lugar se da una reacción de ciclación entre

el grupo amino liberado y un grupo carbamato, obteniendo un derivado de imidazolidinona (Esquema 57-B). De esta forma se elimina el primer espaciador autoinmolativo, que deja a su vez un grupo p-hidroxibenciloxycarbonilo que conduce a un proceso espontaneo de eliminación de tipo 1,6-bencilo (Esquema 57-C). La degradación del segundo espaciador permite la activación del tercero de los espaciadores del sistema, el cual descarboxila en primera instancia, para liberar a continuación una unidad de etilendiamina, que cicla del mismo modo que el anterior (Esquema 57-D). De esta forma se llega a la unidad de amplificación, que mediante los procesos de eliminación descritos para los sistemas aromáticos conjugados evoluciona de forma consecutiva en medio acuoso, consiguiendo así, a partir de la activación de un único gatillo, la liberación de tres fármacos diferentes.

En el siguiente ejemplo, publicado por L. Yuan y colaboradores,¹⁷⁵ se combinan las propiedades de las nanopartículas inorgánicas de sílica, tales como una elevada resistencia mecánica, alta estabilidad química, resistencia a agentes microbianos, elevada superficie específica, tamaño de partícula, biocompatibilidad, etc. con su fácil funcionalización, para desarrollar un sistema transportador de un agente citotóxico, el paclitaxel, el cual se libera de forma controlada mediante un sistema autoinmolativo de ciclación. Los grupos silanol presentes en la superficie de las nanopartículas de sílice permiten enlazar covalentemente el sistema autoinmolativo conteniendo el gatillo, el espaciador y el profármaco, junto con una unidad de fluoresceína que posibilita el seguimiento y visualización de las nanopartículas. En este caso el gatillo utilizado es un puente disulfuro, sensible a tioles libres y entornos reductores, unido a un espaciador autoinmolativo de ciclación que permite, gracias a la nucleofilia del tiol resultante de la reducción del disulfuro, la liberación de paclitaxel en su forma activa en el interior celular (Esquema 58).



Esquema 58 - Sistema autoinmolativo transportado mediante nanopartículas de sílica y activado mediante GSH para liberar in situ Paclitaxel y benzotiofenona como subproducto.¹⁷⁵

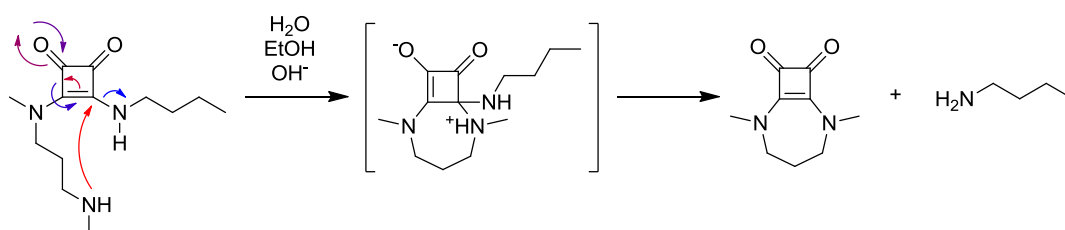
4.4 Módulos autoinmolativos escuaramídicos

A pesar de que se han desarrollado sistemas autoinmolativos efectivos como son los ya descritos, éstos resultan estructuras complejas, sintéticamente costosas y en ocasiones difíciles para su aplicación en clínica, por lo que existe una necesidad de diseñar y obtener nuevos sistemas autoinmolativos que puedan conjugarse fácilmente con los sistemas de transporte y las moléculas a liberar.

En este sentido la unidad escuaramida ha demostrado ser apta para su utilización en entornos biológicos, por su resistencia a la degradación, capacidad de interacción con otras moléculas, facilidad de combinación con diversas aminas, etc., tal y como se ha demostrado en los capítulos anteriores. Su aplicación en el campo de los sistemas autoinmolativos aportaría un sistema totalmente nuevo y versátil gracias a la facilidad de conjugación con aminas.

El uso de escuaramidas con fines autoinmolativos no se ha descrito en la bibliografía, sin embargo, en el grupo de Química Supramolecular se han obtenido resultados que indican que es posible aprovechar sus cualidades para obtener espaciadores autoinmolativos escuaramídicos.

En concreto, se ha observado que durante la preparación de γ -metilaminoescuaramidas, en disolventes polares o a pH básico, se obtiene un subproducto cíclico mediante reacción intramolecular (Esquema 59).¹⁸⁷



Esquema 59 – Autociclación de un derivado escuaramídico.

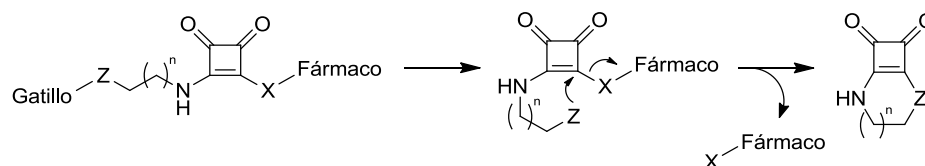
La reacción intramolecular está muy favorecida ya que la escuaramida adopta una conformación E,Z. Esta conformación está favorecida por la presencia del metilo situado en el nitrógeno de la escuaramida respecto al derivado no metilado. De esta forma el sistema queda preorganizado, dejando el par de electrones de la amina secundaria en una buena posición para realizar un ataque nucleófilo intramolecular.

¹⁸⁷ Resultados no publicados obtenidos por el Sr. Luís Martínez y que forman parte de su tesis doctoral.

4.5 Objetivos

Estos antecedentes nos han impulsado a diseñar un sistema autoinmolativo basado en la unidad escuaramida y a plantear los siguientes objetivos:

- Diseñar y optimizar un sistema de liberación de fármacos escuaramídico que se active espontáneamente tras un determinado estímulo intracelular, un autoinmolativo con base escuaramídica (Esquema 60).



Esquema 60 – Sistema autoinmolativo basado en la unidad escuaramida.

- Evaluar la evolución temporal y estabilidad del sistema en medio acuoso y a pH fisiológico.

4.6 Resultados y discusión

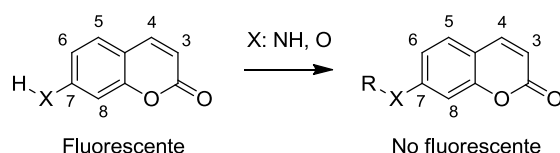
4.6.1 Diseño de un sistema autoinmolativo de base escuaramida

A continuación se describen las características que tendrán dos de las partes más relevantes que componen el sistema autoinmolativo: el espaciador autoinmolativo y la carga. La elección del gatillo se realiza en función de los resultados obtenidos, tomando como punto de partida un grupo amino, resultante de la activación de un supuesto gatillo, pendiente de definir.

4.6.1.1 Elección de la carga

Para estudiar la viabilidad del espaciador autoinmolativo se ha optado por usar una estrategia off-on utilizando un fluoróforo a modo de carga. Esta estrategia radica en el hecho de que un fluoróforo no presenta fluorescencia significativa cuando se encuentra en unas condiciones determinadas mientras que al cesar esas condiciones recupera su fluorescencia. Una de estas condiciones se debe a los diferentes tipos de “quenching” propios de cada fluoróforo. En este caso, la escuaramida por si sola ya presenta unas propiedades adecuadas para provocar un “quenching” tipo PET por proximidad espacial. Por otra parte, los fluoróforos ven disminuida su fluorescencia cuando se bloquean pares de electrones libres de heteroátomos situados en el esqueleto molecular impidiendo su deslocalización en el sistema.

En cuanto al fluoróforo elegido, se ha decidido trabajar con derivados de cumarina (2H-benzopirán-2-ona) Este fluoróforo es poco fluorescente cuando el heteroátomo (O, N) en la posición 7 tiene bloqueado su par de electrones (Esquema 61).



Esquema 61 – Estructura del núcleo de cumarina y propiedades fluorescentes según la funcionalización de la posición siete.

Al combinar la conjugación del fluoróforo con la proximidad a la escuaramida se espera conseguir un conjugado con poca fluorescencia, que se incrementará al cesar ambas condiciones.

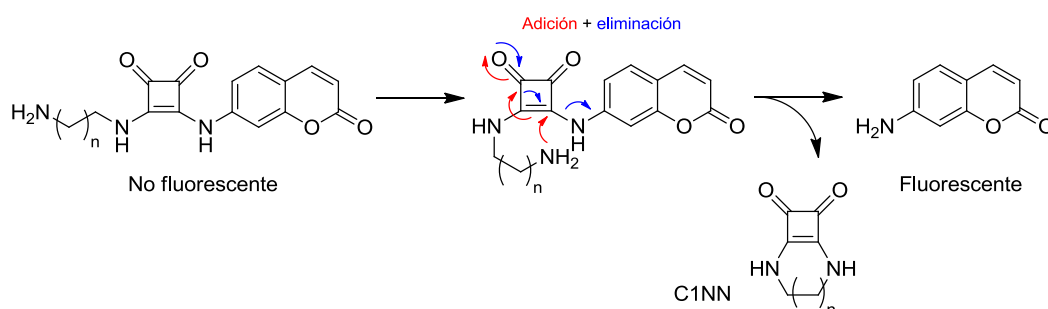
La intensidad de fluorescencia observada para derivados de cumarina en disolución es función del pH. En los derivados fenólicos (7-hidroxicumarinas), la fluorescencia se reduce notablemente a valores de pH ácidos en función de la longitud de onda de excitación. Excitando a 370 nm se observa una disminución de la fluorescencia hasta intensidades casi nulas en el intervalo de pH entre 6 y 8, mientras que cuando la excitación se produce a 330 nm la intensidad de fluorescencia es prácticamente

constante hasta valores de pH cercanos a 4, a partir del cual sí que se reduce notablemente la fluorescencia.¹⁸⁸ En el caso de derivados nitrogenados (7-aminocumarinas) la fluorescencia no se ve prácticamente alterada a pH fisiológico.¹⁸⁹

Para evitar los posibles problemas derivados de variaciones en el pH de las disoluciones y por tanto de la intensidad de fluorescencia observada, los ensayos iniciales se han orientado a la conjugación de escuarato de dietilo con 7-aminocumarinas. De esta forma se aprovecha por una parte el “quenching” producido por el bloqueo del par de electrones del grupo amino de la cumarina, y por otra, la experiencia adquirida hasta el momento en la funcionalización de escuaratos de dietilo con aminas.

4.6.1.2 Diseño del espaciador autoinmolativo

En cuanto al diseño del espaciador autoinmolativo se ha optado por una escuaramida aminoalquilsustituida capaz de evolucionar mediante ciclación intramolecular adaptada al uso de cumarinas. En este sistema el grupo amino primario desplazaría el nitrógeno aromático de la cumarina según se muestra en el esquema 62.



Esquema 62 – Evolución del espaciador autoinmolativo mediante la acción de aminas primarias sobre escuaramidas derivadas de anilinas.

El ataque nucleófilo intramolecular permitirá la eliminación del grupo saliente con mayor a menor dificultad, estableciendo de este modo la siguiente escala donde se representa la estabilidad de diferentes derivados escuaramídicos frente a ataques nucleófilos (Fig. 108).

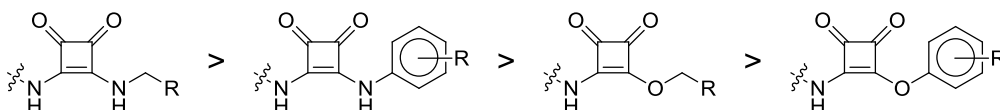


Figura 108 – Estabilidad de diferentes derivados escuaramídicos frente a ataques nucleófilos.

¹⁸⁸ Fink, D. W.; Koehler, W. R.; pH Effects on Fluorescence of Umbelliferone. *Anal. Chem.*, **1970**, 42, 990-993.

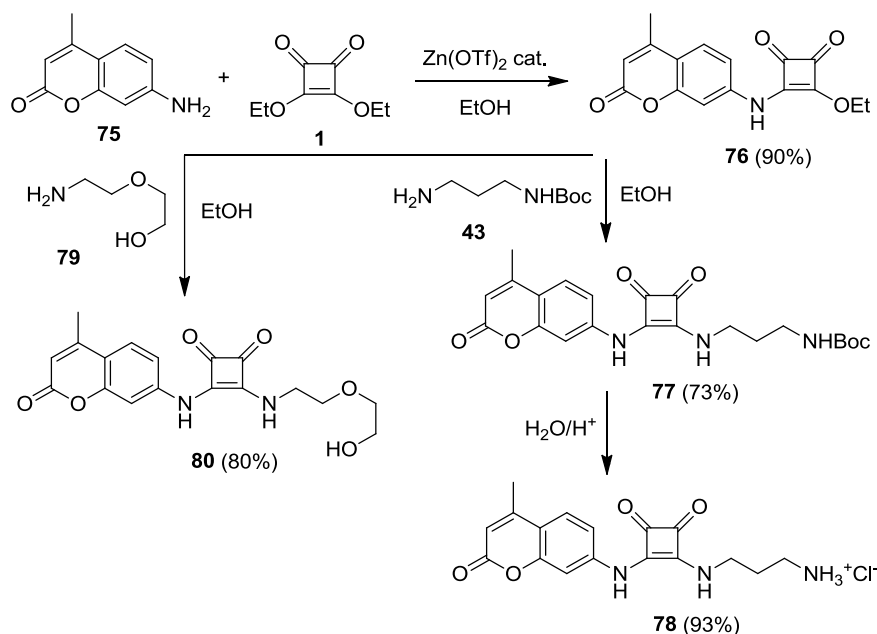
¹⁸⁹ Jin, X.; Uttamapinant, C.; Ting, A. Y.; Synthesis of 7-Aminocoumarin by Buchwald-Hartwig Cross Coupling for Specific Protein Labeling in Living Cells. *ChemBioChem*, **2011**, 12, 65-70.

A igual que en los derivados de ácidos carboxílicos, si se asume que tiene lugar un ataque nucleófilo de tipo adición-eliminación sobre el carbono que soporta el grupo saliente, cabe esperar que el orden de reactividad coincida con el menor pK_a del ácido conjugado del grupo saliente. Por esta razón cabe pensar que los ésteres fenólicos (grupo saliente fenol, $pK_a \approx 10$), reaccionarán mejor que ésteres alifáticos (grupo saliente alcoholes, $pK_a \approx 16-18$), escuaramidas aromáticas (grupo saliente anilinas, $pK_a \approx 30$) o escuaramidas alifáticas (grupo saliente aminas, $pK_a \approx 36-38$).

La elección de la longitud de la cadena (n) se ha realizado teniendo en cuenta que los estudios realizados hasta el momento, han demostrado que tres carbonos es una longitud de cadena óptima para poder establecer interacciones intramoleculares entre el nitrógeno aceptor y el grupo NH escuaramídico donador, permitiendo de la misma forma un ataque nucleófilo.

4.6.2 Síntesis y evaluación de diferentes grupos funcionales como activadores del proceso autoinmolativo

En primer lugar y para evaluar la reactividad del espaciador autoinmolativo propuesto se han preparado una serie de compuestos modelo que presentan una estructura común, la unidad escuaramido-cumarina, diferenciándose en el segundo sustituyente de la escuaramida. Inicialmente no se ha considerado la presencia de un posible gatillo, observando únicamente la evolución del espaciador.



Esquema 63 – Síntesis de los diferentes derivados escuaramido-cumarina.

En esta primera aproximación se han utilizado como segundo sustituyente alquilaminas con la finalidad de valorar la estabilidad en medio acuoso de la unión escuaramido-cumarina en presencia de diferentes grupos funcionales. Los derivados

78 (grupo amino) y **80** (grupo hidroxilo) se han elegido en función de su diferente nucleofilia con el objetivo de evaluar su capacidad para reaccionar formando el compuesto cíclico y desplazando la cumarina, mientras que los compuestos **76** y **77** permiten descartar falsos positivos debidos a una posible hidrólisis. Según la figura 108, solo se espera observar la eliminación de cumarina en el caso de la amina **78**, ya que el alcohol alifático no debería desplazar la cumarina, debido principalmente a la diferencia de los valores de pK_a (Esquema 63).

4.6.2.1 Síntesis de derivados escuaramido-cumarínicos

El monoescuarato de etilo de la aminocumarina **76** se ha preparado por condensación entre 7-amino-4-metilcumarina **75** y escuarato de dietilo **1**, usando como catalizador triflato de zinc. A partir de este compuesto se ha obtenido el derivado **80** por condensación con 2-(2-aminoetoxi)etanol **79**, y el derivado **77**, por condensación con N-Boc-1,3-propandiamina **43**. A partir de éste último se obtuvo la escuaramida **78** mediante desprotección selectiva del grupo Boc en disolución acuosa ácida según el procedimiento general descrito para la preparación de los oligómeros escuaramídicos.

4.6.2.2 Evaluación inicial de los derivados escuaramido-cumarínicos

En primer lugar se ha analizado la evolución espontánea que pueden sufrir los compuestos **76**, **77**, **78** y **80** en medio acuoso neutro (pH 6,5-7,0) mediante UV-Vis y fluorimetría.

A una temperatura de 37 °C la intensidad de fluorescencia de los cuatro derivados bajo estudio no se incrementa significativamente. Tampoco se observa una variación del espectro ultravioleta en ninguno de los conjugados durante las primeras 24 horas. Este hecho demuestra que a pH neutro el agua no es capaz de hidrolizar los enlaces escuaramídicos y que tampoco ocurre un ataque intramolecular por parte de ninguno de los grupos funcionales estudiados.

Por otra parte, al basificar el medio in situ hasta alcanzar un pH aproximado de 9,5 se observa que la intensidad de fluorescencia del conjugado **78**, que tiene el grupo amino en su estructura, se incrementa rápidamente. Este incremento es mucho menor en los otros casos (Fig. 109). Este resultado parece indicar que el proceso autoinmolutivo responde al pK_a del grupo amino, y por tanto a la protonación de éste, indicando además que el derivado con el grupo amino es el único capaz de evolucionar liberando la cumarina.

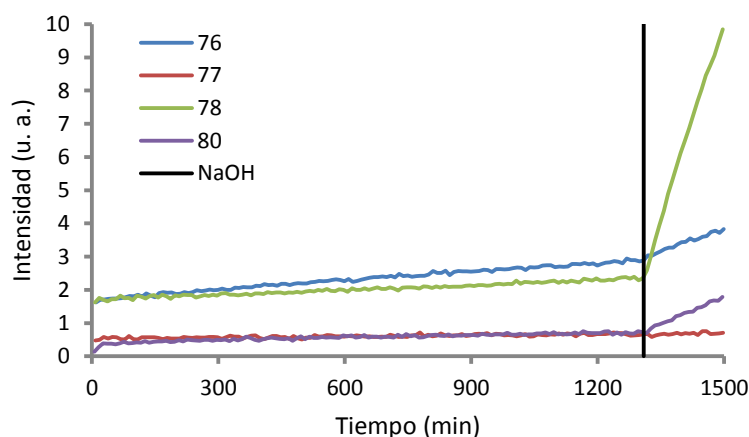


Figura 109 – Intensidad de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 332 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 443 \text{ nm}$) en función del tiempo para los compuestos **76**, **77**, **78** y **80**, $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ en agua, con un 4% de DMSO, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. La línea vertical indica el momento de la basificación in situ del medio.

A partir de lo observado anteriormente se ha evaluado la influencia del pH del medio en el proceso de autoinmolación del producto **78**. Los experimentos se han realizado en un intervalo de valores de pH comprendido entre 6,6 y 9,1, utilizando para ello diferentes tampones (Fig. 110).

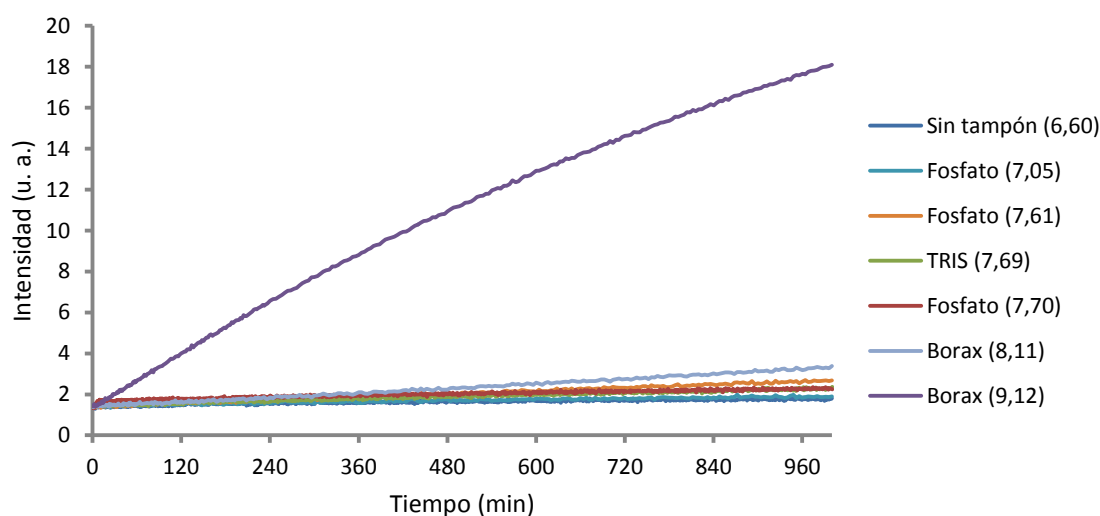


Figura 110 – Intensidad de fluorescencia ($\lambda_{exc} = 332 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 443 \text{ nm}$) en función del tiempo para el compuesto **78**, $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$, 4% DMSO. El pH del medio se ha mantenido utilizando tampones fosfato, TRIS y borato a una concentración 1 mM con fuerza iónica constante (NaCl) 100 mM . Los valores entre paréntesis indican el pH de la disolución.

Los resultados revelan que únicamente se produce un incremento de la fluorescencia de la disolución a un pH básico (9,1)). En estas condiciones de pH el par electrónico del grupo amino se encuentra libre ($pK_a = 9,5 - 10,5$), observando a partir de este valor una respuesta autoinmolativa.

La representación de la intensidad de fluorescencia respecto al tiempo permite calcular la velocidad inicial de aparición de cumarina libre. El valor calculado a un pH

de 9,1 ha sido de $1,74 \times 10^{-11} \text{ Ms}^{-1}$. En ausencia de otros procesos competitivos y/o de hidrólisis inespecífica, ésta sería una medida de la velocidad de autoinmolación. Este valor es muy bajo, a nivel práctico se traduce en un 9% de cumarina liberada al cabo de 16 horas.

En consecuencia, debido al pH básico necesario para que se dé el proceso y a la baja velocidad a la que tiene lugar, el uso de un grupo amino como nucleófilo sobre un NH de una escuaramida, donde el grupo saliente es una anilina, no resulta apropiado para un proceso autoinmolativo aceptable.

Ante estos resultados ha sido imprescindible la elección de otro grupo funcional con mejores propiedades nucleófilas a pH fisiológico, como por ejemplo el grupo tiol.

4.6.3 Sistemas autoinmolativos derivados de escuaramido-cumarinas con grupos tiol

4.6.3.1 Ventajas del grupo tiol frente al grupo amino

La utilización de tioles para efectuar desplazamientos nucleofílicos sobre derivados del ácido escuárico resulta una alternativa atractiva.¹⁹⁰ Un tiol alifático presenta un pK_a de alrededor de 10, lo cual no supone una mejora importante frente a un grupo amino, sin embargo este valor se ve disminuido por efecto inductivo ante la presencia de nitrógenos en posición β , como en el caso de la cisteamina ($pK_a = 8,6$), o más acusado aún en el caso del aminoácido cisteína ($pK_a = 8,3$), debido a la presencia además del carboxilato (Fig. 111).¹⁹¹

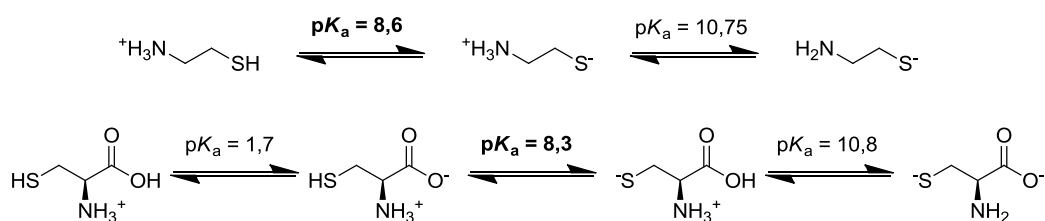


Figura 111 – Equilibrios ácido-base de la cisteamina y el aminoácido cisteína. Se han señalado en **negrita** los valores de pK_a correspondientes a la desprotonación del grupo tiol.¹⁹¹

La elección del tiol como la parte fundamental del espaciador autoinmolativo permite además el uso de disulfuros como gatillos. Como se ha indicado en la introducción, éstos son grupos funcionales presentes de forma natural en los sistemas vivos, y estables además en medio acuoso siempre que no exista un entorno reductor o grupos nucleófilos con los que pueda interactuar. Estas condiciones se cumplen por ejemplo en el medio extracelular. El enlace disulfuro se rompe en el momento de internalizarse en la célula debido a la presencia de un entorno reductor y una alta concentración de

¹⁹⁰ Sejwal, P.; Han, Y.; Shah, A.; Luk, Y.; Water-Driven Chemoselective Reaction of Squarate Derivatives with Amino Acids and Peptides. *Org. Lett.*, **2007**, 9, 4897-4900.

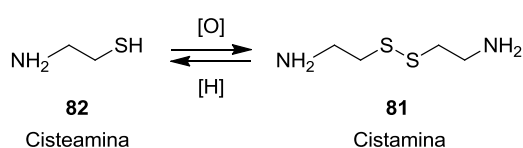
¹⁹¹ Edsall, J. T.; Wyman and Jeffries, *Biophysical Chemistry*, **1958**, Academic Press, Inc., New York.

GSH, unas condiciones que se pueden reproducir fácilmente para estudiar el proceso in vitro mediante la adición de reductores o incluso GSH.

De esta forma, introduciendo un enlace de disulfuro en nuestro sistema, se obtiene de forma directa el espaciador y el gatillo, una estructura de la cual se prescindió en la primera aproximación al utilizar el grupo amino.

4.6.3.2 Elección del disulfuro

Considerando este nuevo grupo funcional se ha procedido al rediseño del sistema autoinmolativo utilizando la cisteamina **82** como tiol, que en su forma oxidada se denomina cistamina **81** e incorpora el puente disulfuro que actuará a modo de gatillo (Esquema 64).



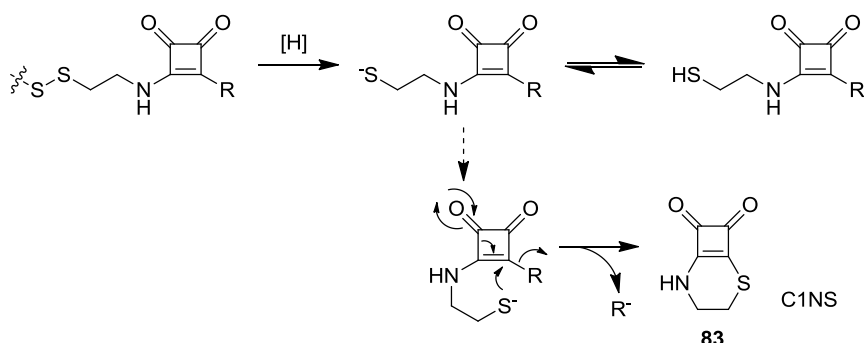
Esquema 64 – Equilibrio oxidación-reducción del aminoetanotiol (cisteamina) **82**.

El uso de disulfuros implica un intercambio entre tioles ante la presencia de trazas de reductor, por este motivo, trabajando con disulfuros simétricos se simplifica tanto la síntesis de los diferentes derivados como los análisis de la evolución temporal.

La cisteamina y la cistamina permiten la funcionalización directa con escuarato de etilo. Además, la distancia de dos carbonos entre heteroátomos, aun siendo menor que en el caso de la amina **78**, resulta adecuada para formar el compuesto cíclico, característico de la inmolación. Por último, la cistamina **81** es un producto comercialmente disponible, tanto en su forma oxidada como reducida, con un coste asequible.

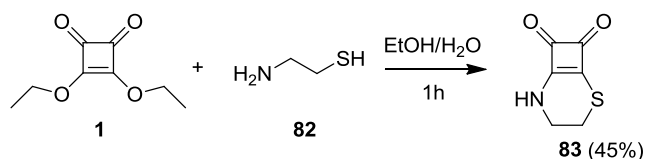
4.6.3.3 Síntesis del producto de ciclación C1NS **83**

La evolución esperada del proceso autoinmolativo de estos compuestos resulta en el producto de ciclación **83** según se muestra en el esquema 65.



Esquema 65 – Mecanismo esperado para la autoinmolación mediante disulfuros.

Por este motivo, para comprobar la viabilidad de la propuesta, y con el fin de identificar inequívocamente la formación del compuesto cíclico C1NS **83**, éste se ha obtenido a partir de cisteamina **82** y escuarato de dietilo **1**, en medio etanol:agua (1:0.7) (Esquema 66).



Esquema 66 – Síntesis del compuesto cíclico C1NS **83** en presencia de escuarato de dietilo **1** y cisteamina **82**.

El espectro ¹H-RMN (D₂O/10% DMSO-d₆) presenta dos multipletes a 3,2 y 3,8 ppm mientras que el espectro ¹³C-RMN muestra seis picos, dos a campo alto (27,0 y 42,1 ppm), y cuatro a campo bajo (161,2, 178,4, 186,2 y 187,0 ppm), correspondientes al anillo escuaramídico. Los espectros 2D HSQC y HMBC permiten la asignación inequívoca de todas las señales. El espectro HMBC muestra picos de cruzamiento característicos (marcados como c, d y e) que confirman la estructura cíclica de **83** (Fig. 112). Adicionalmente, el espectro MALDI-TOF (**83**+CsCl) indica la presencia de un compuesto con una relación m/z de 287,882, que concuerda con la masa calculada para el ión [**83**+Cs]⁺ ([C₆H₅NO₂S+Cs]⁺) de 287,910 g/mol.

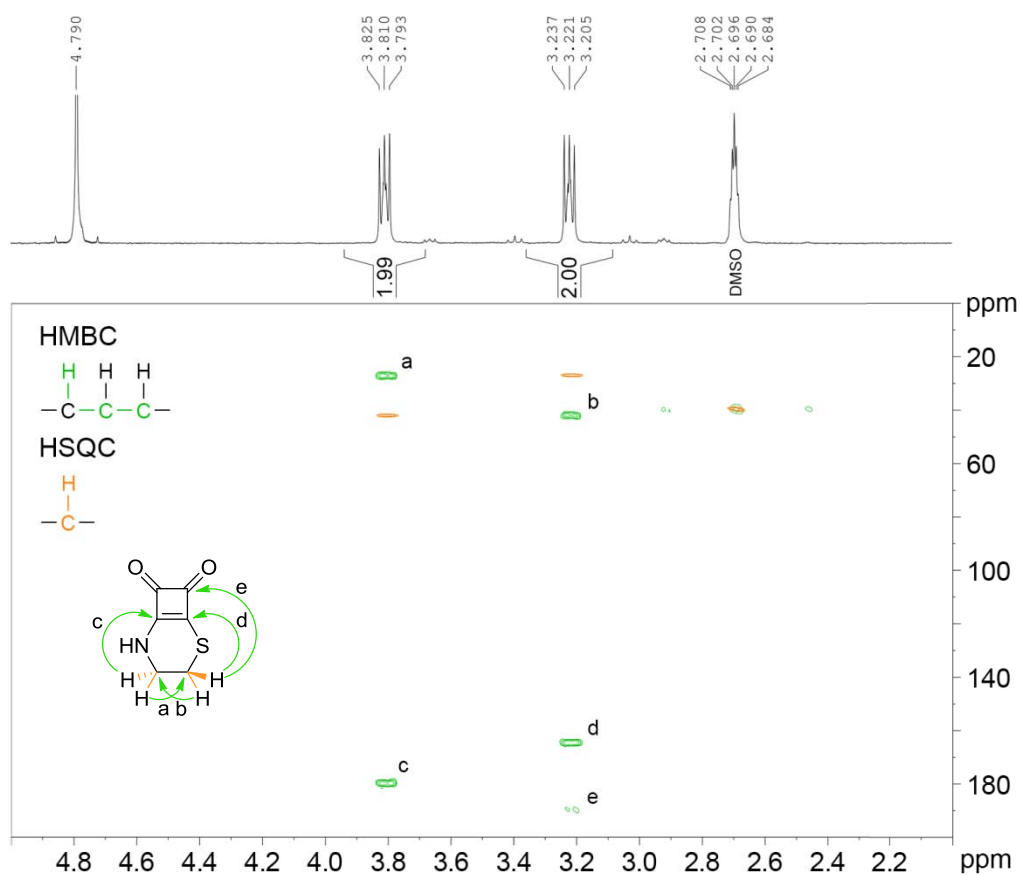
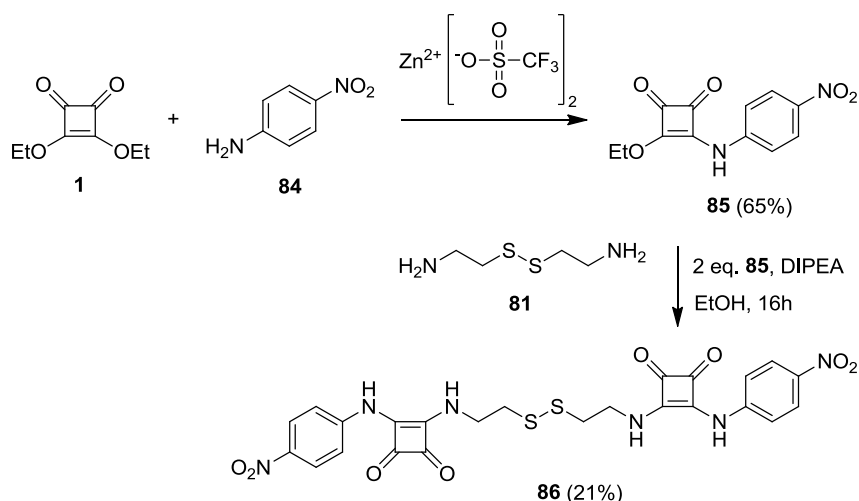


Figura 112 – Elucidación de la estructura cíclica del producto C1NS **83** (10 mM, D_2O / 20% DMSO-d_6) mediante experimentos 2D ^1H - ^{13}C HMBC y HSQC.

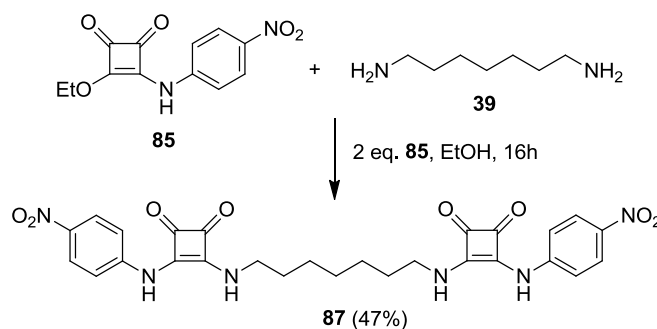
4.6.3.4 Síntesis del sistema autoinmolativo **86** como modelo de trabajo

Para avanzar en el diseño de un espaciador autoinmolativo de base escuaramida y gatillo de disulfuro, se ha diseñado el disulfuro simétrico **86** utilizando p-nitroanilina **84** como carga en lugar del fluoróforo. De este modo es posible estudiar la evolución mediante espectrometría UV-Vis. La síntesis del disulfuro se ha realizado mediante la introducción secuencial sobre escuarato de dietilo **1**, primero de la p-nitroanilina **84** y posteriormente de la cistamina **81**, obteniendo el producto simétrico **86** con un rendimiento del 21% (Esquema 67).



Esquema 67 – Síntesis del modelo autoinmolativo no fluorescente **86**.

El compuesto **87** se ha sintetizado de un modo similar, a partir de la condensación de la semiescuaramida **85** con 1,7-heptildiamina **39**. Este compuesto sin capacidad autoinmolativa se ha preparado para evaluar la estabilidad de la estructura escuaramídica ante la presencia del reductor o la posible hidrólisis (Esquema 68).



Esquema 68 – Síntesis del conjugado sin capacidad autoinmolativa **87**.

4.6.3.5 Agentes reductores de disulfuros

Previamente al estudio del sistema autoinmolativo se han valorado diversos agentes reductores responsables de la activación del gatillo. Habitualmente se utilizan tioles, que actúan mediante intercambio tiol-disulfuro, o bien fosfinas, que actúan mediante mecanismo redox. En la figura 113 y el esquema 69 se presentan algunos agentes habituales y los mecanismos propuestos para cada tipo de agente reductor.^{192,193}

¹⁹² Burns, J. A.; Butler, J. C.; Moran, J.; Whitesides, G. M.; Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 2648-2650.

¹⁹³ Dmitrenko, O.; Thorpe, C.; Bach, R. D.; Mechanism of S_N2 Disulfide Bond Cleavage by Phosphorus Nucleophiles. Implications for Biochemical Disulfide Reducing Agents. *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 8298-8307.

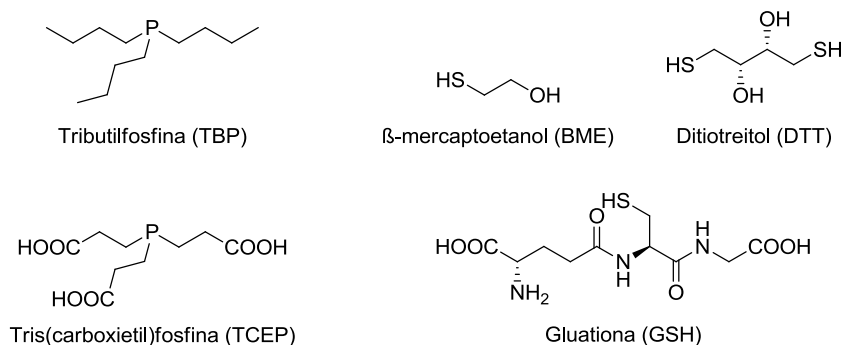
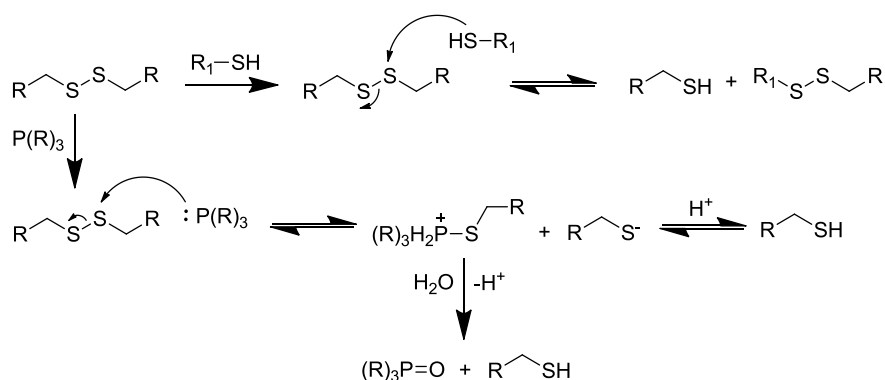


Figura 113 – (Izquierda) Fosfinas que actúan mediante reacciones redox. (Derecha) Tioles que actúan mediante un mecanismo de intercambio.



Esquema 69 – (Arriba) Mecanismo de reducción de disulfuros mediante intercambio con tioles. (Abajo) Mecanismo de reducción de disulfuros mediante fosfinas en disolución acuosa.¹⁹²

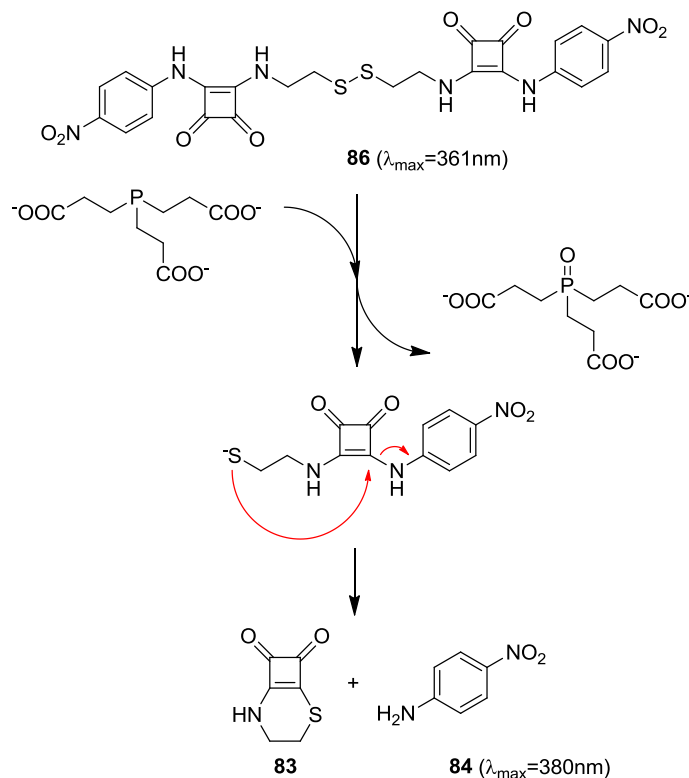
Entre los tioles utilizados se encuentran el BME (β -mercaptoetanol) y el DTT (ditiotreitolo) pero se descartó su uso en esta Tesis por sus principales inconvenientes, es decir, su inestabilidad y tendencia a oxidarse en presencia de aire. Además la banda a 260 nm del DTT de su forma oxidada solaparía con la banda escuaramídica alrededor de 280 nm. Por otra parte, el tripéptido glutatión (GSH) es el reductor más utilizado para el estudio de compuestos con actividad biológica, debido a que se encuentra de forma natural en todas las células. Sin embargo, el GSH tiende a formar aductos mixtos (R-SS-R₁ en el esquema 69), ralentizando el proceso de autoinmolación.

Alternativamente, las fosfinas presentan una importante capacidad de reducción superior y no forman aductos mixtos. Los estudios realizados de forma preliminar con la TBP (tributilfosfina) muestran que es un compuesto que reacciona lentamente con el oxígeno y de forma más rápida con otros agentes oxidantes, como por ejemplo el DMSO, necesario para poder trabajar en disolución acuosa. Por otra parte, la tris(carboxietil)fosfina (TCEP) tiene características ideales para la realización de los estudios de evolución propuestos. Se trata de un sólido estable en disolución acuosa, mantiene su poder reductor a pH fisiológico y es selectivo para disulfuros. Además no presenta bandas de absorción por encima de 220 nm y solo presenta dos señales en el

espectro de ^1H -RMN, fácilmente identificables tanto en su forma reducida como oxidada, entre 1,8 y 2,4 ppm.

4.6.3.6 Evaluación del modelo de sistema autoinmolativo **86**

En el esquema 70 se representa el proceso esperado para la autoinmolación del producto **86** al añadir el reductor TCEP.



Esquema 70 – Evolución esperada para el sistema autoinmolativo **86** después de la adición del reductor TCEP. Se han indicado los máximos de absorción para el residuo de p-nitroanilina.

La p-nitroanilina **84** presenta un máximo de absorción a 380 nm ($\epsilon_{84} = 1,33 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), sufriendo un efecto hipsocrómico hasta 361 nm ($\epsilon_{86} = 1,62 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) cuando está conjugada a la escuaramida. En cuanto a las bandas de la escuaramida, en los conjugados **86** y **87** se observa un máximo a 296 nm ($\epsilon_{86} = 1,87 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), mientras que en el ciclo **83** existen dos máximos a 274 y 306 nm ($\epsilon_{83}^{274\text{nm}} = 1,41 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{83}^{306\text{nm}} = 1,30 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Fig. 114).

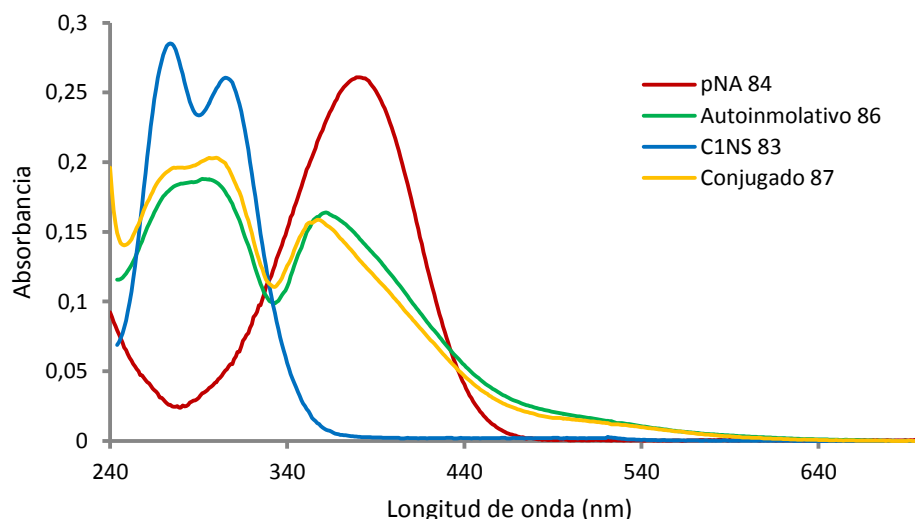


Figura 114 – Espectros de absorción UV-Vis de los compuestos **86** y **87** ($1,0 \times 10^{-5}$ M, PBS/1% DMSO), y de los productos esperados finales, p-nitroanilina **84** y el ciclo C1NS **83** ($2,0 \times 10^{-5}$ M, PBS/1% DMSO).

De esta forma, el cambio en la longitud de onda del máximo de la p-nitroanilina (de 360 a 380 nm) permite evaluar el proceso.

Los estudios de evolución temporal mediante espectrometría UV-Vis se han llevado a cabo con el conjugado **87** y el sistema autoinmolativo **86** a una concentración $1,0 \times 10^{-5}$ M en PBS/1% DMSO, adquiriendo espectros en intervalos de 1-2 minutos.

En la figura 115 se puede observar como el tratamiento de **87**, que carece del grupo disulfuro, con un equivalente de TCEP no provoca ningún cambio significativo en el espectro UV-Vis, descartando procesos de degradación alternativos a los propuestos. Sin embargo, se observa una pequeña disminución de la intensidad de absorción atribuible a una precipitación parcial debido a la baja solubilidad del compuesto.

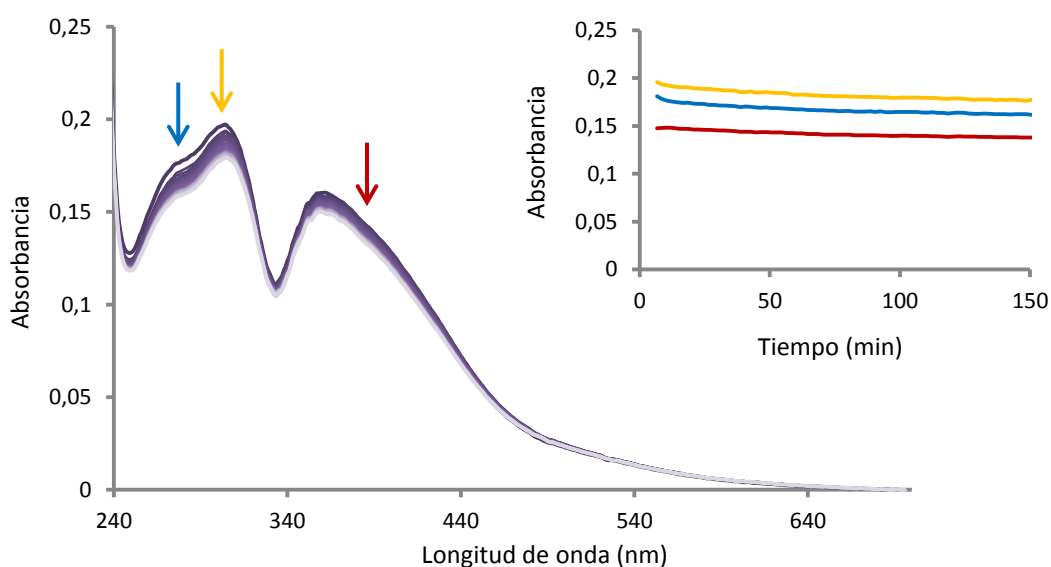


Figura 115 – Evolución temporal del espectro UV-Vis del compuesto **87** ($1,0 \times 10^{-5}$ M) tratado con un equivalente de TCEP ($1,0 \times 10^{-5}$ M). El inserto de la esquina superior derecha muestra la evolución de la señal en función del tiempo a tres longitudes de onda, 285 (azul), 300 (amarillo) y 380 nm (rojo).

Por su parte, la evolución del compuesto autoinmolativo **86** resulta en una variación mucho más evidente (Fig. 116).

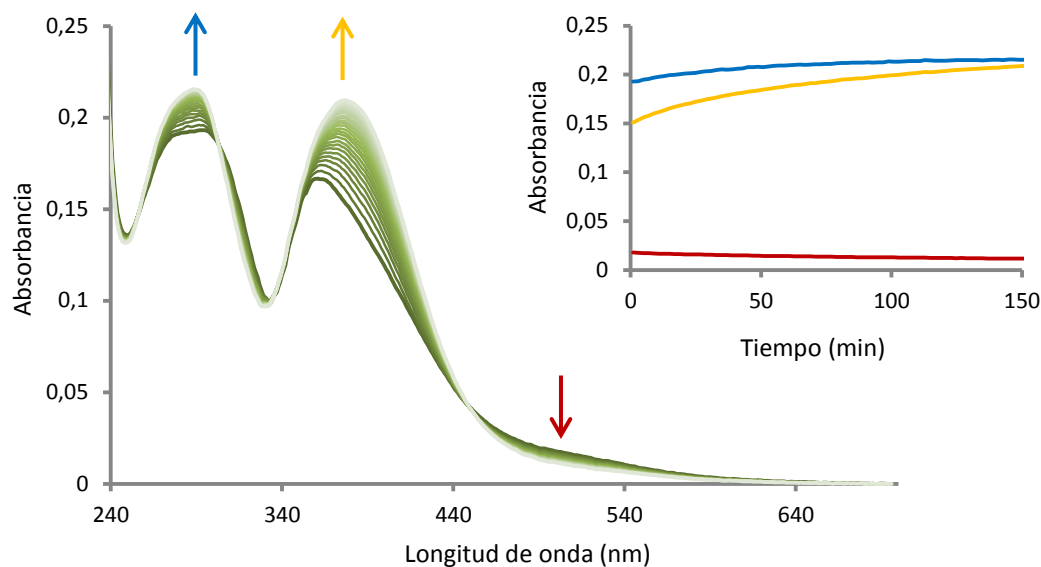


Figura 116 – Evolución temporal del espectro UV-Vis del compuesto **86** ($9,95 \times 10^{-6}$ M) tratado con un equivalente de TCEP ($9,95 \times 10^{-6}$ M). El inserto de la esquina superior derecha muestra la evolución de la señal en función del tiempo a tres longitudes de onda, 290 (azul), 379 (amarillo) y 500 nm (rojo).

En el gráfico se observa un incremento de la banda situada alrededor de los 290 nm. Además se observa el desplazamiento del máximo de la banda del residuo de p-nitroanilina hacia 380 nm, y la disminución de la cola de dicha banda sobre los 500 nm, hechos que parecen indicar la formación de p-nitroanilina libre. Sin embargo no se llegan a diferenciar las dos bandas a 274 y 312 nm correspondientes al ciclo C1NS **83**.

A partir de los espectros UV-Vis es posible calcular la velocidad de aparición de la p-nitroanilina. Para ello se debe hacer uso de la ley de Lambert-Beer. Puesto que no hay ninguna longitud de onda donde la absorción de los diferentes compuestos no solapen hay que utilizar sistemas de ecuaciones y considerar aditiva la absorción de los diferentes compuestos implicados en la reacción.

Según la ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot [] \quad (\text{Ec. 8})$$

para una mezcla de tres productos en disolución, A, B y C, con una reacción del tipo:



donde, A = **86**, B = p-nitroanilina **84** y C = C1NS **83**, la absorbancia total a una longitud de onda determinada es:

$$A_T^\lambda = A_A^\lambda + A_B^\lambda + A_C^\lambda \quad (\text{Ec. 10})$$

$$A_T^\lambda = \varepsilon_A^\lambda \cdot l \cdot [A] + \varepsilon_B^\lambda \cdot l \cdot [B] + \varepsilon_C^\lambda \cdot l \cdot [C] \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde ε corresponde al coeficiente de extinción molar, l al paso óptico, que será 1 cm por defecto, y $[]$ a la concentración de cada uno de los productos.

Si el producto **86**, tiene una concentración inicial $[A]^0$, en el punto final existe una concentración de producto final igual a:

$$2 \cdot [A]^0 = [B]^f = [C]^f \quad (\text{Ec. 12})$$

y en un punto intermedio cualquiera:

$$[B] = 2 \cdot ([A]^0 - [A]) = [C] \quad (\text{Ec. 13})$$

Por tanto:

$$A_T^\lambda = \varepsilon_A^\lambda \cdot [A] + \varepsilon_B^\lambda \cdot 2 \cdot ([A]^0 - [A]) + \varepsilon_C^\lambda \cdot 2 \cdot ([A]^0 - [A]) \quad (\text{Ec. 14})$$

Despejando $[A]$ obtenemos:

$$[A] = \frac{A_T^\lambda - 2 \cdot [A]^0 (\varepsilon_B^\lambda + \varepsilon_C^\lambda)}{\varepsilon_A^\lambda - 2(\varepsilon_B^\lambda + \varepsilon_C^\lambda)} \quad (\text{Ec. 15})$$

De esta forma, dado que se conocen los coeficientes de absorción molar de todos los productos que intervienen, es posible calcular las concentraciones de ambas especies con las ecuaciones 13 y 15, y representar la disminución de las concentraciones del compuesto autoinmolativo **86** y del incremento de concentración de la p-nitroanilina **84** (Fig. 117). Esta representación se ha realizado teniendo en cuenta los datos de absorbancia a 381 nm.

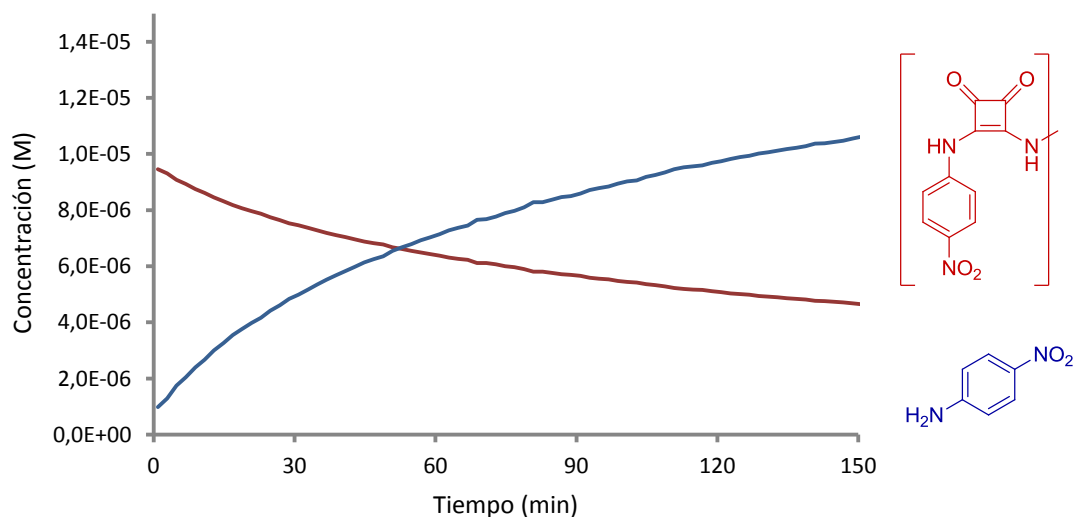


Figura 117 – Representación de las concentraciones de **86** (rojo) y p-nitroanilina **84** (azul) en función del tiempo transcurrido a 381 nm, calculadas a partir de las ecuaciones 13 y 15.

En este caso la velocidad inicial de desaparición de **86** a pH fisiológico es de $1,9 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$ y de $3,8 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$ si se calcula a partir de la aparición de la p-nitroanilina. Este

dato resulta ser dos órdenes de magnitud superior al observado para el compuesto **78** utilizando el grupo amino como parte del espaciador a pH 9.

La ausencia en los espectros UV-Vis de las dos bandas correspondientes al ciclo C1NS **83** ha motivado el estudio de la evolución del modelo autoinmolativo **86** mediante RMN con el objetivo de intentar detectar la formación del compuesto cíclico C1NS **83**.

Desafortunadamente, a una concentración 1 mM, el compuesto **86** resulta insoluble incluso en disoluciones con un 50% de DMSO (Fig. 118-centro). Al añadir la TCEP, la reducción de **86** incrementa la concentración del tior, sin embargo no hay ninguna evidencia que indique la formación del compuesto cíclico ni tampoco de la presencia de p-nitroanilina **84**, hecho que contradice los resultados preliminares obtenidos mediante espectrometría UV-Vis a pesar de las diferentes condiciones de trabajo (Fig. 118).¹⁹⁴

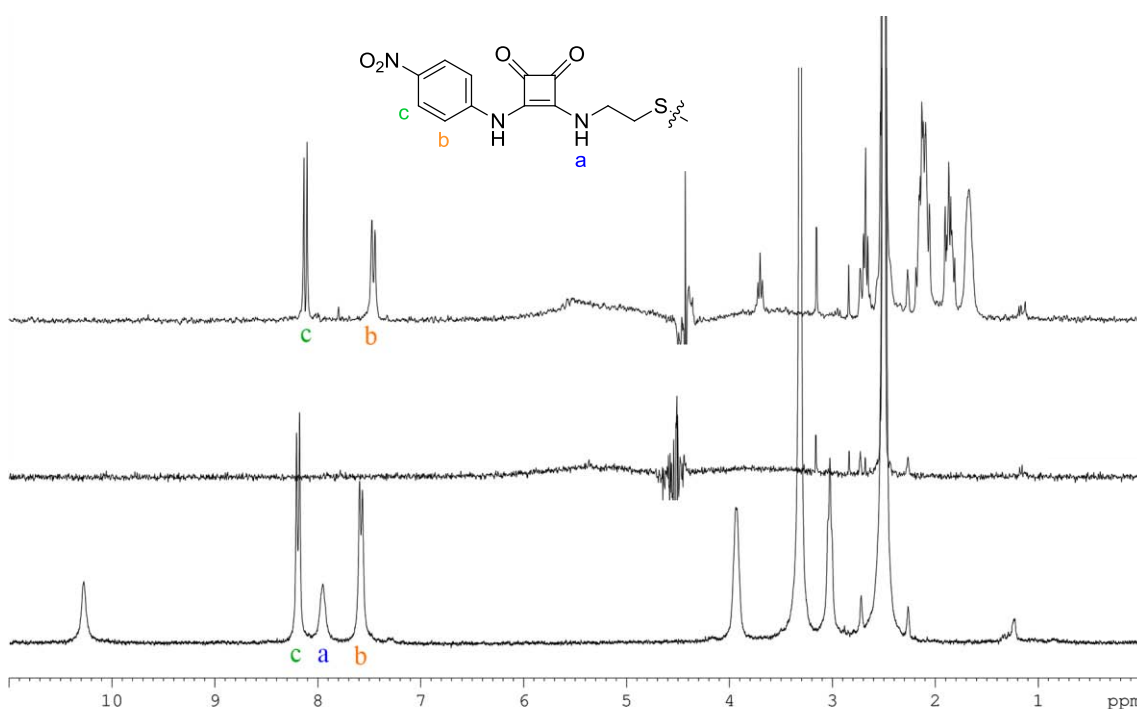


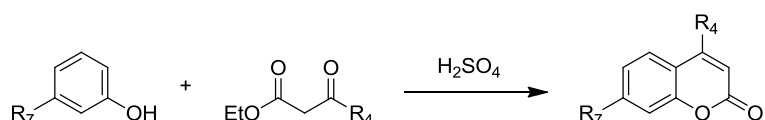
Figura 118 – Señales aromáticas correspondientes al residuo de p-nitroanilina de **86** en DMSO-d₆ (abajo), PBS:DMSO-d₆ (50%) (centro) y PBS:DMSO-d₆ (50%) + un equivalente de TCEP (arriba).

¹⁹⁴ Los desplazamientos del anillo aromático son prácticamente idénticos en las formas oxidada y reducida, sin embargo los desplazamientos de la cadena alifática permiten identificar cada uno de los productos.

4.6.3.7 Síntesis del sistema autoinmolativo **96**

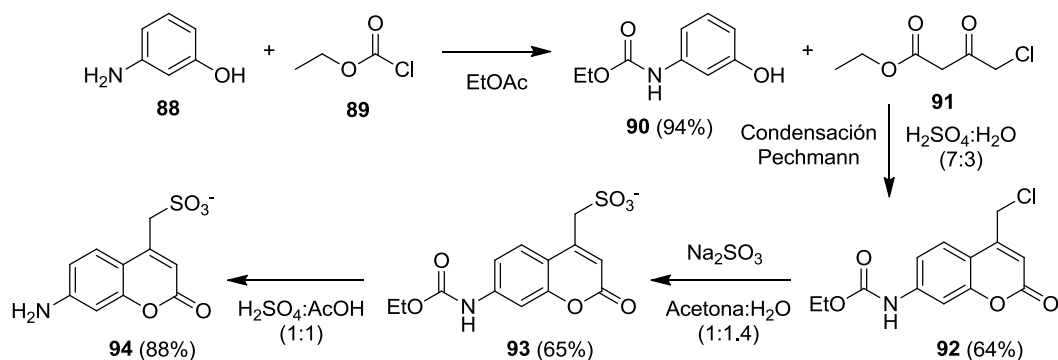
Con el fin de mejorar la solubilidad en agua del modelo autoinmolativo se decidió obtener un modelo cumarínico sustituido en la posición cuatro con un grupo sulfonato, esperando que éste aportase la solubilidad necesaria al conjunto, gracias a la particularidad de encontrarse ionizado independientemente del pH de la disolución.

Los derivados de cumarina se obtienen de forma general mediante condensación de Pechmann, que utiliza fenoles y β -ceto ésteres diferentemente funcionalizados según la reacción del esquema 71.



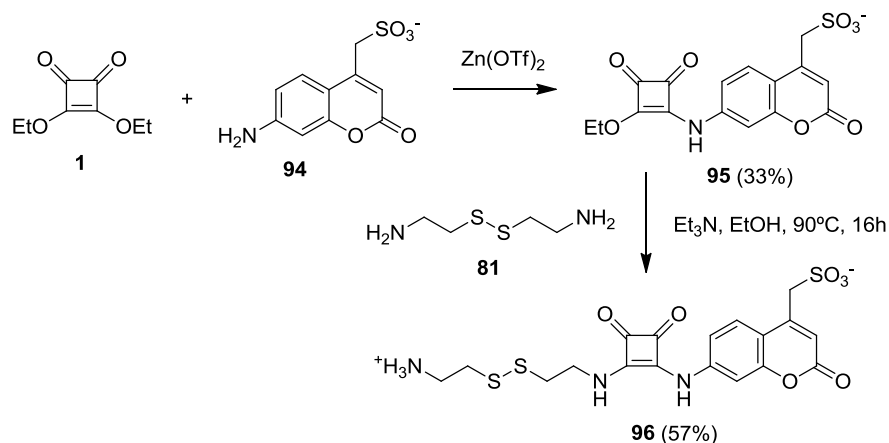
Esquema 71 – Síntesis de Pechmann para la obtención de cumarinas.

La síntesis se ha llevado a cabo a partir del aminofenol **88**, previa protección del grupo amino con cloroformato de etilo, obteniendo el fenol **90**. A continuación la condensación de Pechmann en medio ácido con 4-cloroacetoacetato de etilo conduce a la cumarina clorometilada **92**. Posteriormente la adición nucleófila de sulfito sódico y la desprotección del grupo amino proporciona la aminocumarina **94** con un rendimiento global en cuatro pasos del 34% (Esquema 72).



Esquema 72 – Síntesis de 4-(sulfonatometil)-7-aminocumarina, **94**.

La semiescuaramida **95** se ha obtenido por conjugación del escuarato de dietilo con la cumarina **94** según el procedimiento general descrito para anilinas. Ésta se acopla a cistamina en presencia de base para dar el disulfuro **96** con un rendimiento del 57% (Esquema 73).



Esquema 73 – Síntesis del modelo autoinmolativo soluble en agua **96**.

En este caso, y a pesar de realizar varios intentos, no se ha obtenido el producto de doble entrada simétrico, lo que hace pensar que se puede establecer una interacción entre la amina y el sulfonato impidiendo que ésta reaccione con otro equivalente de semiescuaramida **95** en las condiciones indicadas.

El espectro 1H -RMN del conjugado **96** indica la presencia de dos conforméromos diferenciables gracias al desdoblamiento de las señales l, k y i (correspondientes a las posiciones 3, 4' y 6) de la cumarina y del NH escuaramídico (Fig. 119).

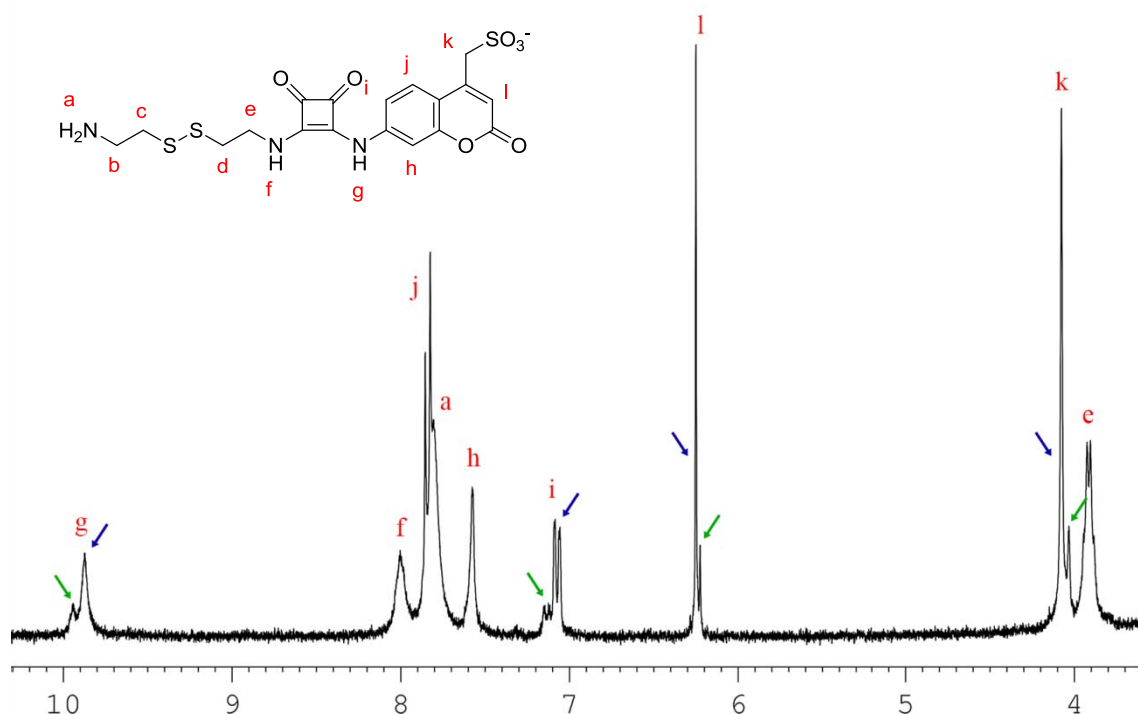
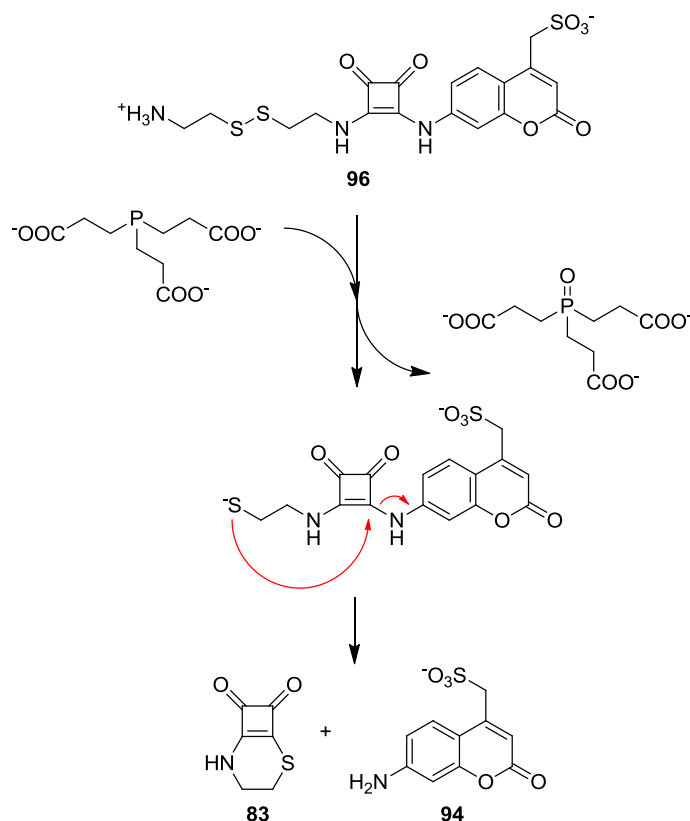


Figura 119 – Espectro de 1H -RMN del compuesto **96** en $DMSO-d_6$. Las señales se han asignado mediante un código de letras. Las flechas de un mismo color (azul o verde) indican el conjunto de señales asignado a cada una de las conformaciones minoritarias observadas.

4.6.3.8 Evaluación del modelo de sistema autoinmolativo **96**

En el esquema 74 se representa la evolución esperada del sistema autoinmolativo **96** al añadir el reductor TCEP.



Esquema 74 – Evolución esperada para el sistema autoinmolativo **96** después de la adición del reductor TCEP.

Los estudios de la evolución temporal del sistema autoinmolativo **96** se han llevado a cabo mediante RMN, en disolución de PBS/25% DMSO- d_6 . Los espectros de ^1H -RMN se han adquirido en intervalos de tiempo variables, indicados en la figura 120. En esta figura se han incluido además los espectros del compuesto **96** y de la cumarina **94**, como producto esperado del proceso de autoinmolación, en las mismas condiciones que las utilizadas para estudiar la evolución del compuesto **96**.

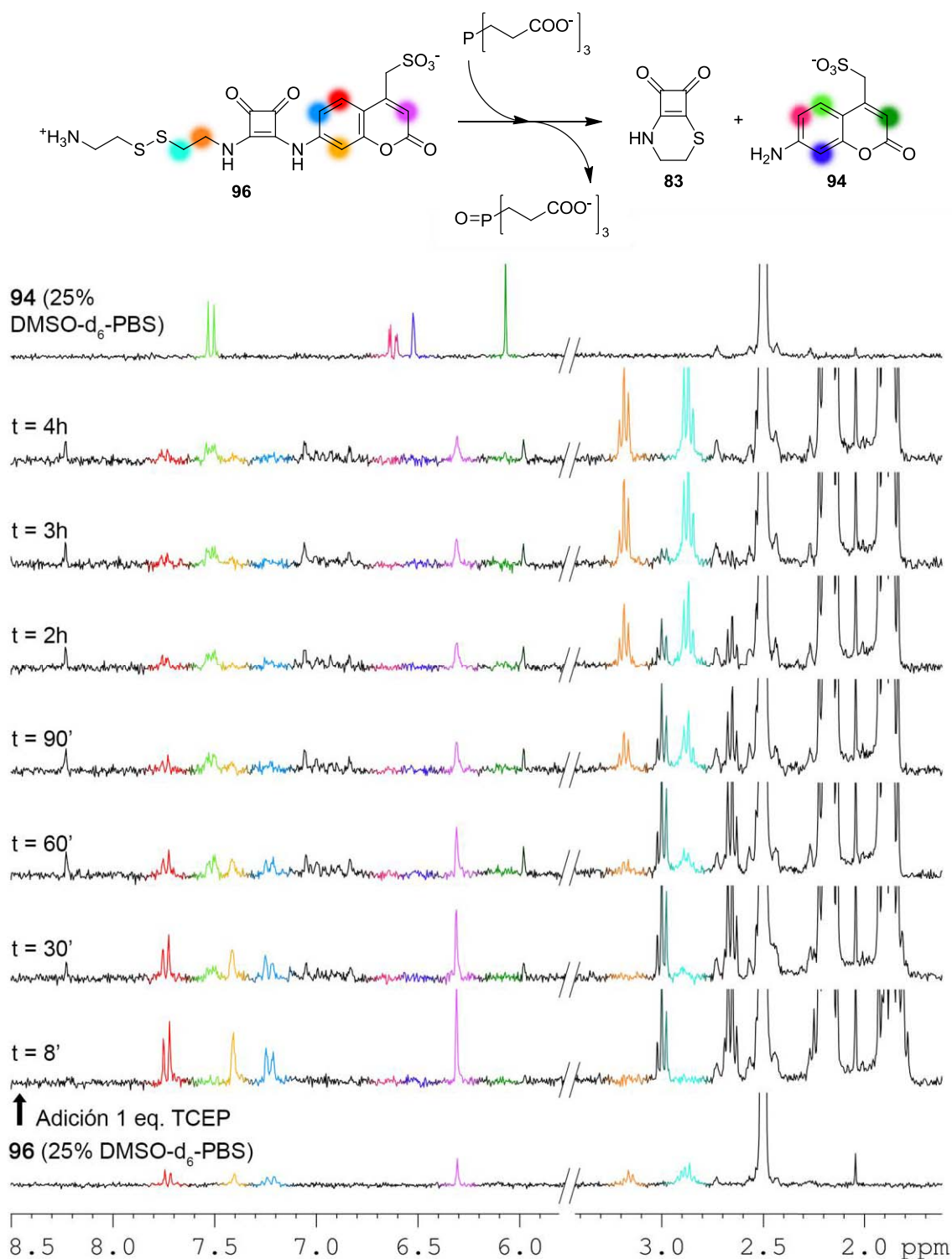


Figura 120 – Evolución temporal mediante ¹H-RMN del compuesto **96** (0,83 mM, PBS/25% DMSO) al adicionar un equivalente de TCEP. Se incluyen el espectro del compuesto **96** (abajo) y de la cumarina **94**, registrados en las mismas condiciones del experimento con fines comparativos.

A la vista de los espectros presentados en la figura 120 se puede afirmar que existe una reducción inmediata del producto **96** mediante la acción de la TCEP, observándose la desaparición de las señales contiguas al puente disulfuro (2,9 y 3,1 ppm) y la aparición de las señales correspondientes a la oxifosfina (1,8 y 2,2 ppm).

A partir de 60 minutos se empieza a observar la reoxidación del tiol, detectándose de nuevo las señales correspondientes al disulfuro. Sin embargo, el anillo de cumarina se va degradando y muestra señales en la zona aromática del espectro que no corresponden a ninguna de las estructuras propuestas en el diseño original (entre 6,8 y 7,1 ppm y a 8,3 ppm). A partir de estos resultados puede afirmarse que no hay liberación del fluoróforo, ya que no se observan los picos característicos del fluoróforo libre a 6,5 y 6,6 ppm respectivamente.

Los estudios realizados mediante fluorimetría con el producto **96**, realizados a una concentración $2,5 \times 10^{-6}$ M en medio PBS/1% DMSO, muy inferior a la concentración utilizada para RMN, muestran un incremento de la fluorescencia después de la adición del reductor, sin embargo esta evolución apenas alcanza un 12% del total después de 10 horas (Fig. 121).

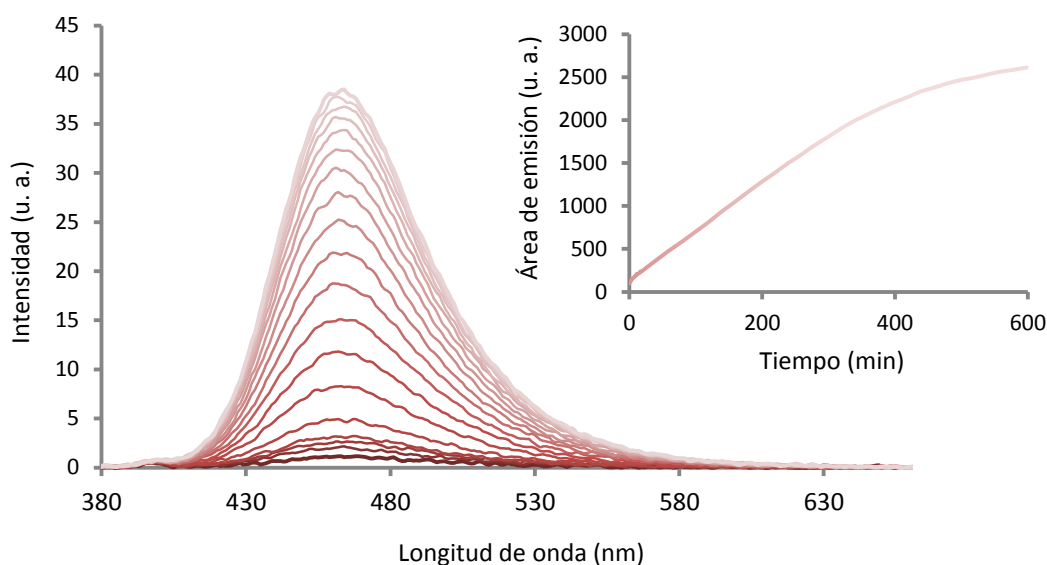


Figura 121 – Evolución temporal del espectro de emisión del compuesto **96** al ser tratado a una concentración $2,5 \times 10^{-6}$ M con tres equivalentes de TCEP ($7,5 \times 10^{-6}$ M). El inserto de la esquina superior derecha representa el área correspondiente de cada curva de emisión en función del tiempo.

En consecuencia, debido a la degradación del sistema, la combinación de un grupo tiol/tiolato como nucleófilo sobre un NH de una escuaramida, que tiene un grupo anilina como grupo saliente, no resulta apropiada para un proceso de autoinmolación aceptable.

En este punto es evidente que ninguno de los dos sistemas estudiados (**86** y **96**) ha cumplido la función para la cual han sido diseñados, haciendo necesario el diseño de una estructura alternativa que permita obtener el espaciador autoinmolativo.

4.6.4 Sistemas autoinmolativos derivados de escuarato-cumarinas con grupos tiol

Ante la poca reactividad de los sistemas de escuaramido-cumarinas estudiados hasta el momento se planteó la síntesis de sistemas más lábiles. Para ello se optó por utilizar derivados de escuarato-cumarinas ya que los ésteres derivados del ácido escuárico, que tendrían un alcohol como grupo saliente, serán mucho más lábiles que las escuaramidas anteriores (Fig. 122).

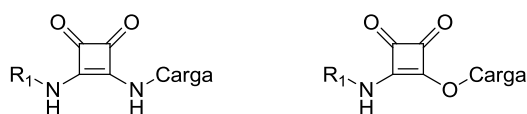
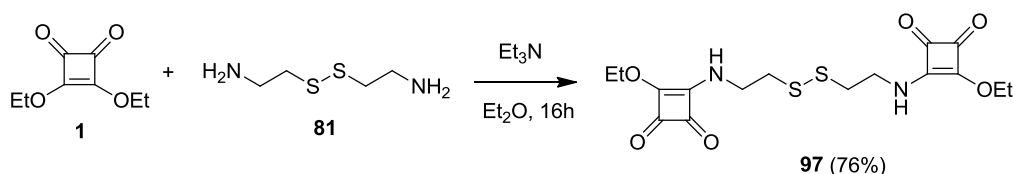


Figura 122 – Representación esquemática de las bis-escuaramidas utilizadas hasta el momento en comparación con los ésteres del ácido escuárico planteados como alternativa.

4.6.4.1 Síntesis y evaluación del sistema autoinmolativo **97**

Las primeras pruebas se realizaron sobre el modelo más simplificado posible pero que contiene los elementos necesarios para ser considerado un sistema autoinmolativo. El disulfuro **97** se ha obtenido mediante una condensación entre cistamina **81** y escuarato de dietilo **1** en un 76% de rendimiento (Esquema 75).



Esquema 75 – Síntesis del modelo autoinmolativo **97** a partir de escuarato de dietilo y cistamina.

En este sistema el grupo disulfuro será el “gatillo” mientras que el tiol actuará como nucleófilo para desplazar al etanol. La evolución se ha seguido mediante RMN y espectrometría UV-Vis. El compuesto **97** resulta ser totalmente soluble a una concentración 1 mM en PBS con un 10% de DMSO- d_6 , al contrario de lo que ocurría con los derivados diescuaramídicos. Los experimentos de RMN se han llevado a cabo a esta concentración añadiendo un equivalente de TCEP y registrando espectros de ^1H -RMN sucesivos. El mecanismo esperado, los espectros de ^1H -RMN obtenidos durante los primeros 90 minutos desde la adición del reductor TCEP, así como la asignación de las diferentes señales observadas se muestran en la figura 123.

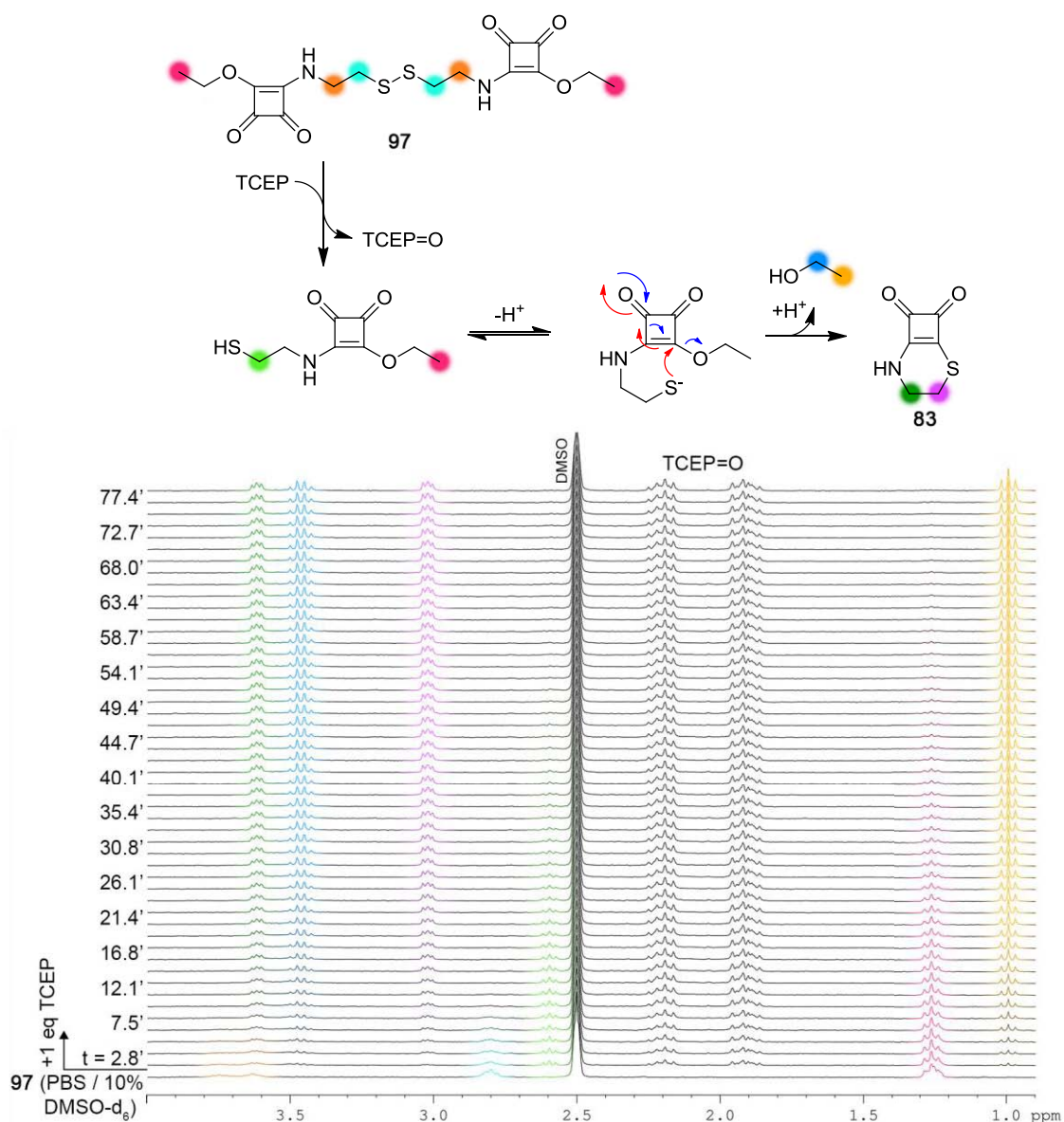


Figura 123 – Mecanismo propuesto de autoinmolación del compuesto **97** (1 mM) mediante reducción con TCEP, asignación de las señales características, y espectros de 1H -RMN donde se ha señalado la evolución de las señales de los productos.

La representación de la integral de las señales referenciadas a la señal residual de DMSO, permite calcular la concentración de cada especie en función del tiempo. Dividiendo el valor de la integral de cada señal por el número de protones que integra esa señal se obtiene la relación molar de los diferentes productos implicados (Fig. 124).

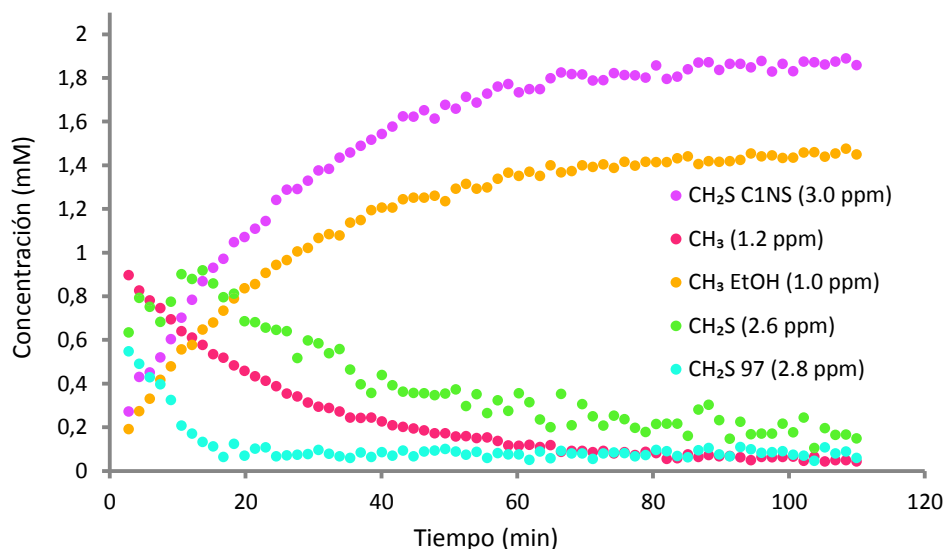


Figura 124 – Evolución de la concentración de los diferentes productos derivados del proceso de autoinmolación del producto **97** tratado con TCEP en función del tiempo.

La desaparición de la señal del CH₂S del disulfuro inicial **97** a 2,8 ppm y su sustitución por otra señal a 2,6 ppm correspondiente al CH₂S del tiol, muestran que el enlace disulfuro se rompe completamente en los primeros veinte minutos. La concentración de tiol resultante duplica a la del producto de partida **97** debido a la estequiometría de la reacción. Además de la reducción del disulfuro, se observa desde el primer minuto un incremento de la señal del CH₃ correspondiente al etanol (1,0 ppm) así como la correspondiente al ciclo C1NS **83** a 3,0 ppm. Se observa también que la concentración del producto C1NS **83** prácticamente duplica la del disulfuro inicial, indicando una autoinmolación total. Sin embargo, la señal correspondiente al etanol no responde totalmente a esta relación, hecho que se puede explicar por diferencias en la integración debidas a causas instrumentales o por la evaporación del etanol.

La RMN permite confirmar la evolución de la reacción de reducción del disulfuro y permite evaluar la velocidad de reacción global medida a partir de la señal del producto final C1NS **83**. De este modo, la velocidad estimada de aparición de C1NS es de $1,0 \times 10^{-6} \text{ Ms}^{-1}$, muy superior a las observadas para los compuestos derivados de anilinas.

Los experimentos adicionales realizados mediante espectrometría UV-Vis confirman la viabilidad del proceso de autoinmolación, en este caso trabajando en un rango de concentraciones mucho menor (Fig. 125).

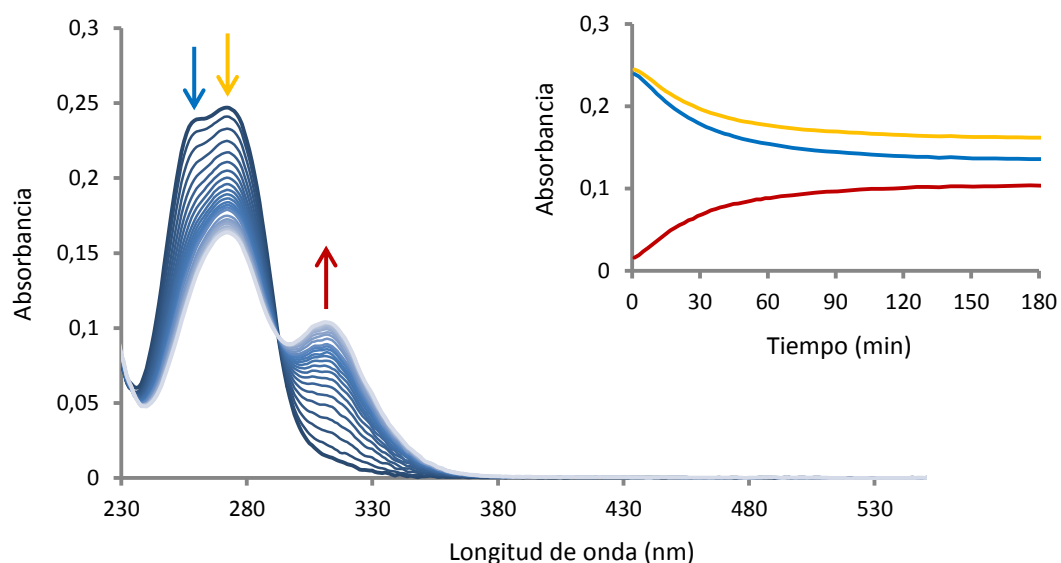


Figura 125 – Evolución del espectro UV-Vis del compuesto **97** ($5,0 \times 10^{-6}$ M, en PBS/1% DMSO) después de ser tratado con un equivalente de TCEP ($5,0 \times 10^{-6}$ M). El inserto de la esquina superior derecha muestra la evolución de la señal en función del tiempo a longitudes de onda de 260 (azul), 275 (amarillo) y 310 nm (rojo). El punto isosbético se sitúa sobre los 292 nm.

En la figura anterior, el espectro inicial (azul oscuro) muestra dos bandas parcialmente solapadas correspondientes al disulfuro y la escuaramida, con un máximo absoluto a 272 nm. La adición del reductor produce la disminución de la intensidad de esta banda, desapareciendo principalmente la subestructura de la banda a más baja longitud de onda, pero manteniendo el máximo de absorción a 272 nm. Al mismo tiempo se observa la aparición de una nueva banda sobre 312 nm, asignable, junto con la banda a 272 nm, al ciclo C1NS **83**, con máximo a 274 y 306 nm (Fig. 126).

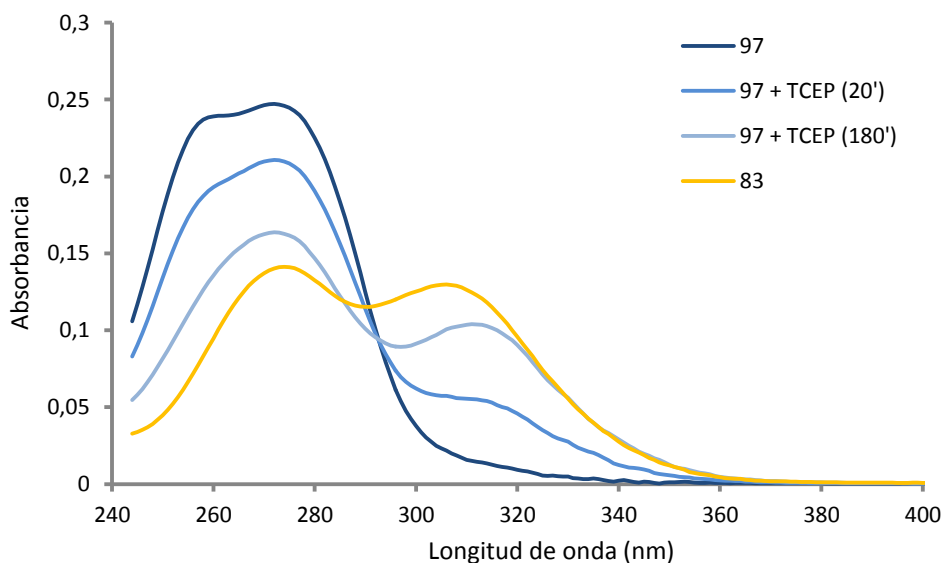


Figura 126 – Superposición de espectros UV-Vis del modelo autoinmolativo **97** ($5,0 \times 10^{-6}$ M, PBS/1% DMSO), **97** + TCEP después de 20 minutos de evolución, **97** + TCEP después de 180 minutos, y del ciclo C1NS **83** ($1,0 \times 10^{-5}$ M, PBS/1% DMSO).

En la representación de la absorbancia en función del tiempo a diferentes longitudes de onda de la figura 125 se puede observar la disminución de las intensidades a 260 y 275 nm, el incremento de la banda a 310 nm y un punto isobéptico que indica la formación de un cromóforo distinto, C1NS **83**.

4.6.4.2 Síntesis del sistema autoinmolativo **104**

Los experimentos de RMN y UV-Vis descritos en el apartado anterior confirman la viabilidad del proceso de autoinmolación usando el disulfuro como gatillo sobre ésteres del ácido escuárico, por lo que se decidió introducir cargas más representativas que el etanol. La cumarina ha seguido siendo el núcleo fluorescente elegido para actuar como modelo de carga. No obstante la funcionalización de la escuaramida a través del grupo fenólico en posición 7 conduciría a ésteres fenólicos que son muy reactivos frente a ataques nucleófilos.¹⁹⁰ Por este motivo se ha utilizado una cumarina con un grupo hidroximetileno en la posición 4 para formar un éster alifático con la escuaramida (Fig. 127).

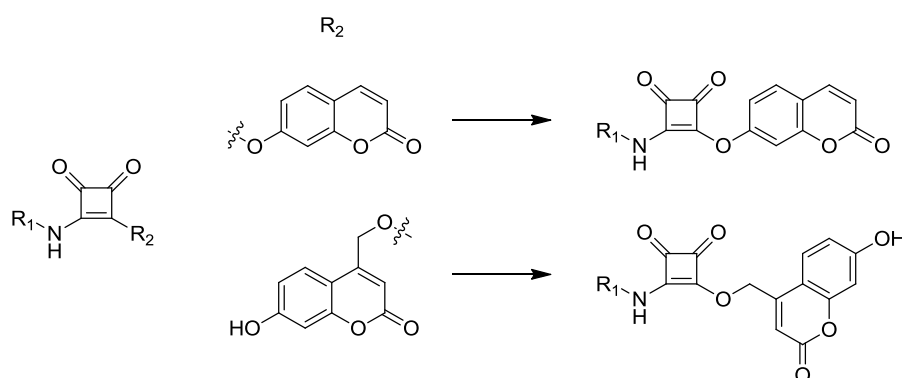


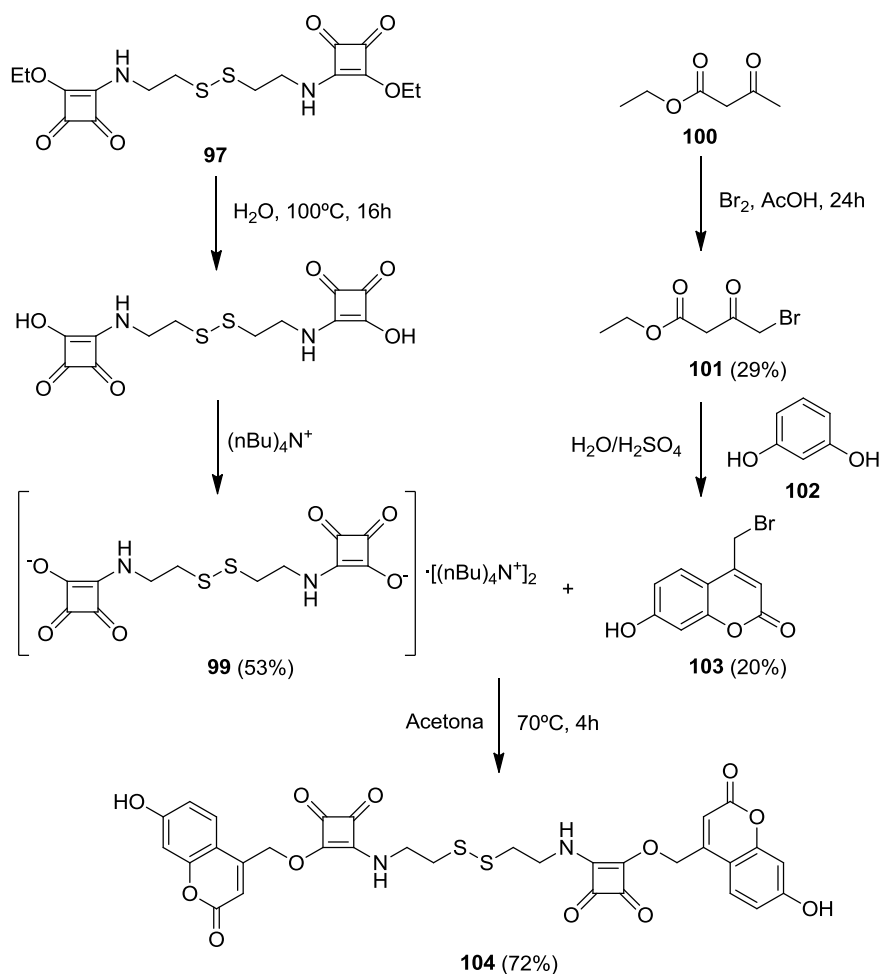
Figura 127 – Representación de la funcionalización de escuaramidas con cumarinas a través del fenol de la posición 7 para formar un éster fenólico o de un grupo hidroxilo en la posición 4, obteniendo un éster alifático, menos reactivo.

Para la síntesis del éster es necesario utilizar una metodología alternativa a la habitual. En este caso, primero se ha hidrolizado el diéster **97**, obteniendo un diácido que se aísla como sal de TBA **99**. Seguidamente, la reacción entre esta sal y el haluro primario de la cumarina **103** permite obtener el modelo autoinmolativo **104** con una carga pro-fluorescente. La 4-bromo-7-hidroxicumarina **103** se obtuvo siguiendo un procedimiento similar a los publicados (Esquema 76).^{195,196,197,198}

¹⁹⁵ Zhou, Z.; Fahrni, C. J.; A Fluorogenic Probe for the Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Ligation Reaction: Modulation of the Fluorescence Emission via 3(n, π*)- 1(π, π*). *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 8862-8863.

¹⁹⁶ Woo, H.; You, Y.; Kim, T.; Jhon, G.J.; Nam, W.; Fluorescence ratiometric zinc sensors based on controlled energy transfer. *J. Mater. Chem.*, **2012**, 22, 17100-17112.

¹⁹⁷ Sun, H.; Peng, X.; Template-Directed Fluorogenic Oligonucleotide Ligation Using “Click” Chemistry: Detection of Single Nucleotide Polymorphism in the Human p53 Tumor Suppressor Gene. *Bioconjugate Chem.*, **2013**, 24, 1226-1234.



Esquema 76 – Síntesis del sistema autoinmolativo 104.

El espectro ^1H -RMN del producto **104** presenta señales anchas, un hecho que no se había observado en los diferentes derivados de cumarina obtenidos hasta el momento. Por su parte, el espectro de ^{13}C -RMN presenta picos desdoblados correspondientes tanto al anillo de escuaramida como de la cumarina (Fig. 128).

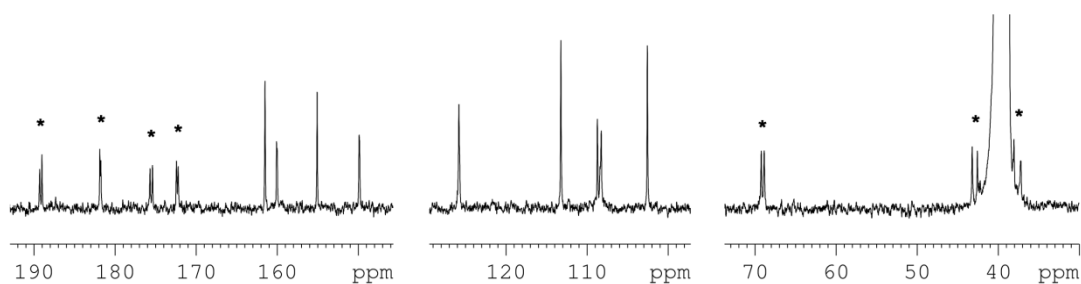


Figura 128 – Espectro de ^{13}C -RMN del producto **104** en DMSO-d_6 donde se han marcado (*) las señales desdobladas.

¹⁹⁸ Karthik, S.; Puvvada, N.; Kumar, B. N. P.; Rajput, S.; Pathak, A.; Mandal, M.; Singh, N. D. P.; Photoresponsive Coumarin-Tethered Multifunctional Magnetic Nanoparticles for Release of Anticancer Drug. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, 5, 5232-5238.

Los experimentos bidimensionales confirman que el compuesto **104** presenta un equilibrio conformacional que resulta característico en compuestos de tipo escuaramida-esquarato (Fig. 129).

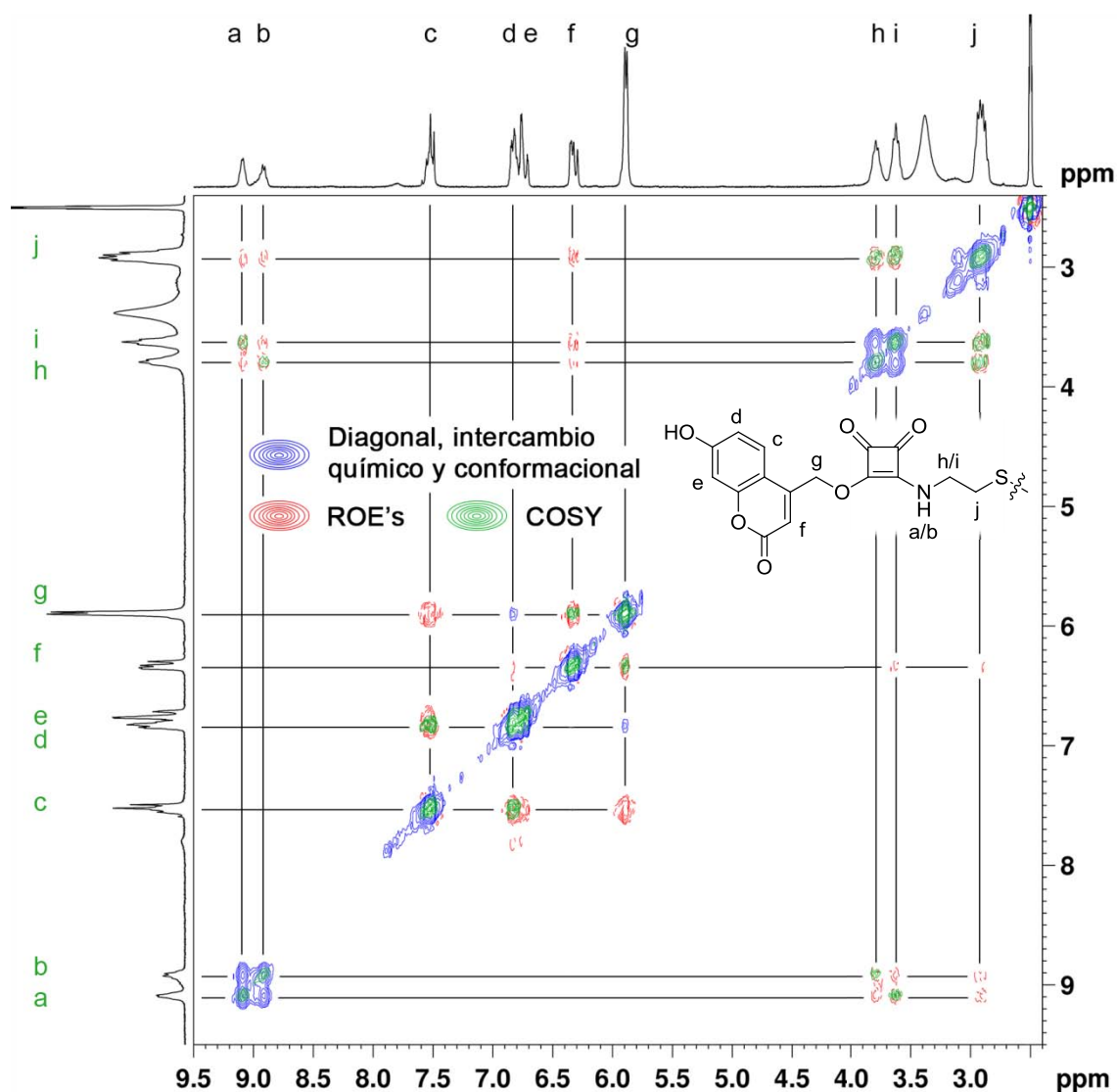


Figura 129 – Superposición de espectros bidimensionales homonucleares de RMN del producto **104**. En color verde se pueden observar los contactos ^1H - ^1H COSY. En azul y rojo los correspondientes al programa de pulsos ROESY, donde se han diferenciado los contactos ROE, negativos (en rojo), y los correspondientes a la diagonal principal junto con los de intercambio químico y conformacional, de signo contrario a los anteriores (en azul).

Es interesante destacar de la figura anterior los contactos ROE observados para el protón f (posición 3 del anillo de cumarina) con prácticamente todos los protones de la cadena alifática debido al intercambio conformacional Z/E observable en las parejas de señales a/b y h/i. Además también se puede observar con menor intensidad, el cambio

conformacional Z/E que experimentan los ésteres de ácidos escuarámicos.¹⁹⁹ Este cambio conformacional se observa con la señal de cruzamiento del protón g (sustitución 4 del anillo de cumarina) a 6,1 y 6,9 ppm.

El espectro UV-Vis del compuesto **104** presenta una banda con un máximo a 270 nm, con un coeficiente de extinción molar de $4,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, correspondiente a la escuaramida, y una banda del fluoróforo con un máximo relativo a 325 nm y coeficiente de extinción molar $1,75 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Por su parte el máximo de la banda de emisión de fluorescencia se sitúa a 472 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$). La intensidad de fluorescencia del conjugado es hasta 25 veces menor al compararla con la cumarina libre debido al “quenching” provocado por la escuaramida. Por otra parte, el rendimiento cuántico a 325 nm es de 0,01 unidades utilizando sulfato de quinina como estándar (Fig. 130).²⁰⁰

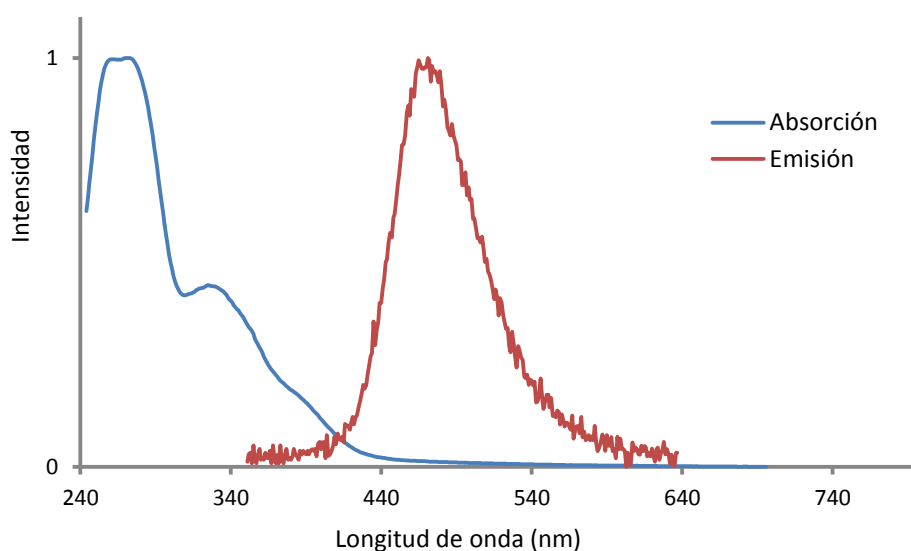
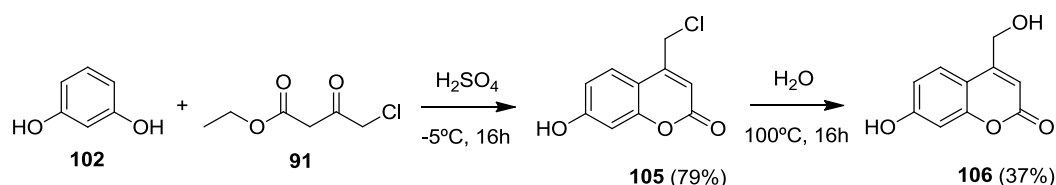


Figura 130 – Espectros de absorción-emisión normalizados del sistema autoinmolativo **104**.

Para estudiar el proceso de autoinmolación con la nueva carga y a efectos de comparación con el compuesto **104**, se ha preparado la cumarina **106** como el producto esperado de la liberación de la carga, mediante una condensación de Pechman, como en los casos anteriores, entre el cloroacetoacetato de etilo **91** y el resorcinol **102**. La cumarina **106** se ha obtenido en un 29% de rendimiento global según el esquema 77, pudiendo obtener así sus propiedades espectroscópicas, necesarias para poder estudiar el proceso autoinmolativo.

¹⁹⁹ Rotger, M. C.; Piña, M. N.; Frontera, A.; Martorell, G.; Ballester, P.; Deyà, P. M.; Costa, A.; Conformational Preferences and Self-Template Macrocyclization of Squaramide-Based Foldable Modules. *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 2302-2308.

²⁰⁰ Se ha usado sulfato de quinina como estándar (Ref. Aldrich 22640), a una concentración $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ en una disolución de HClO_4 0.1 M, considerando un rendimiento cuántico de 0,60 según la referencia bibliográfica: Velapoldi, R. A.; Tonnesen, H. H.; Corrected Emission Spectra and Quantum Yields for a Series of Fluorescent Compounds in the Visible Spectral Region. *J. Fluoresc.*, **2004**, 14, 465-472.



Esquema 77 – Síntesis de la cumarina 106.

Esta cumarina presenta dos bandas de absorción de intensidad variable en función del pH de la disolución. En PBS/1% DMSO, el máximo de absorción se encuentra a 325 nm y el de emisión a 470 nm. El coeficiente de extinción molar a 325 nm es de $1,05 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Fig. 131). La fluorescencia responde linealmente a la concentración hasta valores de $5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ con un rendimiento cuántico en estas condiciones de 0,67 a 325 nm utilizando sulfato de quinina, $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ en medio HClO_4 0,1 M, como estándar.

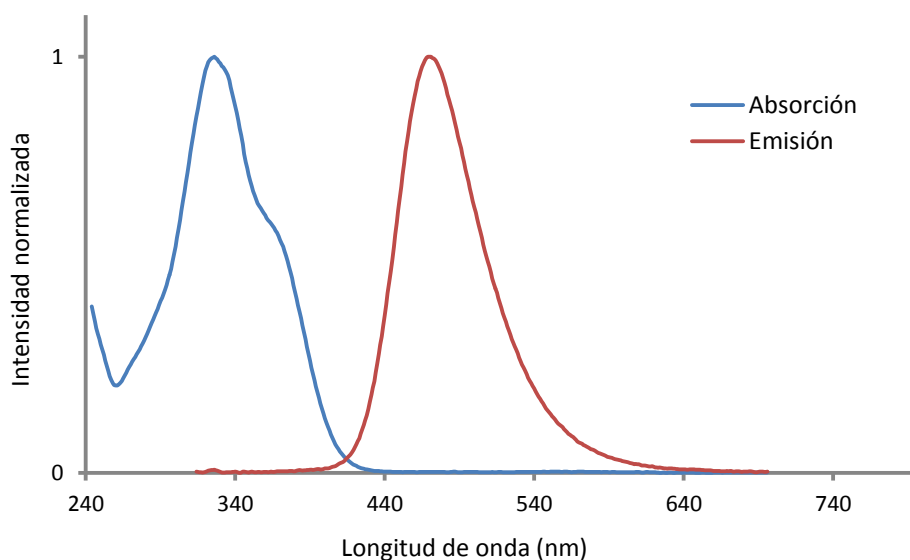


Figura 131 – Espectros de absorción-emisión normalizados de la cumarina 106.

4.6.4.3 Evaluación del sistema autoinmolativo 104 mediante RMN

La evolución temporal del sistema autoinmolativo 104 se ha investigado mediante experimentos de RMN en las condiciones habituales, 104 (1 mM) en PBS/10% DMSO- d_6 y adición de un equivalente de TCEP. De nuevo el sistema autoinmolativo no es demasiado soluble a esta concentración, sin embargo, en esta ocasión la reacción transcurre liberando el fluoróforo 106, aunque a una velocidad menor de lo observado en el caso del modelo simple 97 (Fig. 132). Esta reducción de la velocidad del proceso resulta evidente al observar señales residuales de TCEP en su forma reducida durante más de dos horas después de la adición.

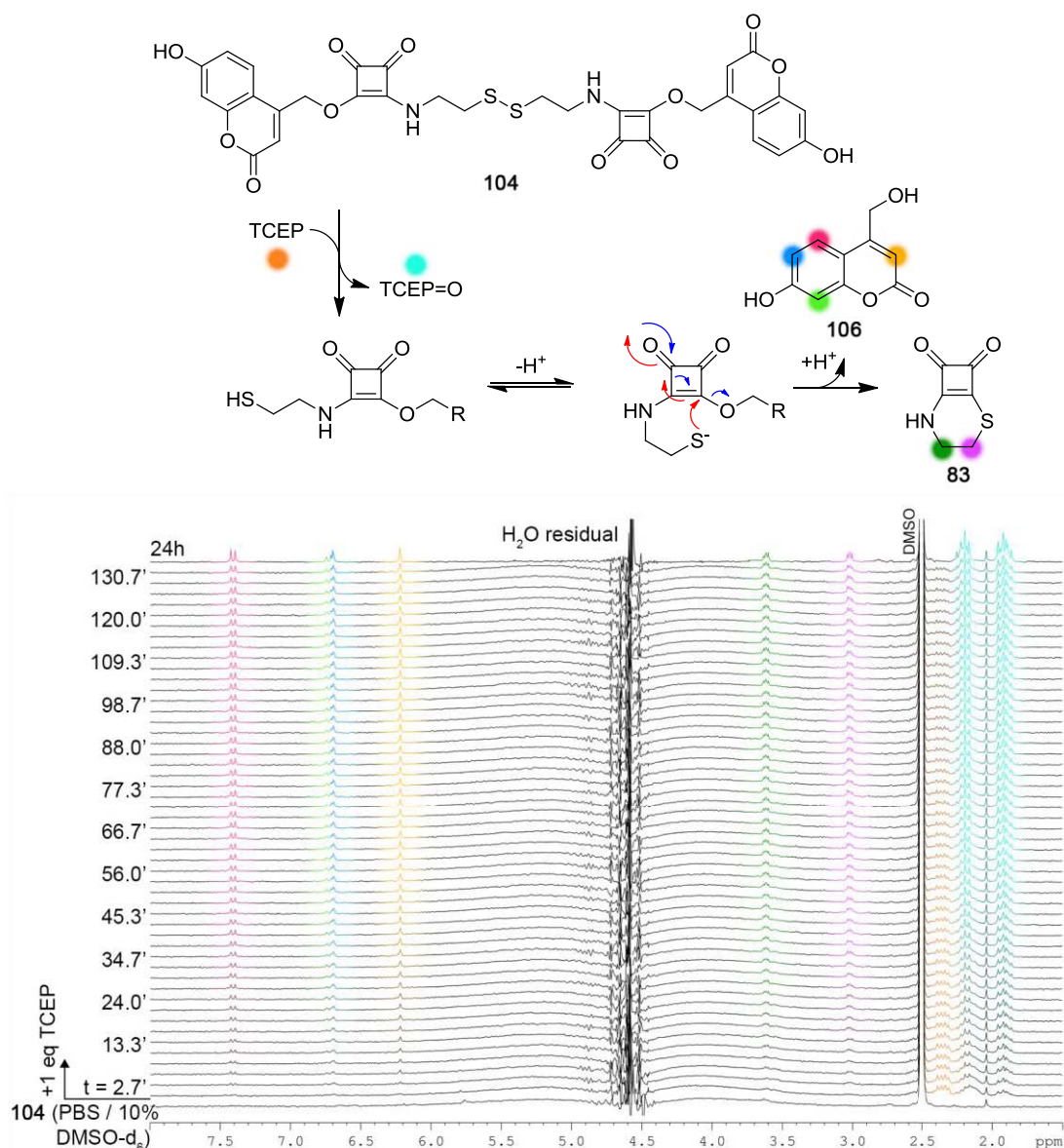


Figura 132 – Mecanismo propuesto de autoinmolación del compuesto **104** (1 mM) mediante reducción con TCEP, asignación de las señales características, y espectros de $^1\text{H-RMN}$ donde se ha señalado la evolución de las señales de la cumarina **106**, el ciclo C1NS **83** y la TCEP en su forma oxidada.

Los espectros obtenidos permiten asegurar que el proceso transcurre tal como se ha diseñado. Se identifican claramente las señales propias de la 7-hidroxi-4-(hidroximetil)cumarina **106**. No obstante, la limitada solubilidad del modelo autoinmolativo **104** no ha permitido obtener unos valores de velocidad de aparición del producto que representen correctamente el proceso.

Se ha comprobado que a una concentración 1 mM es necesario no menos de un 40% de DMSO para que el disulfuro de partida se mantenga en disolución. Al analizar la evolución en estas condiciones se observa que transcurridos tres minutos después de la adición de la TCEP ya se observan los picos correspondientes a los productos finales C1NS **83** y la cumarina **106**, indicando con ello que tanto la reducción como la

autoinmolación tienen lugar de forma muy rápida. Puesto que se quiere estudiar el proceso de autoinmolación en un medio biocompatible, los resultados obtenidos con un 40% de DMSO no son biológicamente relevantes, aunque sí indicativos de un proceso autoinmolativo efectivo.

4.6.4.4 Evaluación del sistema autoinmolativo **104** mediante UV-Vis y fluorimetría

El espectro UV-Vis del compuesto **104** tratado con un equivalente de TCEP en las condiciones estándar ($5,0 \times 10^{-6}$ M, PBS/1% DMSO) muestra la disminución de la banda de la escuramida a 270 nm, acompañada de un incremento de las bandas correspondiente a la cumarina libre **106** (325 nm) y el ciclo C1NS **83** (306 nm) (Fig. 133).

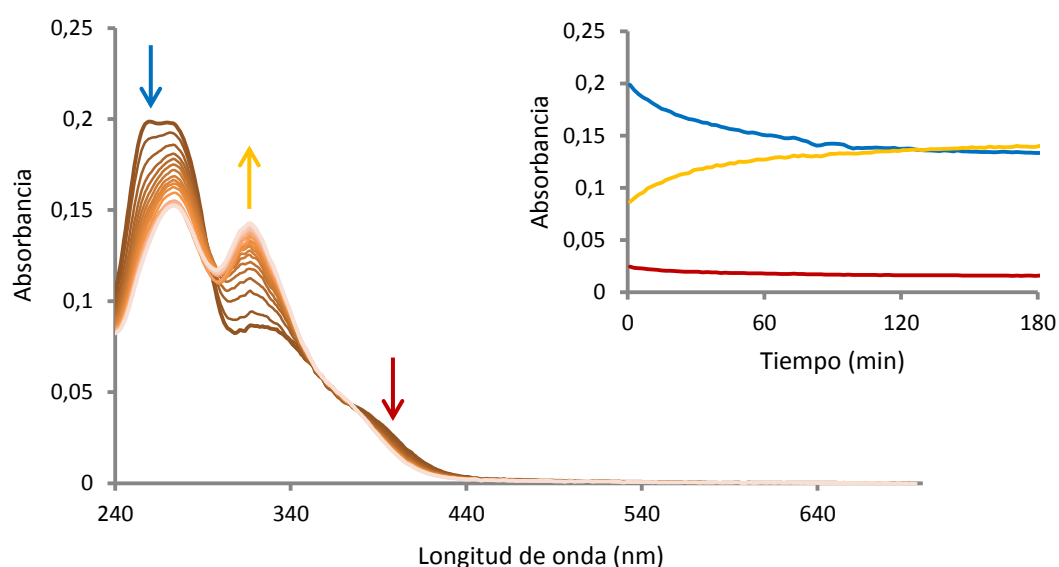


Figura 133 – Evolución temporal del espectro UV-Vis del compuesto **104** ($5,0 \times 10^{-6}$ M, PBS/1% DMSO) al de ser tratado con un equivalente de TCEP ($5,0 \times 10^{-6}$ M). El inserto de la esquina superior derecha muestra la evolución la absorbancia en función del tiempo transcurrido a 260 nm (azul), 320 nm (amarillo) y 400 nm (rojo).

La disminución observada a 400 nm es consistente con la desaparición del conjugado escuarato-cumarina (Fig. 134).

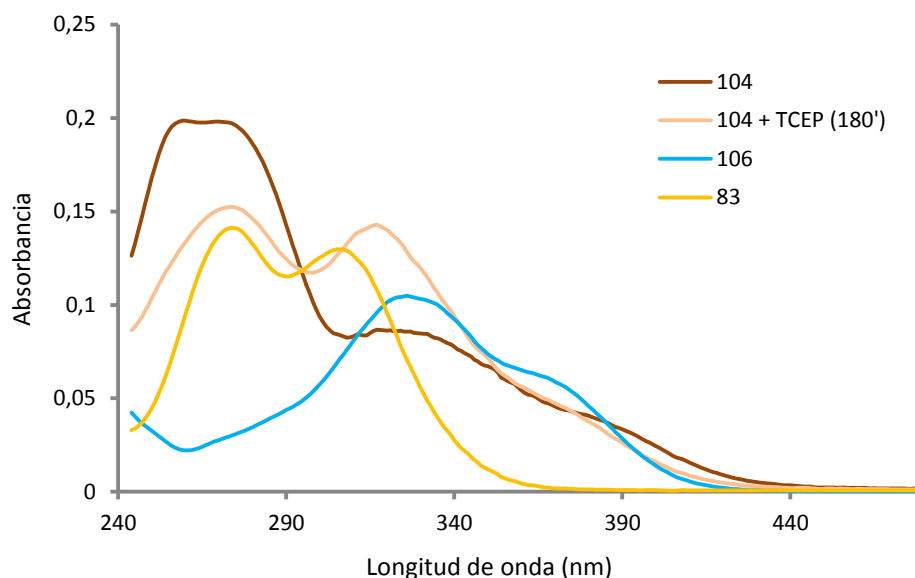


Figura 134 – Superposición de espectros UV-Vis del modelo autoinmolativo **104** ($5,0 \times 10^{-6}$ M, PBS/1% DMSO), **104** + TCEP después de 180 minutos de evolución, del ciclo C1NS **83** ($1,0 \times 10^{-5}$ M, PBS/1% DMSO), y de la cumarina **106** ($1,0 \times 10^{-5}$ M, PBS/1% DMSO).

El mismo experimento realizado mediante fluorimetría ($2,5 \times 10^{-6}$ M, PBS/1% DMSO) muestra un incremento de la intensidad de fluorescencia de más de 16 veces la inicial como resultado de la eliminación de cumarina **106** (Fig. 135).

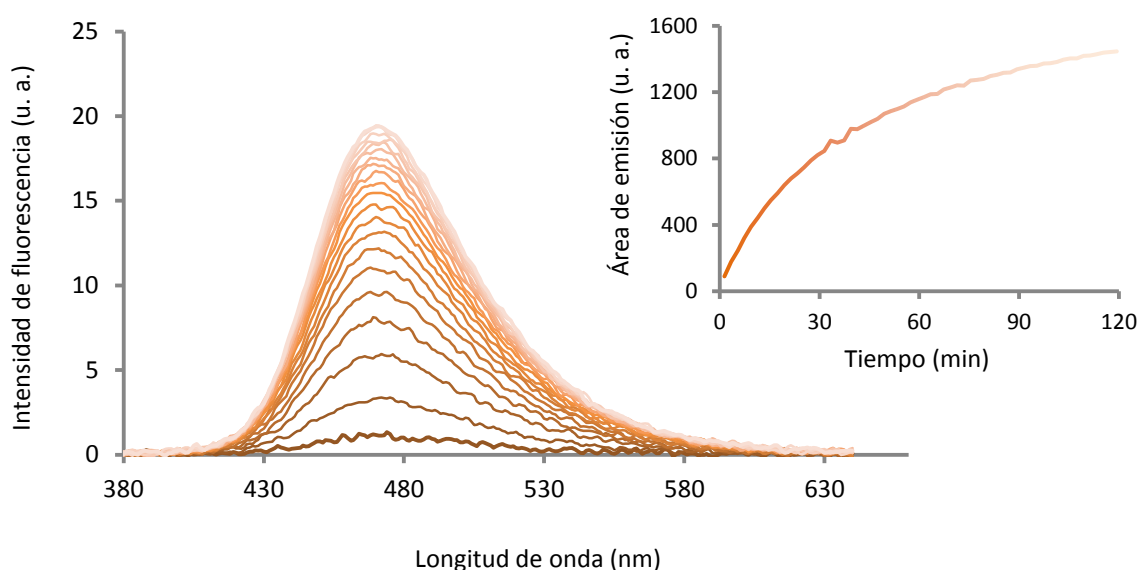


Figura 135 – Evolución del espectro de emisión del compuesto **104** ($2,5 \times 10^{-6}$ M) ($\lambda_{exc} = 325$ nm) al ser tratado con un equivalente de TCEP ($2,5 \times 10^{-6}$ M). El inserto de la esquina superior derecha muestra la evolución del área de la curva de emisión en función del tiempo.

La velocidad inicial de aparición/desaparición se ha calculado a partir del espectro UV-Vis a 320 nm para los diferentes tiempos utilizando las ecuaciones 13 y 15. La velocidad de aparición de la cumarina libre **106** es de $1,2 \times 10^{-9}$ Ms⁻¹. A nivel práctico, se

observa una liberación del 42% del fluoróforo a las dos horas de iniciado el proceso (Fig. 136).

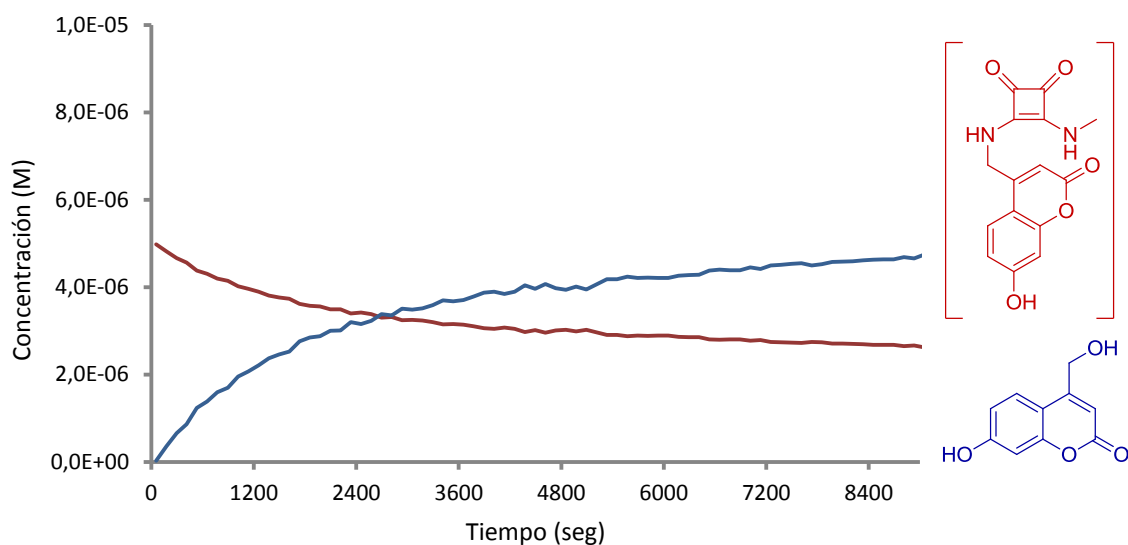


Figura 136 – Representación de las concentraciones del sistema autoinmolativo **104** (rojo) y la cumarina **106** (azul) en función del tiempo transcurrido a 320 nm, calculadas a partir de las ecuaciones 13 y 15.

Para calcular la velocidad de aparición mediante fluorimetría, se debe tomar la precaución de restar al área de la curva de emisión, la correspondiente al conjugado **104**, obteniendo de esta forma la fluorescencia correspondiente a la formación de cumarina **106** mediante el proceso autoinmolativo inducido. Si bien se debería considerar la evolución de la concentración de 104 en función del tiempo, la fluorescencia de este compuesto es muy reducida, por lo cual a medida que se incrementa la concentración de **106**, esta corrección es despreciable. De esta forma se puede calcular la concentración de fluoróforo en función del tiempo y la velocidad de aparición inicial (Fig. 137).

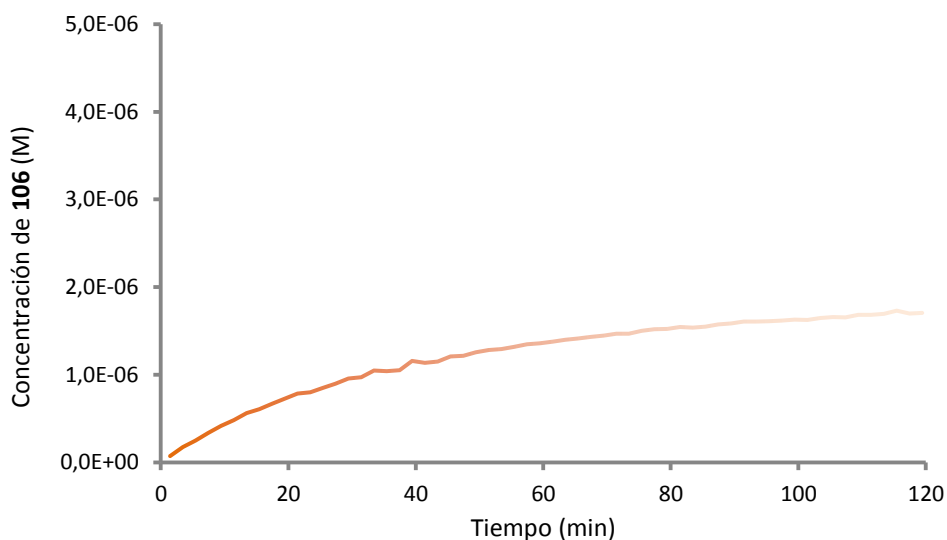


Figura 137 – Evolución de la concentración de la cumarina **106** mediante fluorimetría ($\lambda_{exc} = 325$ nm).

En estas condiciones la velocidad inicial de aparición de la cumarina libre **106** es de $0,8 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$, con una liberación a las dos horas del 34% del fluoróforo, unos resultados ligeramente inferiores aunque del mismo orden de magnitud que los obtenidos mediante espectrometría UV-Vis.

La liberación parcial del fluoróforo observada con ambas técnicas plantea algunos interrogantes. Es posible que la cantidad de reductor no sea suficiente o que la fosfina utilizada se degrade en el medio de reacción. Por ello se han realizado una serie de experimentos utilizando distintas concentraciones y proporciones entre sustrato y reductor (Tabla 18).

Tabla 18 – Resumen de velocidades iniciales de aparición y tanto por ciento de liberación de fluoróforo **106** en función de la concentración de TCEP. Todos los experimentos se han realizado en PBS/1% DMSO.

Técnica	[104]	[TCEP]	Eq. TCEP	$V_0^{106} (\text{Ms}^{-1})$	% 106 en 2h.
Fluo.	$2,5 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-6}$	1	$0,8 \times 10^{-9}$	34%
Fluo.	$2,5 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-6}$	2	$1,2 \times 10^{-9}$	50%
UV-Vis	$5,0 \times 10^{-6}$	$5,0 \times 10^{-6}$	1	$2,5 \times 10^{-9}$	43%
UV-Vis	$5,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-5}$	2	$3,5 \times 10^{-9}$	63%
UV-Vis	$5,0 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-5}$	4	$4,5 \times 10^{-9}$	73%

De la tabla anterior se puede extraer que a medida que se incrementa la concentración de reductor se incrementa la velocidad de formación de la cumarina **106** como corresponde a una reacción de segundo orden. Sin embargo, un aumento de la concentración del producto de partida **104** incrementa la velocidad inicial pero no provoca una mayor liberación de la cumarina.

4.6.4.5 Fotoestabilidad del sistema autoinmolativo **104** en disolución

La fotoestabilidad del sistema autoinmolativo **104** se ha estudiado en medio PBS/1% DMSO a pH 7,4 mediante espectrometría UV-Vis, realizando hasta 55 adquisiciones sucesivas del espectro entre 220 y 700 nm, con un tiempo de adquisición de aproximadamente dos minutos (Fig. 138).

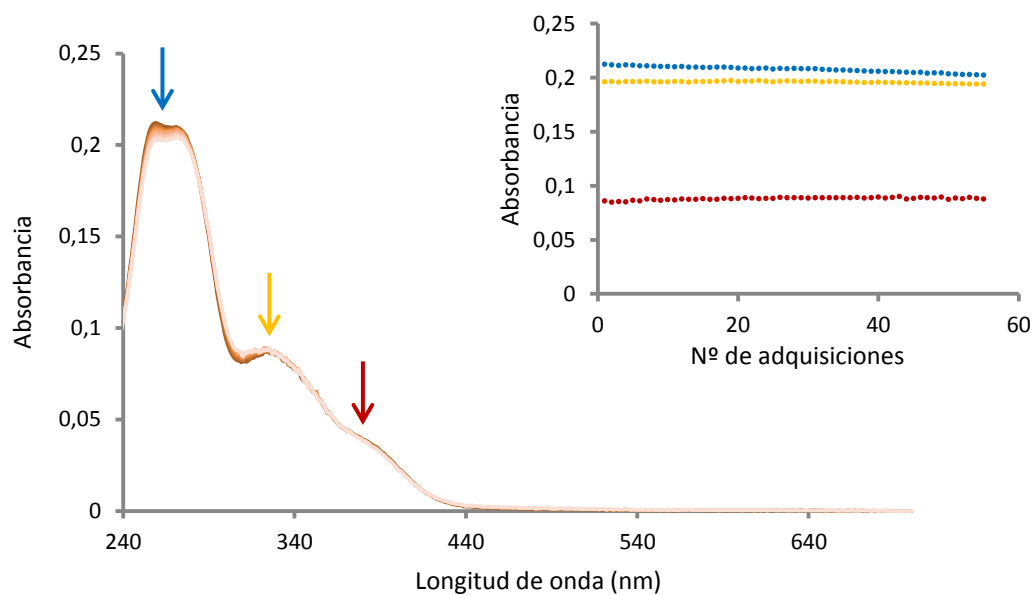


Figura 138 – Evolución del espectro ultravioleta-visible del compuesto **104** ($5,0 \times 10^{-6}$ M, PBS/1% DMSO). El inserto de la esquina superior derecha muestra la evolución de la señal en función del número de espectros de absorción adquiridos a longitudes de onda de 270 (azul), 329 (amarillo) y 370 nm (rojo).

Como se puede observar, la degradación fotoquímica del sistema es prácticamente nula en un período superior a las dos horas, lo que indica que el conjugado es química y fotoquímicamente estable en estas condiciones. Para comprobar si este equilibrio se conserva a diferentes valores de pH, se han realizado estudios de evolución temporal mediante fluorimetría a pH 6,28, 7,67 y 8,83, valores obtenidos mediante la adición de HCl 3M o NaOH 1M a una disolución de PBS. Para la obtención de estos datos se han realizado hasta 60 adquisiciones del espectro de emisión ($\lambda_{exc} = 325$ nm) en intervalos de dos minutos. Los valores obtenidos se han comparado con los obtenidos mediante fluorimetría a la misma concentración mediante la adición de un equivalente del reductor (Fig. 139).

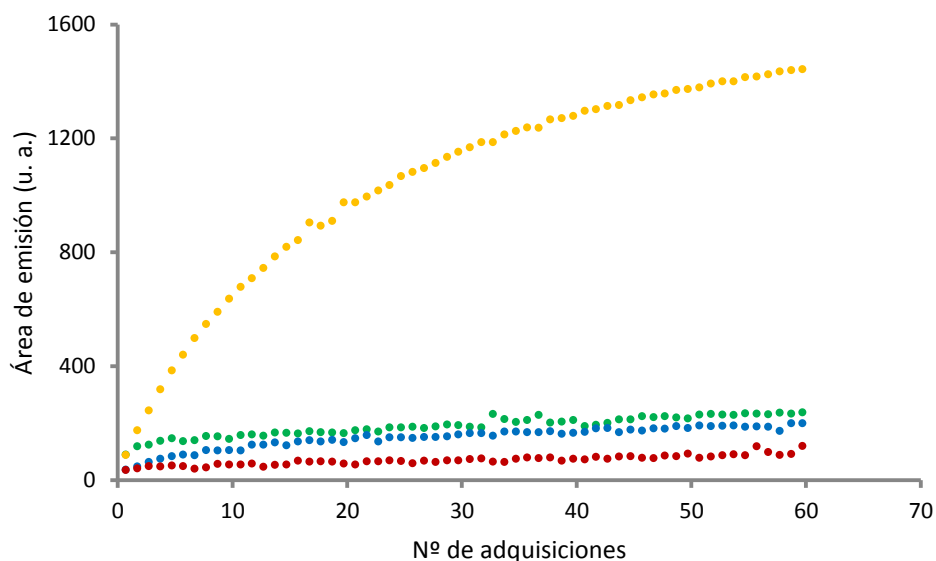


Figura 139 – Evolución del valor de la integral de la banda de emisión del sistema autoinmolativo **104** ($2,5 \times 10^{-6}$ M, 1% DMSO) a pH 6,28 (rojo), 7,67 (azul) y 8,83 (verde). Se han incluido en la comparación los valores de obtenidos del tratamiento del sistema autoinmolativo **104** en presencia del reductor TCEP en PBS/1% DMSO (amarillo).

En este caso no hay adición de ningún reductor, por tanto, la pequeña evolución observada puede deberse a una autoinmolación residual, que no representa un porcentaje global significativo al cabo de dos horas.

4.6.4.6 Estabilidad cinética del sistema autoinmolativo **104** frente a nucleófilos

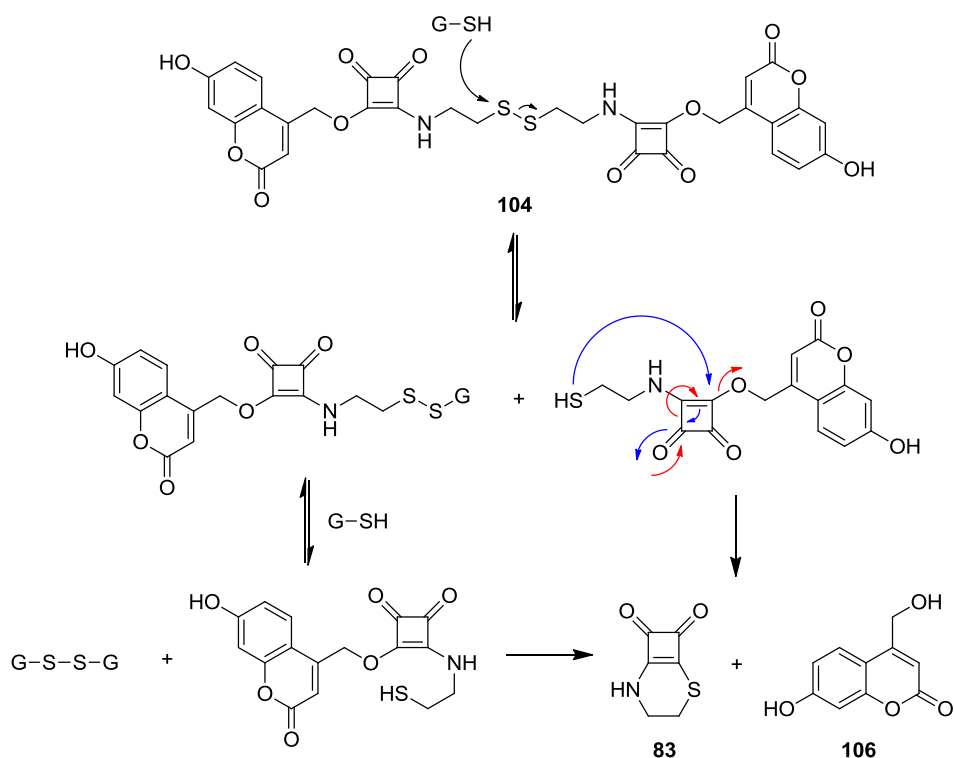
Otro factor a tener en cuenta con miras a una aplicación en sistemas biológicos es su estabilidad frente a otros nucleófilos presentes en el medio, principalmente aminas primarias. Las aminas reaccionan con los ésteres de ácido escuárico y podrían provocar la liberación del fluoróforo sin haberse activado el gatillo de disulfuro.

Por este motivo se ha estudiado la estabilidad del conjugado en presencia de tres aminoácidos, leucina, lisina y arginina, que ofrecen diversas posibilidades de interacción con el sistema autoinmolativo **104**. Los experimentos se han llevado a cabo mediante fluorimetría en medio PBS/1% DMSO añadiendo a una disolución de **104** ($2,5 \times 10^{-6}$ M) y el aminoácido correspondiente ($5,0 \times 10^{-6}$ M). En los tres casos estudiados, la evolución de la fluorescencia observada es similar a la obtenida en el experimento anterior a pH 7,67, indicando que la presencia del aminoácido no influye en la estabilidad del sistema autoinmolativo.

De esta forma se puede asegurar que el sistema autoinmolativo **104** es cinéticamente estable en disolución a valores de pH entre 6,3 y 8,8, según se ha demostrado en el apartado anterior, y además en presencia de otros nucleófilos como aminoácidos a pH fisiológico.

4.6.4.7 Autoinmolación en presencia de GSH como reductor

Los experimentos descritos hasta ahora se han realizado utilizando un reductor muy efectivo como la TCEP pero que no es natural. A nivel biológico el reductor natural más importante es el glutatión (GSH). Tal y como se ha descrito anteriormente, la acción reductora del GSH se debe a la presencia de un grupo tiol, lo que implica una complicación adicional debido a la posibilidad de reacciones de intercambio disulfuro-tiol, esperando la evolución descrita a continuación (Esquema 78).



Esquema 78 – Evolución esperada para el sistema autoinmolativo **104** en una disolución de PBS con una concentración 1 mM de GSH.

Con la finalidad de investigar la viabilidad biológica, el modelo autoinmolativo **104** se ha tratado con GSH a una concentración típica de un entorno intracelular, 1 mM, manteniendo la concentración de **104** constante en función de la técnica utilizada ($5,0 \times 10^{-6}$ M para UV-Vis y $2,5 \times 10^{-6}$ M para fluorimetría) (Fig. 140).

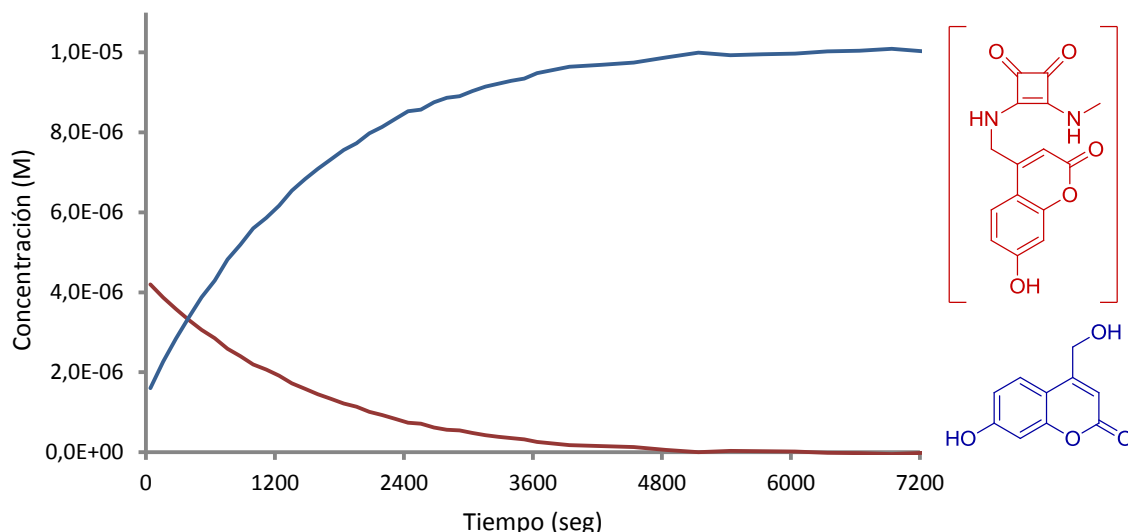


Figura 140 – Representación de las concentraciones del sistema autoinmolativo **104** (rojo) y la cumarina **106** (azul) en función del tiempo transcurrido a 320 nm, calculadas a partir de las ecuaciones 13 y 15.

Las velocidades iniciales de aparición de la cumarina **106** en presencia de GSH (1 mM) son de $5,0 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$ en UV-Vis, con un 95% de liberación del fluoróforo a las dos horas, y de $3,1 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$ mediante fluorimetría, con un 75% de liberación en el mismo tiempo.

Al comparar los valores obtenidos se observa que la velocidad inicial de aparición de fluoróforo libre **106** usando una disolución 1 mM de GSH es muy similar a la obtenida al usar cuatro equivalentes de TCEP (0,02 mM en UV-Vis). Sin embargo, por la propia naturaleza de la reducción de disulfuros mediante el intercambio con otros tioles, GSH en este caso, la velocidad inicial de aparición de cumarina es más lenta. Sin embargo, se alcanzan finalmente valores cercanos al 100% de liberación de la carga del sistema autoinmolativo.

4.6.4.8 Dependencia del proceso autoinmolativo en función del pH del medio

Se ha comprobado anteriormente que un valor de pH comprendido entre 6,3 y 8,8 no afecta a la estabilidad del sistema autoinmolativo **104** (Fig. 140). Sin embargo, es interesante estudiar la dependencia del proceso de autoinmolación en presencia de activadores del gatillo en función del pH, debido a los diferentes valores de pH que existen en los distintos compartimentos intracelulares.

El hecho de usar hidroxycumarinas implica que la fluorescencia de éstas es dependiente del pH de la disolución. Por este motivo es necesario realizar las correcciones oportunas a la hora de calcular las concentraciones liberadas de fluoróforo calculando previamente la intensidad de fluorescencia de **106** en función del pH (Fig. 141).

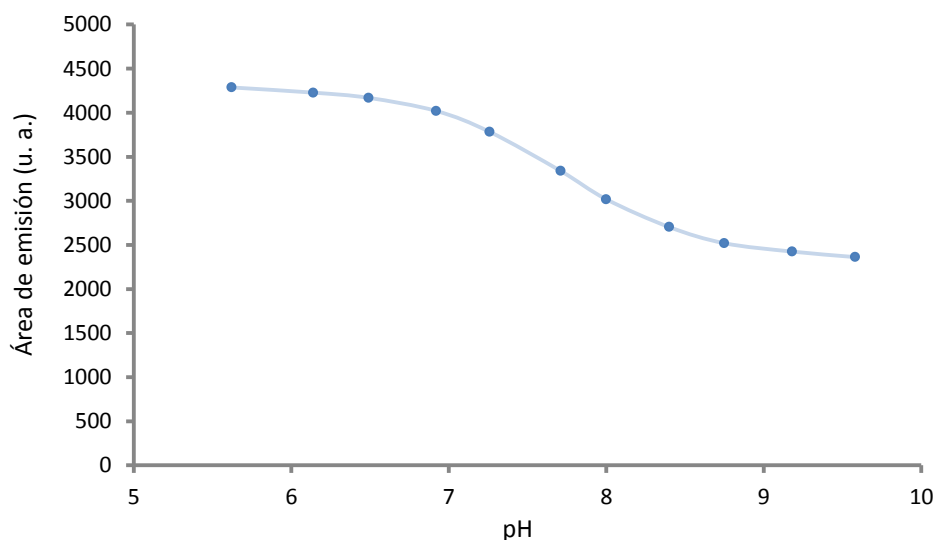


Figura 141 – Área de la curva de emisión de fluorescencia de **106** ($2,5 \times 10^{-6}$ M, 1% DMSO) en función del pH de la disolución ($\lambda_{exc} = 325$ nm).

Mediante fluorimetría se han realizado estudios de evolución del conjugado autoinmolativo **104** en presencia de un equivalente de TCEP utilizando disoluciones de PBS con el pH ajustado a valores de 6,28, 7,67 y 8,83 (Fig. 142).

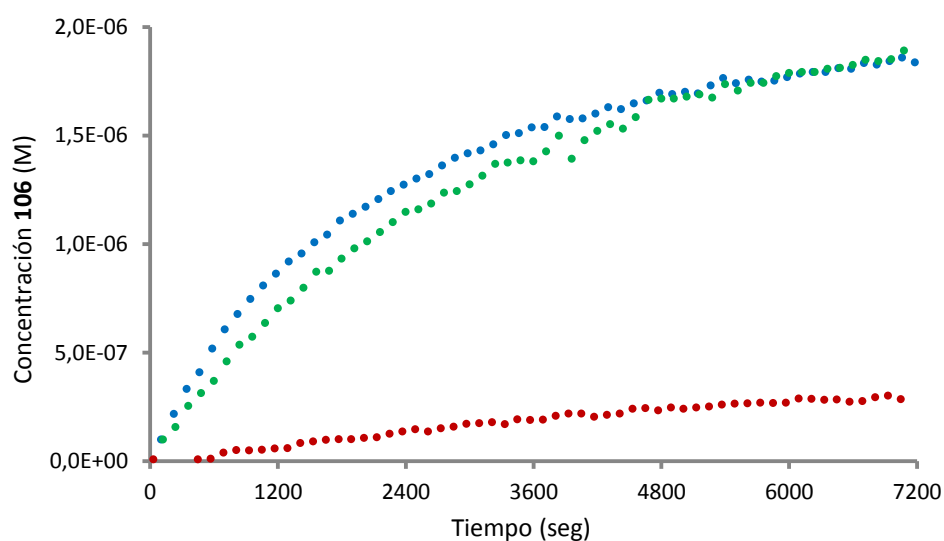


Figura 142 – Evolución del valor de la integral de la banda de emisión de **104** ($2,5 \times 10^{-6}$ M, 1% DMSO, $\lambda_{exc} = 325$ nm) después del tratamiento con un equivalente de TCEP a valores de pH de 6,28 (rojo), 7,67 (azul) y 8,83 (verde).

La tabla 19 presenta los valores de la velocidad de aparición de **106** calculados a partir de los datos de la figura 142.

Tabla 19 – Velocidades iniciales y tantos por ciento de liberación de fluoróforo en función del pH de la disolución.

pH	Cte. Fl. vs [106] (M^{-1})	V_0 (Ms^{-1})	% 106 en 2h.
6,28	$8,4 \times 10^8$	$0,5 \times 10^{-10}$	5,7%
7,67	$6,8 \times 10^8$	$9,2 \times 10^{-10}$	37%
8,83	$5,0 \times 10^8$	$6,7 \times 10^{-10}$	38%

La baja velocidad inicial y avance de la reacción en medio ácido podría deberse a la alteración del equilibrio tiol/tiolato en favor del tiol, que es menos nucleófilo que el tiolato y reduciría la velocidad del proceso de autoinmolación. En cuanto al experimento a pH básico, la menor velocidad inicial observada se puede atribuir a la autooxidación parcial de la TCEP a pH básico.¹⁹² Sin embargo, la velocidad posterior parece no decaer al mismo ritmo que lo hace en la disolución a pH 7,67, un hecho que puede ser debido a la mayor proporción de tiolato, favoreciendo el proceso de ciclación.

4.6.5 Perspectivas de aplicabilidad en sistemas biológicos

Como se ha presentado en el capítulo anterior, las oligoescuaramidas cíclicas se internalizan de forma rápida y específica mediante endocitosis quedando secuestradas principalmente en los endosomas tardíos. De esta forma, la unión de un sistema de transporte como es la oligoescuaramida cíclica, internalizada por endocitosis, con un gatillo especialmente lábil, como son los puentes de disulfuro, podría ser una combinación idónea, dejando el extremo opuesto del disulfuro para la funcionalización mediante espaciadores autoinmolativos y profármacos. Con los resultados obtenidos en este capítulo acerca de la posibilidad de utilizar espaciadores autoinmolativos de ciclación de base escuaramida-éster, la internalización de este conjugado autoinmolativo se daría muy probablemente del mismo modo que la sonda fluorescente C2-BDP **69**, mediante endocitosis. Una vez en el endosoma, un entorno ácido, se reduciría el disulfuro mediante mecanismos redox,¹⁷⁸ para finalmente, una vez recuperado el pH fisiológico, dar lugar al proceso de ciclación autoinmolativo liberando la carga (Fig. 143).

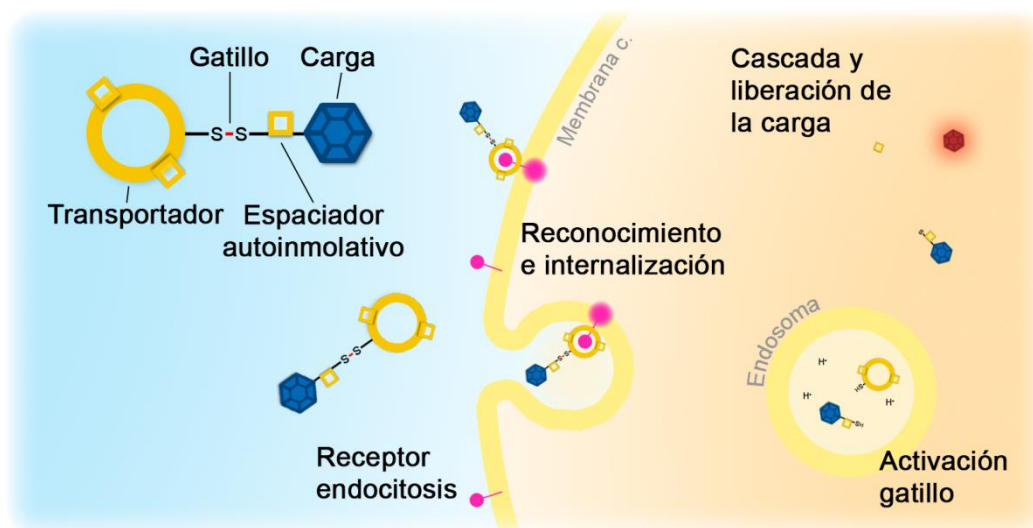


Figura 143 – Representación esquemática de la posible aplicabilidad del sistema autoinmolativo sintetizado.

4.7 Conclusiones

1. Se han sintetizado una serie de compuestos diseñados para evaluar la posibilidad de utilizar escuaramidas como pieza clave de un nuevo sistema autoinmolativo.
2. Se ha determinado que el grupo amino no es capaz de provocar un ataque nucleófilo intramolecular significativo a pH fisiológico sobre derivados de escuaramidas N,N'-sustituidas.
3. Se ha probado que la utilización de tioles como nucleófilos sobre escuaramidas N,O sustituidas resulta ser adecuada. El sistema autoinmolativo evoluciona a pH fisiológico, obteniendo velocidades de aparición de la carga del orden de 10^{-9} Ms^{-1} . A nivel práctico, y en función del sistema utilizado, implica la liberación de entre un 30% y un 100% de la carga a las dos horas.
4. La mayor velocidad de liberación de la carga, $5,0 \times 10^{-9} \text{ Ms}^{-1}$, se ha conseguido mediante el uso de GSH a una concentración típica de un entorno intracelular, 1 mM, consiguiendo en este caso una liberación superior al 95% en dos horas.
5. Se ha comprobado tanto la estabilidad cinética como la fotoestabilidad del conjugado en disolución acuosa a diferentes valores de pH y en presencia de diferentes aminoácidos. Sin embargo, el pH de la disolución sí que parece influenciar en la evolución del proceso autoinmolativo, reduciendo la velocidad de éste a pH ácido.
6. El sistema desarrollado permite plantear la posibilidad de aplicarlo, en estudios posteriores, a una finalidad terapéutica, mediante el uso de la oligoescuaramida C2 como transportador y un profármaco como carga.

4.8 Métodos experimentales

Todos los disolventes utilizados han sido adquiridos a Scharlau y Sigma-Aldrich. Cuando ha sido necesario, estos disolventes se han secado y destilado según los procedimientos indicados en la bibliografía.²⁰¹ El agua utilizada en los procesos de síntesis, elaboración o preparación de muestras se ha purificado por electroósmosis con un equipo ELIX10 (Millipore) y, posteriormente, por tratamiento a través de un equipo MilliQ (Millipore) consiguiendo una resistividad máxima de 18,2 MΩ.

Los disolventes deuterados utilizados en los experimentos de RMN se han adquirido con calidad espectroscópica para RMN con una riqueza del 99,98% siendo utilizados sin tratamiento previo.

Todos los reactivos y sales utilizados han sido adquiridos a través de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Panreac o TCI Chemicals. Se han utilizado sin purificación previa a no ser que se indique lo contrario.

El sistema RF-HPLC utilizado para la purificación de los productos ha sido un sistema Gilson, equipado con bombas modelo 321 y un módulo detector UV-Vis-152.

Los espectros de RMN (^1H y ^{13}C) se han registrado en un instrumento Bruker AVANCE-300 o bien mediante un instrumento Bruker AVANCE 600 MHz. Los desplazamientos químicos indicados en ppm están referenciados a la señal residual del disolvente utilizado en el caso de DMSO y CDCl_3 . En el caso de los espectros realizados exclusivamente en D_2O , se ha utilizado la sal sódica del ácido 3-(trimetilsilil)-1-propanosulfónico como patrón interno. Los espectros de masas se han registrado con un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) Micromass AutoSpec 3000, provisto de un sistema de entrada de la muestra mediante electroespray (ESI) o bien mediante un sistema Bruker Autoflex MALDI-TOF.

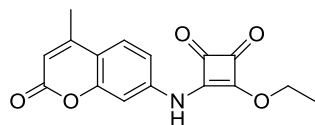
La obtención de los espectros UV-Vis se ha realizado mediante un espectrómetro UV-Vis modelo Varian Cary 300 Bio de doble haz. Para los espectros de emisión de fluorescencia se ha utilizado un espectrofotómetro Varian Cary Eclipse.

El tampón PBS se prepara mediante la disolución de un preparado salino (Ref. P5368 Sigma-Aldrich) en un litro de agua, obteniendo una concentración final de fosfato 0,01 M, NaCl 0,138 M y KCl 0,0027 M, con un pH 7,4.

²⁰¹ Armarego, W. L. F.; Chai, C.; Purification of Laboratory Chemicals, 6th Ed., 2009, Butterworth Heinemann, Elsevier. Oxford, UK.

4.8.1 Síntesis

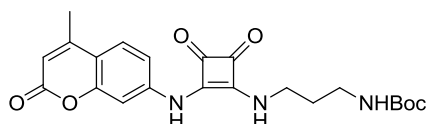
Éster escuaramídico **76**:



Una suspensión de 4-metil-7-aminocumarina **75** (0,5 g, 2,85 mmol), triflato de zinc (104 mg, 0,285 mmol), Et₃N (438 µl, 3,14 mmol) y escuarato de dietilo **1** (0,971 g, 5,71 mmol) en EtOH (23 ml) se mantiene durante 16 horas a reflujo en atmósfera de argón. La disolución resultante se concentra. El residuo se lava con acetonitrilo (15 ml). La mezcla resultante se enfría, se filtra y se lava con acetonitrilo frío (2 x 5 ml), obteniendo **76** como un sólido amarillo (0,759 g, 2,57 mmol). Rdto: 90%

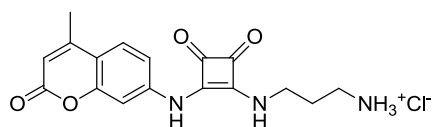
¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,44 (t, ³J(H,H) = 7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 2,38 (d, ⁴J(H,H) = 1,1 Hz, 3H, CCH₃⁽⁴⁾), 4,80 (q, ³J(H,H) = 7,1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 6,25 (d, ⁴J(H,H) = 1,2 Hz, 1H, CH⁽³⁾CCH₃), 7,37 (dd, ³J(H,H) = 8,6 Hz, ⁴J(H,H) = 2,2 Hz, 1H, CH⁽⁶⁾CH), 7,42 (d, ⁴J(H,H) = 1,9 Hz, 1H, CH⁽⁸⁾C), 7,71 (d, ³J(H,H) = 8,6 Hz, 1H, CH⁽⁵⁾CH), 11,04 (br, 1H, NHC). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 15,6, 18,0, 70,0, 105,8, 112,4, 115,2, 126,4, 141,7, 153,1, 153,8, 159,9, 169,4, 179,4, 184,2, 187,3. HRMS (ESI) calc. para 322,0691 (M+Na⁺; C₁₆H₁₃NNaO₅⁺) encontrado: 322,0679.

Diescuaramida **77**:

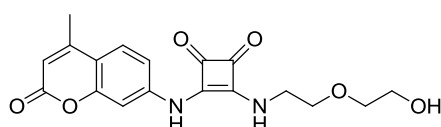


El semiéster **76** (0,124 g, 0,41 mmol) se suspende en una disolución de la amina **43** (88 mg, 0,46 mmol) en EtOH (21 ml). La reacción se mantiene a reflujo durante 16 horas. Posteriormente se concentra y se lava con Et₂O frío (2 x 15 ml) y acetonitrilo (2 x 10 ml), obteniendo el producto **77** como un sólido amarillo (0,129 g, 0,30 mmol). Rdto: 73%

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,38 (s, 9H, C(CH₃)₃), 1,69 (t, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2,40 (s, 3H, CCH₃⁽⁴⁾), 3,02 (q, ³J(H,H) = 6,0 Hz, 2H, CH₂NHCOO), 3,62 (q, ³J(H,H) = 5,7 Hz, 2H, CH₂NHCCO), 6,24 (s, 1H, CH⁽³⁾CCH₃), 6,89 (br, 1H, NHCOO), 7,31 (dd, ³J(H,H) = 8,7 Hz, ⁴J(H,H) = 2,2 Hz, 1H, CH⁽⁶⁾CH), 7,60 (s, 1H, CH⁽⁸⁾C), 7,73 (d, ³J(H,H) = 8,7 Hz, 1H, CH⁽⁵⁾CH), 7,74 (br, 1H, NHCCO), 10,05 (br, 1H, NHC). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 18,0, 28,2, 31,0, 36,9, 41,5, 77,6, 104,6, 111,7, 114,2, 126,6, 142,5, 153,1, 154,3, 155,7, 160,0, 162,6, 169,8, 180,2, 184,7. HRMS (ESI) calc. para 450,1641 (M+Na⁺; C₂₂H₂₅N₃NaO₆⁺) encontrado: 450,1638.

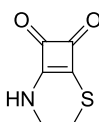
Diescuaramida 78:

El producto **78** (19 mg, 0,044 mmol) se disuelve en una disolución acuosa (6 ml) de HCl (30 μ l 3M, 0,089 mmol). Ésta se lleva a 100 °C durante 5 horas y posteriormente se evapora el disolvente a sequedad, aislándose el clorhidrato **78** como un sólido amarillo (15 mg, 0,041 mmol), que se usa en los estudios de autoinmolación sin realizar ninguna etapa de purificación posterior. Rdto: 93%

Diescuaramida 80:

El semiéster **76** (0,1 g, 0,334 mmol) se suspende en EtOH (17 ml). A esta disolución se adiciona 2-(2-aminoetoxi)etanol **79** (47 μ l, 0,47 mmol) y la disolución se deja a reflujo durante 16 horas. Seguidamente el crudo se lleva a sequedad obteniendo un sólido naranja que se lava con acetonitrilo (2 x 10 ml) para obtener el producto **80** como un sólido de color amarillo (96 mg, 0,27 mmol). Rdto: 80%

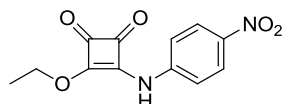
^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2,39 (s, 3H, $\text{CCH}_3^{(4)}$), 3,51 (m, 4H, CH_2O), 3,60 (t, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 4,9$ Hz, 2H, CH_2OH), 3,78 (br, 2H, CH_2NH), 4,64 (br, 1H, CH_2OH), 6,23 (d, $^4\text{J}(\text{H,H}) = 0,8$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(3)}\text{CCH}_3$), 7,29 (dd, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8,6$ Hz, $^4\text{J}(\text{H,H}) = 2,2$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(6)}\text{CH}$), 7,61 (s, 1H, $\text{CH}^{(8)}\text{C}$), 7,71 (d, $^3\text{J}(\text{H,H}) = 8,6$ Hz, 1H, $\text{CH}^{(5)}\text{CH}$), 7,91 (br, 1H, NHCH_2), 10,09 (br, 1H, NHC). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 18,0, 43,8, 60,1, 69,8, 72,2, 104,6, 111,7, 114,2, 126,6, 142,6, 153,2, 154,3, 160,0, 162,6, 169,7, 180,2, 184,7. HRMS (ESI) calc. para 381,1063 ($\text{M}+\text{Na}^+$; $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_6^+$) encontrado: 381,1068.

Ciclo C1NS 83:

Una disolución de escuarato de dietilo **1** (1,0 g, 5,88 mmol) en EtOH (30 ml) se adiciona gota a gota sobre otra de cistamina **81** (453 mg, 5,88 mmol) en H_2O (21 ml) previamente desoxigenada mediante una corriente de argón. La mezcla se mantiene con agitación durante 1 hora. Durante este tiempo se forma un precipitado que se filtra y se lava con H_2O (15 ml) y Et_2O (15 ml), obteniendo el producto **83** (411 mg, 2,65 mmol) como un sólido amarillo pálido. Rdto: 45%

^1H RMN (300 MHz, D_2O :20% DMSO-d_6): $\delta = 3,22$ (m, $J(\text{H,H}) = 4,8$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{S}$), $3,81$ (m, $J(\text{H,H}) = 4,8$ Hz, 2H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{S}$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 25,2, 46,2, 161,2, 178,4, 186,2, 187,0$.

Éster escuaramídico **85**:

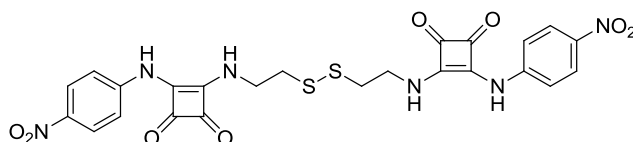


Sintetizado según el procedimiento descrito en la bibliografía con algunas modificaciones.²⁰²

Una disolución de escuarato de dietilo **1** (530 mg, 3,11 mmol), p-nitroanilina **84** (359 mg, 2,60 mmol) y triflato de zinc (189 mg, 0,52 mmol) en EtOH (26 ml) se mantiene en agitación durante 1 hora. Posteriormente se concentra, el residuo se suspende en H_2O (15 ml) y se añade HCl 3M (50 μl). El sólido resultante se centrifuga y se disuelve en CH_2Cl_2 (20 ml) y se separa la fracción insoluble mediante filtración. El CH_2Cl_2 se evapora y el sólido obtenido se lava con NH_4Cl 1M (10 ml) y H_2O (10 ml), aislándose un sólido naranja. Este sólido se recristaliza en AcOEt (25 ml), obteniendo agujas de color naranja que corresponden al producto **85** (442 mg, 1,69 mmol). Rdto: 65%

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,56$ (t, $^3J(\text{H,H}) = 7,1$ Hz, 3H, CH_2CH_3), $4,94$ (q, $^3J(\text{H,H}) = 7,1$ Hz, 2H, CH_2CH_3), $7,47$ (dd, $^3J(\text{H,H}) = 7,2$ Hz, $^4J(\text{H,H}) = 2,1$ Hz, 2H, CHCNH), $8,26$ (dd, $^3J(\text{H,H}) = 7,2$ Hz, $^4J(\text{H,H}) = 2,1$ Hz, 2H, CHCNO_2), $8,45$ (br, 1H, NH). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 15,5, 70,1, 118,9, 125,2, 142,3, 144,3, 169,2, 179,8, 184,7, 187,2$.

Bis-(diescuaramida) **86**:



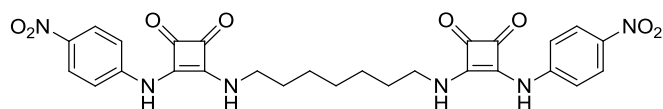
El semiéster **85** (0,2 g, 0,76 mmol) se adiciona sobre una disolución del diclorhidrato de cisteamina (86 mg, 0,38 mmol) y DiPEA (139 μl , 0,80 mmol) en EtOH (15 ml) formándose una suspensión. La suspensión se agita en atmósfera de argón a 70 °C durante 30 minutos y luego se deja enfriar progresivamente hasta alcanzar la temperatura ambiente manteniendo la agitación un total de 16 horas. Transcurrido este período se observa la formación de un precipitado. El sólido se filtra y se lava con EtOH (10 ml). La purificación se lleva a cabo disolviendo el producto en DMF (20 ml) y añadiendo H_2O (40 ml), con lo que se obtiene un precipitado que se aísla por

²⁰² Rostami, A.; Colin, A.; Li, X. Y.; Chudzinski, M. G.; Lough, A. J.; Taylor, M. S.; N,N'-Diarylsquaramides: General, High-Yielding Synthesis and Applications in Colorimetric Anion Sensing. *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 3983-3992.

centrifugación. Una vez lavado con H₂O (10 ml) se obtiene el compuesto **86** como un sólido naranja (46 mg, 0,079 mmol). Rdto: 21%

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3,03 (br, 4H, CH₂S), 3,94 (br, 4H, CH₂NH), 7,59 (d, ³J(H,H) = 8,4 Hz, 4H, CHCNH), 7,96 (br, 2H, NHCH₂), 8,20 (d, ³J(H,H) = 9 Hz, 4H, CHCNO₂), 10,28 (br, 2H, NHC). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 38,3, 42,6, 117,7, 125,6, 141,4, 145,2, 162,3, 170,1, 180,3, 185,2. HRMS (ESI) calc. para 753,1737 (M+Na⁺; C₃₀H₃₄N₈NaO₁₀⁺) encontrado: 753,1751.

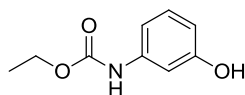
Bis-(diescuaramida) **87**:



Una suspensión del semiéster **85** (0,1 g, 0,38 mmol) y heptildiamina **39** (25 mg, 0,19 mmol) en EtOH (15 ml) se mantiene en agitación durante 16 horas. Posteriormente se concentra la disolución y se disuelve en DMF (20 ml). La adición de Et₂O (30 ml) provoca la aparición de un precipitado, el cual se filtra y lava con H₂O (20 ml) y EtOH (10 ml) aislándose un sólido de color rojo oscuro que corresponde al producto **87** (51 mg, 0,091 mmol). Rdto: 47%

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,34 (br, 6H, CH₂(CH₂)₃CH₂), 1,57 (br, 4H, CH₂(CH₂)₃CH₂), 3,60 (t, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 4H, CH₂NH), 7,24 (br, 0,4H, NH), 7,55 (d, ³J(H,H) = 8,6 Hz, 4H, CHCNH), 7,83 (br, 1,3H, NH), 8,16 (d, ³J(H,H) = 8,6 Hz, 4H, CHCNO₂), 10,02 (br, 0,6H, NH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 25,7, 28,1, 30,5, 43,7, 118,1, 125,5, 140,8, 146,8, 163,4, 170,7, 181,0, 185,1. HRMS (ESI) calc. para 731,2765 (M+Na⁺; C₃₃H₄₀N₈NaO₁₀⁺) encontrado: 731,2768.

Etil (3-hidroxifenil)carbamato **90**:



El producto se obtiene según el procedimiento descrito en la bibliografía modificando el procedimiento de elaboración.²⁰³

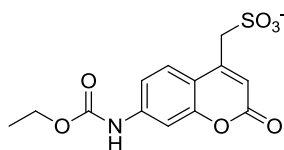
El aminofenol **88** (25 g, 229 mmol) se disuelve en AcOEt (115 ml) a 80 °C durante 30 minutos. Posteriormente se añade gota a gota durante un período de 90 minutos una disolución de cloroformato de etilo **89** (12,4 g, 115 mmol) en AcOEt (5 ml). Pasadas las 2 horas totales de reacción, se elimina el disolvente obteniendo un líquido viscoso

²⁰³ Maly, D. J.; Leonetti, F.; Backes, B. J.; Dauber, D. S.; Harris, J. L.; Craik, C. S.; Ellman, J. A.; Expedient Solid-Phase Synthesis of Fluorogenic Protease Substrates Using the 7-Amino-4-carbamoylmethylcoumarin (ACC) Fluorophore. *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 910-915.

marrón oscuro. Éste se diluye con Et₂O (150 ml) y se lava con HCl 1M (2 x 50 ml), una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 50 ml), H₂O (50 ml) y una disolución saturada de NaCl (50 ml). La disolución orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se concentra obteniendo un sólido de color marrón claro que corresponde al producto **90** (19,59 g, 108 mmol). Rdto: 94%

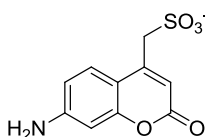
¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 1,31 (t, ³J(H,H) = 7,1 Hz, 3H, CH₂CH₃), 4,23 (q, ³J(H,H) = 7,1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 6,26 (br, 1H, COH), 6,55-6,65 (br, 3H, CHCHCHC(OH)CH), 7,13 (t, ³J(H,H) = 8,1 Hz, 1H, CHCHCH), 7,35 (br, 1H, NHCOO). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14,6, 61,7, 106,0, 110,6, 110,8, 130,1, 139,1, 154,0, 157,0.

4-sulfonatometil-7-(etoxicarbonil)amino cumarina **93**:



El producto se obtiene según el procedimiento descrito en la bibliografía a partir del fenol **90** y 4-cloroacetoacetato de etilo **91**.²⁰⁴

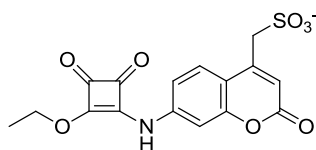
4-sulfonatometil-7-amino cumarina **94**:



La cumarina **93** (2,0 g, 5,10 mmol) se disuelve en una mezcla de AcOH (4,25 ml) y H₂SO₄ (4,25 ml) y se agita durante 2 horas a 125 °C. La disolución se deja enfriar a temperatura ambiente y se vierte sobre EtOH (100 ml) enfriado a -10 °C, observándose la formación de un precipitado. La mezcla se agita a dicha temperatura durante 30 minutos y posteriormente se filtra y lava con EtOH (150 ml). El precipitado, de color marrón claro, corresponde a la sal amónica del producto **94** (1,674 g, 4,46 mmol). Rdto: 88%

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 3,88 (s, 2H, CH₂⁽⁴⁾SO₃⁻), 5,95 (s, 1H, CH⁽³⁾CO), 6,42 (d, ⁴J(H,H) = 2,1 Hz, 1H, CH⁽⁸⁾C), 6,54 (dd, ³J(H,H) = 8,7 Hz, ⁴J(H,H) = 2,1 Hz, 1H, CH⁽⁶⁾CH), 5,57 (d, ³J(H,H) = 8,7 Hz, 1H, CH⁽⁵⁾CH). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 53,3, 100,3, 110,2, 110,5, 112,1, 128,1, 149,9, 150,3, 155,4, 160,8.

²⁰⁴ Woronoff, G.; El Harrak, A.; Mayot, E.; Schicke, O.; Miller, O. J.; Soumillion, P.; Griffiths, A. D.; Ryckelynck, M.; New Generation of Amino Coumarin Methyl Sulfonate-Based Fluorogenic Substrates for Amidase Assays in Droplet-Based Microfluidic Applications. *Anal. Chem.*, **2011**, 83, 2852-2857.

Éster escuaramídico 95:

La cumarina **94** (266 mg, 0,71 mmol), triflato de zinc (39 mg, 0,11 mmol) y Et_3N (317 μl , 2,27 mmol) se disuelven en EtOH (8,8 ml) y se mantienen en agitación durante 30 minutos. Posteriormente se añade una disolución de escuarato de dietilo **1** (320 μl , 2,16 mmol) en EtOH (2 ml) y se mantiene la disolución a reflujo 16 horas. El sólido resultante se filtra y se purifica mediante HPLC de fase reversa, aislándose la sal de amino del producto **95** como un sólido amarillo (93 mg, 0,23 mmol). Pureza determinada por HPLC: > 95% Rdto: 33%

Procedimiento seguido para la purificación mediante HPLC:

Columna: XBridge™ Prep C18 OBD™ 5 μm , 19x150 mm, de Waters.

Fase móvil: Eluyente A (H_2O , 10 mM AcONH_4 , pH 4,45). Eluyente B (Acetonitrilo).

Perfil de elución: 0'-1' (10% B); 1'-9,5' (10-30% B); 9,5'-11,5' (30% B); 11,5'-13,5' (30-10%); 13,5'-15,5' (10% B). 17 ml/min.

Tiempo de elución: 6,0'.

Longitud de onda de detección: 350 nm.

Procedimiento para la determinación de la pureza mediante HPLC:

Columna: XBridge™ C18 5 μm , 4,6x150 mm, de Waters.

Fase móvil: Eluyente A (H_2O , 10 mM AcONH_4 , pH 4,45). Eluyente B (Acetonitrilo).

Perfil de elución: 0'-1' (10% B); 1'-9,5' (10-30% B); 9,5'-11,5' (30% B); 11,5'-13,5' (30-10%); 13,5'-15,5' (10% B). 1,0 ml/min.

Tiempo de elución: 8,5'.

Longitud de onda de detección: 290-350-380 nm.

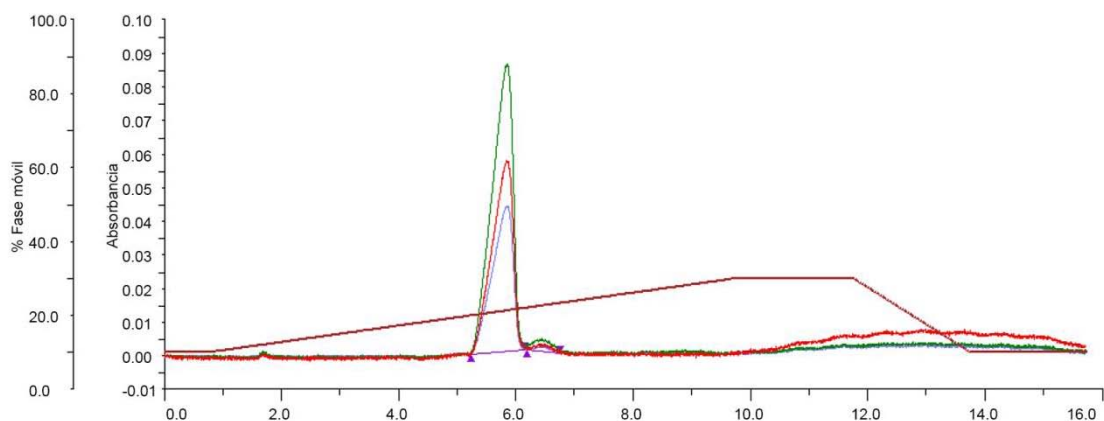
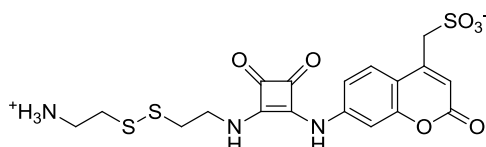


Figura 144 – Traza de HPLC del éster escuaramídico 95 purificado mediante HPLC. Área de la señal principal: 98%.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,45 (t, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 7,1 Hz, 3H, CH_2CH_3), 4,01 (s, 2H, $\text{CH}_2^{(4)}\text{SO}_3^-$), 4,81 (q, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 7,2 Hz, 2H, CH_2CH_3), 6,27 (s, 1H, $\text{CH}^{(3)}\text{CO}$), 7,34 (dd, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 8,9 Hz, $^4\text{J}(\text{H,H})$ = 2,2 Hz, 1H, $\text{CH}^{(6)}\text{CH}$), 7,43 (d, $^4\text{J}(\text{H,H})$ = 7,2 Hz, 1H, $\text{CH}^{(8)}\text{C}$), 7,91 (d, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 8,7 Hz, 1H, $\text{CH}^{(5)}\text{CH}$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6 , sal de Et_3N): δ = 8,7, 15,7, 45,8, 53,3, 70,0, 105,7, 114,4, 114,9, 114,9, 128,3, 141,1, 150,0, 154,1, 160,1, 169,4, 179,3, 184,3, 187,4. HRMS (ESI $^-$) calc. para 378,0284 (M^- ; $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{NO}_8\text{S}^-$) encontrado: 378,0298.

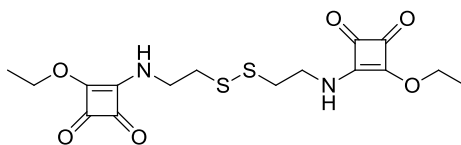
Diescuaramida 96 :



Una disolución del diclorhidrato de cisteamina **82** (41 mg 0,18 mmol) y Et_3N (50 μl , 0,36 mmol) en EtOH (5 ml) se mantiene en agitación durante 30 minutos. Posteriormente, se añade una suspensión del semiéster **95** (142 mg, 0,36 mmol) en EtOH (7 ml). La mezcla se mantiene a reflujo durante 16 horas en atmósfera de argón. Después se elimina el disolvente y el residuo se lava con CH_2Cl_2 (20 ml) y Et_2O (10 ml), obteniéndose un sólido amarillo que corresponde al producto **96** (50 mg, 0,10 mmol). Rdto: 57%

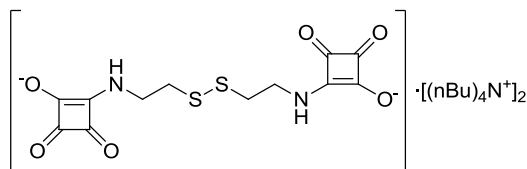
El análisis de los extractos disueltos en CH_2Cl_2 mediante espectrometría MALDI-TOF indica que contienen el producto de doble adición, junto con el producto **96**, pero en muy poca proporción e insuficiente para su aislamiento.

^1H RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2,94 (t, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 7,2, 2,2H, CH_2S), 3,03 (t, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,3, 1,9H, CH_2S), 3,12 (br, 1,9H, CH_2NH_3^+), 3,91 (q, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 6,3, 2,0H, CH_2NH), 4,03 (s, 0,4H, $\text{CH}_2^{b(4)}\text{SO}_3^-$), 4,08 (s, 1,6H, $\text{CH}_2^{a(4)}\text{SO}_3^-$), 6,23 (s, 0,15H, $\text{CH}^{b(3)}\text{CO}$), 6,25 (s, 0,8H, $\text{CH}^{a(3)}\text{CO}$), 7,07 (dd, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 8,6 Hz, $^4\text{J}(\text{H,H})$ = 1,7 Hz, 0,7H, $\text{CH}^{a(6)}\text{CH}$), 7,13 (dd, $^3\text{J}(\text{H,H})$ = 8,6 Hz, $^4\text{J}(\text{H,H})$ = 2,2 Hz, 0,2H $\text{CH}^{b(6)}\text{CH}$), 7,58 (br, 1,0H, $\text{CH}^{(8)}$), 7,81-7,86 (br, 3,5H, $\text{CH}_2\text{NH}_3^+ + \text{CH}^{(5)}\text{CH}$), 8,00 (br, 1,0H, NHCH_2), 9,87 (br, 0,8H, $\text{NH}^{a(7)}\text{C}$), 9,94 (br, 0,1H, $\text{NH}^{b(7)}\text{C}$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 34,3, 37,8, 38,0, 42,9, 53,0, 104,6, 113,7, 113,8, 114,3, 127,8, 142,0, 149,3, 154,4, 160,1, 162,5, 169,3, 180,2, 184,5. HRMS (ESI-) calc. para 484,0307 (M^- ; $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}_3^-$) encontrado: 484,0314.

Bis-(éster escuarámico) 97:

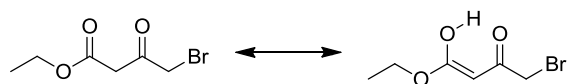
La cisteamina diclorhidrato **82** (0,3 g, 1,34 mmol) se suspende en una mezcla de Et₂O, acetonitrilo y EtOH (10 ml, 5 ml, 5 ml) y Et₃N (0,56 ml, 4 mmol). A esta suspensión se le adiciona una disolución de escuarato de dietilo **1** (0,5 g, 2,94 mmol) en Et₂O (5 ml) y la mezcla se agita durante 16 horas a temperatura ambiente en atmósfera de argón. El crudo de reacción se filtra y el residuo sólido se lava con Et₂O (2 x 5 ml). Los extractos orgánicos se combinan y concentran al vacío para obtener un líquido amarillo que se disuelve en CH₂Cl₂ (30 ml). La fase orgánica se lava con HCl 0,1N (2 x 15 ml) y una disolución saturada de NaCl (15 ml) y se seca sobre Na₂SO₄. El disolvente se elimina bajo presión reducida y el residuo se lava con Et₂O frío obteniendo el diéster **97** como sólido blanco (0,41 g, 1,02 mmol). Rdto: 76%

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 1,37 (t, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 6H, CH₂CH₃), 2,90 (br, 4H, CH₂S), 3,59 (br q, 2,3H, CH₂^aNH), 3,76 (br q, 1,8H, CH₂^bNH), 4,65 (q, ³J(H,H) = 6,9 Hz, 4H, CH₂CH₃), 8,69 (br t, 0,9H; NH^a), 8,88 (br t, 1,1H; NH^b). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 15,6, 37,7, 38,2, 42,5, 42,9, 68,9, 172,4, 172,7, 176,8, 177,1, 182,1, 182,3, 189,0, 189,2. HRMS (ESI) calc. para 423,0660 (M+Na⁺; C₁₆H₂₀N₂NaO₆S₂⁺) encontrado: 423,0663.

Sal de tetrabutil amonio del bis-(ácido escuarámico) 99:

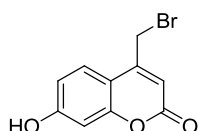
El diéster **97** (0,252 g, 0,63 mmol) se suspende en H₂O (15 ml) y se calienta a reflujo durante 16 horas. La disolución de color amarillo pálido se basicifica con hidróxido de tetrabutilamonio 1M en MeOH hasta un pH aparente de 7. El disolvente se elimina a presión reducida para obtener un líquido de color marrón que se disuelve en CH₂Cl₂ (10 ml). La adición de hexano provoca la decantación del producto **99** como un aceite denso de color amarillo que contiene trazas de hidróxido de amonio (0,278 g, 0,34 mmol). El producto se emplea en el siguiente paso sin purificar. Rdto: 53%

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = 0,99 (t, ³J(H,H) = 7,2 Hz, 35H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 1,42 (m, ³J(H,H) = 7,2 Hz, 23H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 1,67 (m, 23H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 2,93 (t, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 4H, CH₂S), 3,32 (m, 23H, NCH₂CH₂CH₂CH₃), 3,90 (q, ³J(H,H) = 6,6 Hz, 4H, CH₂NH), 6,34 (br, 1.4H, NH). HRMS (ESI⁻) calcd para 343,0059 (M-TBA+H⁺; C₁₂H₁₁N₂O₆S₂⁻) encontrado 343,0066.

4-Bromoacetoacetato de etilo 101:

Sintetizado según se describe en la bibliografía con pequeñas modificaciones en el procedimiento.²⁰⁵ El acetoacetato de etilo **100** (19,4 ml, 153 mmol) se disuelve en ácido acético (75 ml) y se le añade gota a gota una disolución de bromo (25 g, 156 mmol) disuelto en ácido acético (75 ml). La mezcla se agita durante 24 horas a temperatura ambiente. Después, la mayor parte del ácido acético se elimina a presión reducida obteniendo un líquido de color marrón que se diluye con H₂O (250 ml). Esta disolución se extrae con CH₂Cl₂ (2 x 100 ml). Los extractos orgánicos se combinan y se lavan con una disolución saturada de Na₂CO₃ (100 ml), H₂O (100 ml) y finalmente una disolución saturada de NaCl (100 ml). La disolución se seca entonces con Na₂SO₄ y se elimina el disolvente obteniendo un aceite espeso de color marrón, que se purifica mediante cromatografía en columna (SiO₂, hexano:AcOEt, de 9:1 a 8:2) para obtener un aceite amarillo-verdoso como el producto **101** (9,418 g, 45,1 mmol). Rdto: 29%

¹H RMN (300 MHz, CDCl₃): δ = (forma ceto) 1,29 (t, ³J(H,H) = 7,2 Hz, 3H*, CH₂CH₃), 3,70 (s, 1,4H, BrCH₂), 4,05 (s, 1,2H, COCH₂CO), 4,22 (q, ³J(H,H) = 7,2 Hz, 1,8H*, CH₂CH₃); (forma enol) 1,30 (t, ³J(H,H) = 7,2 Hz, 3H*, CH₂CH₃), 3,85 (s, 0,4H, BrCH₂), 4,23 (q, ³J(H,H) = 7,2 Hz, 1,8H*, CH₂CH₃), 5,28 (s, 0,2H, COCHCOH), 12,00 (s, 0,2H, COH). *: Las señales de las formas ceto y enol están solapadas. ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃): δ = (forma ceto) 14,2, 34,0, 46,2, 61,9, 166,7, 194,7; (forma enol) 14,3, 28,8, 60,8, 91,9, 170,6, 172,2.

4-bromometil-7-hidroxycumarina 103:

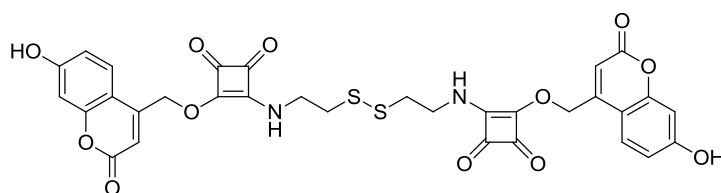
El resorcinol **102** (0,985 g, 8,95 mmol) finamente pulverizado se mezcla con el 4-bromoacetoacetato de etilo **101** (1,87 g, 8,95 mmol) y se enfría a 0 °C. Seguidamente, se adiciona lentamente una disolución acuosa al 80% de H₂SO₄ (18 ml). La reacción se mantiene en agitación mientras la temperatura se va incrementando lentamente hasta temperatura ambiente y durante 16 horas adicionales. Después la disolución se vierte sobre H₂O (200 ml) a 0 °C y se deja agitando durante 1 hora. El producto se extrae con AcOEt (3 x 70 ml) y los extractos combinados se lavan con una disolución saturada de NaCl (80 ml). La disolución se seca sobre Na₂SO₄ y se elimina el disolvente a presión reducida obteniendo un aceite marrón que se purifica mediante cromatografía en

²⁰⁵ Choi, H. Y.; Chi, D. Y.; Nonselective Bromination-Selective Debromination Strategy: Selective Bromination of Unsymmetrical Ketones on Singly Activated Carbon against Doubly Activated Carbon. *Org. Lett.*, **2003**, 5, 411-414.

columna (SiO₂, AcOEt:hexano, 1:1) y se recristaliza con AcOEt y hexano para obtener cristales de color marrón claro del producto **103** (0,457 g, 1,79 mmol). Rdto: 20%

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 4,81 (s, 2H, CH₂⁽⁴⁾Br), 6,46 (s, 1H, CH⁽³⁾COO), 6,75 (d, ⁴J(H,H) = 2,4 Hz, 1H, CH⁽⁸⁾COH), 6,85 (dd, ³J(H,H) = 8,7 Hz, ⁴J(H,H) = 2,4 Hz, 1H, CHCH⁽⁶⁾COH), 7,71 (d, ³J(H,H) = 8,7 Hz, 1H, CH⁽⁵⁾CHCOH), 10,65 (s, 1H; COH⁽⁷⁾). ¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 28,1, 102,5, 109,3, 111,4, 113,0, 126,7, 151,5, 155,4, 160,1, 161,5.

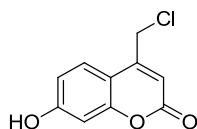
Bis-(éster escuaramídico) **104**:



El compuesto **99** (190 mg, 0,23 mmol) y la cumarina **103** (143 mg, 0,56 mmol) se disuelven en acetona anhidra (20 ml) y se agita durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la temperatura se incrementa lentamente durante un período de 2 horas hasta alcanzar los 70 °C. Después de 30 minutos a dicha temperatura, la solución se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida. El residuo se disuelve en DMSO (1 ml) y se adiciona H₂O (10 ml) para obtener un precipitado blanco que corresponde al producto **104** (115 mg, 0,17 mmol). Rdto: 72%

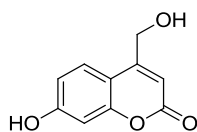
¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 2,92 (m, 4H, CH₂S), 3,62 (br, 2,2H, CH₂^aNH), 3,79 (br, 1,8H, CH₂^bNH), 5,88 (m, 4H, CH₂⁽⁴⁾O), 6,32 (m, 2H, CH⁽³⁾COO), 6,71-6,85 (m, 4H, CH⁽⁶⁾-⁽⁸⁾COH), 7,52 (m, 2H, CH⁽⁵⁾CHCOH), 8,91 (br, 1H, NH^a), 9,09 (br, 1H, NH^b), 10,66 (m, 2H, COH⁽⁷⁾). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 37,2, 38,1, 42,6, 43,2, 68,8, 69,2, 102,5, 108,2, 108,7, 113,2, 125,8, 149,9, 155,1, 160,1, 161,5, 172,2, 172,4, 175,4, 175,7, 181,7, 181,9, 189,0, 189,3. HRMS (MALDI-TOF) calc. para 691,0698 (M-H⁻; C₃₂H₂₃N₂O₁₂S₂⁻) encontrado: 691,0680.

4-clorometil-7-hidroxicumarina **105**:



Sintetizado según se describe en la bibliografía a partir de resorcinol **102** y 4-cloroacetoacetato de etilo **91**.²⁰⁶ Rdto: 79%

²⁰⁶ Lin, W.; Long, L.; Feng, J.; Wang, B.; Guo, C.; Synthesis of meso-Coumarin-Conjugated Porphyrins and Investigation of Their Luminescence Properties. *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 4301-4304.

4-hidroximetil-7-hidroxicumarina 106:

Sintetizado según se describe en la bibliografía modificando la elaboración posterior.²⁰⁶

La cumarina **105** (1,0 g 4,79 mmol) se suspende en H₂O (150 ml) y se lleva a reflujo durante 16 horas, obteniendo una disolución de color amarillo pálido. La disolución se concentra a sequedad y el residuo se disuelve en AcOEt (80 ml). Esta solución se filtra y se añade Et₂O (100 ml). El producto **106** precipita como un sólido blanco (344 mg, 1,79 mmol). Rdto: 37%

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ = 4,69 (d, ³J(H,H) = 1,4Hz, 2H, CH₂⁽⁴⁾OH), 5,49 (br, 0,4H, CH₂OH), 6,23 (t, ⁴J(H,H) = 1,25Hz, 1H, CH⁽³⁾CO), 6,72 (d, ⁴J(H,H) = 2,3 Hz, 1H, CH⁽⁸⁾COH), 6,77 (dd, ³J(H,H) = 8,7 Hz, ⁴J(H,H) = 2,3 Hz, 1H, CH⁽⁶⁾CH), 7,52 (d, ³J(H,H) = 8,7 Hz, 1H, CHCH⁽⁵⁾), 10,53 (br, 1H, COH⁽⁷⁾). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆): δ = 59,1, 102,3, 106,5, 109,6, 112,9, 125,5, 154,9, 156,9, 160,7, 161,0.

4.8.2 Procedimiento general para la realización de los estudios de evolución temporal mediante espectrometría UV-Vis y fluorimetría

En un procedimiento típico, el compuesto a estudiar se disuelve en DMSO a una concentración 1 mM. Por otra parte se obtiene una disolución de TCEP en 10x PBS a una concentración 1 mM.

En un estudio mediante espectrometría UV-Vis típico, 20 μl de la disolución del producto se diluyen en 3,94 ml de PBS. A esta disolución se añaden 20 μl de DMSO y 20 μl de la disolución 1 mM del reductor (1 equivalente), obteniendo una concentración final 5,0x10⁻⁶ M de producto en PBS/1% DMSO. El momento en el cual se adiciona el reductor se considera t = 0 y se adquieren espectros UV-Vis en intervalos regulares de dos minutos durante los primeros treinta minutos y posteriormente cada cinco minutos.

Para el estudio mediante fluorimetría, se diluyen 10 μl de la disolución del producto en 3,95 ml de PBS. A esta disolución se añaden posteriormente 30 μl de DMSO y 10 μl del reductor 1 mM, consiguiendo una concentración final de producto 2,5x10⁻⁶ M en PBS/1% DMSO. Se considera t = 0 en el momento de la adición del reductor, a partir del cual se comienzan a adquirir espectros de emisión en intervalos regulares de dos minutos.

4.8.3 Procedimiento general para la realización de los estudios de evolución temporal mediante RMN

Los productos se disuelven en DMSO-d₆ a una concentración 10 mM y el reductor en 10 x PBS para obtener una disolución 50 mM.

Para un estudio típico, en un tubo de resonancia se introducen 528 µl de PBS y 60 µl de la disolución del producto. Se adquiere un espectro de referencia de ¹H-RMN con un programa de supresión de agua mediante “excitation sculpting”.²⁰⁷ Posteriormente se adiciona al tubo de RMN 12 µl de la disolución 50 mM del reductor, momento en el cual se considera t = 0, se agita rápidamente y se adquieren espectros de ¹H-RMN cada dos minutos durante dos horas.

4.8.4 Procedimiento general para la obtención de los coeficientes de extinción molar

A modo de ejemplo, y como procedimiento general, se preparan por dilución en PBS un total de doce disoluciones en el intervalo de concentración comprendido entre 1,0x10⁻⁵ y 2,0x10⁻⁷ M. En todas las disoluciones preparadas se adiciona el volumen necesario de DMSO para que la disolución final contenga un 1% de DMSO en volumen. Se registran los espectros UV-Vis de las doce muestras preparadas y se representa la absorbancia a una longitud de onda determinada en función de la concentración. El coeficiente de extinción molar se determina como el valor de la pendiente de la recta resultante.

De forma similar y para poder cuantificar la evolución temporal por fluorimetría, se realizan las lecturas de la banda de emisión de las muestras más diluidas, generalmente aquellas con una concentración inferior a 5,0x10⁻⁶ M. La pendiente de la recta que resulta al representar la integral de la banda de fluorescencia, calculada mediante la ecuación 2, y la concentración permite obtener un valor que representa la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de fluoróforo.

$$I_{Fl} = \sum_{i=\lambda_0}^{\lambda_f} [I_{Fl}]_{i+1} \cdot (\lambda_{i+1} - \lambda_i) \quad (\text{Ec. 2})$$

4.8.5 Procedimiento general para el cálculo de las velocidades iniciales de aparición/desaparición

Para el cálculo de la progresión de la reacción se deben calcular en primer lugar las diferentes concentraciones de los productos en disolución. Este procedimiento difiere en función de la técnica utilizada.

²⁰⁷ Hwang, T. L.; Shaka, A. J.; Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J. Magn. Reson. Ser. A*, **1995**, 112, 275-279.

Mediante RMN, la integral de cada señal de intensidad variable se referencia respecto a una señal de intensidad constante. A partir de estos valores se divide el valor de la integral entre el número de protones que integran dicha señal, obteniendo una relación molar entre las diferentes señales. De esta forma, a partir de la concentración inicial conocida del producto se representan las concentraciones de los diferentes productos en función del tiempo.

En espectrometría UV-Vis, debido al solapamiento de bandas entre los productos iniciales y los finales, la concentración de cada uno se puede calcular a partir del valor de la absorbancia total y los coeficientes de extinción molar de cada producto implicado, a una longitud de onda y tiempo determinados, mediante las ecuaciones 15 y 13.

$$[A] = \frac{A_T^\lambda - 2 \cdot [A]^0 (\epsilon_B^\lambda \cdot \epsilon_C^\lambda)}{\epsilon_A^\lambda - 2(\epsilon_B^\lambda + \epsilon_C^\lambda)} \quad (\text{Ec. 15})$$

$$[B] = 2 \cdot ([A]^0 - [A]) = [C] \quad (\text{Ec. 13})$$

Por último, en fluorimetría, la detección de la señal del fluoróforo libre permite, mediante la relación calculada anteriormente entre la concentración y la intensidad de fluorescencia, calcular directamente la concentración de fluoróforo.

A partir de las representaciones de la concentración de los productos en función del tiempo, el valor de la pendiente de la recta obtenida utilizando los valores de los primeros cinco minutos del estudio se corresponde con la velocidad inicial de aparición o desaparición de los compuestos.

4.8.6 Variación de la fluorescencia de la cumarina 106 en función del pH

A una disolución de H₂O a pH 5,24 se añaden 50 µl de una disolución de **106** 2 mM en DMSO, obteniendo una disolución 5,0x10⁻⁶ M de **106** con un porcentaje inferior al 1% de DMSO.

A esta disolución se adicionan de forma sucesiva alícuotas de una disolución de NaOH 1M. Cada variación de 0,4 unidades de pH se extrae una muestra y se registra su espectro de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$) hasta alcanzar un pH de 9,58.

Los valores de la intensidad de fluorescencia obtenidos se corrigen en función de la dilución realizada a lo largo del experimento. La representación del área de emisión en función del pH proporciona una relación entre la intensidad de fluorescencia y la concentración para un valor de pH determinado.

4.8.7 Estabilidad y evolución temporal del producto **104** en función del pH

El estudio de estabilidad del compuesto **104** en función del pH se realiza mediante espectrometría UV-Vis y fluorimetría.

Se preparan tres disoluciones de PBS a pH 6,28, 7,67 y 8,83 respectivamente.

Por otra parte se prepara una disolución del compuesto **104** en DMSO y otra de TCEP en 10x PBS, ambas a una concentración 1 mM.

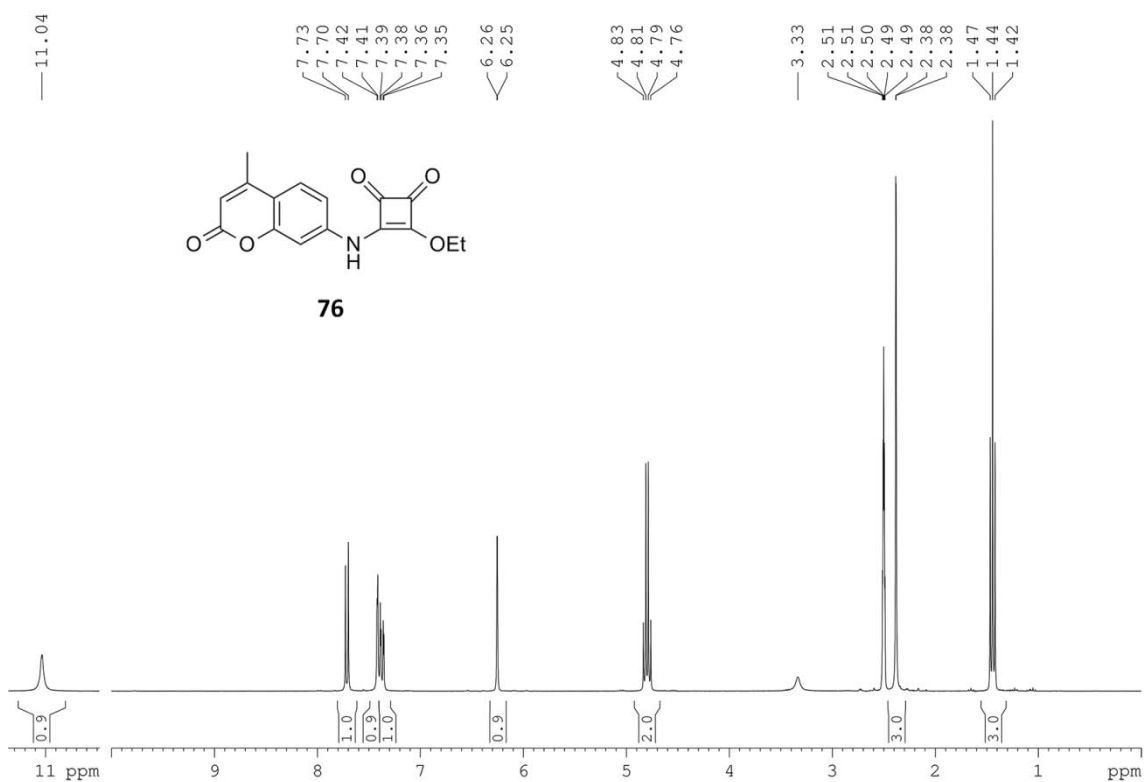
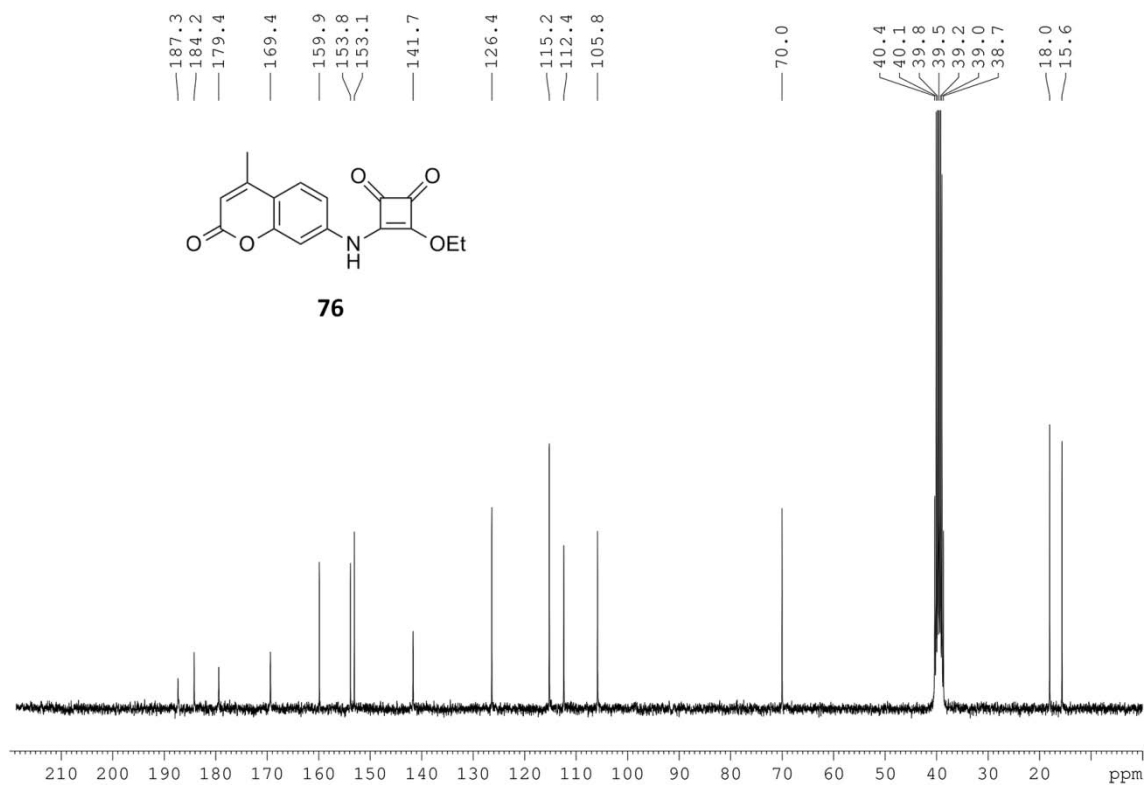
La evaluación de la estabilidad del compuesto **104** frente a la hidrólisis en función del pH mediante fluorimetría se realiza a partir de una disolución del producto **104** en PBS/1% DMSO a una concentración $2,5 \times 10^{-6}$ M. La evolución de la muestra se determina registrando los espectros de emisión de las muestras a intervalos de dos minutos.

El mismo estudio se realiza de forma análoga por UV-Vis utilizando una muestra de **104** a una concentración $5,0 \times 10^{-6}$ M en PBS/1% DMSO a pH 7,4.

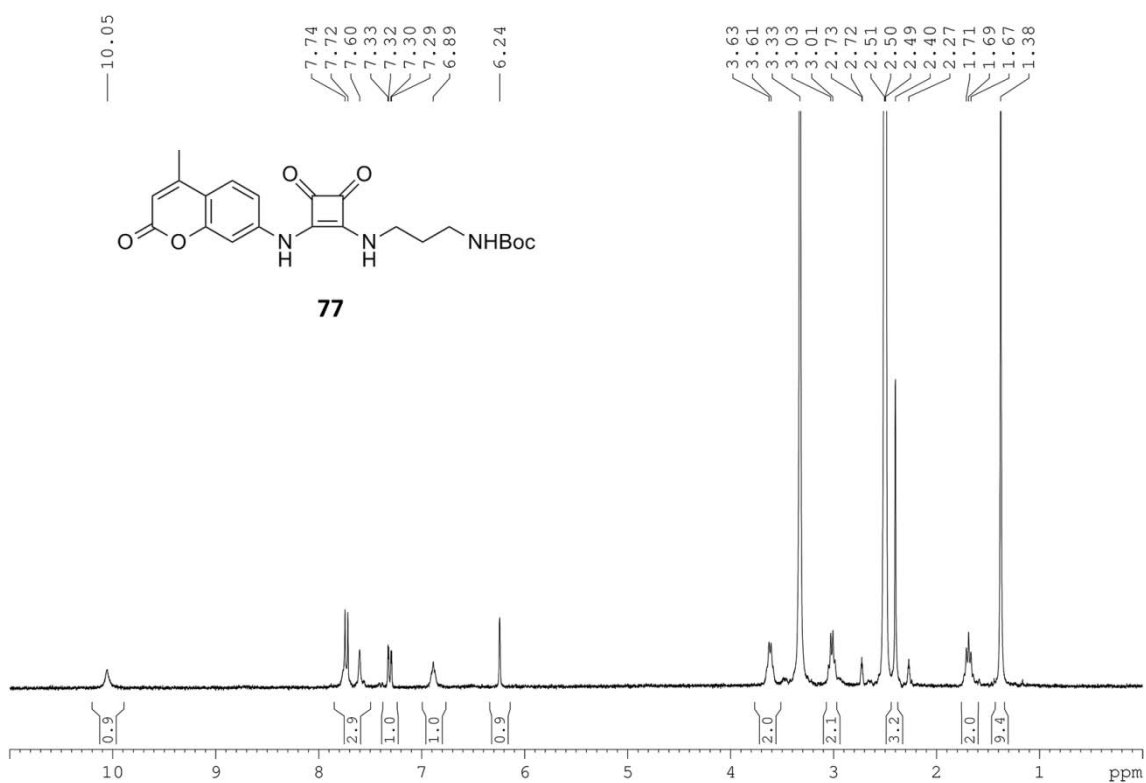
4.8.8 Estabilidad y evolución temporal del producto **104** frente a nucleófilos

Para evaluar la influencia de los aminoácidos en la estabilidad del producto autoinmolativo **104**, se preparan disoluciones de lisina, leucina y arginina, 2 mM en PBS a pH 7,4. En un procedimiento típico se toman las alícuotas necesarias de la disolución del compuesto **104** (1 mM en DMSO) y de la del aminoácido para preparar una disolución que contenga una concentración $2,5 \times 10^{-6}$ M del compuesto **104** y 5×10^{-6} M del aminoácido. La adición del aminoácido se considera como $t = 0$ a partir del cual se adquieren espectros de emisión en intervalos de tiempo regulares de dos minutos, prolongando los experimentos un mínimo de dos horas.

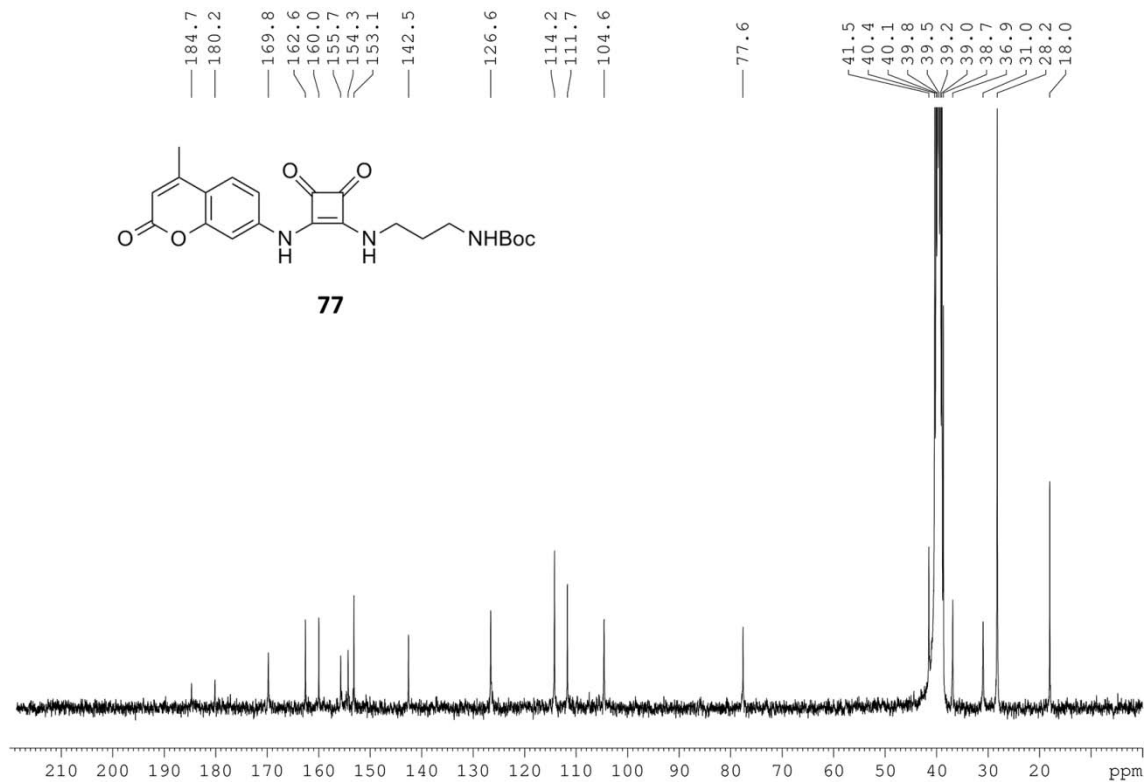
4.9 Colección de espectros de RMN de los productos relevantes

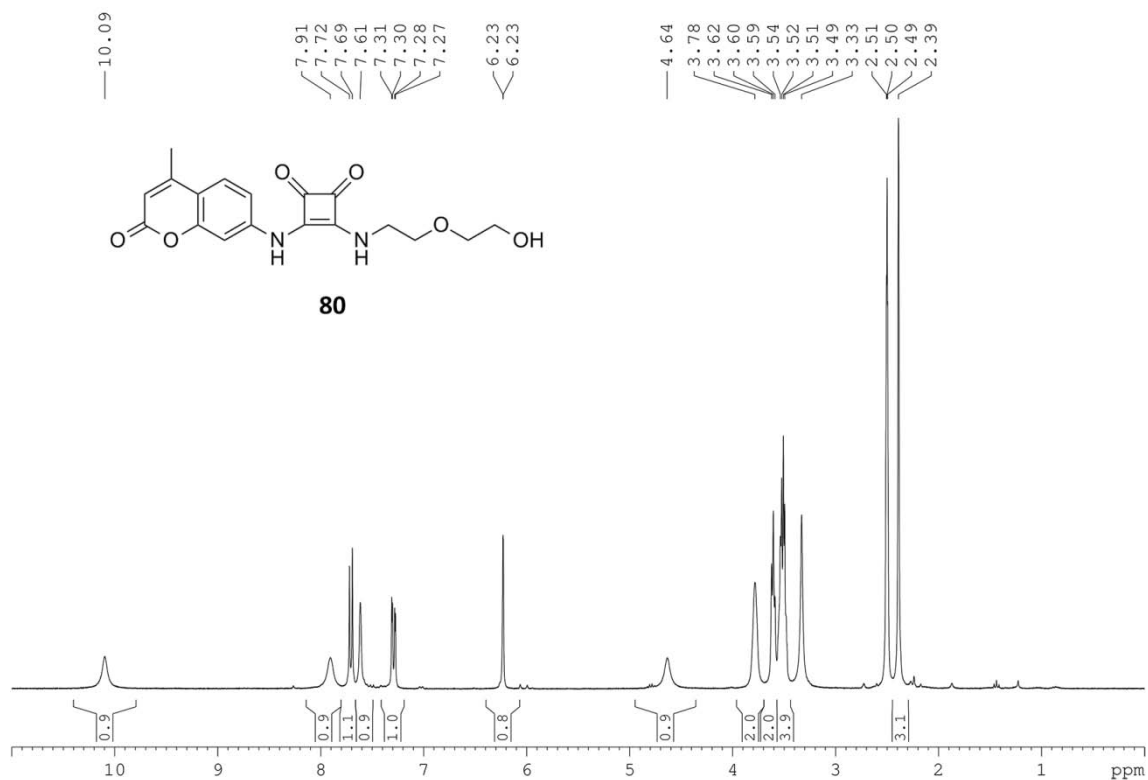
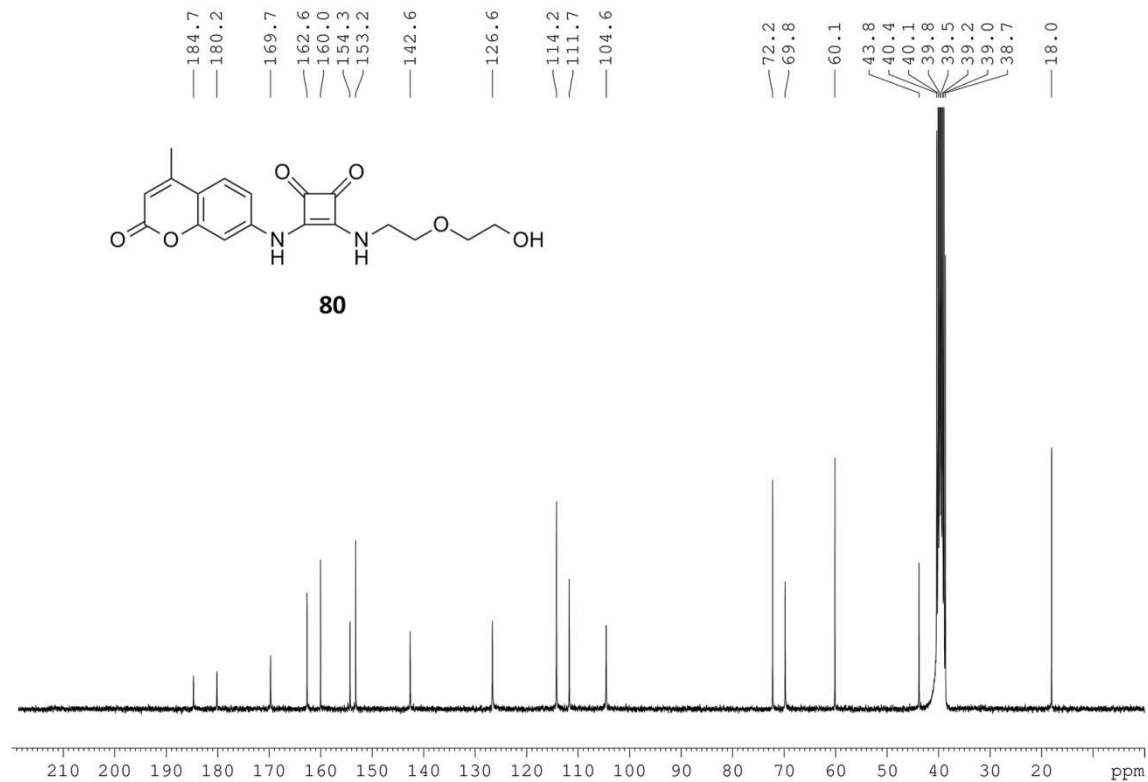
 ^1H -RMN 76 (DMSO- d_6) ^{13}C -RMN 76 (DMSO- d_6)

¹H-RMN 77 (DMSO-d₆)

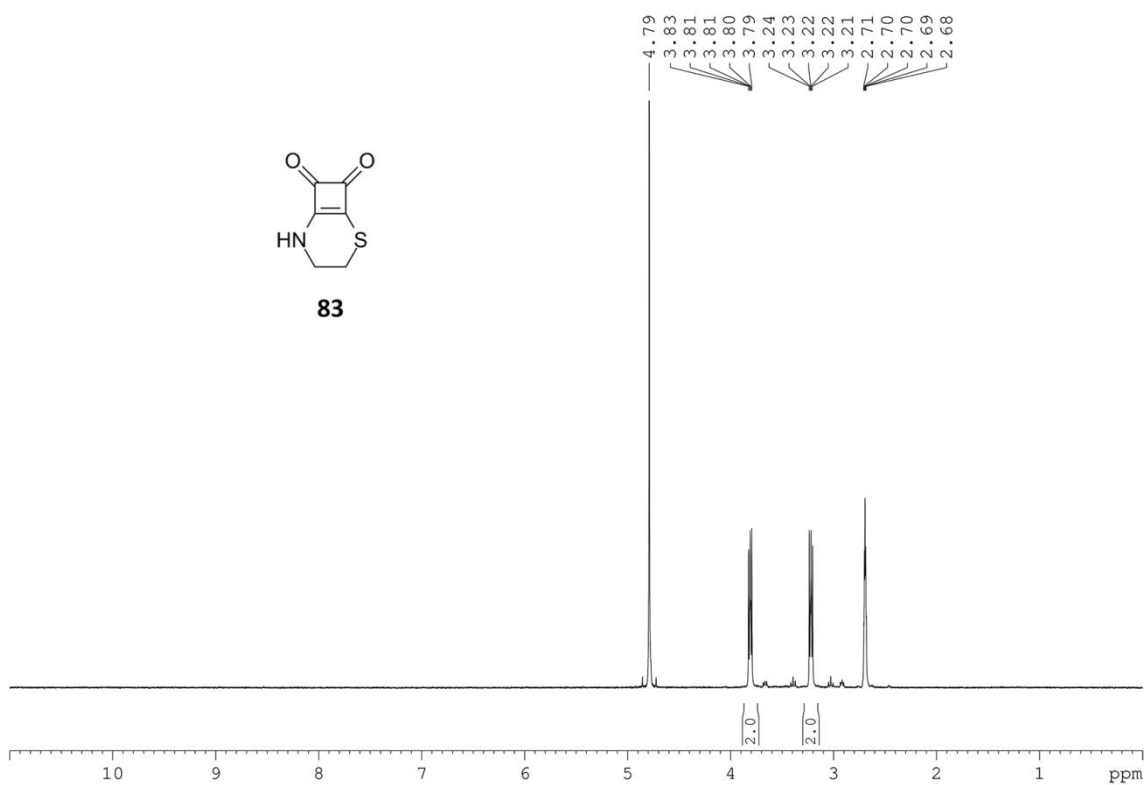


¹³C-RMN 77 (DMSO-d₆)

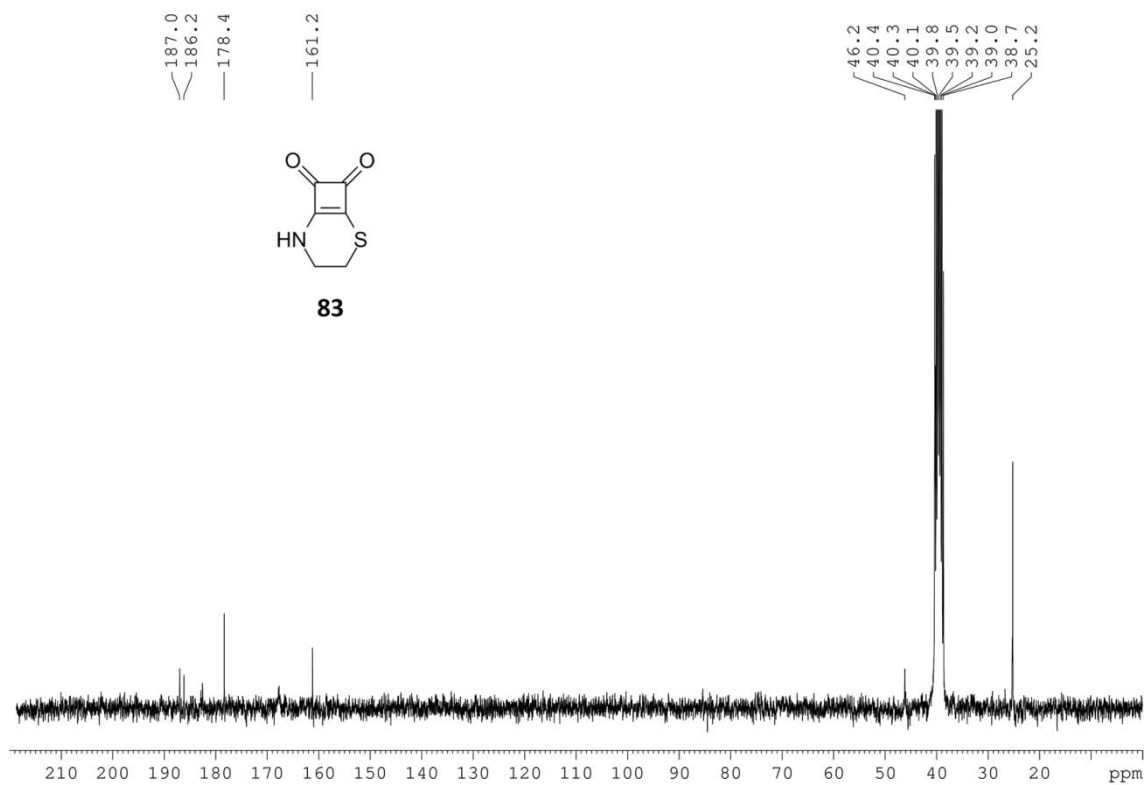


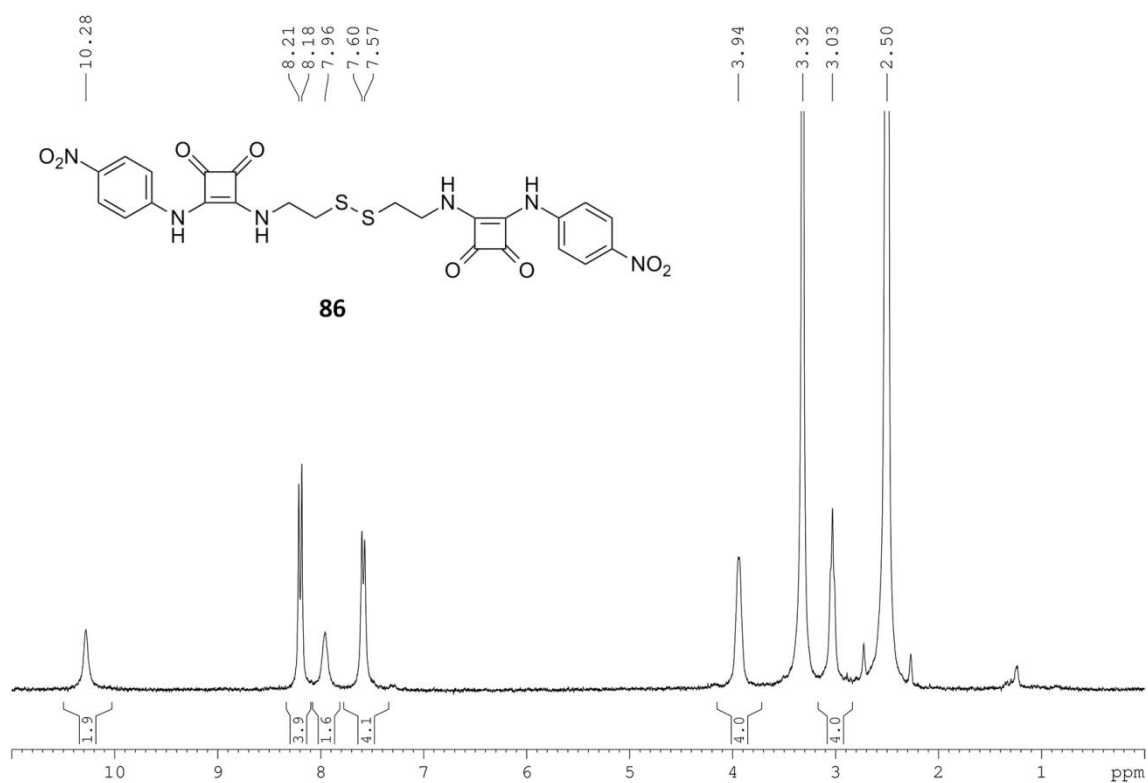
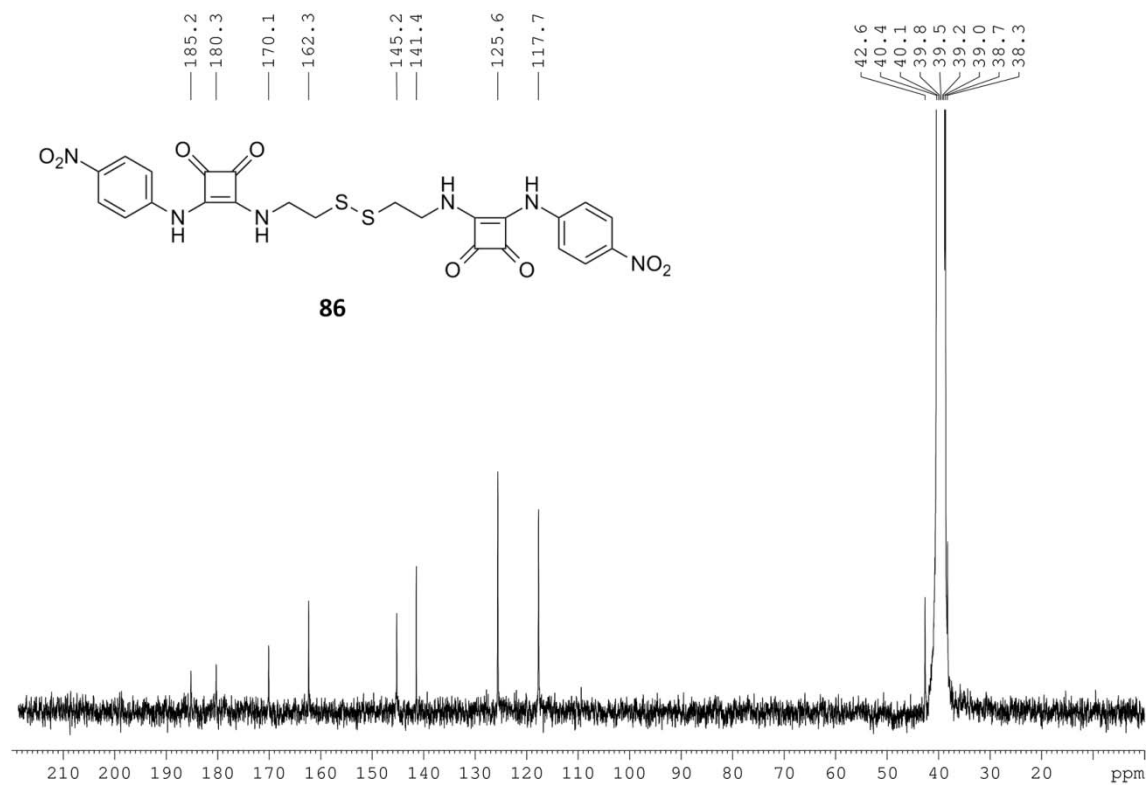
^1H -RMN **80** (DMSO- d_6) ^{13}C -RMN **80** (DMSO- d_6)

^1H -RMN **83** (D_2O -20% DMSO-d_6)

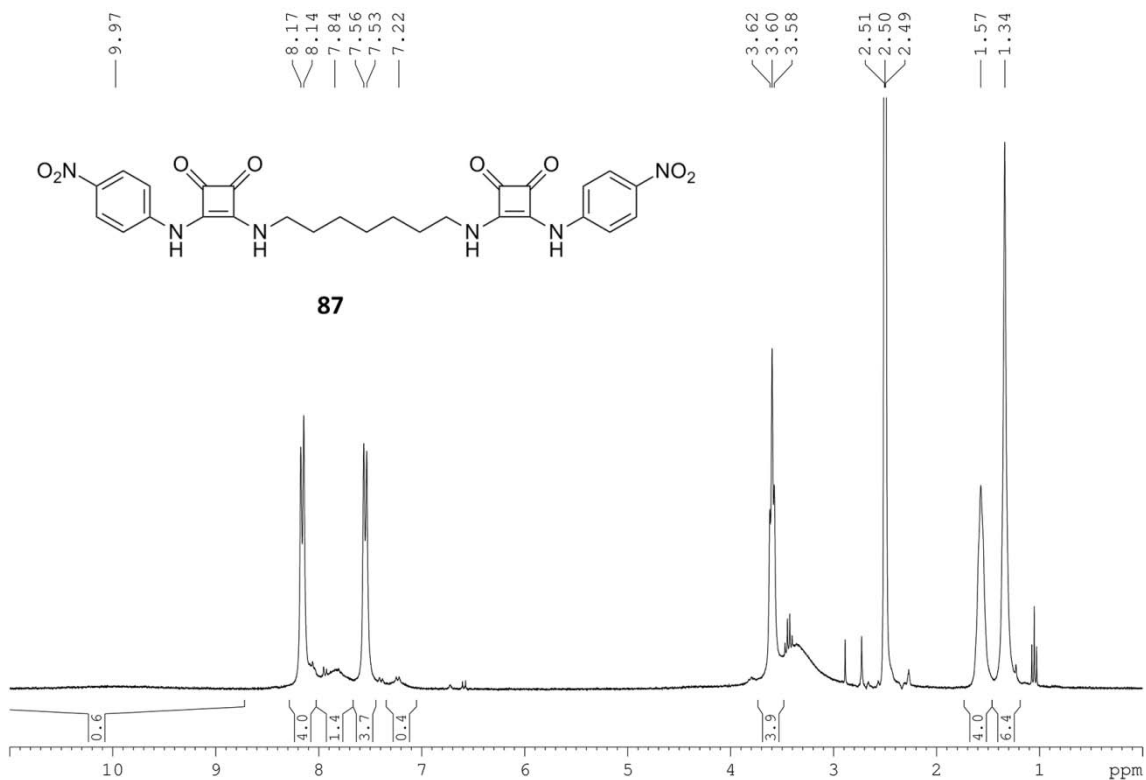


^{13}C -RMN **83** (D_2O -20% DMSO-d_6)

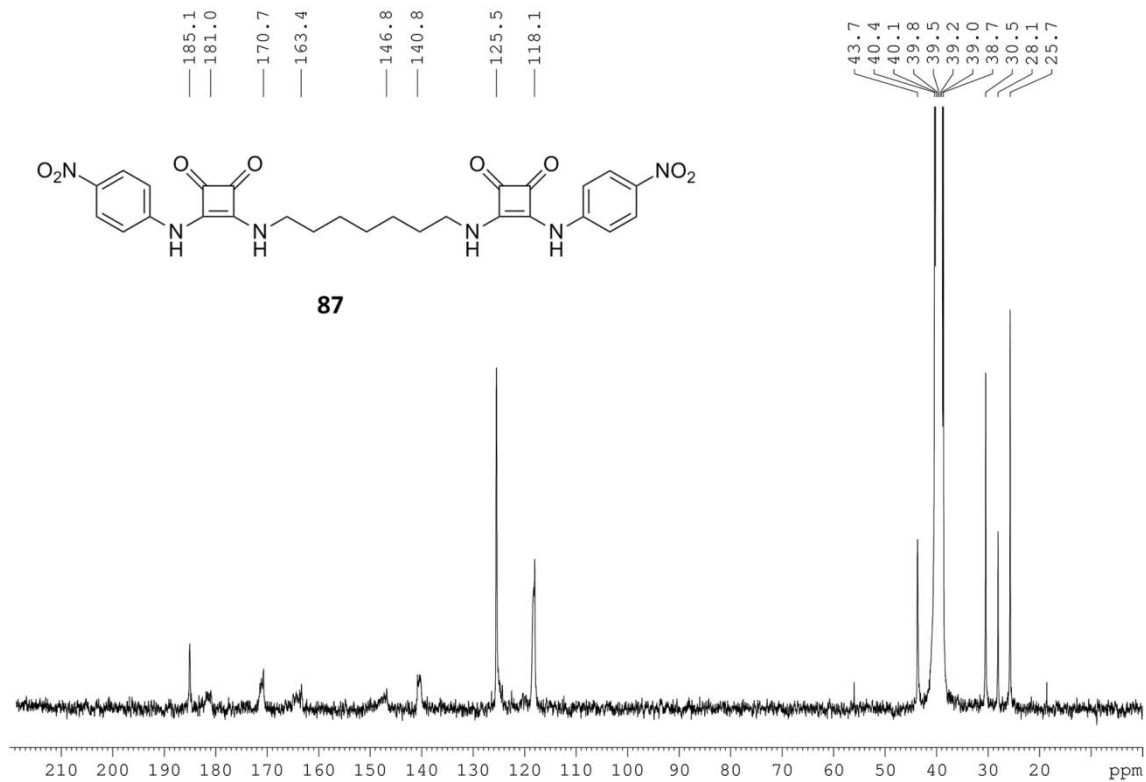


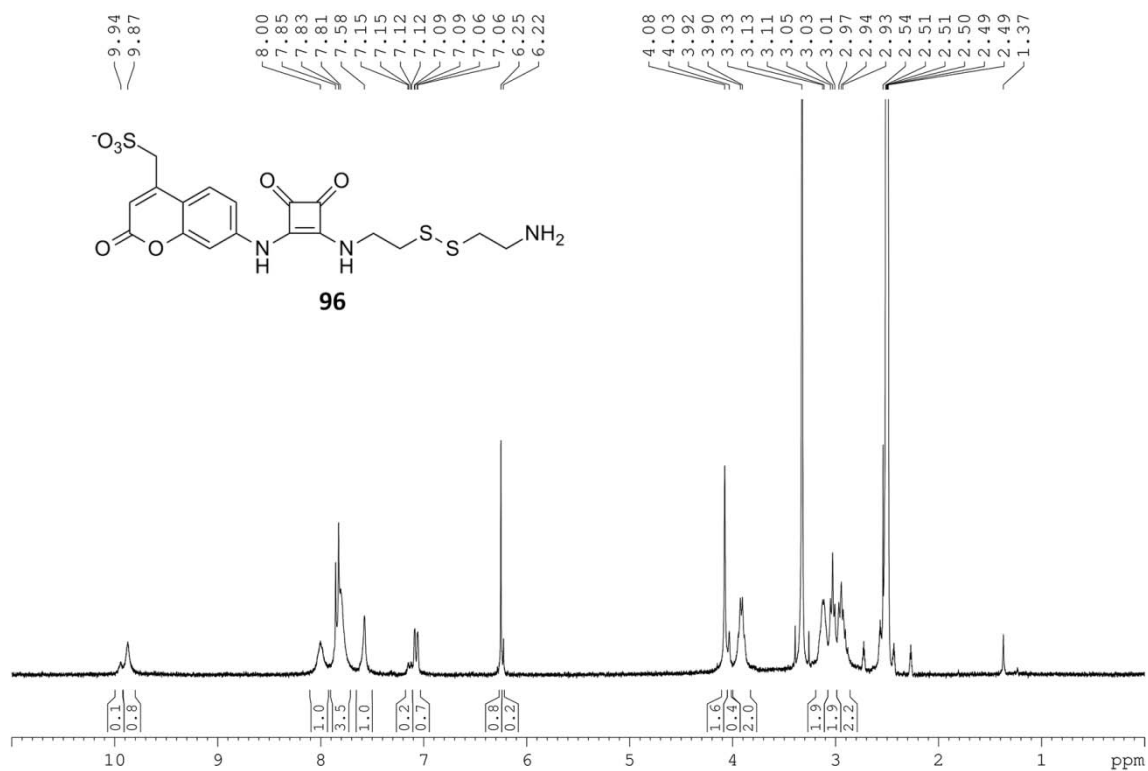
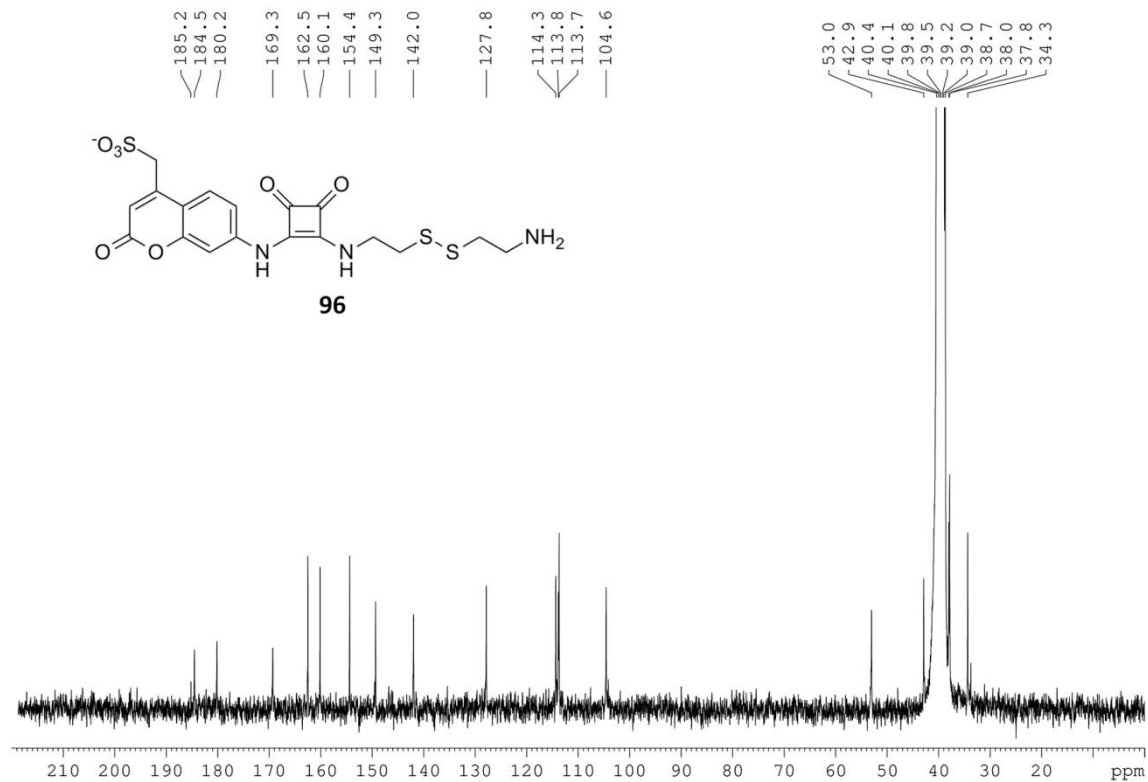
^1H -RMN **86** (DMSO- d_6) ^{13}C -RMN **86** (DMSO- d_6)

^1H -RMN **87** (DMSO- d_6)

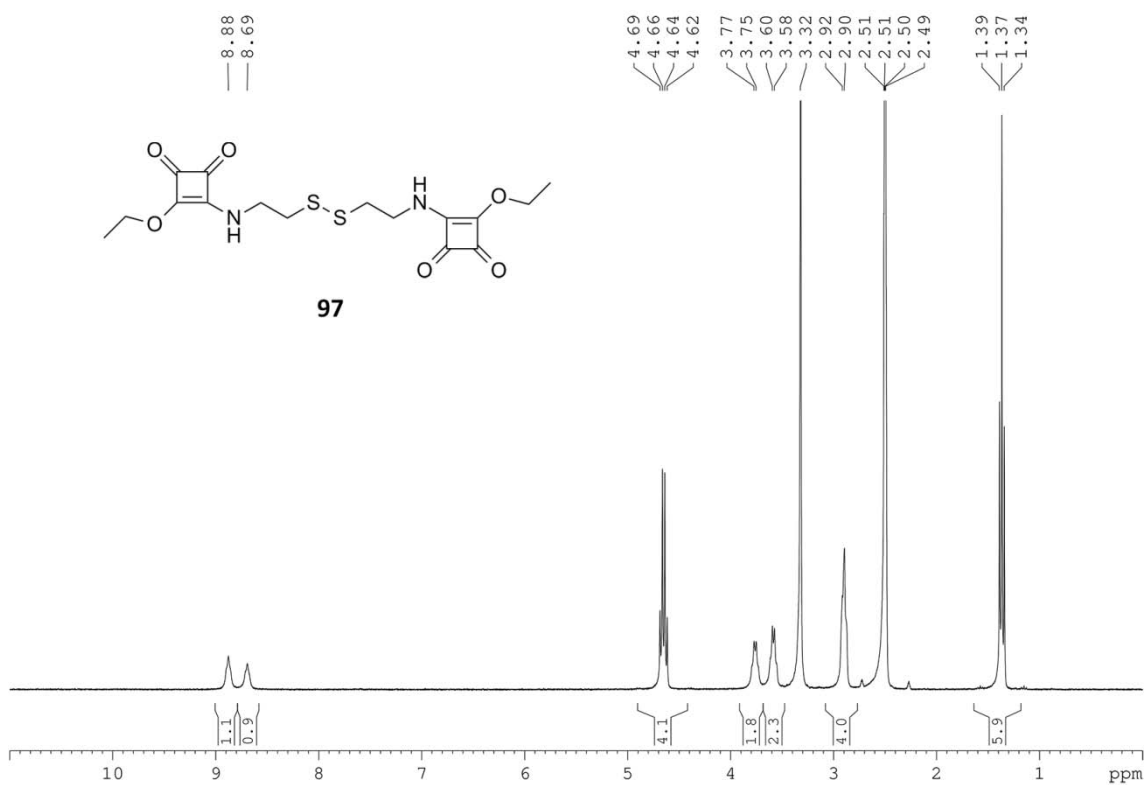


^{13}C -RMN **87** (DMSO- d_6)

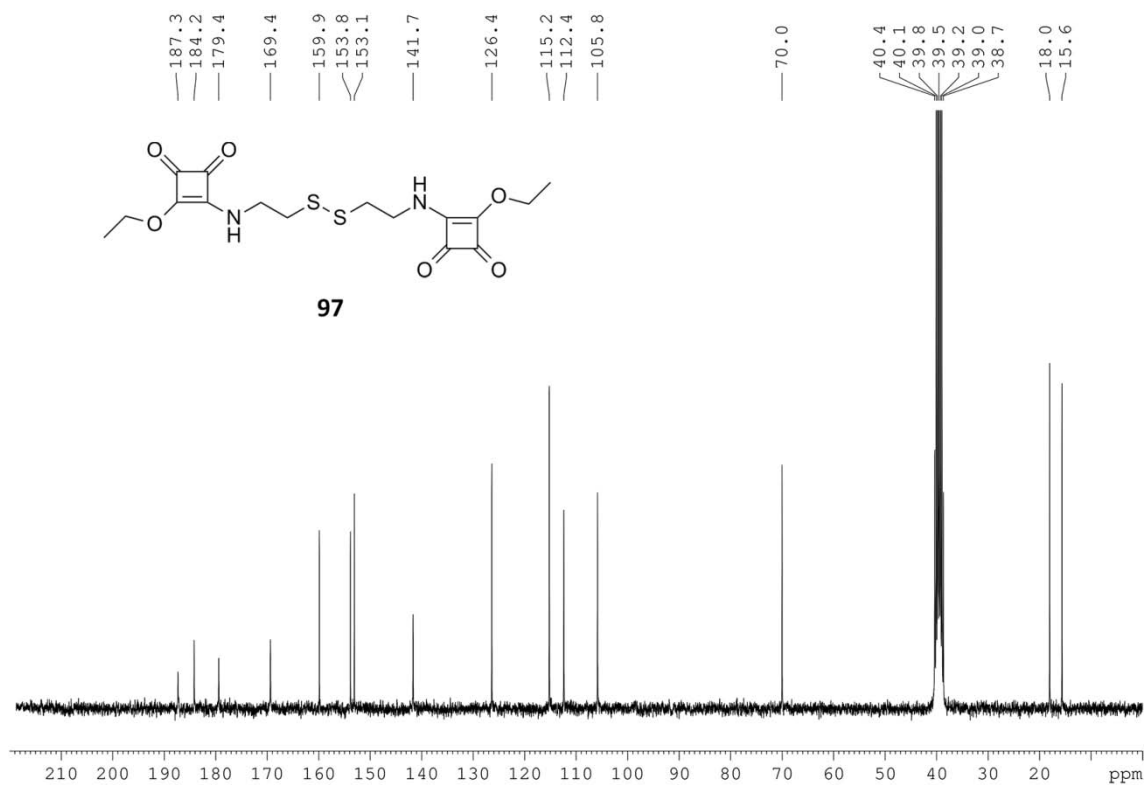


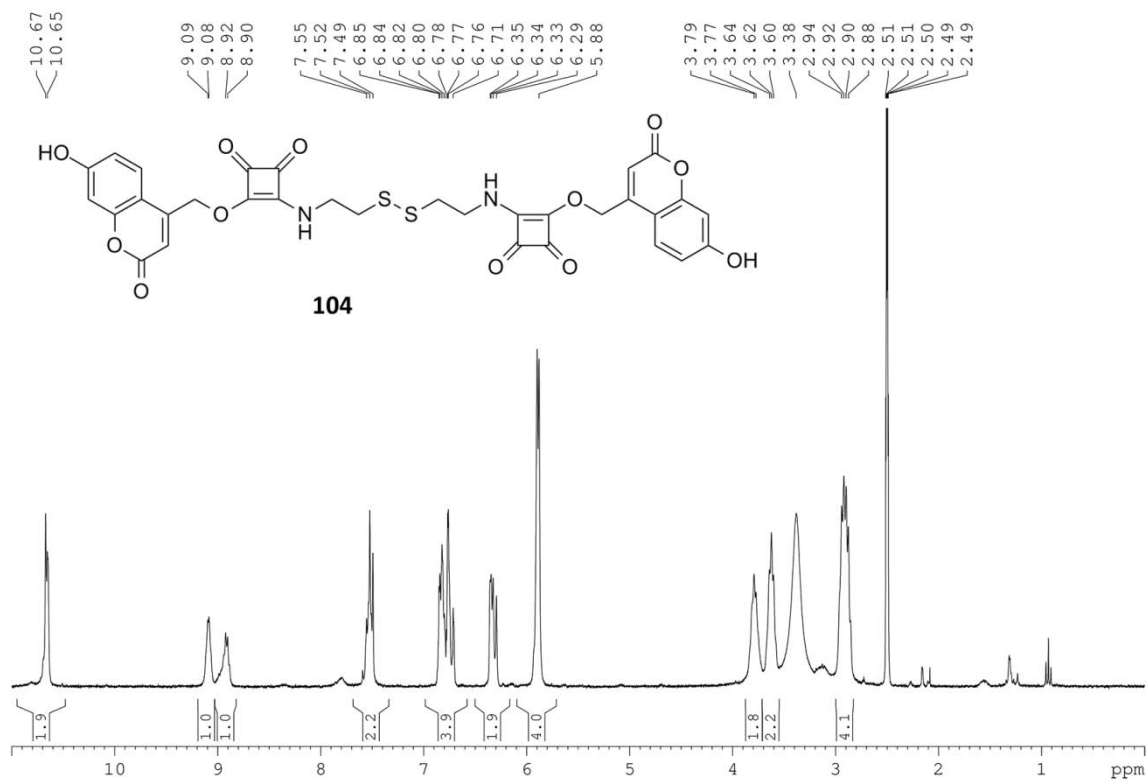
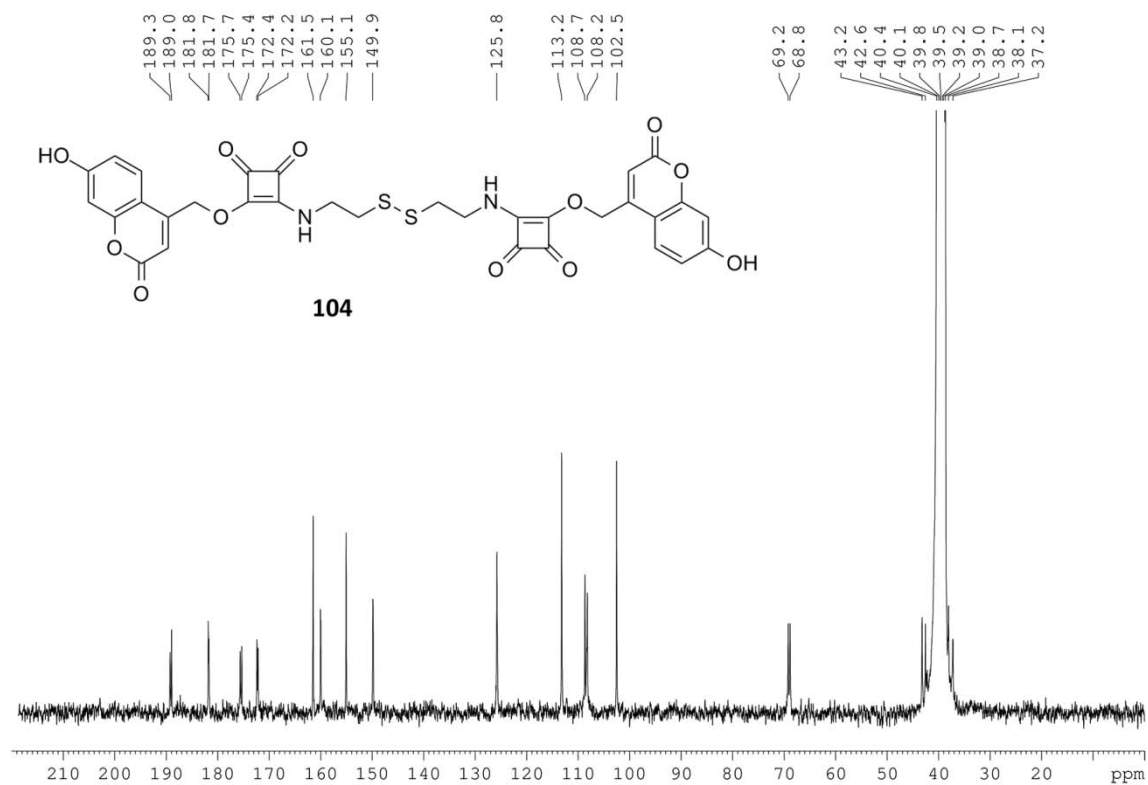
^1H -RMN **96** (DMSO- d_6) ^{13}C -RMN **96** (DMSO- d_6)

$^1\text{H-RMN}$ **97** (DMSO-d_6)

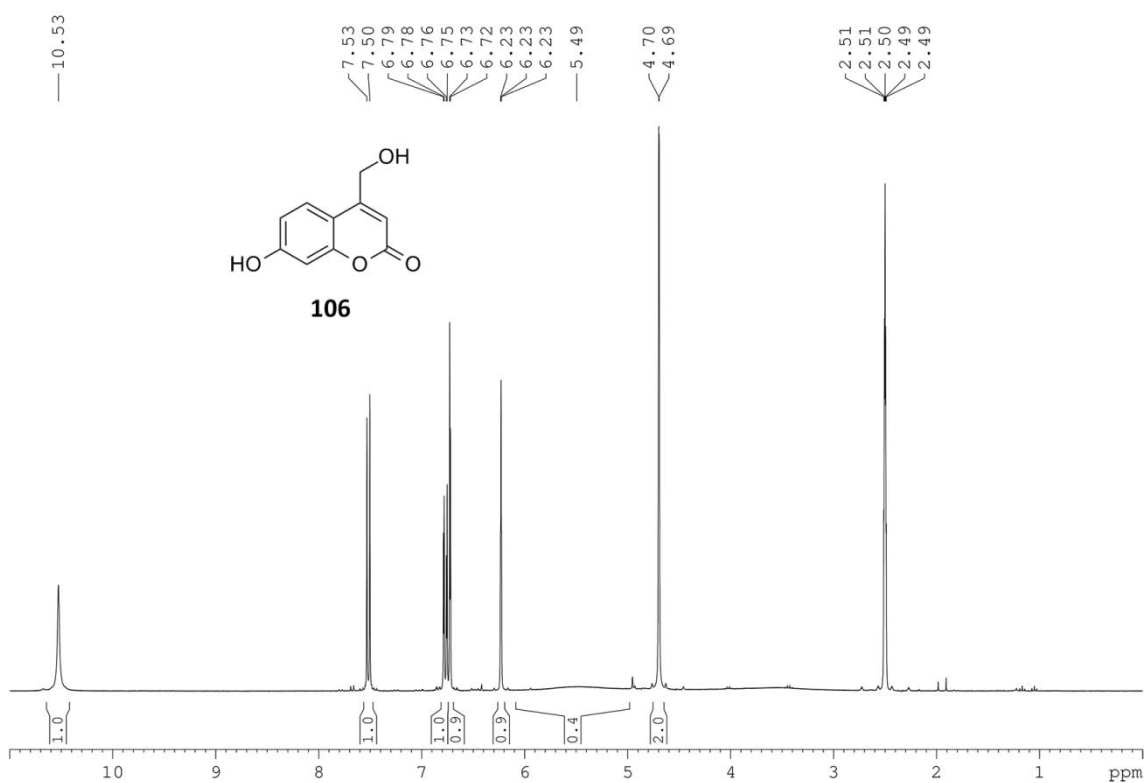


$^{13}\text{C-RMN}$ **97** (DMSO-d_6)



$^1\text{H-RMN}$ **104** (DMSO- d_6) $^{13}\text{C-RMN}$ **104** (DMSO- d_6)

¹H-RMN **106** (DMSO-d₆)



¹³C-RMN **106** (DMSO-d₆)

