



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**Máster Universitario en Investigación Química e Química
Industrial**

Iván Montes de Oca Estrada

Nuevos Ciclofanos Policatiónicos como
agentes de Unión a Cuádruplex de ADN

New Polycationic Cyclophanes as DNA
Quadruplex Binding agents

**Directores: Marcos D. García Romero
Elena Pazos Chantrero**

Curso: 2020/2021

Facultade de Ciencias (UDC), Departamento de Química.

Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA).

Periodo de evaluación: Julio

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mis tutores, el Dr. Marcos D. García Romero y la Dra. Elena Pazos Chantrero por sus consejos y motivación para sacar el trabajo adelante. Gracias por vuestra dedicación en la realización de este trabajo.

Agradecer también a Paula y a Pablo por su ayuda en el laboratorio y por hacer que las horas en él fuesen tan amenas y divertidas.

Gracias también al resto de chicos y chicas del grupo de investigación QUIMOLMAT e Intalent, gracias por hacer tan agradables las horas allí.

Gracias a mis compañeros de máster y a mis amigos de siempre por estar ahí tanto en los momentos buenos como en los malos.

Por último, muchas gracias a mi familia por apoyarme siempre, gracias por vuestra ayuda y cariño.

Abreviaturas

Å Ånström	Hz Hercio
ADN Ácido desoxirribonucleico	J Constante de acoplamiento
ARN Ácido ribonucleico	λ Longitud de onda
°C Grado centígrado	K_D Constante de disociación
DC Dicroísmo circular	m Multiplete
COSY Correlación espectroscópica homonuclear de protón	M Molar
d Doblete	mg Miligramo
DEPT Mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización	mL Mililitro
DOSY Espectroscopía de difusión ordenada	nm Nanómetro
δ Desplazamiento químico	mmol Milimol
Eq. Equivalente	ppm Partes por millón (RMN)
kDa Kilodalton	RMN Resonancia Magnética Nuclear
h Hora	s Singlete
HMBC Correlación espectroscópica heteronuclear de múltiples enlaces	t Triplete
HPLC Cromatografía de líquidos de alta eficacia	TFA Ácido trifluoroacético
HR-MS Espectrometría de masas de alta resolución	TVAR Temperatura variable
HSQC Correlación espectroscópica heteronuclear de un único protón	T^a Temperatura
	UV-Vis Ultravioleta-visible
	μL Microlitro
	μM Micromolar

Índice

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
II.1 El ácido desoxirribonucleico.	4
II.2 Estructura del ADN.....	5
II.3 Estructuras no-canónicas de ADN.....	6
II.3.1 ADN G-cuádruplex.	7
II.3.2 Los télómeros	8
II.3.3 Las telomerasas	9
II.3.4 Otros oligonucleótidos de ADN G-cuádruplex.....	10
II.3.5 Interacciones de moléculas pequeñas con ADN G-cuádruplex	11
II.4 Antecedentes	13
III. OBJETIVOS	16
IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	18
IV. Cronograma	19
IV.1 Estrategia sintética	20
IV.2 Obtención del ciclofano Nf^{4+}	21
IV.3 Obtención del ciclofano Bi^{4+}	28
IV.4 Estudios de interacción con ADN.....	29
IV.4.1 Estudios mediante espectroscopía de UV-Vis	29
IV.4.2 Estudios mediante dicroísmo circular	32
IV.4.3 Estudios mediante docking molecular.....	35
V. PARTE EXPERIMENTAL.....	38
V.1 General.....	39
V.2 Síntesis del precursor 1·2HCl.....	40
V.3 Síntesis del precursor 2.....	40

<i>V.4 Síntesis del precursor 3·2Br</i>	41
<i>V.5 Síntesis del precursor 5·2Br</i>	41
<i>V.7 Síntesis del precursor 6·2Br</i>	43
<i>V.8 Síntesis del ciclofano Nf⁴⁺</i>	43
<i>V.9 Síntesis del ciclofano Bi⁴⁺</i>	44
<i>V.10 Estudios de interacción mediante espectroscopía de UV-Vis</i>	45
<i>V.11 Estudios de interacción mediante espectroscopía de dicroísmo circular</i>	46
<i>V.12 Estudios de modelado molecular</i>	46
VI. CONCLUSIONES	48
VII. ANEXO	53
<i>VII.1 Espectro del precursor 5·2Br</i>	54
<i>VII.2 Espectro del precursor 6·2Br</i>	54
<i>VII.3 Espectros ciclofano Nf⁴⁺</i>	55
<i>VII.4 Espectros ciclofano Bi⁴⁺</i>	59

I. RESUMEN

Resumen

El presente Trabajo de Fin de Máster se centra en la síntesis, purificación y caracterización de dos ciclofanos (**Nf**⁴⁺ y **Bi**⁴⁺), análogos al macrociclo *RedBox* (**Rb**⁴⁺), previamente sintetizado por el grupo de investigación QUIMOLMAT.

Además, se estudió la interacción entre la **Rb**⁴⁺/**Bi**⁴⁺ con distintas estructuras de ADN G-cuádruplex (*h-TELO*, *c-MYC* y *Hairpin*): mediante valoraciones UV-Vis y DC y, a través de estudios *in silico* mediante docking molecular. Dichos estudios tienen como objetivo principal demostrar la interacción entre ambas especies y tratar de racionalizarla, dentro de la búsqueda de nuevos fármacos antitumorales.

Resumo

O presente Traballo de Fin de Máster céntrase na síntese, purificación e caracterización de dous ciclofanos (**Nf**⁴⁺ e **Bi**⁴⁺), análogos do macrociclo *RedBox* (**Rb**⁴⁺), previamente sintetizado polo grupo de investigación QUIMOLMAT.

Ademais, estúdiouse a interacción entre a **Rb**⁴⁺ e a **Bi**⁴⁺ con distintas estruturas de ADN G-cuádruplex (*h-TELO*, *c-MYC* e *Hairpin*): mediante valoracións UV-Vis e DC e, a través de estudos *in silico* mediante docking molecular. Ditos estudos teñen como obxectivo principal demostrar a interacción entre ambas especies e a súa racionalización, no contexto da procura de novos fármaco antitumorais.

Abstract

This Final Master's Thesis focuses on the synthesis, purification and characterization of two cyclophanes (**Nf**⁴⁺ and **Bi**⁴⁺), analogues of the macrocycle *RedBox* (**Rb**⁴⁺), previously synthesized by the QUIMOLMAT research group.

In addition, the interaction between the **Rb**⁴⁺/**Bi**⁴⁺ with different G-quadruplex DNA structures (*h-TELO*, *c-MYC* and *Hairpin*) was studied: by UV-Vis and CD titrations and, through *in silico* studies by molecular docking. The main objective of these studies is to demonstrate the interaction between both species and its rationalization, within the context of the discovery of new antitumor drugs.

II. INTRODUCCIÓN

II. Introducción

El presente trabajo de Fin de Máster se centra en el estudio de la interacción supramolecular entre diferentes compuestos macrocíclicos orgánicos, con diversas estructuras de ADN de tipo dúplex y cuádruplex. El proyecto tiene como objetivo la síntesis, purificación y caracterización de nuevos derivados de la *Red Box*, macrociclo previamente desarrollado por el grupo de investigación QUIMOLMAT y, posteriormente, estudiar su posible interacción con la biomolécula.

II.1 El ácido desoxirribonucleico.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) conforma nuestro genoma. Se trata de una biomolécula que determina la especie que somos a través de la información que almacena en su estructura, es decir, es la biomolécula considerada como la base de la vida. El ADN contiene toda la información genética hereditaria que sirve como guía para desarrollarnos, vivir y reproducirnos. Dicha molécula se encuentra mayoritariamente en el núcleo celular, aunque una pequeña proporción también se localiza en las mitocondrias (ADN nuclear y mitocondrial, respectivamente).¹

Como parte de esta función, el ADN interacciona con distintas proteínas para que se produzca su replicación, es decir, para que se realicen copias de sí mismo y se transfiera la información genética de una célula madre a las hijas. Además de replicarse, el ADN se transcribe en ARN mensajero, y éste se traduce en proteínas, que en última instancia regulan los procesos celulares. A pesar de que las células poseen la maquinaria necesaria para evitar que se produzcan errores en el proceso de replicación, en muchas ocasiones surgen mutaciones durante esta etapa.² Estas mutaciones permiten a los organismos vivos evolucionar, pero en ciertas ocasiones son el origen de muchas enfermedades como el cáncer, lo que coloca al ADN como una de las principales dianas farmacológica de los compuestos anticancerígenos. Por ejemplo, uno de los fármacos más empleados en quimioterapia es el cisplatino, usado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer incluyendo testicular, de ovario, de pulmón, etc.³ Dicho compuesto se une al ADN bloqueando la división celular y, provocando la muerte celular. En este

¹ Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*; 2017.

² ADN y ARN concepto, diferencias y funciones | VIU <https://www.universidadviu.com/es/actualidad/nuestros-expertos/adn-y-arn-concepto-diferencias-y-funciones> (accedido Mar 18, 2021).

³ CISPLATINO | Oncohealth Institute <http://www.oncohealth.eu/es/area-paciente/cancer/informacion-soporte-paciente/informacion-general/tratamiento/quimioterapia/listado-farmacos/cisplatino> (accedido Mar 18, 2021).

caso hablaríamos de un fármaco con perfil quimioterapéutico, ya que su eficacia reside en las diferencias existentes entre células normales y enfermas, con las segundas presentando una mayor velocidad de reproducción y, por lo tanto, resultando más afectadas por el fármaco. En base a estos descubrimientos, las posteriores investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevos agentes de unión al ADN, no solo que permitan controlar su función, si no que encuentren una mejor selectividad como compuestos citotóxicos.

II.2 Estructura del ADN

El ADN se suele encontrar como una estructura de doble hélice conformada por dos hebras antiparalelas. Estas hebras están formadas por unidades que se repiten, denominadas nucleótidos, constituidas por la unión de un azúcar (2-desoxirribosa), una de las cuatro bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina, A, G, C y T, respectivamente) y un grupo fosfato. Los nucleótidos se unen entre sí mediante el enlace del grupo fosfato presente en la posición 5' de un nucleótido con el hidroxilo en posición 3' de otro nucleótido, dando lugar a una cadena que transcurre en sentido 5'→3'.

En 1953, Watson y Crick propusieron la estructura tridimensional del ADN de doble hebra, denominada B-ADN. Esta estructura se forma por la interacción de una hebra en sentido 5'→3' con otra hebra antiparalela, a través de enlaces de hidrógeno entre las bases de A-T y C-G:⁴

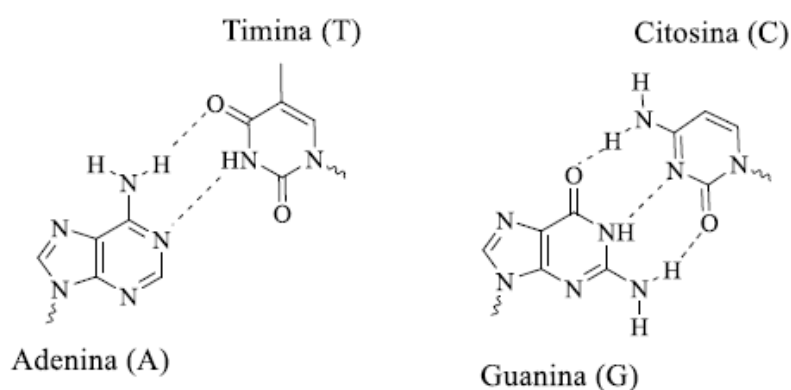


Fig. 1 Apareamiento de pares de bases de nucleótidos de ADN.

⁴ Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 737–738.

Esta estructura se caracteriza por presentar dos surcos bien definidos, denominados surco mayor y surco menor, un diámetro de 2 nm, una media de 10.5 bases por cada giro y una distancia media entre ellas de 3.4 nm (**Figura 2**).

Estudios posteriores de difracción de rayos X permitieron identificar otras dos estructuras de ADN de doble hélice denominadas A-ADN y Z-ADN. La primera de ellas aparece cuando la humedad relativa es reducida a menos de un 75% durante el proceso de cristalización, lo que origina una doble hélice dextrógira, con hebras antiparalelas, más ancha y corta que el B-ADN. En cambio, la segunda hélice presenta una rotación hacia la izquierda, siendo además más larga y estrecha que las otras dos estructuras.

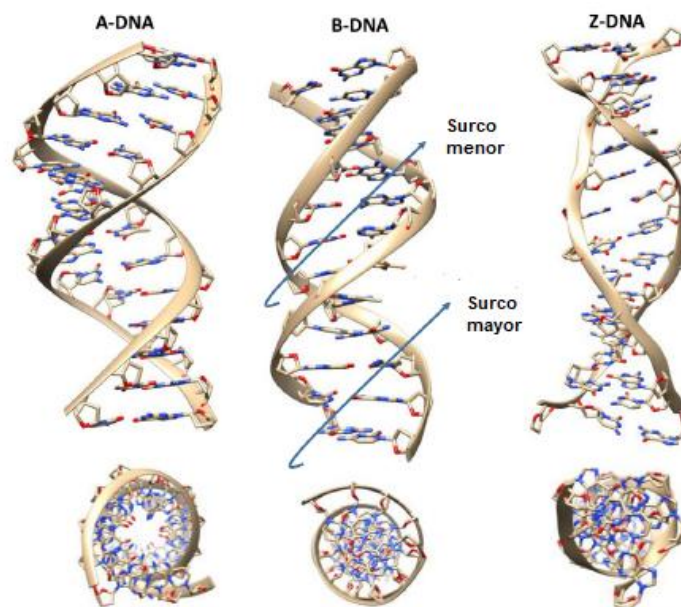


Fig. 2 Dos visualizaciones de las estructuras cristalinas de los tres tipos de ADN dúplex (códigos PDB 1BNA, 1ANA y 2DCG, respectivamente).

II.3 Estructuras no-canónicas de ADN

Pese a que en la mayoría de las células la estructura del ADN se encuentre mayoritariamente como una doble hélice B-ADN, también existen otras estructuras secundarias que pueden desempeñar un papel biológico importante. Este tipo de estructuras se pueden conocer como ADN triple, ADN G-cuádruplex, *i-motif* y uniones de tres- y cuatro- vías. La formación de estas estructuras dependen de un gran número de factores entre los que destacan la secuencia polinucleotídica, el nivel de hidratación,

la naturaleza y la concentración de los cationes metálicos, el superenrollamiento y las modificaciones químicas que pueden presentar las bases.⁵

II.3.1 ADN G-cuádruplex.

Desde hace 50 años se conoce que ciertas secuencias ricas en guaninas pueden formar estructuras moleculares plano-cuadradas (tétrada-G, G4, **Fig. 3**). Este tipo de estructura no canónica se caracteriza por presentar cuartetos de guanosina, cuatro unidades de nucleótido unidas mediante enlaces de hidrógeno y estabilizadas por la presencia de cationes metálicos (sodio o potasio).

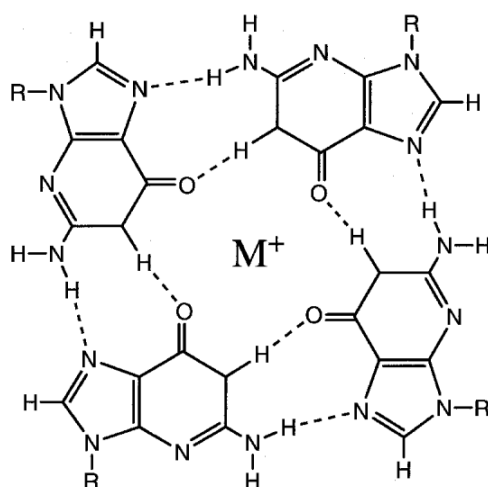


Fig. 3 Estructura G-cuádruplex.

Las estructuras de G-cuádruplex se pueden formar de varias formas: a partir de una sola hebra de ADN doblada tres veces sobre si misma (unimolecular), por el plegamiento de dos hebras normalmente idénticas (bimolecular) o, por último, mediante la unión de tres o cuatro hebras (cuádruplex tetramolecular).

⁵ Gonzalez-Garcia, J.; Vilar, R. *Supramolecular Principles for Small Molecule Binding to DNA Structures*; **2017**; Vol. 4.

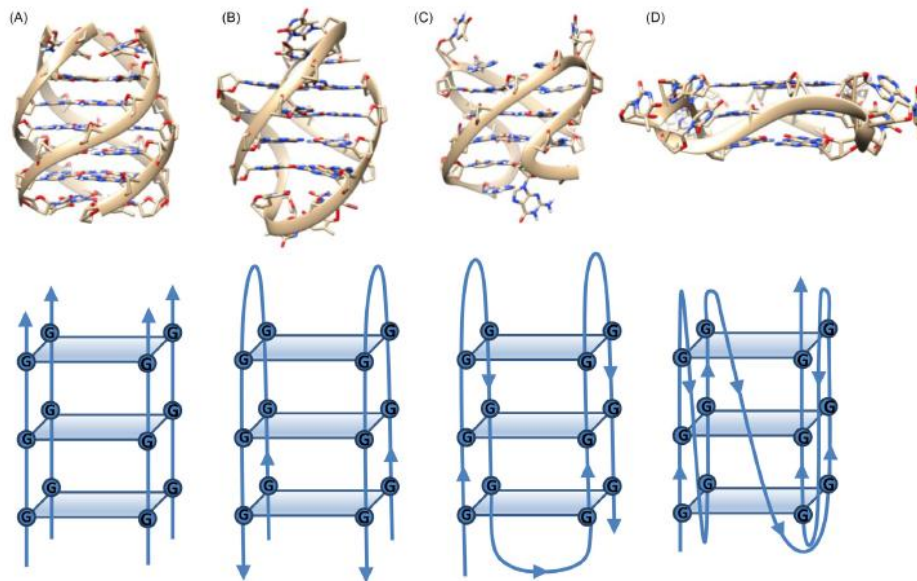


Fig. 4 Estructura (**arriba**) y representación esquemática (**abajo**) de cuatro formas diferentes de ADN G4: (A) Tetramolecular paralelo (PBD:139D), (B) Bimolecular antiparalelo (PBD:1JPQ), (C) Unimolecular antiparalelo (PBD:2KM3) y (D) Unimolecular paralelo (PBD:1KF1).

La formación de estas estructuras está influenciada por procesos biológicos tales como la replicación, translación y empalme. La formación de los G4 es rápida, y dichas estructuras son termodinámicamente estables bajo condiciones fisiológicas, en especial en presencia de iones Na^+ y K^+ . Esto es debido a que estos cationes interactúan electrostáticamente con los grupos carbonilos de las guaninas.⁶ En función del radio iónico del metal, la capacidad para estabilizar el canal central de la estructura varía, siendo mayor en el caso del ion K^+ .

II.3.2 Los telómeros

Los telómeros son los extremos de los cromosomas. Éstos son regiones de ADN no codificante esenciales, ya que dotan de estabilidad a los cromosomas al protegerlos frente a la degradación y los reparan. Además, participan en funciones tan importantes como la mitosis y la estabilidad cromosómica. Recientemente, se ha demostrado que tienen relación con algunas enfermedades, especialmente con el cáncer.

El ADN telomérico (ADNt) consiste en repeticiones en tándem de pequeñas secuencias nucleotídicas con una distribución asimétrica de los pares G:C, las guaninas se acumulan en una de las hebras (hebra G) y se encuentran agrupadas. El extremo 3' del ADN telomérico no está apareada, lo que da lugar a un extremo monofibrilar con

⁶ Chambers, V. S.; Marsico, G.; Boutell, J. M.; Di Antonio, M.; Smith, G. P.; Balasubramanian, S. High-Throughput Sequencing of DNA G-Quadruplex Structures in the Human Genome. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 877–881.

una longitud que varía según la especie. Por esta razón, esta hebra puede dar lugar a estructuras secundarias de ADN G4.¹

Es importante resaltar que en cada uno de los procesos de replicación los telómeros se acortan progresivamente, lo que conduce a una pérdida de información y al envejecimiento celular.

II.3.3 Las telomerasas

El descubrimiento de las telomerasas en 1985 por Blackburn y colaboradores resolvió, en principio, el problema de la replicación de los extremos de las moléculas lineales de ADN. En condiciones normales la longitud de los telómeros se mantiene dentro de un rango determinado, debido a un equilibrio dinámico entre acortamiento y elongación, en el que la telomerasa (enzima capaz de añadir secuencias teloméricas en los extremos cromosómicos) desempeña un papel muy importante. Además de realizar la función de mantenimiento de la longitud de los telómeros, el enzima también puede reparar los daños del ADN, mediante la adición de secuencias teloméricas en los extremos de cromosomas rotos.¹

La telomerasa humana es un complejo ribonucleoproteico que presenta un peso molecular de aproximadamente de un megadalton. Está compuesta por una subunidad proteica catalítica con acción de transcriptasa reversa (TERT) y una proteína asociada (TP1) que interactúa con TERT, y modula la actividad de la enzima. Además, también presenta un fragmento de ARN con secuencia complementaria al telómero (TR) que opera como molde para la síntesis del ADN telomérico.

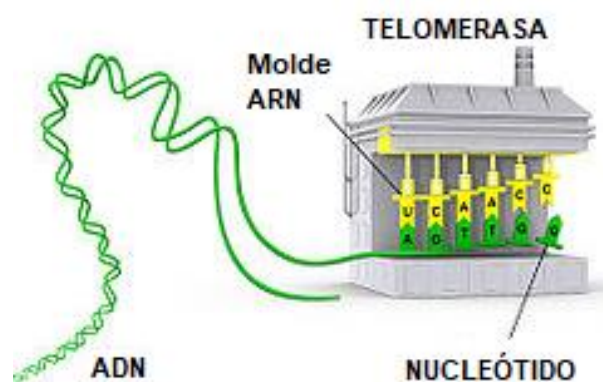


Fig. 5 Mecanismo de adición por parte de la telomerasa de una secuencia de nucleótidos al final del extremo 3' del ADN telomérico.

La enzima telomerasa se encuentra sobreexpresada en la mayoría de las células cancerosas, en torno al 85-90% de ellas, lo que impide que dichas células alcancen una etapa de apoptosis (muerte celular) o senescencia (envejecimiento celular).⁷ El descubrimiento de esta enzima, junto con las secuencias repetitivas de guaninas situadas en los telómeros, han promovido un mayor interés en el estudio de las estructuras de ADN G-cuádruplex. Así, se ha demostrado que ciertas moléculas pequeñas interaccionan y estabilizan el ADN G4, lo que conduce a la inhibición de la actividad de la telomerasa. En base a estos descubrimientos, esta estructura no canónica de ADN se ha convertido en una diana muy prometedora para el diseño de nuevos antitumorales.⁸

II.3.4 Otros oligonucleótidos de ADN G-cuádruplex

Estudios recientes de los últimos años han permitido demostrar que existen secuencias ricas en guaninas no solo en las regiones teloméricas sino también en regiones de ciertos oncogenes, como *c-KIT* o *c-MYC*, y en el ARN.

- ***c-MYC***: Junto con *L-MYC* y *N-MYC*, se trata de un gen perteneciente a la familia de los protooncogenes. *c-MYC* codifica la expresión de la proteína c-MYC en el núcleo de la célula. Esta proteína es un factor de transcripción que se une al ADN regulando la actividad de otros genes. Por lo tanto, la sobreactivación de este tipo de genes puede estimular el desarrollo de cáncer, ya que puede provocar que células normales pierdan el control de la división y de cualquier tipo de regulación. Estudios recientes han demostrado que la inhibición de este tipo de gen, mediante la interacción de moléculas con las regiones de G-cuádruplex, induce la muerte de células de cáncer de pulmón en ratones, lo que lo convierte en una potencial diana para futuros tratamientos.^{9,10}

⁷ Arvelo, F.; Morales, A. *Revision (Biología Celular) Telomero, Telomerasa Y Cáncer*; **2004**; Vol. 55.

⁸ Sun, D.; Guo, K.; Rusche, J. J.; Hurley, L. H. Facilitation of a Structural Transition in the Polypurine/Polypyrimidine Tract within the Proximal Promoter Region of the Human VEGF Gene by the Presence of Potassium and G-Quadruplex-Interactive Agents. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6070–6080.

⁹ Soucek, L.; Whitfield, J.; Martins, C. P.; Finch, A. J.; Murphy, D. J.; Sodik, N. M.; Karnezis, A. N.; Swigart, L. B.; Nasi, S.; Evan, G. I. Modelling Myc Inhibition as a Cancer Therapy. *Nature* **2008**, *455*, 679–683.

¹⁰ Maiti, S.; Saha, P.; Das, T.; Bessi, I.; Schwalbe, H.; Dash, J. Human Telomeric G-Quadruplex Selective Fluoro-Isoquinolines Induce Apoptosis in Cancer Cells. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 1141–1154.

- **ADN horquilla:** Se trata de una estructura que se produce por emparejamiento de bases de forma intramolecular en una propia molécula. Usualmente aparece en ARN aunque, ocasionalmente, también ocurre en moléculas de ADN monocatenarias.¹¹

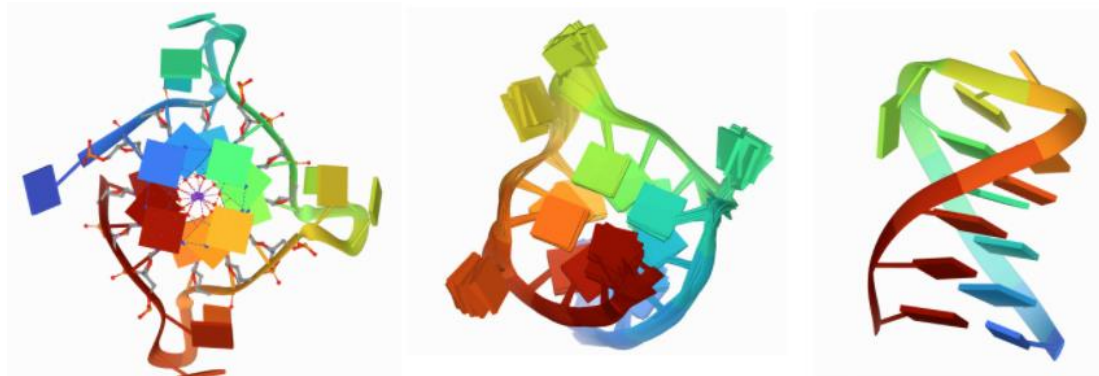


Fig. 6 Estructura plegada del oligonucleótido: **Izq:** *h-TELO*, **Centro:** *c-MYC* y **Dcha:** Horquilla.

II.3.5 Interacciones de moléculas pequeñas con ADN G-cuádruplex

Hace más de 20 años que se descubrió que ciertas moléculas pequeñas con afinidad hacia el ADN G-cuádruplex, pueden producir la inhibición de la enzima telomerasa, la cual está activada en la mayoría de las células cancerosas pero no en células normales.¹² Desde entonces, se han descrito y estudiado multitud de moléculas de pequeño tamaño (< 500 KDa) que interaccionan con el ADN G4, estabilizando su estructura.

La interacción entre una molécula y el ADN G-cuádruplex se produce mayoritariamente a través de interacciones de van der Waals, apilamiento π - π e interacciones electrostáticas. Además, la interacción se suele producir con las tétradas externas del G-cuádruplex, aunque también es posible la unión a los surcos, bucles o una combinación de estos dos. No se considera viable que la molécula intercale entre las tétradas de guaninas debido a la presencia de los cationes monovalentes en el canal central. El diseño de las moléculas que interaccionan con los G4 presenta características comunes. Por ejemplo, cuentan con sistemas que presentan uno o más anillos aromáticos policíclicos, así como una gran superficie plana capaz de interaccionar con las tétradas de ADN. Normalmente, también presenta grupos cargados positivamente a

¹¹ Tallo-bucle - Wikipedia, la enciclopedia libre <https://es.wikipedia.org/wiki/Tallo-bucle#Ejemplos> (accedido Mar 25, 2021).

¹² Bates, P.; Mergny, J.; Yang, D. Quartets in G-major. *EMBO Rep.* **2007**, *8*, 1003–1010.

pH fisiológico, lo que permite que haya una interacción electrostática entre las moléculas y los grupos fosfatos de los surcos/bucles que le aportan estabilidad al complejo ADN-ligando.¹³ Además, es importante que dichas moléculas sean selectivas e interaccionen preferentemente con el ADN G-cuádruplex frente al ADN de estructura canónica.

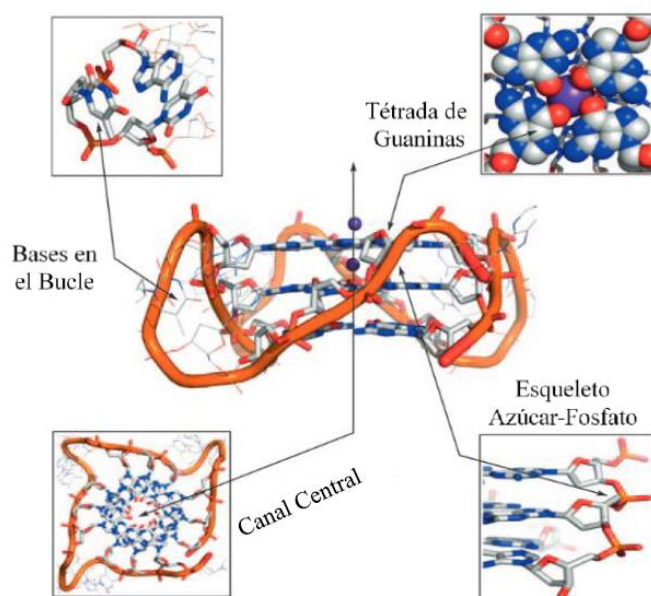


Fig. 7 Estructura del ADN G-cuádruplex que pueden actuar como dianas de unión con moléculas previamente diseñadas.

Por ejemplo, uno de los primeros compuestos que demostraron cierta capacidad para inhibir la telomerasa mediante la estabilización de estructuras de ADN G-cuádruplex fueron las amidoantraquinonas. Estos compuestos presentan algunas de las características mencionadas anteriormente: la presencia de un anillo aromático sustituido con grupos amida y cadenas laterales con grupos cargados positivamente. Sin embargo, estos compuestos también presentan efectos secundarios, como por ejemplo una elevada citotoxicidad celular.¹⁴

¹³ Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M. P. A Hitchhiker's Guide to G-Quadruplex Ligands. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6 (4), 627–636.

¹⁴ Sun, D.; Thompson, B.; Cathers, B. E.; Salazar, M.; Kerwin, S. M.; Trent, J. O.; Jenkins, T. C.; Neidle, S.; Hurley, L. H. Inhibition of Human Telomerase by a G-Quadruplex-Interactive Compound. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 2113–2116.

II.4 Antecedentes

Los ciclofanos representan una clase importante de compuestos debido a su habilidad para comportarse como receptores moleculares, capaces de unirse a diferentes moléculas utilizando interacciones no covalentes. En particular, los ciclofanos tetracatiónicos consisten en dos bipyridinios pobres en electrones π capaces de formar interacciones muy fuertes dador-aceptor con compuestos ricos en electrones π , dando lugar a complejos receptor-sustrato dependiendo del tamaño de la cavidad. El químico británico J. Fraser Stoddart ha sido uno de los pioneros en el desarrollo de ciclofanos que constan de unidades aromáticas conectadas por puentes metílenos. Dicho ciclofano es conocido como *Blue Box de Stoddart* (**Figura 9**).¹⁵

En el grupo de investigación QUIMOLMAT se han diseñado en la última década una serie metalociclos de Pt(II) similares estructuralmente a la *Blue Box*.¹⁶ Se demostró que este tipo de metalociclos presentan interacción con el ADN y, en algunos, con el ADN G4.¹⁷ A modo de ejemplo, se encontró que la actividad de unión al ADN y las actividades *in vitro* observadas para una serie de metalociclos de tamaño creciente (M_{1-3}^{8+} , **Figura 9**) se modulaban de acuerdo con dichos cambios en la forma. Así, el más pequeño de los análogos preparados $M1^{8+}$ tenía menos afinidad, pero mejor selectividad, para la topología G4 particular *c-KIT*, un hecho que se racionalizó sobre la base de que dicho metalociclo era el único de los tres capaz de posicionarse adecuadamente en el bolsillo hidrofóbico de esta estructura particular de G4.

No obstante, pese a estos buenos resultados, los metalociclos de Pt(II) son difíciles de sintetizar y de purificar y, además, presentan cierta toxicidad al tener presente el metal de transición. Por ello, el grupo optó por el diseño de nuevos ciclofanos derivados de estos metalociclos y similares estructuralmente a la *Blue Box*, pero totalmente orgánicos. Así, como alternativa sintética a la preparación de estructuras de tipo ciclofano mediante autoensamblaje dirigido por centros metálicos de Pt(II), el grupo de investigación QUIMOLMAT, ha desarrollado más recientemente una estrategia basada en la utilización de enlaces dinámicos de tipo imina.¹⁶

¹⁵ Asakawa, M.; Dehaen, W.; L'abbé, G.; Menzer, S.; Nouwen, J.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. Improved Template-Directed Synthesis of Cyclobis(Paraquat-p-Phenylene). *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (26), 9591–9595.

¹⁶ Neira, I.; Blanco-Gómez, A.; Quintela, J. M.; García, M. D.; Peinador C. Dissecting the “Blue Box”: Self-Assembly Strategies for the Construction of Multipurpose Polycationic Cyclophanes. *Acc. Chem. Res.* **2020**, *53*, 2336–2346.

¹⁷ Domarco, O.; Lotsch, D.; Schreiber, J.; Dinhof, C.; Van Schoonhoven, S.; Garcia, M. D.; Peinador, C.; Keppler, B. K.; Berger, W.; Terenzi, A. Self-Assembled Pt₂L₂ Boxes Strongly Bind G-quadruplex DNA and Influence Gene Expression in Cancer Cells. *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 329–332.

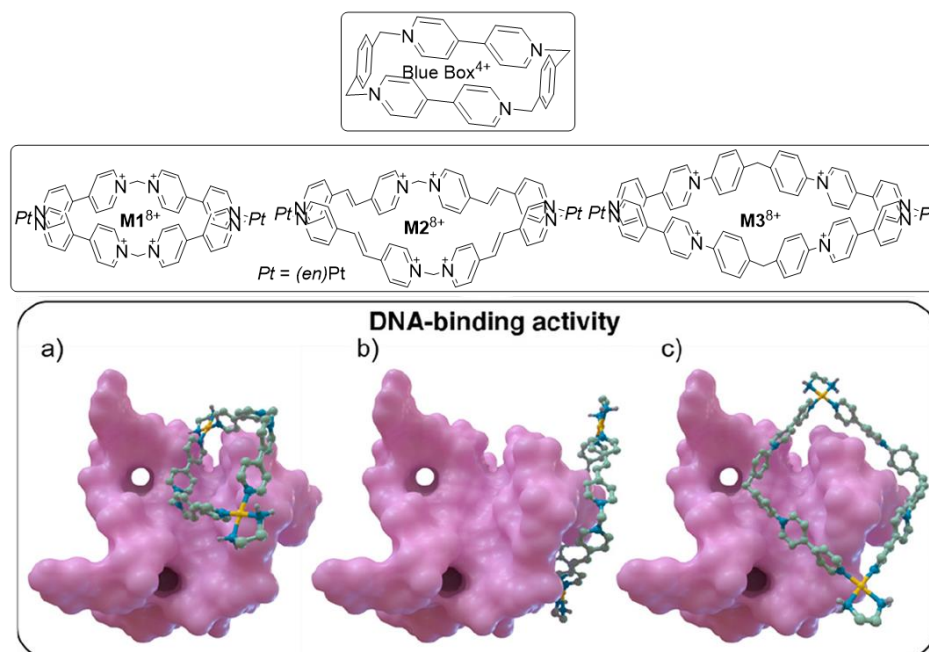


Fig. 8 Estructuras de los ciclofanos *Blue Box* de Stoddart y metalociclos de Pt(II) M_{1-3}^{8+} desarrollados por el grupo QUIMOLMAT con capacidad de unión al ADN. Docking molecular mostrando la pose más probable para la interacción de *c-KIT* G4 y (a) M_1^{8+} , (b) M_2^{8+} , and (c) M_3^{8+} .

En particular, el Dr. Arturo Blanco sintetizó y aisló un análogo al que se denominó *White Box*. Dicho compuesto incorpora en su estructura grupos acil hidrazona, que permiten la formación de un macrociclo inusualmente estable y que se forma bajo control termodinámico en medio acuoso. Además, dicho macrociclo presenta propiedades análogas a las discutidas anteriormente para los macrociclos de Pt(II), presentando la capacidad de interactuar con una gran variedad de sustratos aromáticos en medio acuoso, a través de la combinación de interacciones π - π , $CH \cdots \pi$ e interacciones hidrofóbicas.^{18,19} A la vista de los buenos resultados obtenidos con la *White Box*, el grupo se planteó la posibilidad reemplazar los enlaces acil hidrazona por hidrazona, dando lugar al análogo *Red Box*.¹⁹ Sorprendentemente, la sustitución realizada no produce una mayor inestabilidad hidrolítica de los enlaces imina, formándose estos bajo control cinético debido a la gran deslocalización de carga electrónica sobre los dos anillos pirídnicos en cada lado de la estructura.

¹⁸ Blanco-Gómez, A. Stimuli-Responsive Pyridinium-Based Macrocyclic Hosts. Tesis doctoral, Universidade da Coruña, 2020.

¹⁹ Blanco-Gómez, A.; Neira, I.; Barriada, J. L.; Melle-Franco, M.; Peinador, C.; García, M. D. Thinking Outside the “Blue Box”: From Molecular to Supramolecular PH-Responsiveness. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (46), 10680–10686.

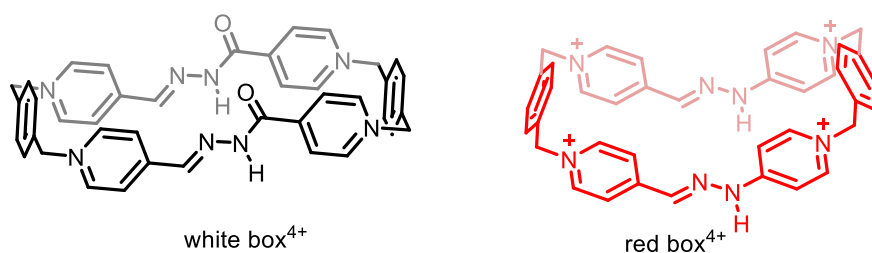


Fig. 9 Estructuras de los ciclofanos *White Box* y *Red Box* desarrollados por el grupo QUIMOLMAT mediante química covalente dinámica de iminas.

Así, se puede decir que análogos completamente orgánicos de los metalociclos de Pt(II) previamente desarrollados por el grupo de investigación pueden ser preparados de una forma más eficiente a través de la química de iminas, preservando las características estructurales de forma y deficiencia electrónica, las cuales se mostraron fundamentales en la capacidad de los metalociclos para su interacción con el ADN. Por tanto, el presente trabajo fin de Máster se centrará en la síntesis, purificación y aislamiento de dos análogos del ciclofano *Red Box*, así como en corroborar la capacidad de estas estructuras macrocíclicas para interactuar con el ADN.

III. OBJETIVOS

III. Objetivos

En base a lo comentado en la introducción, este proyecto se centra en el diseño, síntesis y caracterización de diferentes compuestos análogos de la *Red Box*. También se estudiará su capacidad para interactuar con el ADN, ya que éstos son análogos orgánicos de los metalociclos de Pt(II), previamente desarrollados en el grupo de investigación QUIMOLMAT, que son agentes de unión al ADN. Además, se explorará cómo la variación en el tamaño y forma de estos ciclofanos influye en su interacción con el ADN-G4. Con esto en mente, los objetivos específicos que se proponen para este trabajo de fin de máster son los siguientes:

1. Síntesis, purificación y elucidación estructural de dos nuevos análogos de la *Red Box* (\mathbf{Rb}^{4+}), en los que se sustituyen los fenilos de los laterales de \mathbf{Rb}^{4+} por bifenilo (\mathbf{Bi}^{4+}) y naftaleno (\mathbf{Nf}^{4+}).

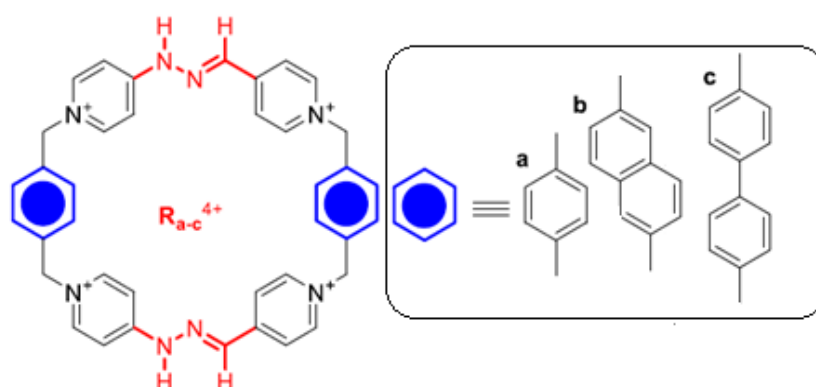


Fig. 10 Estructura general de los ciclofanos: **a)** *Red Box* (\mathbf{Rb}^{4+}), **b)** Análogo \mathbf{Nf}^{4+} , **c)** Análogo \mathbf{Bi}^{4+} .

2. Estudios de interacción de la *Red Box* y del derivado con el grupo Bifenilo con diferentes oligonucleótidos de ADN G-cuádruplex (*c-MYC*, secuencia nucleotídica: TGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAGG; *h-TELO*, secuencia nucleotídica: TTGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGA; y Hairpin, secuencia nucleotídica: CGAATTCGTTTTCGAATTCG) mediante espectroscopía de UV-Vis y de dicroísmo circular (DC).

3. Estudios de interacción *in silico* mediante docking molecular de dos ciclofanos con modelos de *c-MYC* y *h-TELO*.

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

IV. Cronograma

FEBRERO						
L	M	Mi	J	V	S	D
1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28

MARZO						
L	M	Mi	J	V	S	D
1	2	3	4	5	6	7
8	9	10	11	12	13	14
15	16	17	18	19	20	21
22	23	24	25	26	27	28
29	30	31				

ABRIL						
L	M	Mi	J	V	S	D
			1	2	3	4
5	6	7	8	9	10	11
12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25
26	27	28	29	30		

MAYO						
L	M	Mi	J	V	S	D
					1	2
3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23
24	25	26	27	28	29	30

JUNIO						
L	M	Mi	J	V	S	D
	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13
14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27
28	29	30				

- Síntesis, purificación y caracterización
- Estudios de interacción
- Elaboración introducción
- Elaboración memoria
- Revisión bibliográfica
- Tutorías
- Festivos

IV. Discusión de resultados

IV.1 Estrategia sintética

En este apartado se describirá el diseño, síntesis y aislamiento de los dos derivados de Rb^{4+} planteados Bi^{4+} y Nf^{4+} (**Fig. 11**).

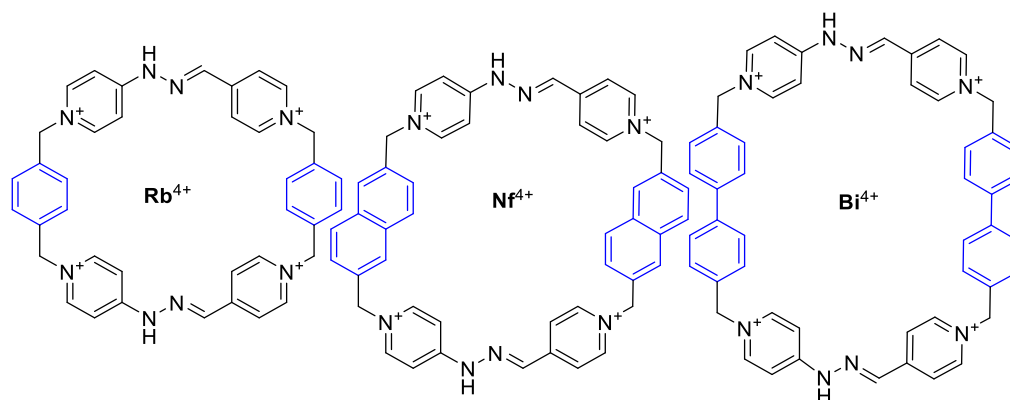
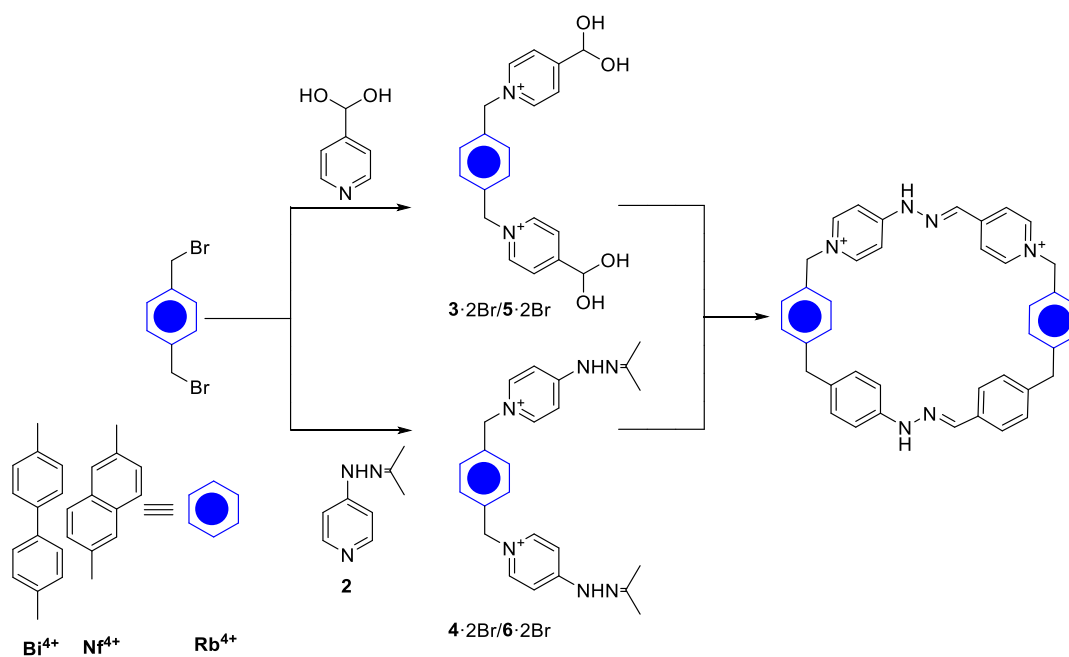


Fig. 11 Estructuras de los ciclofanos discutidos en el presente trabajo.

La síntesis de ambos ciclofanos se planteó en varias etapas siguiendo la metodología descrita para la síntesis de la *Red Box*¹⁹, consistente en preparar las correspondientes herraduras complementarias con grupos hidrazona y aldehído que, a continuación, se ensamblan para dar lugar a los respectivos ciclofanos (**Esquema 1**).

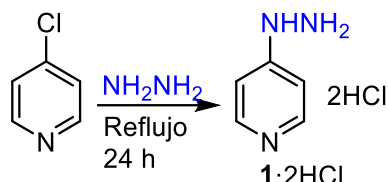


Esquema 1 Esquema sintético de los ciclofanos.

IV.2 Obtención del ciclofano Nf^{4+}

IV.2.1 Síntesis y caracterización de los precursores **1**·2HCl y **2**

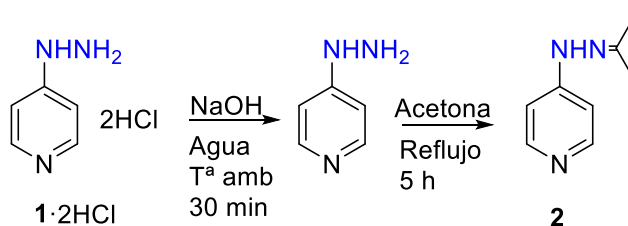
El primer paso para la obtención del ciclofano Nf^{4+} es la preparación del siguiente precursor con el grupo hidracina, como se muestra en el **Esquema 2**.



Esquema 2 Síntesis precursor **1**·2HCl.

Para obtener el compuesto **1**·2HCl se hizo reaccionar la 4-cloropiridina comercial con hidracina mediante una reacción de sustitución nucleófila aromática. La reacción se llevó a cabo en propanol a reflujo durante toda la noche. El seguimiento de la reacción se realizó mediante cromatografía en capa fina. Tras 24 horas, se obtuvo un sólido de color blanco, cuyo espectro de RMN de 1H coincidió con el previamente descrito para la piridihidrazina obtenida con un rendimiento cuantitativo.¹⁹

A continuación, una vez obtenido el precursor **1**·2HCl, se parte de éste para la formación del derivado protegido **2**, tal y como se indica en el siguiente esquema:



Esquema 3 Síntesis precursor **2**.

El precursor **1**·2HCl se disolvió en NaOH 2 M durante media hora. La suspensión inicial de color blanquecino se disolvió poco a poco a la vez que aumentó su temperatura. El producto de reacción se extrajo repetidamente con acetato de etilo, y el extracto combinado se llevó a sequedad. A continuación, el sólido obtenido se disolvió en acetona y se mantuvo a reflujo durante 5 horas, obteniéndose una disolución de color rojo, que se caracteriza mediante RMN de 1H . Así, en el espectro de protón se pueden observar 4 señales. Las dos señales dobletes *a* y *b*, se corresponden con hidrógenos

piridínicos, siendo los *a* los hidrógenos en posición *orto* (α) al nitrógeno y los *b* los hidrógenos en posición *meta* (β) a éste. Las dos señales sobre 4,50 ppm se corresponden con los hidrógenos de los metilos provenientes del grupo cetona, con lo que se puede concluir que la síntesis del precursor **2** ha sido satisfactoria.

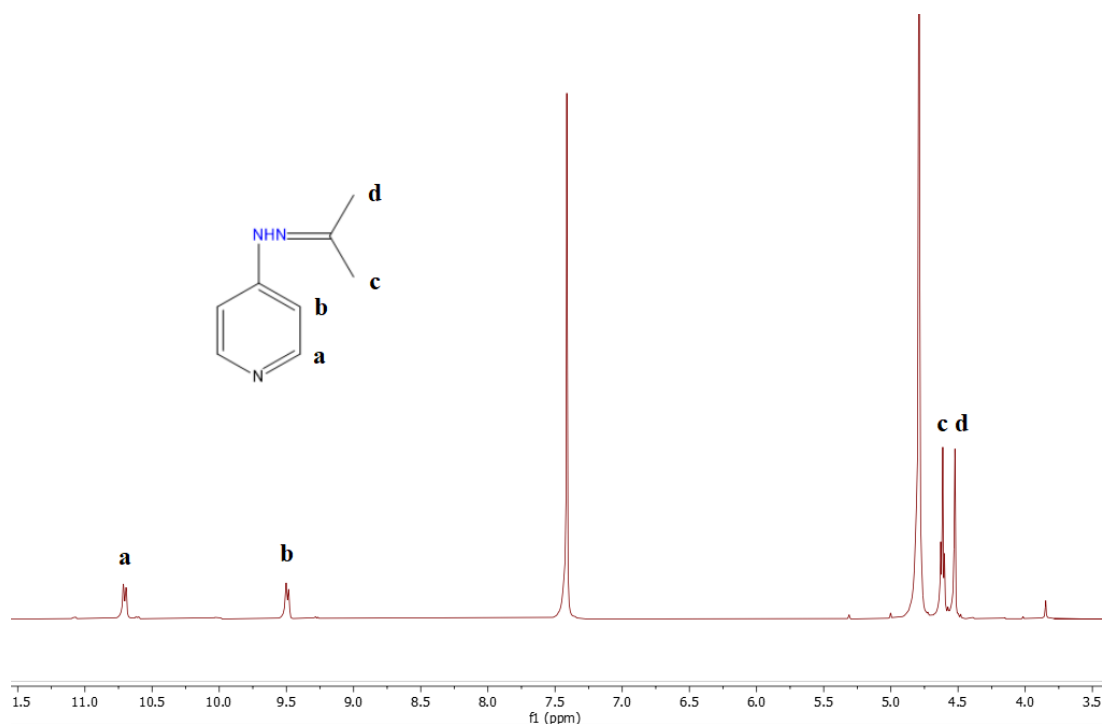
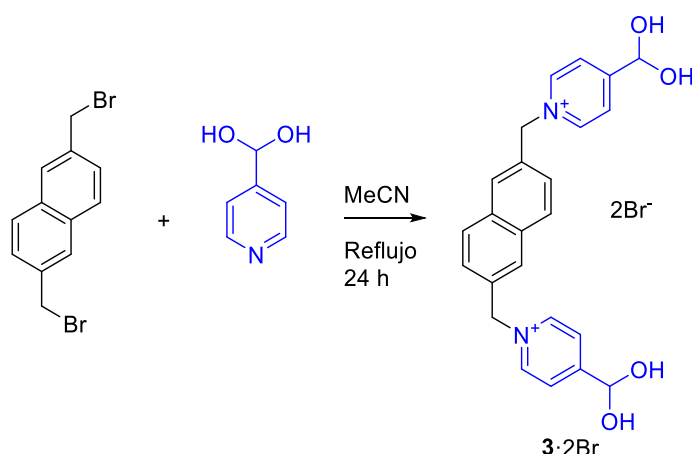


Fig. 12 Espectro de ^1H -RMN (D_2O , 300 MHz) del precursor **2**.

IV.2.2 Síntesis de precursor **3·2Br**

La síntesis de este compuesto se llevó a cabo en un único paso partiendo de los compuestos comerciales 4-piridincarboxialdehído y 2,6-bis(bromometil)naftaleno, que reaccionan mediante una sustitución nucleófila bimolecular $\text{S}_{\text{N}}2$ (**Esquema 4**). Así tras el calentamiento a reflujo de ambos reactivos en acetonitrilo durante toda la noche, se formó un abundante precipitado rojizo que se recogió por filtración y se caracterizó por RMN ^1H .



Esquema 4 Síntesis de la herradura **3·2Br**.

Antes de entrar en detalle con el espectro, hay que comentar que se trata de una molécula que presenta un plano de simetría atravesando los anillos de naftaleno, por lo tanto, las señales que se van a observar son las que se encuentran en uno de los hemisferios (correspondientes a 7 Hs no equivalentes). Así, en primer lugar se encuentran dos dobletes muy desapantallados, debido al efecto de la carga positiva sobre los protones en el anillo pirídínico. Éstos se pueden distinguir por la proximidad a dicha carga, apareciendo a 8.96 ppm H_c , en posición *orto* al N de la piridina, y a 8.13 ppm H_b , en posición *meta*. Seguidos a estos, en torno a 8.00 ppm se observan solapadas las dos señales correspondientes a los protones H_g (s, 4H) y H_e (d, 4H) correspondientes a los anillos de naftaleno. A 7.55 ppm se observa el doblete correspondiente H_f del grupo naftaleno, más apantallado como era de esperar por el patrón de sustitución en el anillo. Por último, se observan dos singletes, uno a 6.18 ppm que integra por 2H y con el desplazamiento típico del hidrógeno del hidrato H_a , y otro a 5.99 ppm por 4H que se corresponde a los grupos CH_2 de la molécula, H_d . Con esta información se puede concluir que la síntesis de la herradura **3·2Br** fue satisfactoria, con un rendimiento alto del 76%.

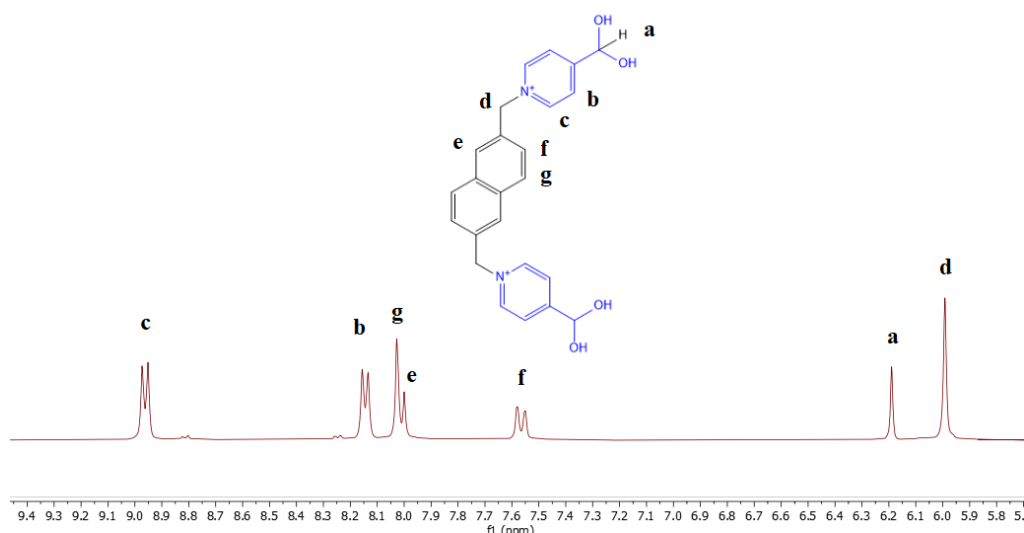
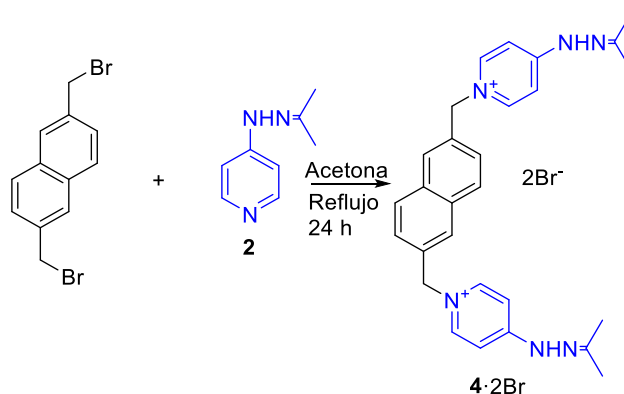


Fig. 13 Espectro de ^1H -RMN (D_2O , 300 MHz) de la herradura $3 \cdot 2\text{Br}$.

IV.2.3 Síntesis y caracterización del precursor $4 \cdot 2\text{Br}$

Para la síntesis del compuesto $4 \cdot 2\text{Br}$, se partió del precursor **2** previamente sintetizado, que se hizo reaccionar con el 2,6-bis(bromometil)naftaleno, mediante un proceso $\text{S}_{\text{N}}2$:



Esquema 5 Síntesis de la herradura $4 \cdot 2\text{Br}$.

El 2,6-bis(bromometil)naftaleno se añadió sobre una disolución del precursor **2** en acetona, y la mezcla se mantuvo a reflujo durante 24 horas. Poco a poco la disolución va tornando hacia un color rojo muy oscuro y apareciendo un copioso precipitado. Tras el día de reflujo la suspensión es enfriada, se filtra y el sólido obtenido de color grisáceo se caracteriza por ^1H RMN (Fig. 15).

Así, en primer lugar, la señal más fácil de identificar es el singlete a 5.48 ppm, H_d 4H, perteneciente a los grupos CH_2 . A continuación, a un desplazamiento más bajo

se encuentran dos singletes por 6H cada uno a 2.08 y 2.02 ppm pertenecientes a los dos metilos de los grupos hidrazona no equivalentes, H_i y H_h . Entre 8-7.40 ppm se encuentran los hidrógenos del grupo naftaleno, apareciendo a mayor desplazamiento los H más próximos al plano de simetría, H_a y H_b , y a menor desplazamiento el H más alejado, H_c . Por último, ha de destacarse que los enlaces Pyr-CNH- presentan rotación impedida (**Figura 14**), por lo que los protones del anillo piridinio se convierten en parcialmente no equivalentes, con señales cercanas a la coalescencia a temperatura ambiente en la escala de tiempos de RMN. En particular, los protones en posición α al nitrógeno se ven menos afectados, apareciendo como un singlete ancho por 4H a 8.16 ppm, H_e . por el contrario las señales correspondientes a H_f y H_g . aparecen mucho más afectadas, prácticamente desapareciendo del espectro (ver ampliación en **Figura 15**).

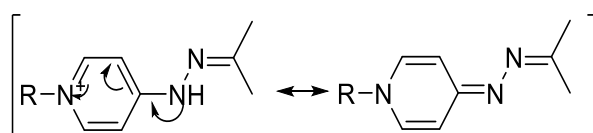


Fig. 14 Formas resonantes para el anillo de piridilhidrazina resultantes en la rotación restringida mencionada en el texto.

En base a la asignación realizada del ^1H RMN, se puede concluir la identidad del sólido como el de la sal **4**·2Br, la cual es obtenida con un rendimiento del 92 %.

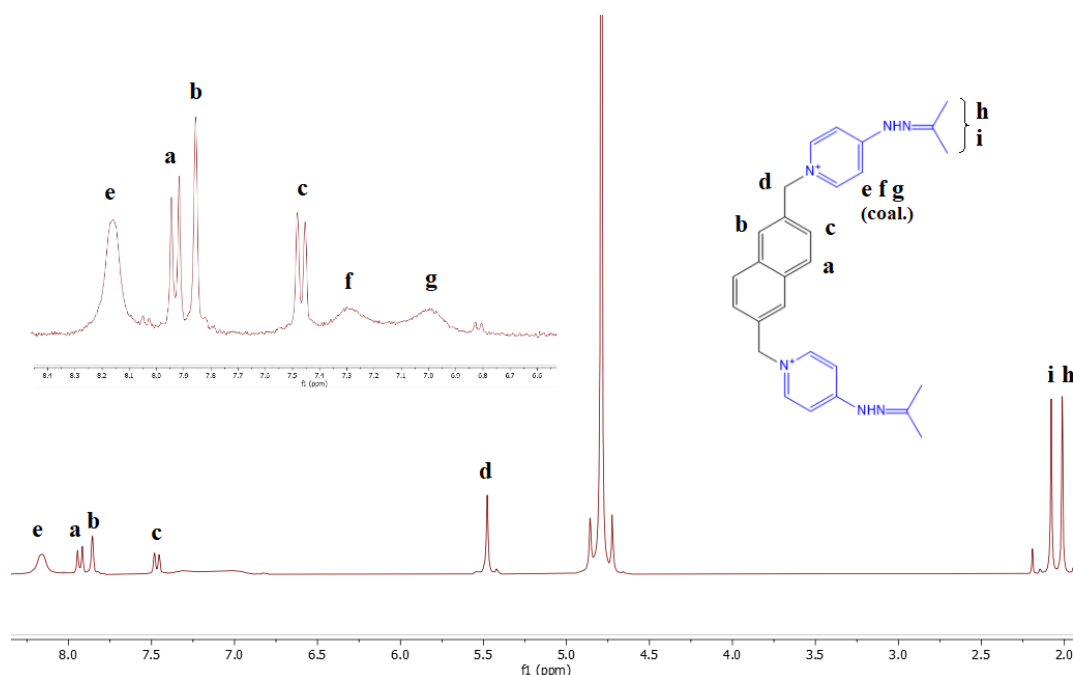
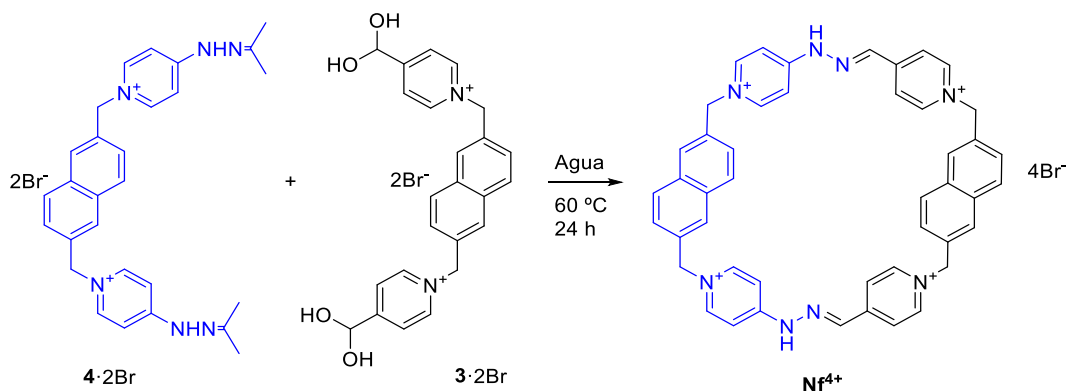


Fig. 15 Espectro ^1H -RMN (D_2O , 300 MHz) de la herradura **4**·2Br.

IV.2.4 Síntesis, purificación y caracterización del ciclofano Nf^{4+}

Para la formación del ciclofano objetivo Nf^{4+} , se partió de las herraduras $\mathbf{3}\cdot 2\text{Br}$ y $\mathbf{4}\cdot 2\text{Br}$:



Esquema 6 Formación del ciclofano Nf^{4+} .

Así, se disolvieron cantidades equimolares de ambas herraduras en 50 mL de agua, sobre la mezcla se añadió 1 μL de TFA como catálisis ácida y la mezcla resultante se calentó a 60 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo la disolución tornó a un color anaranjado. Transcurrido este tiempo se comprobó la formación del ciclofano mediante RMN de protón, observándose la desaparición de las resonancias correspondientes a los materiales de partida, y la aparición de una nueva especie con la resonancia característica de formación de los enlaces imina a 8.23 ppm. Una vez comprobado, se enfrió la disolución con un baño de hielo y, a continuación, se añadió hexafluorofosfato de potasio en exceso para promover la precipitación del ciclofano Nf^{4+} en agua como $\text{Nf}\cdot 4\text{Pf}_6$. Por último, el sólido de color rojo obtenido se filtró a vacío y se procedió a su purificación mediante HPLC en fase reversa.

Así, en primer lugar, se disolvió el sólido en acetonitrilo y se añadió exceso de cloruro de tetrabutilamonio, favoreciéndose la precipitación del ciclofano Nf^{4+} como su sal de cloruro, obteniéndose un sólido de color rojo. Éste se disolvió en la mínima cantidad de agua junto a 100 μL de TFA. Esta disolución se purificó en HPLC en fase reversa obteniéndose un sólido de color amarillento con un rendimiento de la purificación del 11 %.

Una vez se obtuvo el ciclofano $\text{Nf}\cdot 4\text{TFA}$ se caracterizó mediante espectrometría de masas (ESI-MS) y RMN mono y bidimensional: ^1H , ^{13}C , DEPT 135, COSY, HSQC,

HMBC, DOSY, TVAR y EXSY. En el caso de los experimentos bidimensionales de RMN, estos sirvieron para corroborar la asignación de los núcleos de ^1H y ^{13}C en el ciclofano (ver parte experimental y anexos), si bien dicha asignación puede ser realizada fácilmente en base a los desplazamientos químicos, multiplicidades e integración (Hs); o en base a los desplazamientos químicos, intensidades relativas y DEPT-135 (^{13}C).

Brevemente, se puede ver como en el espectro de ^1H RMN para el compuesto mostrado a continuación se pueden observar 15 señales (**Figura 16**), 4 de ellas en coalescencia para $\text{H}_{\text{h-i-j-x}}$, (la última señal está solapada sobre 7.95 ppm, por esta razón no se observa) debidas al fenómeno de rotación restringida previamente mencionado para las unidades de 4-piridilamina. Por el contrario, las señales para las otras dos piridinas, con libre rotación, aparecen bien definidas como dobletes a 8.78 ppm (H_e) y 8.21 ppm (H_f). Otra señal característica de este tipo de compuestos, y fácilmente asignable, es la correspondiente a los protones imínicos H_g , que aparecen especialmente desapantallados por efecto de los anillos piridínicos a 8.24 ppm. Por último, también resultan fácilmente asignables H_d y H_k de los grupos metileno, siendo el más desapantallado el H_d .

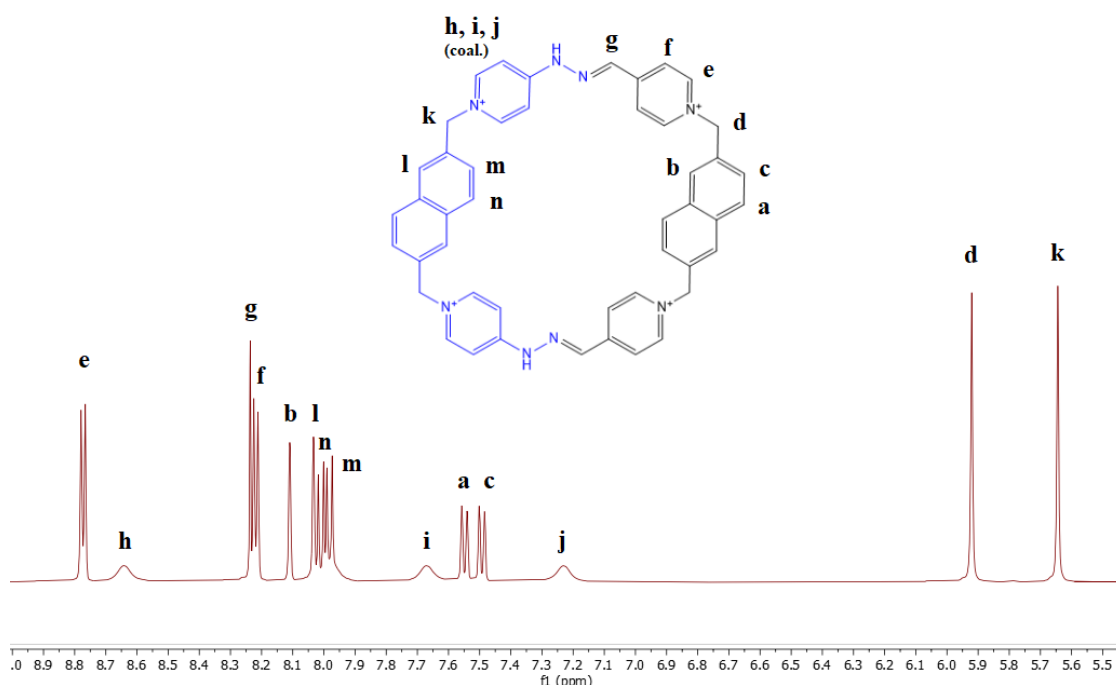


Fig. 16 Espectro de ^1H -RMN (D_2O , 500 MHz) del ciclofano Nf^{4+} .

IV.3 Obtención del ciclofano Bi⁴⁺

IV.3.1 Síntesis y caracterización del precursor 5·2Br

Para realizar la síntesis de la herradura **5·2Br** se siguió la misma ruta sintética que para el ciclofano **Nf⁴⁺**, partiendo en este caso del 4,4'-bis(bromometil)-1,1'-bifenilo (**Esquema 4**). Aquí, se obtuvo un sólido muy oscuro, casi negro, que fue identificado como el compuesto objetivo en base a su ¹H RMN rendimiento = 68 %. Dicho espectro se muestra en el anexo, y resulta fácilmente asignable en base a lo discutido en el **Apartado IV.2.2** para el compuesto análogo **3·2Br**.

IV.3.2 Síntesis y caracterización del precursor 6·2Br

La síntesis de esta herradura se hace del mismo modo que el descrito para la herradura con grupos hidrazona **4·2Br**, en este caso mediante una reacción S_N2 entre el precursor **2** y el reactivo comercial 4,4'-bis(bromometil)-1,1'-bifenilo (**Esquema 5**). En este caso se obtiene un sólido de color grisáceo, que se identifica como el compuesto objetivo en base a su espectro de ¹H RMN (ver anexo); y que es obtenido con un rendimiento cuantitativo.

IV.3.3 Síntesis, purificación y caracterización del ciclofano Bi⁴⁺

Por último, para la formación de **Bi⁴⁺** se utiliza el mismo procedimiento y método de purificación que para el análogo **Nf⁴⁺** (ver **Apartado IV.2.4**). En este caso, se obtiene un sólido con un color amarillento y un rendimiento de purificación del 11 %, tras ser identificado como tal por su ¹H-RMN.

Brevemente, se comentará que el espectro de protón muestra las mismas características generales que el discutido para el análogo **Nf⁴⁺**. Así, aparecen 4 señales en equilibrio lento cercano a coalescencia para los Hs no equivalentes de los grupos 4-piridilamino. Asimismo, a 8.80 ppm (H_c) y 8.25 ppm (H_d), se encuentran los Hs de los otros dos grupos piridinio con rotación libre. Solapado con este último doblete, se encuentra también la señal singlete (2H) característica de los grupos imino formados y, en la zona alifática, también resulta fácil identificar las dos señales singlete a 5.52 y 5.79 ppm (H_i, H_b), para los grupos metileno de la molécula.

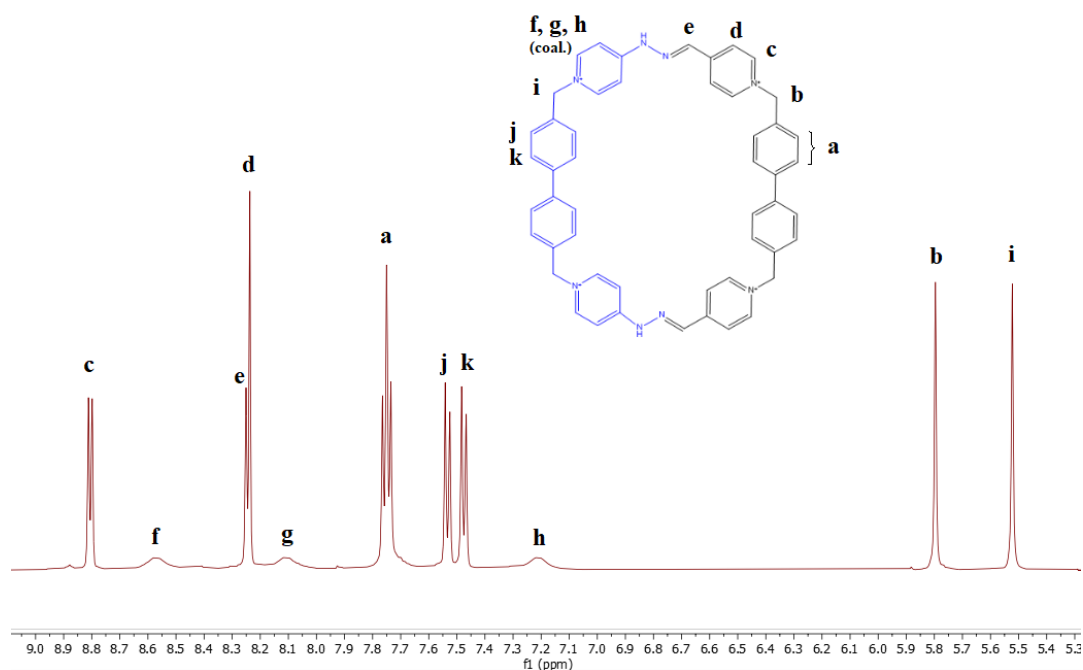


Fig. 17 Espectro ^1H -RMN (D_2O , 500 MHz) del ciclofano Bi^{4+} .

IV.4 Estudios de interacción con ADN

IV.4.1 Estudios mediante espectroscopía de UV-Vis

Las valoraciones por UV-Vis permiten estudiar la interacción de los complejos ciclofano-ADN y, en algunos casos, determinar sus constantes de disociación. Estos experimentos consisten en añadir cantidades crecientes de ADN sobre una disolución de concentración conocida de los ciclofanos, dando lugar a variaciones de los espectros de absorción que se deben a las distintas especies que se encuentran en equilibrio en la disolución. Esta técnica pese a ser sencilla y rápida también presenta ciertas limitaciones, una de ellas la posibilidad de que el espectro de absorción del ADN ($\lambda_{max} = 260 \text{ nm}$) se solape con el de la molécula con la que se espera que interaccione. En nuestro caso, como se puede observar en la **Fig.18**, los espectros de los ciclofanos y del ADN presentan los máximos de absorción a distintas longitudes de onda. Por tanto, si se produce la interacción entre el oligonucleótido y el ciclofano, se podrían observar variaciones en la banda de absorción de este último, como pueden ser: disminución o aumento de la intensidad, o desplazamientos hacia el rojo o el azul.

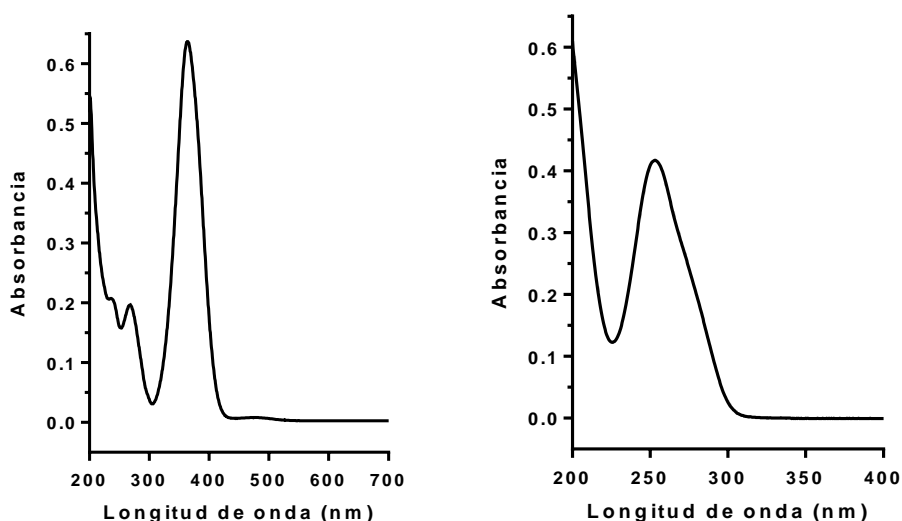
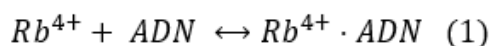


Fig. 18 Espectros de absorción de **Izq:** *Red Box* **Dcha:** *c-MYC*.

Con esto en mente, en primer lugar, se realizó la valoración de la *Red Box* con el oligonucleótido *c-MYC*. Para ello, se registró el espectro de absorción del ciclofano libre ($[Rb^{4+}] = 8 \mu M$). A continuación, se adicionaron cantidades crecientes de una disolución de *c-MYC* ($150 \mu M$) sobre la disolución de la *Red Box*.

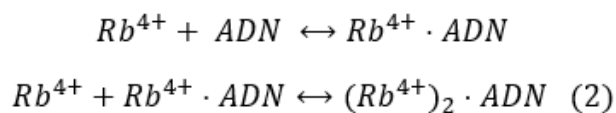
Como se muestra en la **Figura 19**, se observa como la banda a 365 nm disminuye a medida que se aumenta la cantidad de *c-MYC* y, además, el máximo absorción se desplaza inicialmente a mayores longitudes de onda y posteriormente se vuelve a desplazar hacia menores longitudes de onda, lo que sugiere que hay interacción entre la *Red Box* y *c-MYC*. Los datos obtenidos se ajustaron con el programa *DynaFit*²⁰ que, mediante iteraciones con diferentes modelos de equilibrios, permite estimar un valor de la constante o constantes para el/los procesos.

Así, en primer lugar, se realizó un ajuste de los datos obtenidos utilizando un modelo 1:1, es decir, una molécula de *Red Box* interacciona con una molécula de ADN para formar el complejo $Rb^{4+} \cdot ADN$:



²⁰ Kuzmic, P. Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data: Application to HIV Proteinase. *Anal. Biochem.* **1996**, *237*, 260

El ajuste obtenido no fue bueno por lo que a continuación se trató de ajustar los datos con un modelo 2:1 secuencial, es decir, primero se forma un complejo 1:1 y, continuación, hay un segundo equilibrio en el cual se forma el complejo $(Rb^{4+})_2 \cdot ADN$:



Este modelo anterior tampoco proporcionó un buen ajuste, por lo que, se optó por hacer un análisis discriminatorio donde se comparan varios modelos simultáneamente. Así, los datos experimentales se ajustaron bastante bien (**Figura 20 izquierda**), a un modelo donde se unen a la vez cuatro moléculas de *Red Box* con una molécula de ADN, con una constante de disociación $K_D \approx 637 \mu M$:

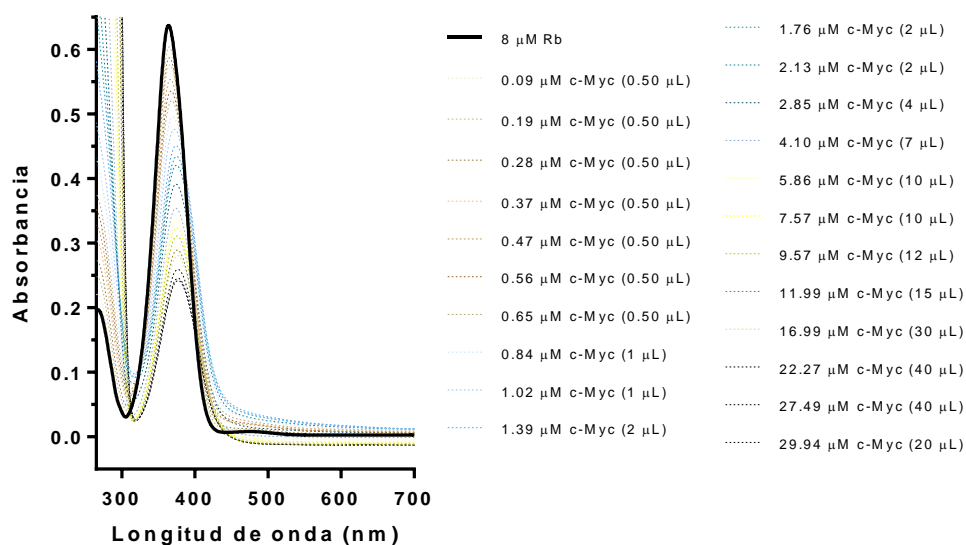
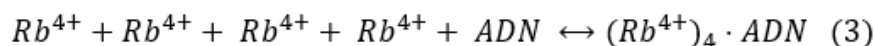


Fig. 19 Espectros de UV-Vis de *Red Box* con cantidades crecientes de *c-MYC*.

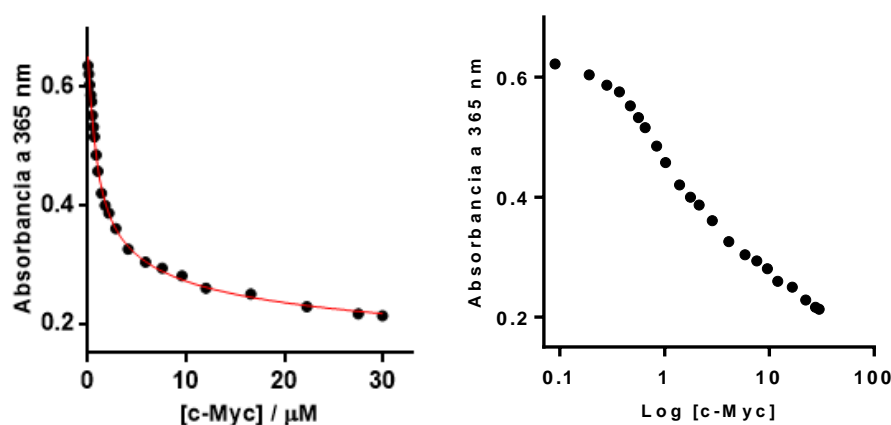


Fig. 20 Perfil de la valoración a 365 nm **Izq:** frente a [c-MYC], incluyendo el ajuste de los datos a un modelo 4:1, **Dcha:** log ([c-MYC]).

Sin embargo, al representar el perfil semilogarítmico de la valoración (**Figura 20 derecha**), se observa que al final de la valoración no se ha alcanzado el *plateau*. Por tanto, para estudiar mejor este equilibrio se necesitaría repetir el experimento añadiendo una mayor cantidad de ADN. Debido al elevado coste de los oligonucleótidos, se decidió continuar los estudios de interacción entre el ADN y la *Red Box* mediante espectroscopía de dicroísmo circular (DC). Utilizando esta técnica se obtiene información muy interesante sobre las variaciones en la estructura quiral del oligonucleótido al interactuar con un determinado ligando, y se necesita menos cantidad de ADN ya que esta especie es la que se mantiene constante durante la valoración.

IV.4.2 Estudios mediante dicroísmo circular

La espectroscopía de dicroísmo circular utiliza luz polarizada circularmente, lo que permite estudiar moléculas quirales, es decir, ópticamente activas. Por ello, esta técnica es muy utilizada para la caracterización de la estructura de distintas biomoléculas como pueden ser las proteínas o el ADN. En este contexto, el DC proporciona información sobre la estructura secundaria, obteniéndose espectros diferentes para estructuras de ADN G4 paralelas o antiparalelas, como es el caso de los oligonucleótidos estudiados en este trabajo.

Además, esta técnica permite estudiar la interacción entre una molécula aquiral y una molécula quirral fácilmente, ya que la molécula aquiral no va a presentar ninguna banda en el espectro de DC, simplificando el estudio.

Teniendo en mente lo comentado anteriormente, en este apartado se comentarán las valoraciones realizadas de los oligonucleótidos *c-MYC*, *h-TELO* y *Hairpin* con los ciclofanos \mathbf{Rb}^{4+} y \mathbf{Bi}^{4+} . En primer lugar, se registraron los espectros de DC de los oligonucleótidos, para así conocer sus perfiles (**Figura 21**).

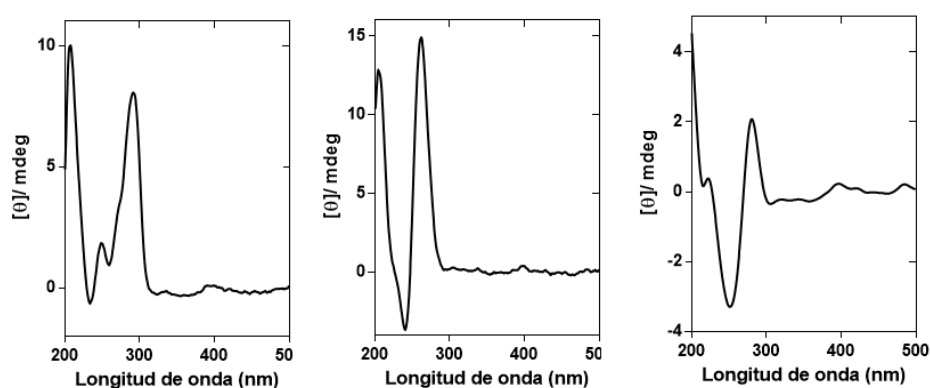


Fig. 21 Espectros de DC de: **Izq:** *h-TELO*, **Centro:** *c-MYC*, **Dcha:** *Hairpin*.

A continuación, se realizan las valoraciones añadiendo cantidades crecientes de los ciclofanos sobre las disoluciones de los oligonucleótidos. En función del oligonucleótido y del ciclofano estudiado, se observaron distintas variaciones en las bandas de los espectros iniciales de los oligonucleótidos.

Como se puede observar en la figura siguiente, en general, todas las valoraciones siguen una tendencia similar, la señal de las bandas iniciales de los oligonucleótidos tiende a disminuir y, en algunos casos, aparece una banda inducida sobre 350/400 nm.

En el caso del *h-TELO* (**Fig. 22.A** y **Fig. 22.D**) se observan diferencias en su interacción con ambos ciclofanos. En ambos espectros, inicialmente se observa un aumento de las bandas a 290 nm y la aparición de una nueva banda inducida, lo que sugiere una interacción entre el ADN y los ciclofanos. A medida que se aumenta la concentración de los ciclofanos, se observa que todas las bandas tienden a disminuir su intensidad, a la vez que se empieza a observar turbidez en la disolución.

En el caso particular de la Rb^{4+} (**Fig. 22.A**) se puede observar como aparece una banda inducida a 398 nm y, en cambio, en el caso de la Bi^{4+} (**Fig. 22.D**) aparece a una longitud de onda menor, sobre 360 nm. Esta diferencia en la longitud de onda de las bandas inducidas, que están asociadas al espectro de absorción de los ciclofanos, podría ser debida a que, estos adopten una conformación diferente al interactuar con *h-TELO* (como parecen sugerir los estudios de Docking del **Apartado IV.4.3**). Para ambos casos, se ajustaron los datos a un modelo 1:1 y se estimó el valor de las constantes de disociación con el programa *Dynafit*, ($K_{D\ 398}(\text{Rb}^{4+}) \approx 0.94\ \mu\text{M}$ y $K_{D\ 367}(\text{Bi}^{4+}) \approx 13.9\ \mu\text{M}$), lo que sugiere una mejor interacción del ciclofano con menor tamaño (*Red Box*) con *h-TELO*.

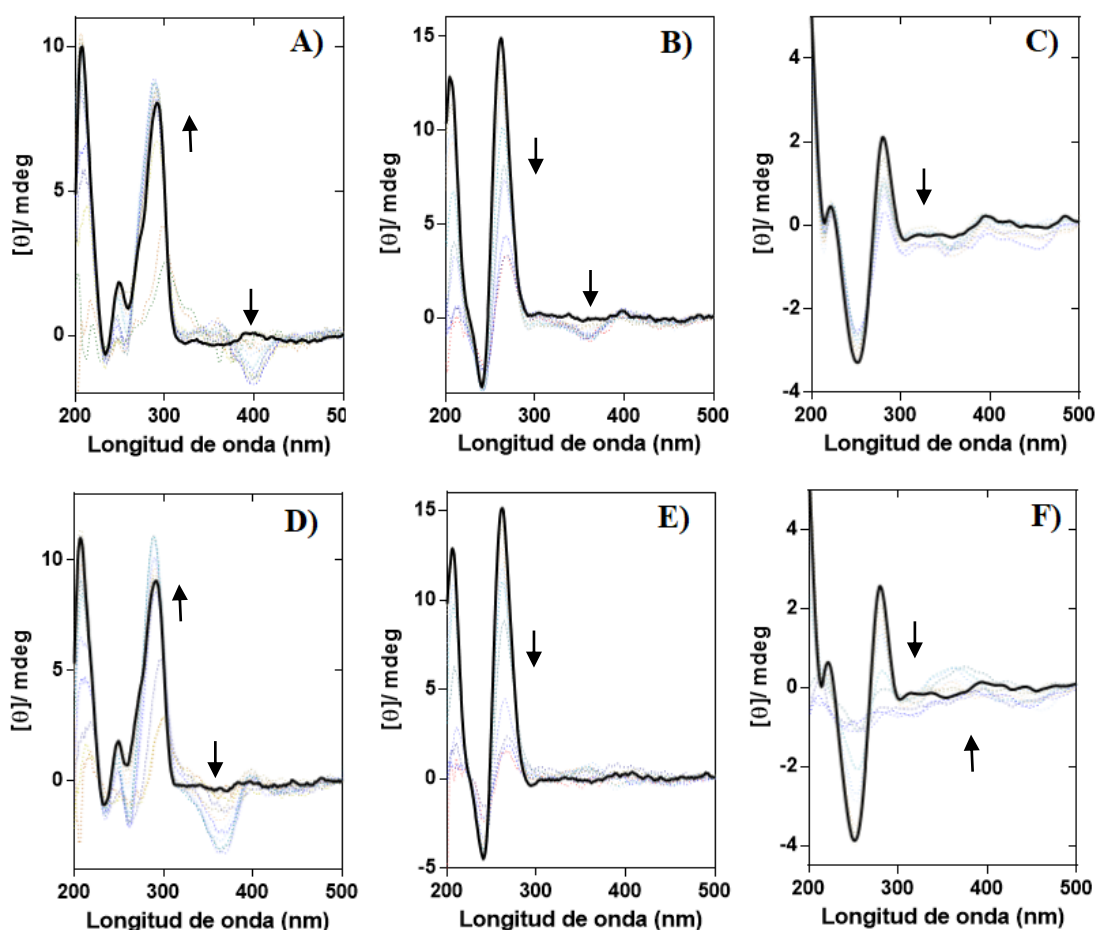


Fig. 22 Valoraciones de DC de: A) *h-TELO* con Rb^{4+} ; B) *c-MYC* con Rb^{4+} ; C) *Hairpin* con Rb^{4+} ; D) *h-TELO* con Bi^{4+} ; E) *c-MYC* con Bi^{4+} ; F) *Hairpin* con Bi^{4+} .

Por otro lado, en el caso particular de *c-MYC* se observa la misma tendencia en la banda a 264 nm, que disminuye su intensidad en ambas valoraciones. En cambio, en el caso de la valoración con la Rb^{4+} (**Fig. 22.B**) se observa la aparición de una banda

inducida sobre 365 nm, que en el caso de la valoración con la **Bi**⁴⁺ (**Fig. 22.E**) no aparece. Puesto que la banda inducida está asociada al espectro de absorción del ciclofano, la ausencia de banda inducida para el ciclofano **Bi**⁴⁺ sugiere que, ambos ciclofanos presentan un modo de interacción con el ADN diferente. Los datos se ajustaron a un modelo 1:1 y se estimó el valor de las constantes de disociación: $K_{D\ 363}$ (**Rb**⁴⁺) $\approx 8\ \mu\text{M}$ y $K_{D\ 263}$ (**Bi**⁴⁺) $\approx 11\ \mu\text{M}$, teniéndose un mejor ajuste de los datos en el caso de la valoración con la **Rb**⁴⁺.

Por último, en el caso del *Hairpin* se observan variaciones comunes en ambas valoraciones, la banda a 282 nm disminuye su intensidad. No obstante, en el caso de la **Bi**⁴⁺ aparece una banda inducida positiva a 360 nm que en el caso de la **Rb**⁴⁺ no aparece. Ajustando los datos a un modelo 1:1 se estimaron las constantes de disociación para ambos ciclofanos: $K_{D\ 280}$ (**Rb**⁴⁺) $\approx 4\ \mu\text{M}$ y $K_{D\ 282}$ (**Bi**⁴⁺) $\approx 11\ \mu\text{M}$, obteniéndose un mejor ajuste para la valoración con la **Rb**⁴⁺.

A modo de resumen, y considerando que se trata todavía de estudios muy preliminares (habría que realizar réplicas para llegar a resultados más fiables), se puede decir que los datos obtenidos sugieren que la interacción de *h-TELO* con la *Red Box* es mejor ya que es la que presenta una mejor constante de disociación.

IV.4.3 Estudios mediante docking molecular

Por último, en este apartado se va a discutir los resultados obtenidos *in silico*, para el estudio de la interacción de modelos 3D de los ciclofanos y oligonucleótidos mediante metodología de docking molecular. En breve, con el docking se buscará encontrar cual es la orientación o pose preferida de los ciclofanos con respecto a los oligonucleótidos *h-TELO* y *c-MYC*. Para ello, los ciclofanos **Rb**⁴⁺ y **Bi**⁴⁺ se consideran como ligandos sin restricciones conformacionales, frente a los oligonucleótidos que serán considerados receptores rígidos.

En la práctica, para realizar estos estudios se utilizaron en primer lugar modelos 3D de los oligonucleótidos que se recogieron de la plataforma RCSB Protein Data Bank (*h-TELO*, PDB: 1KF1; *c-MYC*, PDB: 1XAV). Los modelos 3D de los ciclofanos **Rb**⁴⁺ y **Bi**⁴⁺ fueron generados mediante el programa Avogadro y optimizados en su geometría usando el campo de fuerza mecánica molecular MMFF94 implementado en dicho programa. Acto seguido, el docking molecular *per se* fue realizado usando el software

de libre distribución AutoDock Vina 1.1.2 implementado dentro del software UCSF Chimera y siguiendo los pasos descritos en detalle dentro de la parte experimental de este trabajo. Como resultado de cada experimento, el programa Autodock genera una gran cantidad de posibles poses de ligando, que son evaluadas utilizando una “*score function*”, la cual está basada en un campo de fuerza de mecánica molecular y organiza las distintas poses en un ranking basado en la probabilidad de que estas representen una interacción de unión más o menos favorable. Así, a continuación, se analizarán de forma gráfica las soluciones o poses más probables para cada interacción ciclofano-oligonucleótido.

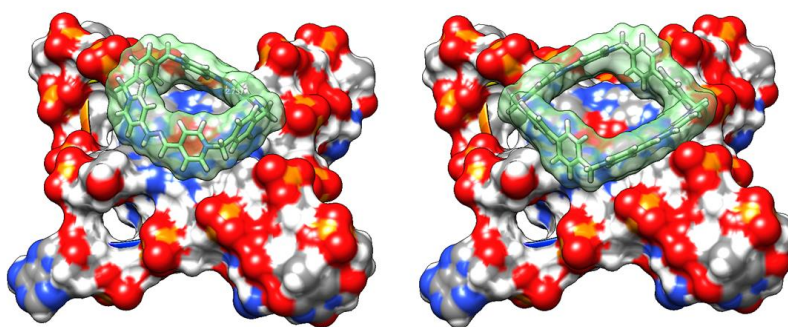


Fig. 23 Resultados Docking **Izq:** *h-TELO/Rb⁴⁺* **Dcha:** *h-TELO /Bi⁴⁺*.

Como se puede observar en la **Figura 23**, ambos ciclofanos interaccionan en la misma zona del modelo de *h-TELO*, colocándose en la parte inferior de su estructura donde optimizan los contactos de van der Waals con la región exterior del cuarteto de guaninas. En el caso de la **Rb⁴⁺** el programa predice también una interacción adicional por enlace de hidrógeno, entre uno de los hidrógenos imínicos del ciclofano y un nitrógeno de una base de guanina (Ver **Fig. 25**).

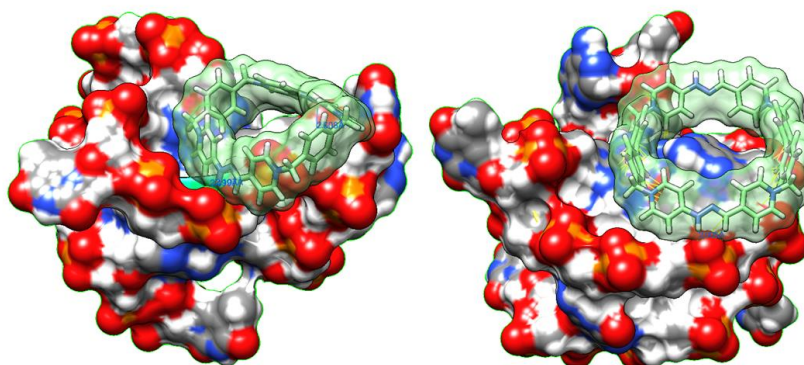


Fig. 24 Resultados Docking **Izq:** *c-MYC/Rb⁴⁺* **Dcha:** *c-MYC/Bi⁴⁺*.

En el caso del Docking de Rb^{4+} y Bi^{4+} con *c-MYC*, se puede observar como los ciclofanos se unen en este caso a diferentes surcos de la estructura, optimizando a través de fuerzas de van der Waals su unión al ADN. Además, se pueden observar enlaces de hidrógeno en ambos casos, que dotan de mayor estabilidad al complejo. En el caso particular de la Rb^{4+} se observan tres enlaces de hidrógeno entre el ciclofano y la biomolécula, dos a través de uno de los hidrógenos imínicos, y el otro con el mismo hidrógeno del lado contrario con otro grupo fosfato de la cadena nucleotídica. Por otro lado, en el caso de la Bi^{4+} se observa un enlace de hidrógeno entre uno de los hidrógenos imínicos del ciclofano y un nitrógeno de una base de guanina (**Figura 25**).

En la siguiente figura se puede observar en más detalle las interacciones debidas a los enlaces de hidrógeno comentadas anteriormente. En el caso del Docking entre el *h-TELO* y Rb^{4+} el enlace de H presenta una distancia de 2,7 Å y un ángulo de 129°. En el caso del *c-MYC* y Rb^{4+} los enlaces de H entre uno de los hidrógenos imínicos y el grupo fosfato presentan una distancia de 2,5 Å (ángulo de 131°) y 2,1 Å y (ángulo de 156°), además de 2,6 Å (ángulo de 137°) entre el hidrógeno imínico contrario y otro grupo fosfato. Por último, en el caso particular entre el *c-MYC* y Bi^{4+} se observa un enlace de hidrógeno que presenta una distancia de 2,4 Å (ángulo de 156°).

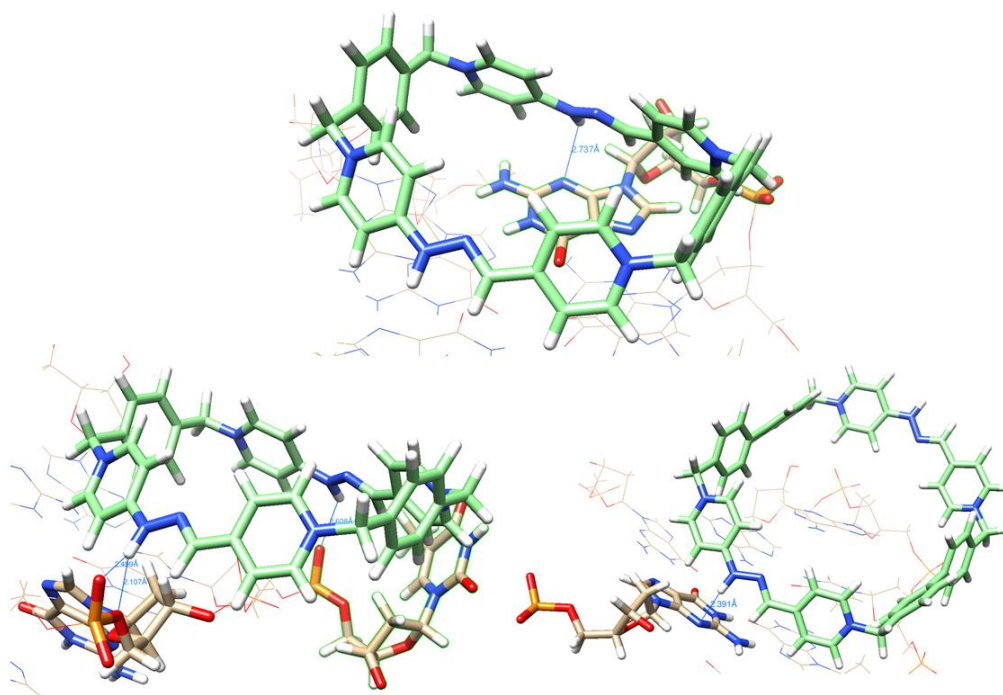


Fig. 25 Representación de los enlaces de hidrógeno entre **Arriba:** *h-TELO*/ Rb^{4+} , **Izq:** *c-MYC*/ Rb^{4+} , **Dcha:** *c-MYC*/ Bi^{4+} .

V. PARTE EXPERIMENTAL

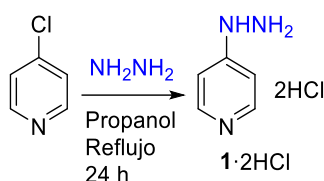
V.1 General

El agua empleada para realizar los experimentos ha sido agua de grado Milli-Q, los reactivos y disolventes utilizados son comerciales sin ninguna purificación adicional. El compuesto *RedBox*-4TFA fue proporcionado por el grupo de investigación QUIMOLMAT5 en cantidad y pureza adecuados para la realización del presente TFM. El seguimiento de las reacciones se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄) y una lámpara ultravioleta a 254 y 360 nm.

La caracterización por RMN se llevó a cabo en el equipo ubicado en el CICA: *Bruker Avance 300* (300 MHz para protón) y en el equipo ubicado en los Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Coruña: *Bruker Avance 500* (500 MHz para protón y 125 MHz para carbono). Los espectros se registraron en agua deuterada siguiendo el pico del disolvente como referencia. La caracterización de espectrometría de masas también se realizó en el SAI empleando un LC-Q-TOF de *Applied Biosystems* y un QSTAR ELITE de alta resolución.

La purificación de los ciclofanos finales se realizó en un HPLC *Agilent 1260 Infinity II* en fase reversa. La detección se llevó a cabo a 220 y 280 nm, simultáneamente. Para las inyecciones analíticas se utilizó una columna analítica Aeris 3.6 µm PEPTIDE XB-C18 100 Å (150 x 2.1 mm) de Phenomenex, y para la purificación una semipreparativa Aeris 5 µm PEPTIDE XB-C18 100 Å (250 x 10.0 mm) de Phenomenex. El gradiente empleado para las inyecciones analíticas fue de 5→95 % en 25 min y para la purificación de 15→55 % en 15 min MeCN 0.1 % TFA/H₂O 0.1 % TFA.

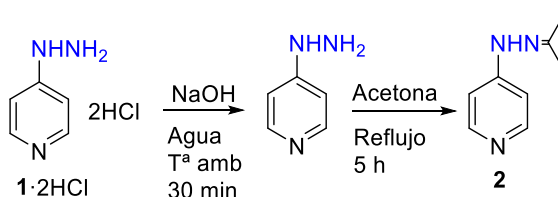
V.2 Síntesis del precursor 1·2HCl



6.0263 g (39.99 mmol, 1 eq) de 4-cloropiridina se añadieron 38 mL (599.9 mmol, 15 eq, 50 % agua) de hidracina y 100 mL de propanol. La disolución resultante, de color amarillento, se dejó a reflujo durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se obtuvo una suspensión de color blanco que se evaporó a sequedad y se liofilizó. Se obtuvieron así 8.6187 gramos de un sólido de color blanco, que se identificó como el compuesto esperado por sus datos espectroscópicos (rendimiento = 118 %).

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 300 MHz), δ (ppm): 7.99 (d, $J = 7.76$ Hz, 2H), 6.94 (d, $J = 7.29$ Hz, 2H).

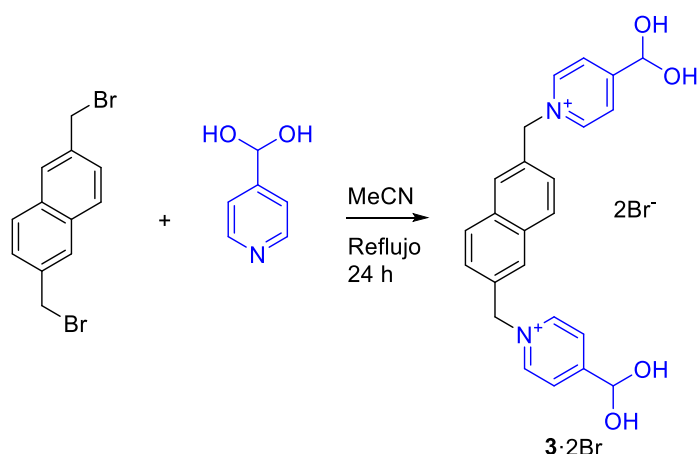
V.3 Síntesis del precursor 2



3.0109 g (39.99 mmol, 1 eq) del precursor 1·2HCl y 11.9634 g (300.0 mmol, 7.50 eq) de NaOH y se disolvieron en 150 mL de agua. La suspensión blanquecina se agitó durante 30 minutos, tiempo tras el cual el sólido se disolvió totalmente y la temperatura de la disolución aumentó. A continuación, se realizaron 8 extracciones con AcOEt. Las fases orgánicas se combinaron y secaron con MgSO_4 . El sólido se eliminó mediante filtración a gravedad y el filtrado se concentró a sequedad obteniéndose un sólido de color rojo. Sobre éste se añadieron 100 mL de acetona y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 5 horas, obteniéndose una disolución de color rojizo que se identificó con el compuesto esperado en base a sus datos espectroscópicos.

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 300 MHz), δ (ppm): 10.70 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 9.53 – 9.45 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H).

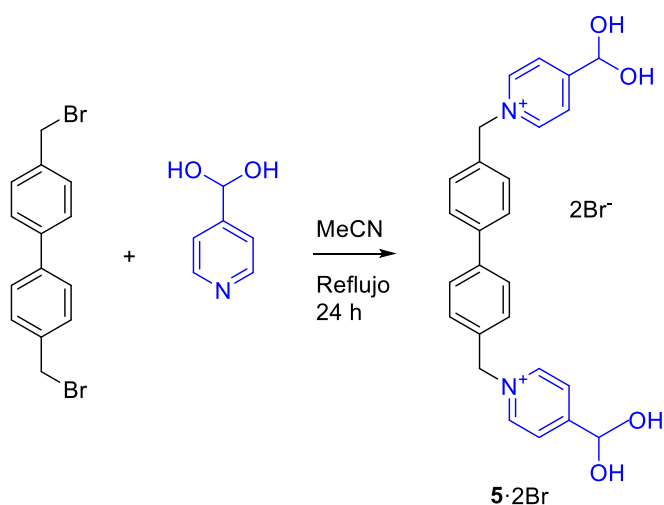
V.4 Síntesis del precursor 3·2Br



0.2696 g (0.886 mmol, 1 eq) de 2,6-bis(bromometil)naftaleno se disolvieron en 20 mL de MeCN. Sobre esta disolución se añadieron 0.500 mL de 4-piridincarboxialdehído (5.32 mmol, 6 eq.) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 24 horas, cambiando de un color amarillo pálido a amarillo anaranjado con la aparición de un abundante precipitado. El sólido obtenido se filtró a vacío y se lavó con MeCN y dietiléter. Se obtuvieron así 0.3812 gramos de un sólido de color rojizo, que se identificó como el compuesto esperado por sus datos espectroscópicos (rendimiento = 76 %).

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 300 MHz), δ (ppm): 8.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 8.14 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 8.03 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 7.57 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.19 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 5.99 (d, $J = 9.4$ Hz, 2H).

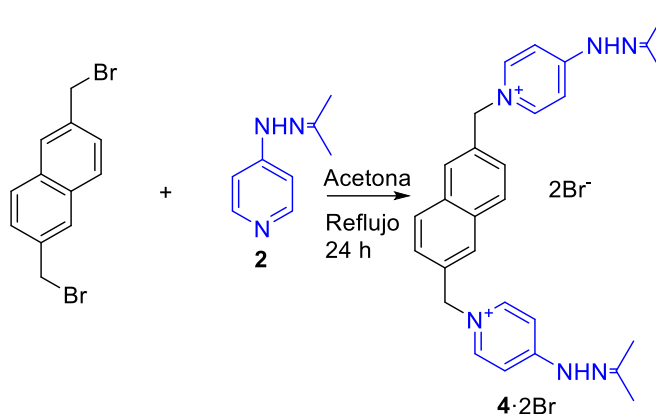
V.5 Síntesis del precursor 5·2Br



0.2854 g (0.847 mmol, 1 eq) de 4,4'-bis(bromometil)-1,1'-bifenilo se disolvieron en 20 mL de MeCN y sobre esta mezcla se añadieron 0.544 mL (5.08 mmol, 6 eq) de piridincarboxialdehído. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 24 horas, cambiando el color de la disolución a un color amarillo anaranjado. Transcurridas las 24 h se observó un precipitado de color muy oscuro, que se filtró y lavó con MeCN y AcOEt. Se obtuvieron así 0.3394 gramos de un sólido muy oscuro, que se identificó como el compuesto esperado por sus datos espectroscópicos (rendimiento = 68 %).

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 300 MHz), δ (ppm): 8.93 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 8.14 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.19 (s, 1H), 5.86 (s, 2H).

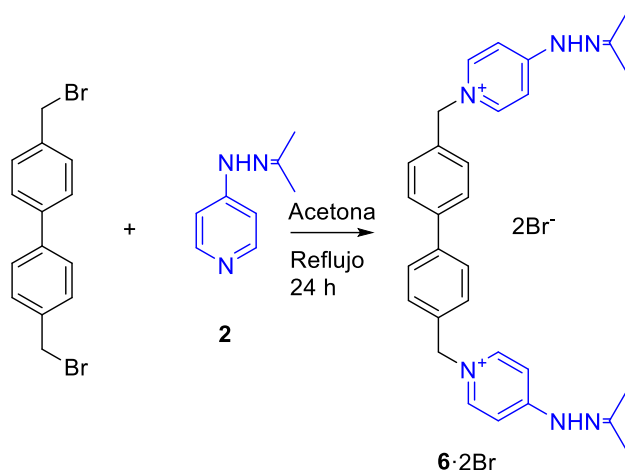
V.6 Síntesis del precursor 4·2Br



0.2231 g (0.722 mmol, 1 eq) de 2,6-bis(bromometil)naftaleno se añadieron sobre 100 mL de una disolución del precursor **2** en acetona comercial. La suspensión se calentó a reflujo durante 24 horas. A continuación, la suspensión se filtró a vacío y el sólido aislado se lavó primero con acetona y después con dietiléter. Se obtuvieron así 0.4073 gramos de un sólido de color grisáceo, que se identificó como el compuesto esperado por sus datos espectroscópicos (rendimiento = 92 %).

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 300 MHz), δ (ppm): δ 8.19 – 8.13 (m, 2H), 7.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.47 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.33 – 7.27 (m, 1H), 7.03 – 6.97 (m, 1H), 5.48 (s, 2H), 2.08 (s, 3H), 2.01 (s, 3H).

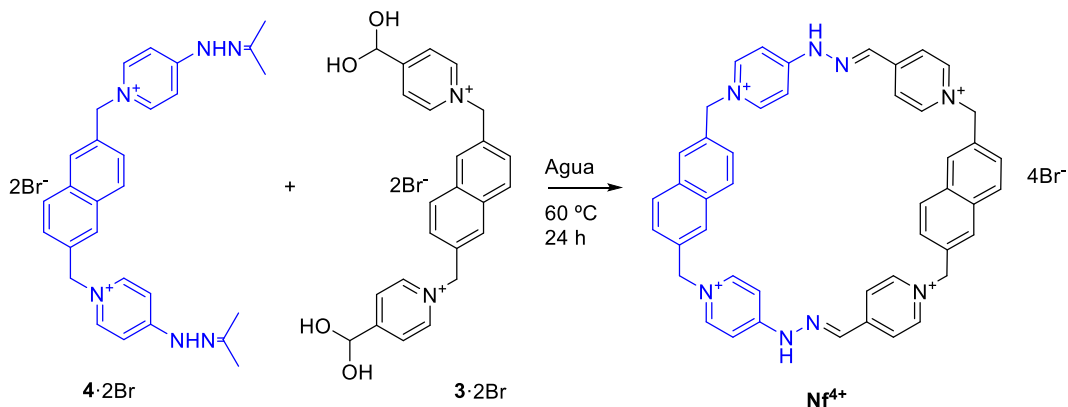
V.7 Síntesis del precursor 6·2Br



0.2884 g (0.849 mmol, 1 eq) de 4,4'-bis(bromometil)-1,1'-bifenilo se añadieron sobre 100 mL de una disolución del precursor **2** en acetona comercial. La suspensión resultante se calentó a reflujo durante 24 horas. Poco a poco el color de la suspensión cambio de rojizo hacia naranja, formándose también una espuma anaranjada. Tras las 24 horas, la suspensión tiene un color crema. Esta suspensión se filtró a vacío y el sólido obtenido se lavó con acetona y dietiléter. Se obtuvieron así 0.5914 gramos de un sólido de color grisáceo, que se identificó como el compuesto esperado por sus datos espectroscópicos (rendimiento = 110 %).

$^1\text{H-RMN}$ (D_2O , 300 MHz), δ (ppm): 8.10 – 8.04 (m, 2H), 7.54 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.23 – 7.17 (m, 1H), 6.96 – 6.90 (m, 1H), 5.26 (s, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.99 (s, 3H).

V.8 Síntesis del ciclofano Nf^{4+}

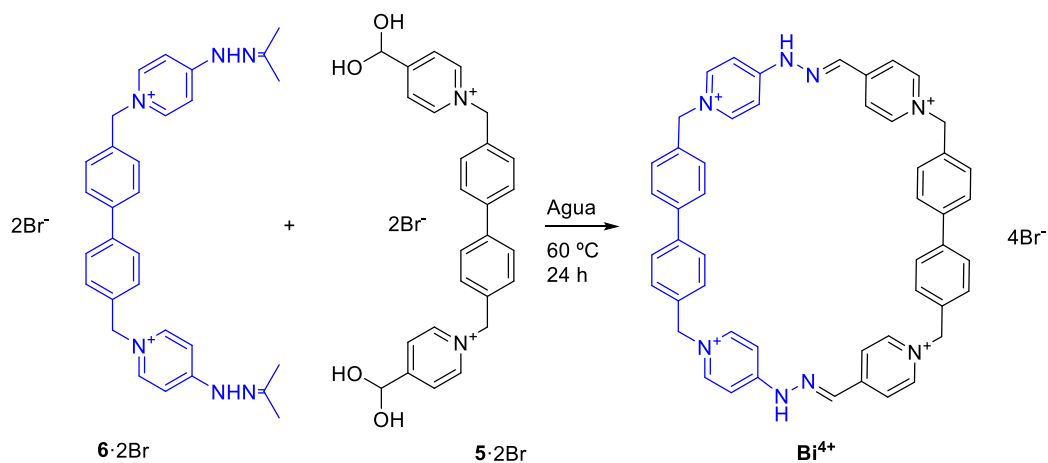


0.0762 g (0.1250 mmol, 1 eq) del precursor **4**·2Br y 0.0703 g (0.1250 mmol, 1 eq) del precursor **3**·2Br se disolvieron en 50 mL de agua. La mezcla se agitó, sonicó y se realizó un ^1H -RMN para comprobar que ambas herraduras están en cantidades equimolares. Una vez ajustadas las cantidades de las herraduras, se añadió 1 μL de TFA a la mezcla y ésta se calentó a 60 $^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se registró un ^1H -RMN para analizar el seguimiento de la síntesis y, a continuación, la disolución se enfrió con un baño de hielo. Se añadió hexafluorofosfato de potasio en exceso, y la mezcla se agitó durante 30 minutos, obteniéndose una suspensión de color rojo. El sólido obtenido se filtró a vacío y se lavó con agua y dietiléter, obteniéndose un sólido de color rojo que se disolvió en MeCN y se purificó por HPLC en fase reversa. Se observó un único pico a los 12 minutos que se identificó como el producto Ni^{4+} mediante ^1H -RMN. Se aisló un sólido de color amarillento con un rendimiento de purificación del 11 %

^1H -RMN (D_2O , 500 MHz), δ (ppm): 8.64 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.22 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 8.11 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.01 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.69 – 7.65 (m, 1H), 7.54 (d, $J = 1.7$ Hz, 0H), 7.49 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.25 – 7.21 (m, 1H), 5.92 (s, 2H), 5.64 (s, 2H).

^{13}C -RMN (D_2O , 125 MHz), δ (ppm): 154.48 (C), 149.92 (C), 144.17 (CH), 140.63 (CH), 133.10 (C), 132.93 (C), 132.22 (C), 131.48 (C), 129.90 (CH), 129.76 (CH), 129.65 (CH), 129.25 (CH), 124.63 (CH), 64.09 (CH_2), 61.96 (CH_2).

V.9 Síntesis del ciclofano Bi^{4+}



0.0796 g (0.1250 mmol, 1 eq) del precursor **6**-2Br y 0.0736 g (0.1250 mmol, 1 eq) del precursor **5**-2Br se disolvieron en 50 mL de agua. La mezcla se agitó, sonicó y se realizó un ^1H -RMN para comprobar que ambas herraduras están en cantidades equimolares. Una vez ajustadas las cantidades de las herraduras, se añadió 1 μL de TFA a la mezcla y ésta se calentó a 60 $^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se registró un ^1H -RMN para analizar el seguimiento de la síntesis y, a continuación, se añadió hexafluorofosfato de potasio en exceso, y la mezcla se agitó durante 30 minutos, obteniéndose una suspensión de color rojo. El sólido obtenido se filtró a vacío y se lavó con agua y dietiléter, obteniéndose un sólido de color rojo que se disolvió en MeCN y se purificó por HPLC en fase reversa. Se observó un único pico a 16 minutos que se identificó como **Bi** $^{4+}$ mediante ^1H -RMN. Se aisló un sólido de color amarillento con un rendimiento de purificación del 11 %.

^1H -RMN (D_2O , 300 MHz), δ (ppm): 8.81 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 8.59 – 8.55 (m, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.24 (d, $J = 1.3$ Hz, 2H), 8.12 – 8.09 (m, 1H), 7.75 (dd, $J = 8.4, 6.9$ Hz, 4H), 7.53 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.23 – 7.19 (m, 1H), 5.80 (s, 2H), 5.52 (s, 2H).

^{13}C -RMN- (D_2O , 125 MHz), δ (ppm): 154.53 (C), 149.94 (C), 144.19 (CH), 140.64 (CH), 140.28 (C), 133.51 (C), 132.67 (C), 129.81 (CH), 129.55 (CH), 127.80 (CH), 127.61 (CH), 124.72 (CH), 63.72 (CH_2), 61.54 (CH_2).

V.10 Estudios de interacción mediante espectroscopía de UV-Vis

Los espectros UV-Vis se recogieron en un equipo *Jasco* V-650 equipado con controlador de la temperatura. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

La concentración de las disoluciones de los ciclofanos **Rb** $^{4+}$ y **Bi** $^{4+}$ se determinó mediante esta técnica midiendo la absorbancia a 365 nm en agua Milli-Q y utilizando la ley de Lambert-Beer. (**Figura 42** en el **Anexo**).

Los oligonucleótidos, purificados por HPLC, se compraron a la compañía *Biomers*. Para los ensayos se utilizaron disoluciones madre 500 μM , cuya concentración fue determinada por UV-Vis midiendo la absorbancia a 260 nm. Para realizar las valoraciones, las disoluciones de los oligonucleótidos se prepararon en disolución tampón de fosfato potásico 10 mM, pH 6.3, 88 mM KCl. Antes de llevar a cabo las valoraciones es necesario hibridar los oligonucleótidos, para ello las disoluciones se

calentaron durante 10 minutos a 95 °C y a continuación se dejaron enfriar lentamente hasta alcanzar temperatura ambiente.

Las valoraciones se realizaron a 25 °C donde. Sobre una disolución 8 μM de ciclofano **Rb**⁴⁺ en buffer de fosfato potásico 10 mM, pH 6.3, 88 mM KCl se añadieron cantidades crecientes de una disolución 150 μM de *c-MYC* y se registraron los correspondientes espectros. Los datos obtenidos se procesaron y ajustaron con los programas informáticos *Prism 6* de *GraphPad* y *DynaFit*, respectivamente.

V.11 Estudios de interacción mediante espectroscopía de dicroísmo circular

Los espectros de DC se recogieron en un espectropolarímetro *Jasco J-185* con controlador de temperatura ubicado en los SAI de la UDC. Se utilizó una cubeta de cuarzo de 2 mm de paso óptico y los espectros se registraron a 25 °C utilizando los siguientes parámetros: rango: 500-200 nm, ancho de banda: 1.3 nm, tiempo por punto: 0.5 s, repeticiones: 1.

Las valoraciones se realizaron añadiendo cantidades crecientes de una disolución madre de cada ciclofano sobre disoluciones 10 μM de *h-TELO*, 5 μM de *h-MYC* y 5 μM de *Hairpin*.

Los datos obtenidos se procesaron y ajustaron con los programas informáticos *Prism 6* de *GraphPad* y *DynaFit*, respectivamente.

V.12 Estudios de modelado molecular

El docking molecular fue realizado mediante el programa AutoDock Vina 1.1.2 implementado dentro del software UCSF Chimera. Los archivos estructurales para los oligonucleótidos estudiados fueron obtenidos del Protein Data Bank ID PDB: 1XAV y 1KF1, utilizándose, respectivamente, como modelos de los cuadruplexes *c-MYC* y *h-TELO*.

Las geometrías de los compuestos **Rb**⁴⁺ y **Bi**⁴⁺, utilizados en los estudios de Docking, fueron previamente pre-optimizadas en sus geometrías mediante cálculos de mecánica molecular implementados en el paquete de programa Avogadro, utilizando la configuración predeterminada en las herramientas de autooptimización para el campo de fuerza MMFF94s.

La opción Dockprep dentro de UCSF Chimera se utilizó para agregar y fusionar hidrógenos no polares y cargas a los receptores. Se creó una caja de Grid lo suficientemente grande como para permitir cualquier posible complejo ligando-receptor (acoplamiento ciego). En particular, el tamaño de Grid para 1XAV se estableció en $44 \text{ \AA} \times 37 \text{ \AA} \times 37 \text{ \AA}$ puntos con un espaciado de la cuadrícula de 1.0 \AA y un centro de la cuadrícula de $-0.947991, 3.46025$ y -0.947638 . El tamaño de la cuadrícula para 1KF1 se estableció en puntos $38 \text{ \AA} \times 34 \text{ \AA} \times 46 \text{ \AA}$ con un espaciado de la cuadrícula de $1,0 \text{ \AA}$ y un centro de la cuadrícula de $25.3755, -1.4381$ y -8.77169 . Las figuras se renderizaron utilizando también software UCSF Chimera.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En relación a los datos analizados en el presente Trabajo de Fin de Máster se pueden llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se han sintetizado los ciclofanos **Nf⁴⁺** y **Bi⁴⁺** de manera satisfactoria siguiendo la estrategia sintética previamente diseñada por el grupo de investigación QUIMOLMAT. La caracterización estructural mediante RMN mono y bidimensional ha permitido corroborar la estructura de los nuevos macrociclos, pudiéndose asignar además los distintos núcleos de ¹H y ¹³C en lo correspondientes espectros.

2. Los ciclofanos **Nf⁴⁺** y **Bi⁴⁺** se han purificado por HPLC, obteniendo los sólidos con un elevado grado de pureza.

3. En lo referido a la interacción entre los ciclofanos **Rb⁴⁺/Bi⁴⁺** y los oligonucleótidos estudiados, los resultados obtenidos mediante las valoraciones UV-Vis no resultan concluyentes por diversas razones, sugiriéndose en el caso de la *Red Box* un modelo de equilibrio donde se unen 4 moléculas de **Rb⁴⁺** a una sola molécula de ADN *h-TELO*.

4. En general, los resultados de las valoraciones por DC sugieren modelos de interacción 1:1 ciclofano:ADN, con constantes de unión muy similares en todos los casos y en el rango μ M. En el caso de la interacción con *h-TELO*, **Rb⁴⁺** presenta una constante mayor y un mejor ajuste con respecto al resto de valoraciones realizadas. Este resultado está en consonancia con el obtenido mediante Docking, en las que se observan un mayor número de interacciones mediante Fuerzas de Van der Waals y enlace de H que para el caso de **Bi⁴⁺**.

5. Por último, el docking molecular permitió observar las poses más probables para las interacciones ciclofano-oligonucleótido. Cabe destacar que dichas predicciones implican un modelo de unión muy similar con *h-TELO* para los dos ciclofanos, y sustancialmente distinto con *c-MYC*.

En conclusión, los presentes estudios de interacción entre los ciclofanos y el ADN permiten demostrar que existe una interacción entre ambas especies. Resultado

que permite que se sigan realizando estudios con los mismos para determinar su posible aplicación como fármaco.

CONCLUSIONES

En relación aos datos analizados no presente Traballo de Fin de Máster pódese chegar ás seguintes conclusións:

1. Sintetizáronse os ciclofanos **Nf⁴⁺** y **Bi⁴⁺** de maneira satisfactoria seguindo a estratexia sintética previamente deseñada polo grupo de investigación QUIMOLMAT. A caracterización estrutural a través RMN mono y bidimensional permitiu corroborar a estrutura dos novos macrociclos, podéndose asignar ademáis os distintos núcleos de ¹H y ¹³C nos correspondentes espectros.

2. Os ciclofanos **Nf⁴⁺** y **Bi⁴⁺** purificáronse por HPLC, conseguindo os sólidos cun elevado grao de pureza.

3. No referido á interacción entre os ciclofanos **Rb⁴⁺/Bi⁴⁺** e os oligonucleótidos estudados, os resultados obtidos mediante as valoracións UV-Vis non resultan concluíntes por diversas razóns, suxerindo no caso da *Red Box* un modelo de equilibrio onde únense 4 moléculas de **Rb⁴⁺** a unha soa molécula de ADN *h-TELO*.

4. En xeral, os resultados das valoracións por DC suxiren modelos de interacción 1:1 ciclofano:ADN, con constantes de unión moi similares en todos os casos e no rango μM . En el caso da interacción con *h-TELO*, **Rb⁴⁺** presenta unha constante maior e un mellor axuste con respecto ó resto de valoracións realizadas. Este resultado está en consonancia co obtenido mediante Docking, nas que se observan un maior número de interaccións mediante Forzas de Van der Waals e enlace de H que para o caso de **Bi⁴⁺**.

5. Por último, o docking molecular permitiu observar as poses máis probables para as interaccións ciclofano-oligonucleótido. Cabe destacar que ditas predicións implican un modelo de unión moi similar con *h-TELO* para os dous ciclofanos, e substancialmente distinto con *c-MYC*.

En conclusión, os presentes estudos de interacción entre os ciclofanos e o ADN permiten demostrar que existe unha interacción entre ambas especies. Resultado que

permite que se sigan realizando estudios con los mismos para determinar a su posible aplicación como fármaco.

CONCLUSIONS

In agreement with the analyzed data of this Master's Final Project, the following conclusions can be reached:

1. The cyclophanes **Nf**⁴⁺ and **Bi**⁴⁺ have been synthesized satisfactorily following the synthetic strategy previously designed by the QUIMOLMAT research group. The structural characterization by mono and bidimensional NMR has allowed to corroborate the structure of the new macrocycles, being able to assign the different ¹H and ¹³C nuclei in the corresponding spectra.

2. The cyclophanes **Nf**⁴⁺ and **Bi**⁴⁺ have been purified by HPLC, obtaining the solids with a high degree of purity.

3. Regarding the interaction between the **Rb**⁴⁺/**Bi**⁴⁺ cyclophanes and the studied oligonucleotides, the results obtained by UV-Vis titrations are not conclusive for various reasons, suggesting in the case of the *RedBox* an equilibrium model where 4 molecules of **Rb**⁴⁺ bind to a single *h-TELO* DNA molecule.

4. In general, the results of DC titrations suggest a 1:1 interaction model for the cyclophan/DNA complexes, with very similar μM range binding constants in all cases. In the case of the interaction with *h-TELO*, **Rb**⁴⁺ has a stronger dissociation constant and a better fitting when compared with the other titrations carried out. This result is in line with that obtained by docking, in which a higher number of Van der Waals forces and H bonding interactions are observed for the *h-TELO-Rb*⁴⁺ complex than for the *h-TELO-Bi*⁴⁺.

5. Finally, molecular docking allowed us to identify the most probable binding modes for the cyclophan-oligonucleotide complexes. It should be noted that these predictions imply a very similar binding pattern with *h-TELO* for the two cyclophanes, and substantially different with *c-MYC*.

In conclusion, the binding assays between the cyclophanes and the DNA sequence allowed us to demonstrate that there is an interaction between both species.

These result prompt us to continue studying these complexes to determine their possible application as a drug.

VII. ANEXO

VII.1 Espectro del precursor 5·2Br

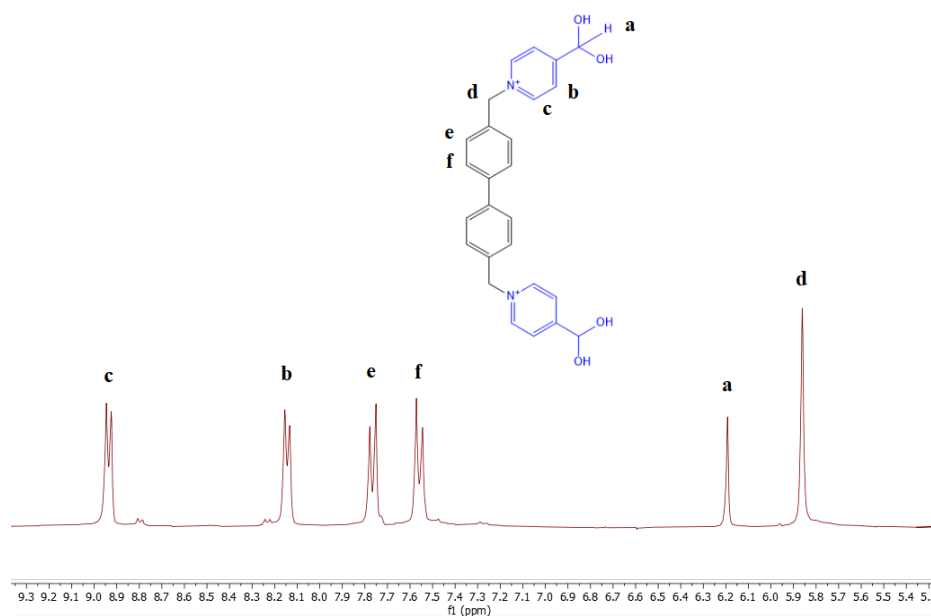


Fig. 26 Espectro ¹H-RMN (D₂O, 300 MHz, 25 °C) del precursor 5·2Br.

VII.2 Espectro del precursor 6·2Br

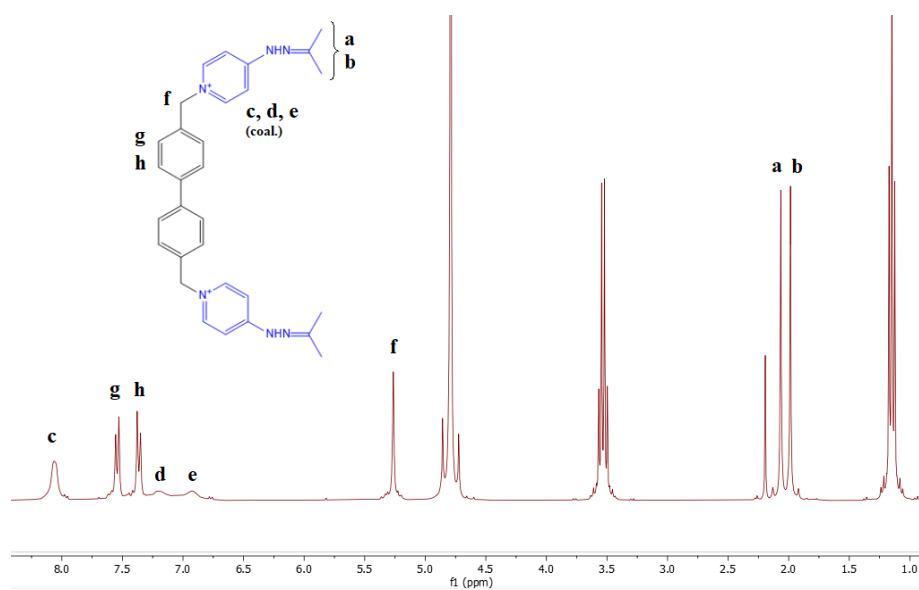


Fig. 27 Espectro ¹H-RMN (D₂O, 300 MHz, 25 °C) del precursor 6·2Br.

VII.3 Espectros ciclofano Nf^{4+}

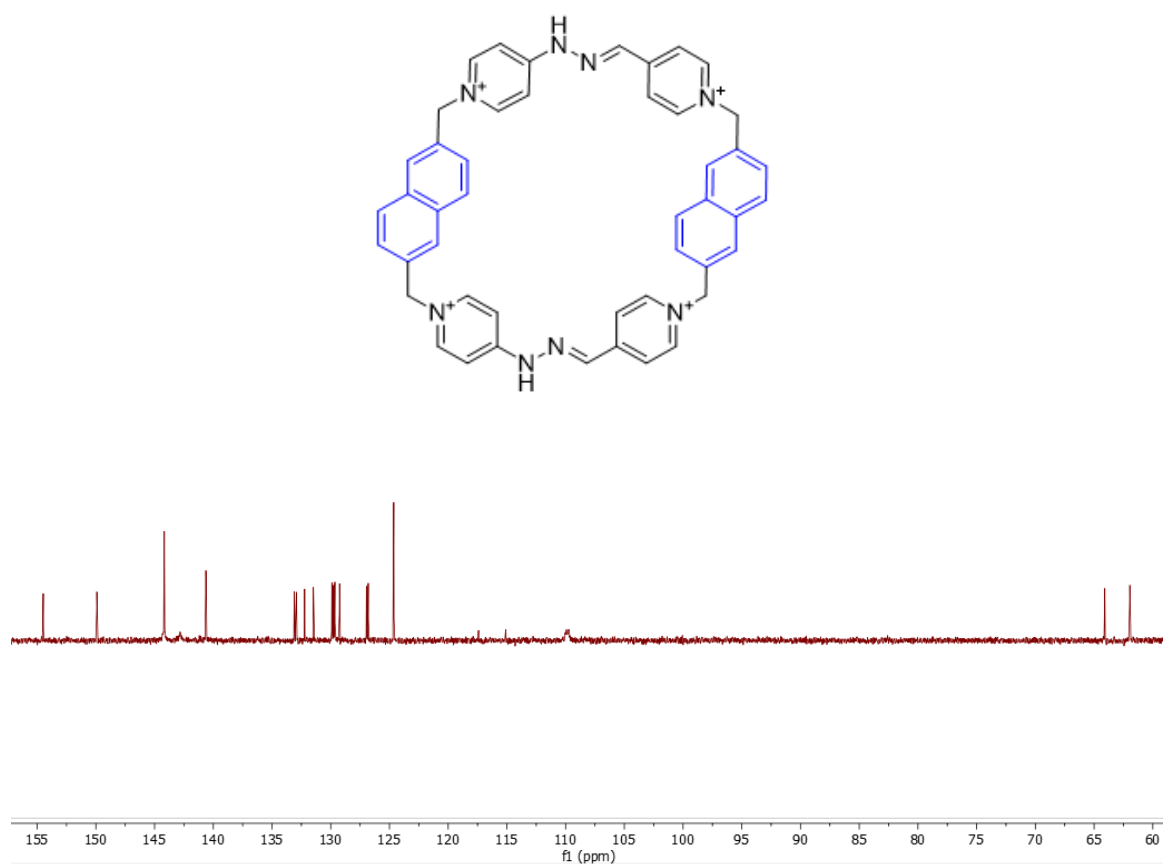


Fig. 28 Espectro ^{13}C -RMN (D₂O, 125 MHz, 25 °C) del ciclofano Nf^{4+} .

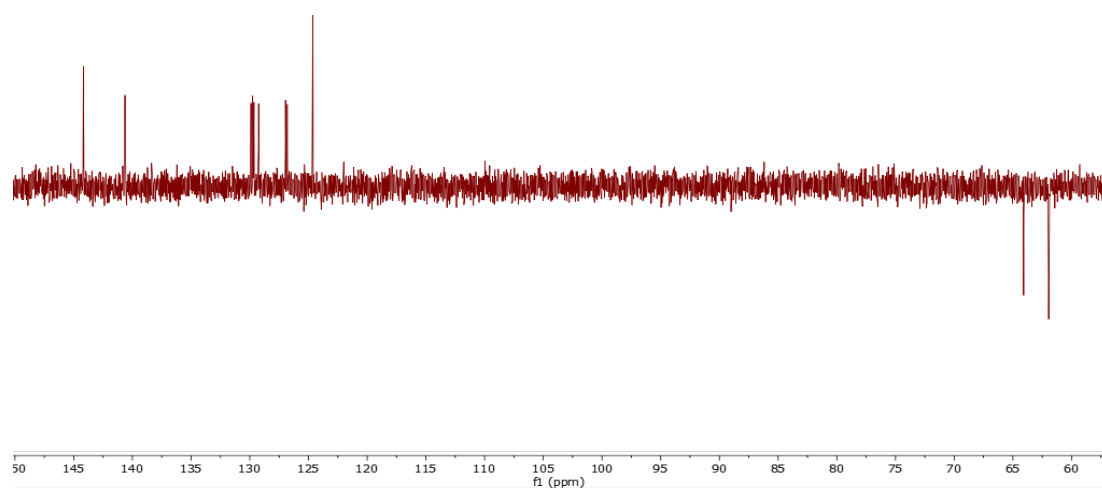


Fig. 29 Espectro RMN-DEPT 135 (D₂O, 125 MHz, 25 °C) del ciclofano Nf^{4+} .

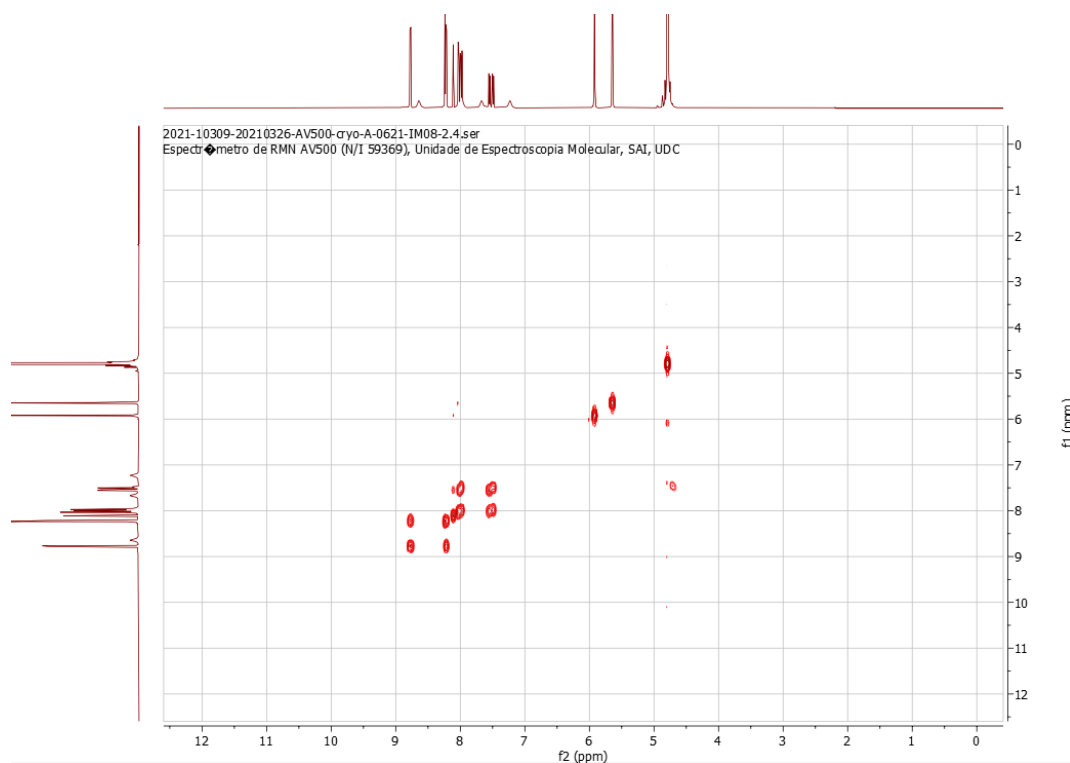


Fig. 30 Espectro RMN-COSY (D₂O, 500 MHz, 25 °C) del ciclofano N⁴⁺.

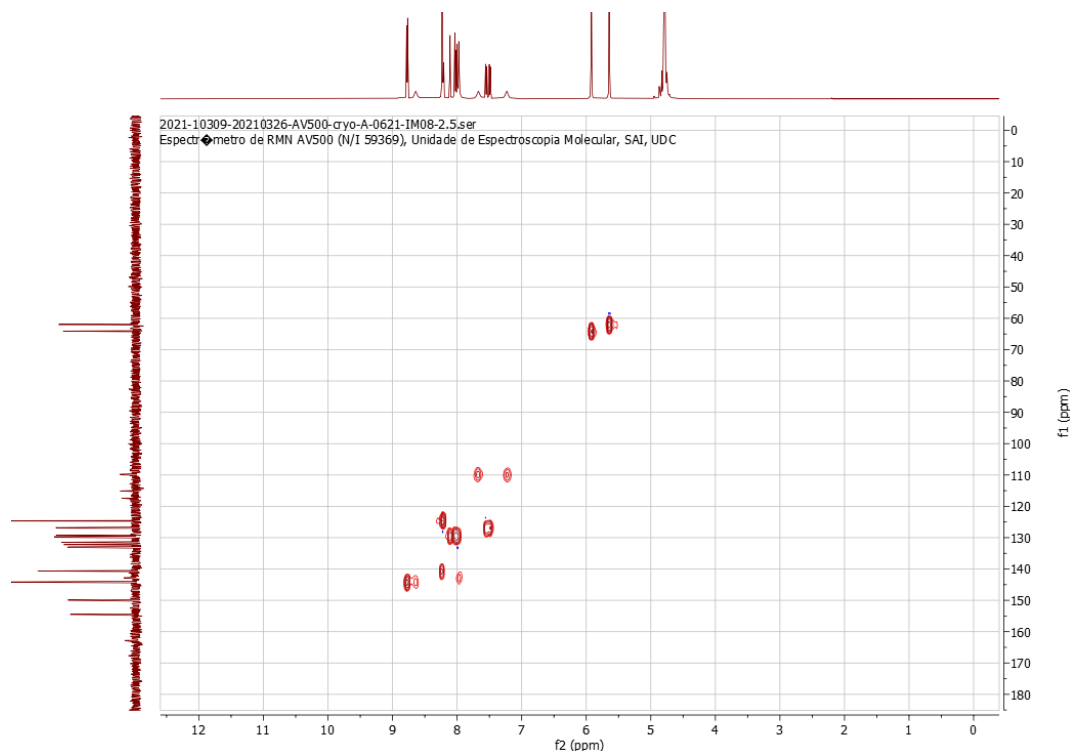


Fig. 31 Espectro RMN-HSQC (D₂O, 500 y 125 MHz para ¹H y ¹³C respectivamente, 25 °C) del ciclofano N⁴⁺.

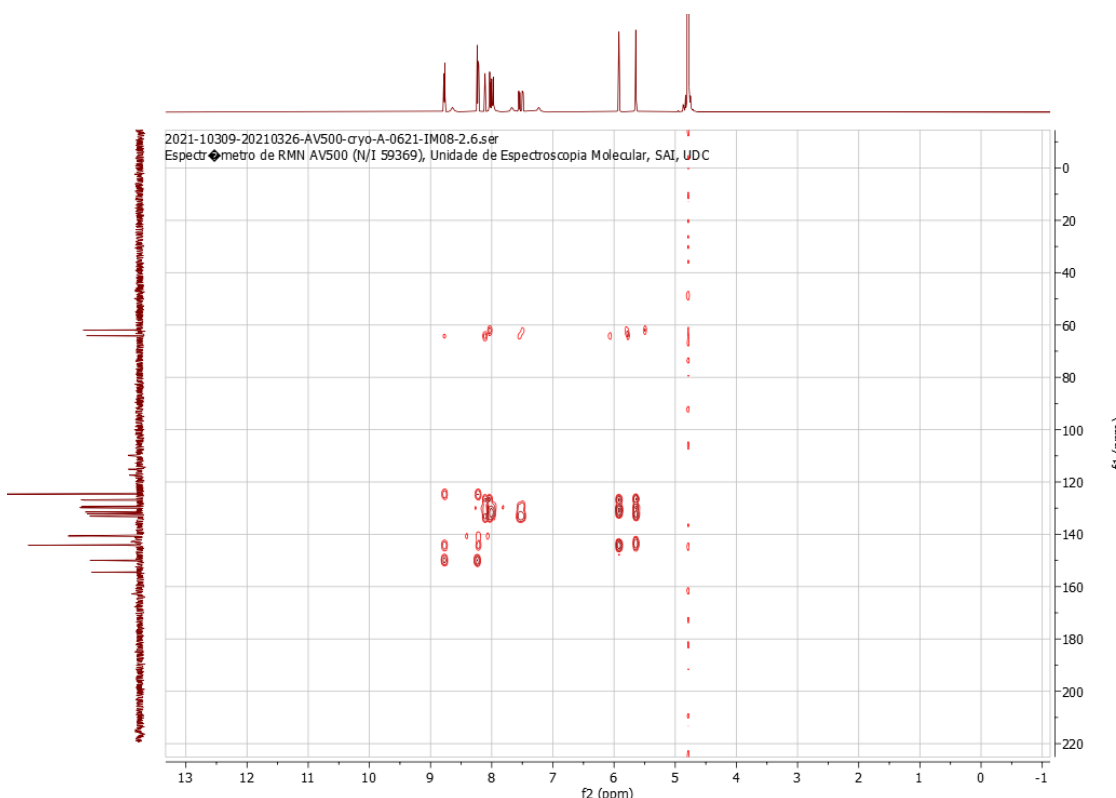


Fig. 32 Espectro RMN-HMBC (D₂O, 500 y 125 MHz para ¹H y ¹³C respectivamente, 25 °C) del ciclohexano N⁴⁺.

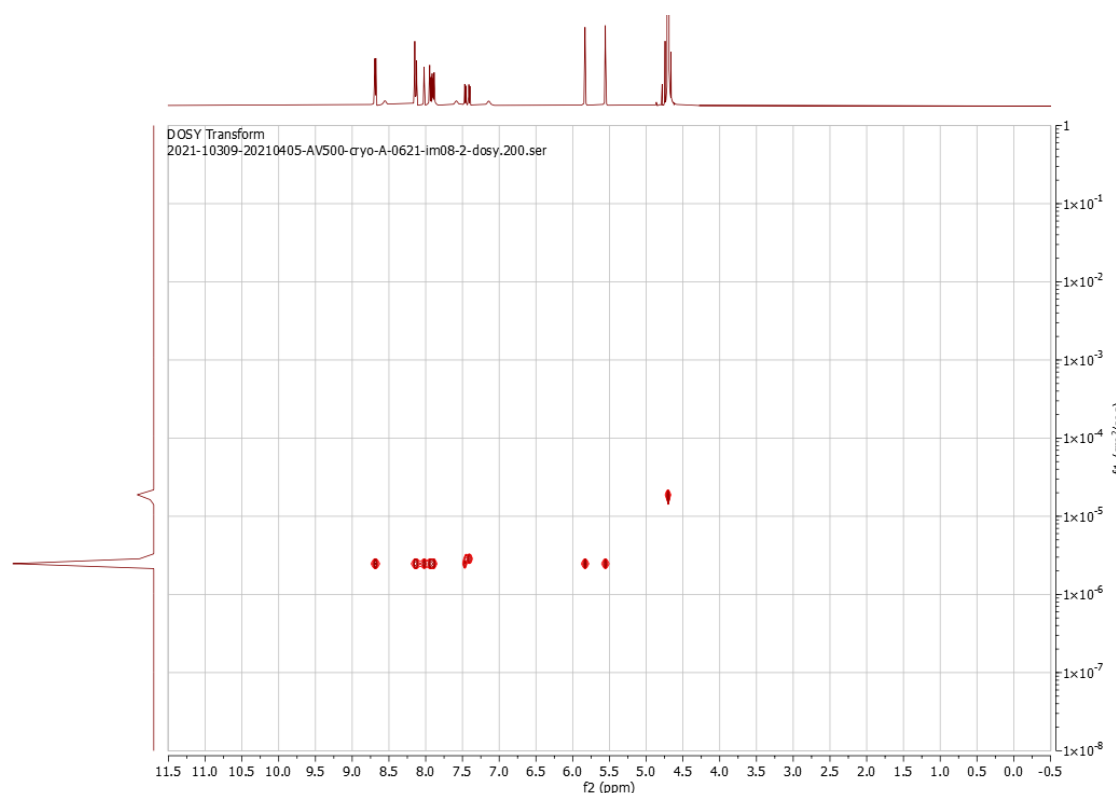


Fig. 33 Espectro RMN-DOSY (D₂O, 500 MHz, 25 °C) del ciclohexano N⁴⁺.

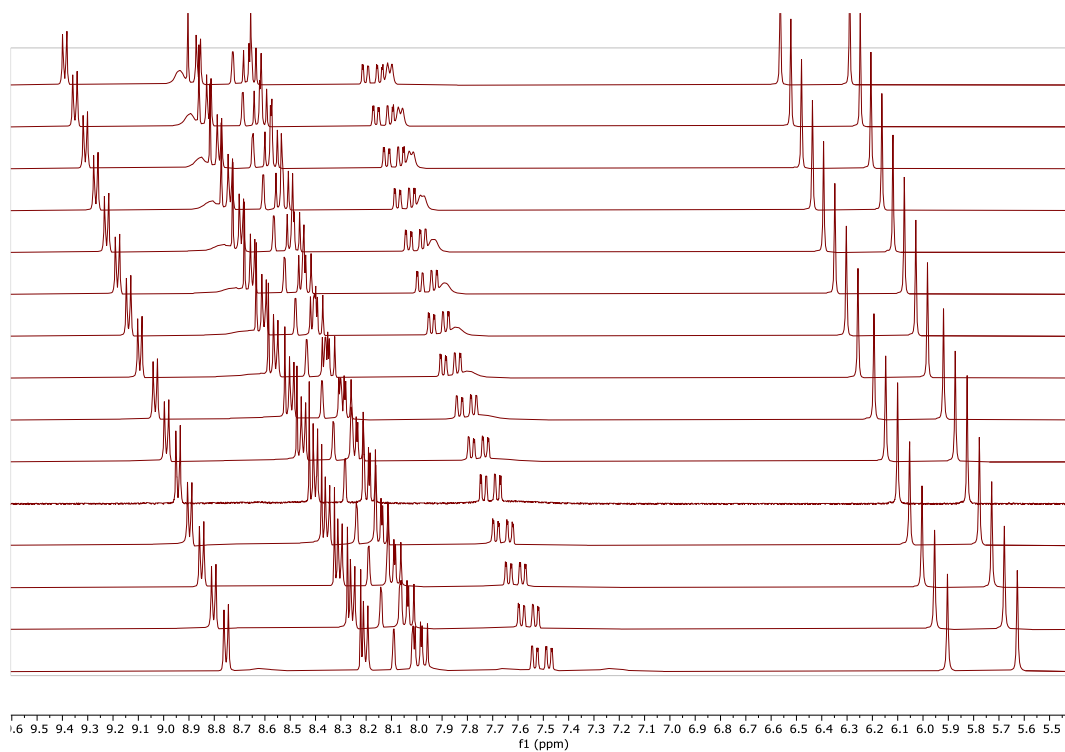


Fig. 34 Espectro RMN-TVAR: 25-60 °C (D₂O, 500 MHz, 25 °C) del ciclofano Nf⁴⁺.

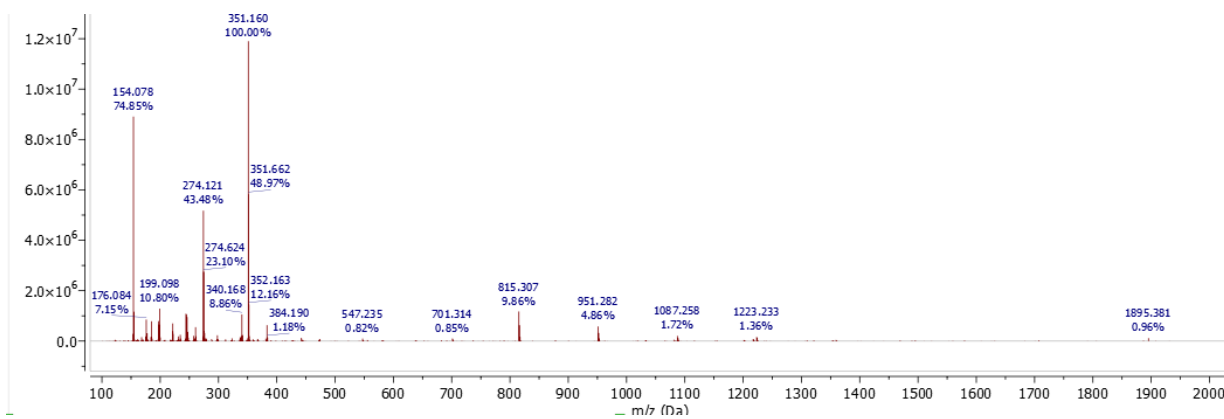
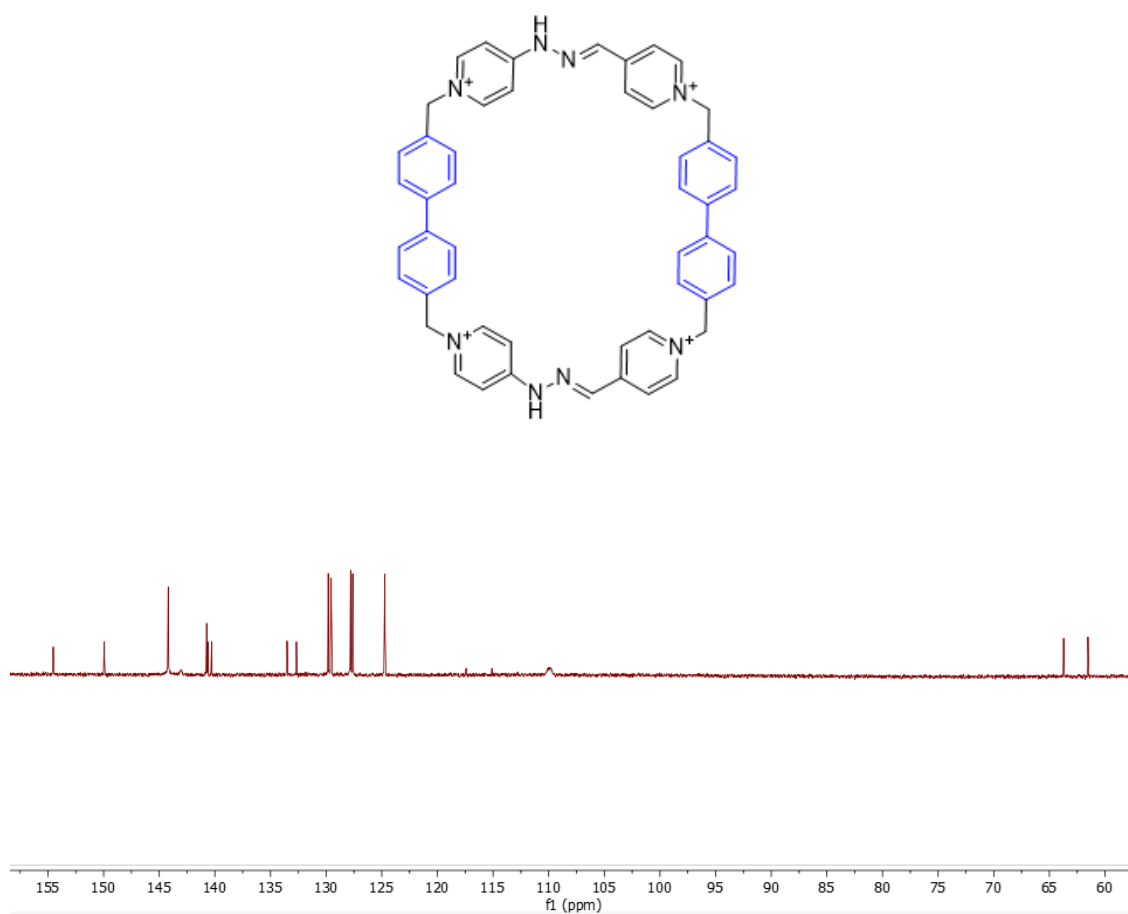
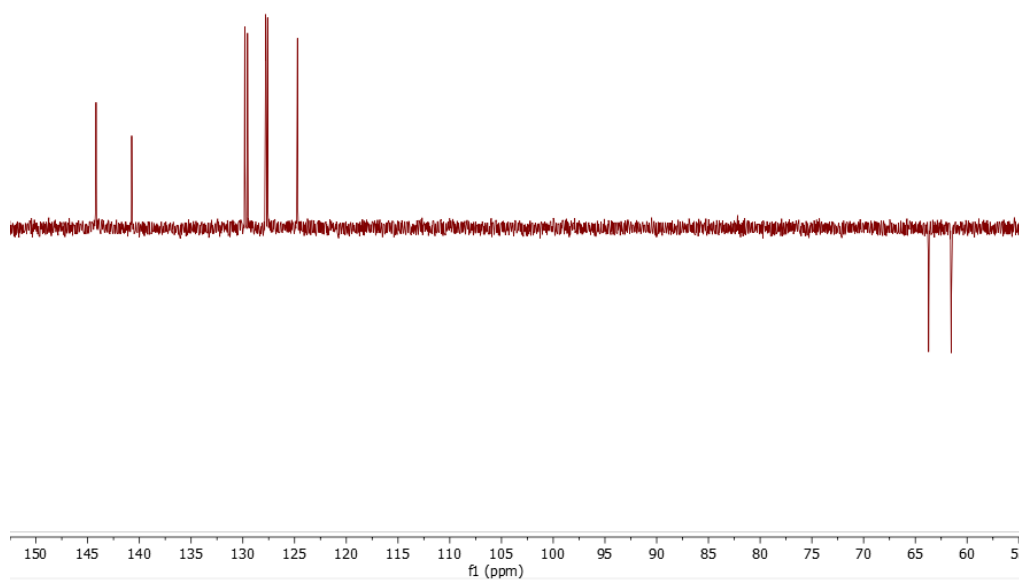


Fig. 35 Espectro de HR-ESI-MS del ciclofano Nf⁴⁺.

VII.4 Espectros ciclofano Bi^{4+} **Fig. 36** Espectro ¹³C-RMN (D₂O, 125 MHz, 25 °C) del ciclofano **Bi⁴⁺**.**Fig. 37** Espectro RMN-DEPT 135 (D₂O, 125 MHz, 25 °C) del ciclofano **Bi⁴⁺**.

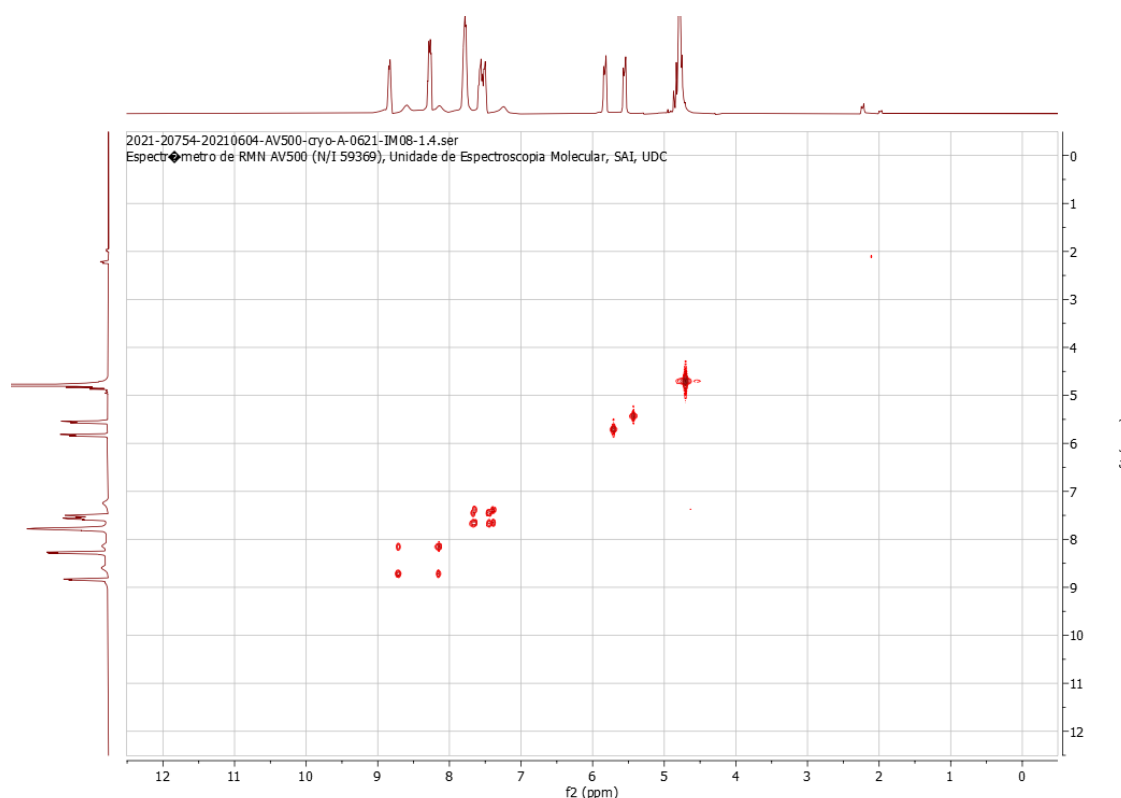


Fig. 38 Espectro RMN-DOSY (D₂O, 500 MHz, 25 °C) del ciclofano **Bi**⁴⁺.

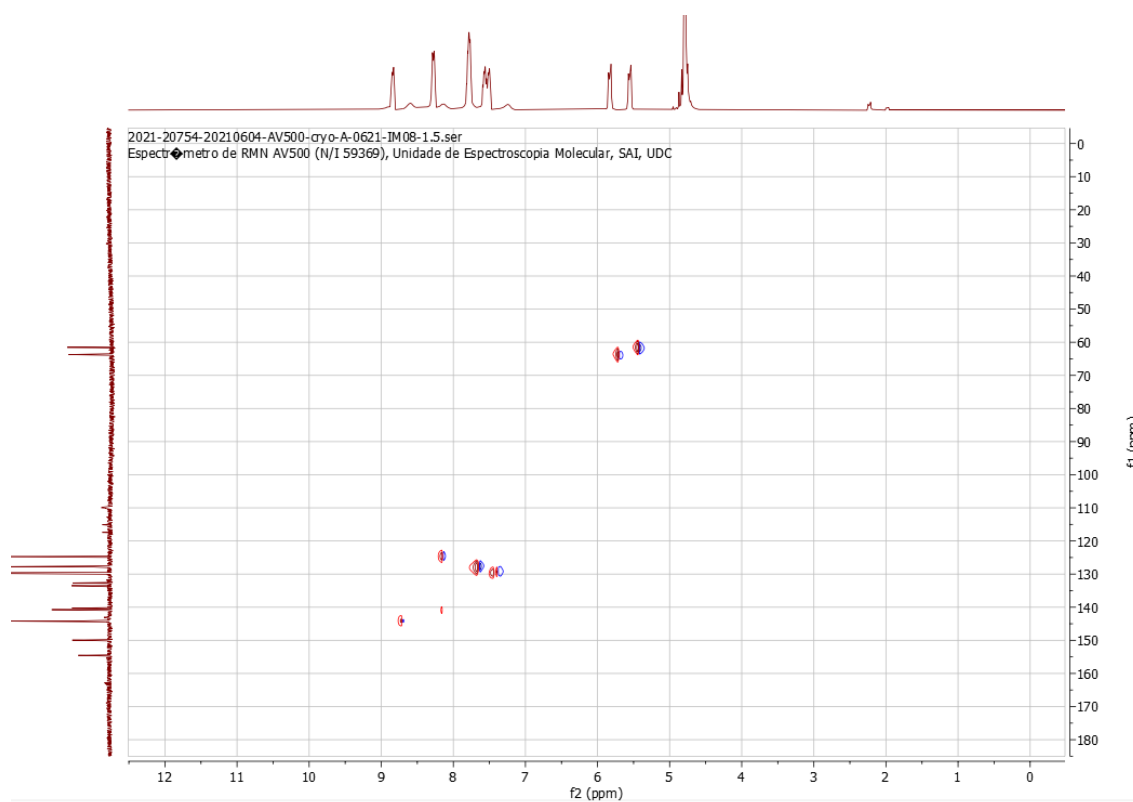


Fig. 39 Espectro RMN-HSQC (D₂O, 500 y 125 MHz para ¹H y ¹³C respectivamente, 25 °C) del ciclofano **Bi**⁴⁺.

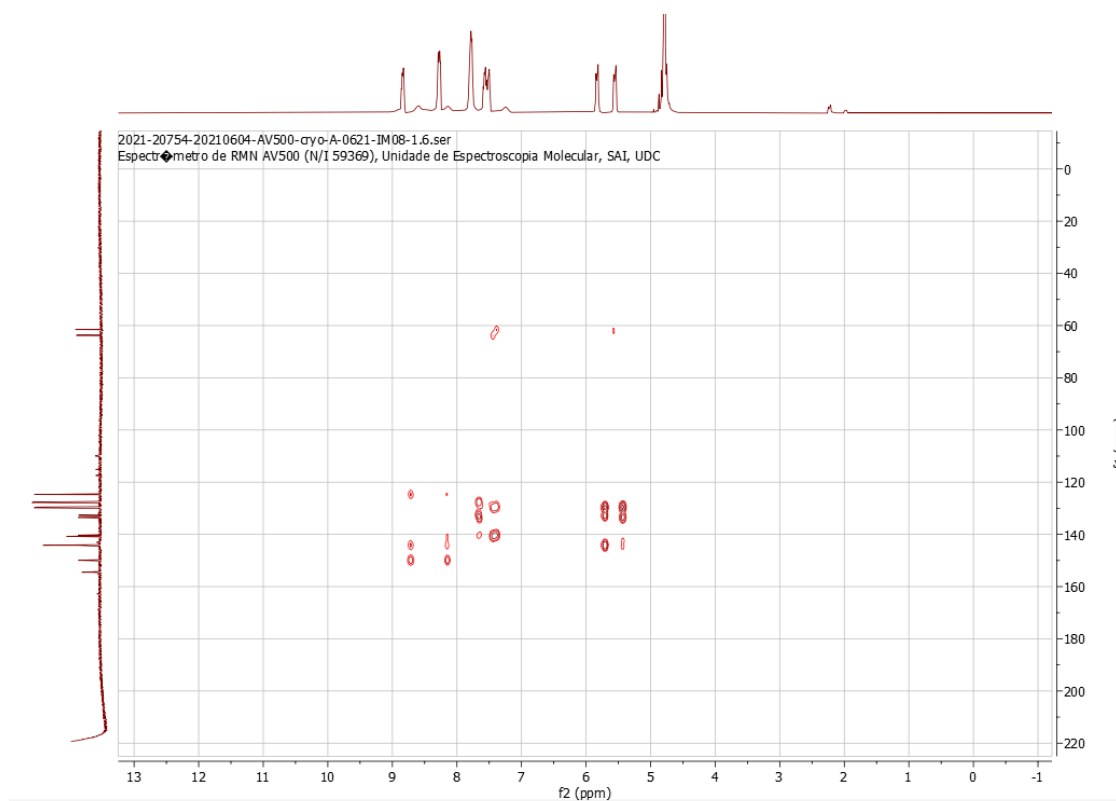


Fig. 40 Espectro RMN-HMBC (D_2O , 500 y 125 MHz para 1H y ^{13}C respectivamente, 25 °C) del ciclofano Bi^{4+} .

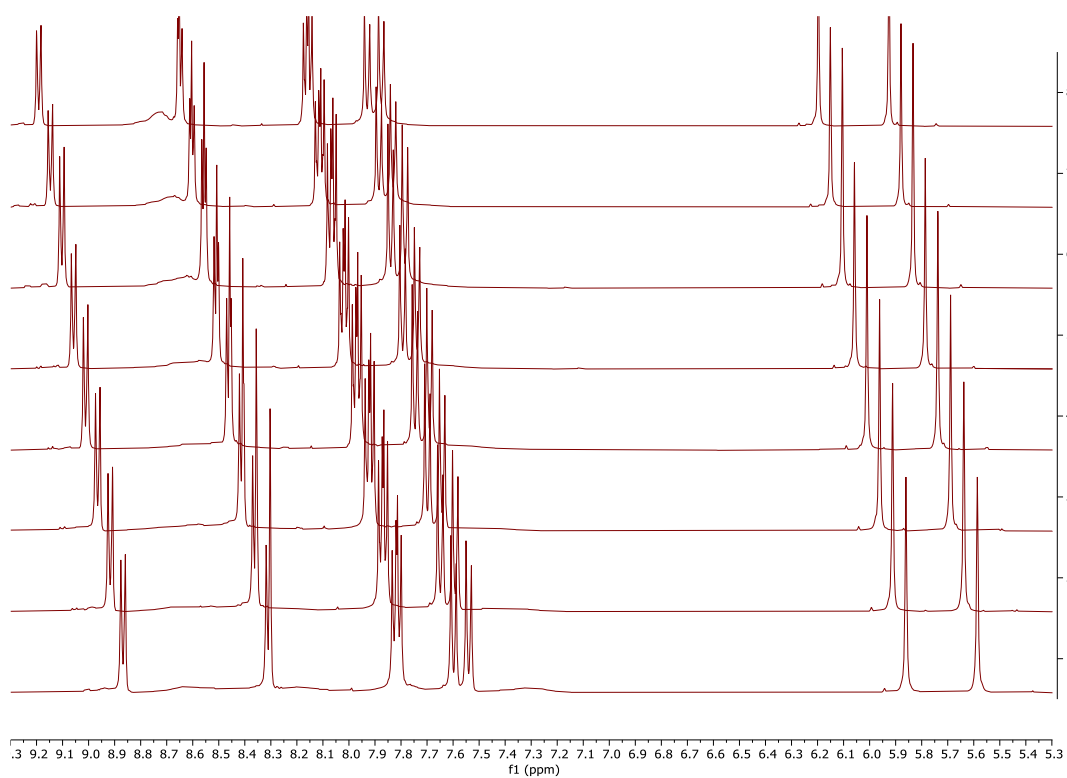


Fig. 41 Espectro RMN-TVAR 25-60 °C (D_2O , 500 MHz, 25 °C) del ciclofano Bi^{4+} .

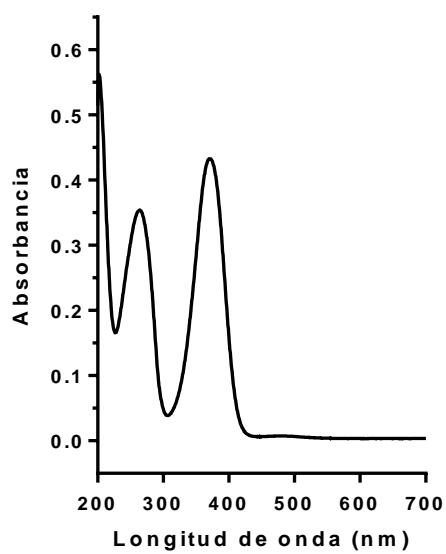


Fig. 42 Espectro UV-Vis 25 °C del ciclohexano Bi^{4+} 8 μM .