

Universidad de Granada
Facultad de Farmacia
Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica



TESIS DOCTORAL

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS
MONOCUATERNIZADOS CON ACTIVIDAD
ANTITUMORAL Y ANTIMALÁRICA**

Programa Oficial de Posgrado en Ciencias Farmacéuticas, REAL DECRETO 56/2005

Lucía Serrán Aguilera

Granada 2015

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Lucía Serrán Aguilera

ISBN: 978-84-9125-103-3

URI: <http://hdl.handle.net/10481/40169>



Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica.
Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

DISEÑO Y SÍNTESIS DE NUEVOS DERIVADOS MONOCUATERNIZADOS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y ANTIMALÁRICA

Memoria presentada por **Lucía Serrán Aguilera** para optar al grado de doctor con
mención internacional en Ciencias Farmacéuticas por la Universidad de Granada.

Granada, Febrero 2015.

Lucía Serrán Aguilera

DIRECTORES:

Miguel Ángel Gallo Mezo
Catedrático de Química
Orgánica.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada.

Antonio Entrena Guadix
Catedrático de Química
Farmacéutica y Orgánica.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada.

Luisa Carlota López Cara
Profesora Titular de Química
Farmacéutica y Orgánica.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada.

La doctoranda **Lucía Serrán Aguilera** y los directores de la tesis **Miguel Ángel Gallo Mezo, Antonio Entrena Guadix** y **Luisa Carlota López Cara** garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

En **Granada**, a **23 de Febrero** de **2015**

Directores de la Tesis

Fdo.: Miguel Ángel Gallo Mezo **Fdo:** Antonio Entrena Guadix **Fdo:** L.Carlota López Cara

Doctorando

Fdo.: Lucía Serrán Aguilera

El trabajo presentado en esta Memoria ha sido realizado gracias a la concesión de una Beca-Contrato del Programa FPU (Formación de Profesorado Universitario) concedida por el Ministerio de Educación en Diciembre del 2010 con la referencia AP2009-0555.

La estancia en el 'Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco' de la 'Università degli Studi di Perugia' (Italia) ha sido posible gracias a la ayuda para estancias breves del Programa anterior.

Parte de los resultados de esta Memoria han sido publicados en:

Serran-Aguilera L; Nuti R; Lopez-Cara LC; Rios-Marco P; Carrasco MP; Marco C; Entrena A; Macchiarulo A; Hurtado-Guerrero R, Choline kinase active site provides features for designing versatile inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2015**, *14* (23), 2684-93.

Érase una vez la historia de una niña nacida en un pequeño pueblo rodeado de montañas que cuando escuchaba en la televisión o en el colegio las palabras “laboratorio” o “científico”, dejaba todo cuanto estaba haciendo, abría de par en par los ojos y admiraba, aún sin saber muy bien qué significaba, aquello que sonaba algo así como “labor investigadora.”

La niña creció rodeada de mil familiares y amigos a los que quiere con locura. En su casa siempre tuvo el ejemplo de una madre extrovertida, fuerte y luchadora que afrontaba la vida con optimismo a pesar de los no pocos obstáculos que se presentaban; la figura de un hermano alegre y maravilloso con el que se lo pasaba “bomba” inventando travesuras (como meter las manos en pintura roja y salir a coger grillos a las tres de la tarde en pleno verano) y el modelo de una tía angelical que era como una hermana y sin duda alguna, una bendición del cielo. Sus amigos eran y son sus compañeros de viaje, sus confidentes, las personas con las que compartía y comparte tanto los buenos como los malos momentos, en los que siempre piensa a pesar de la distancia y en los que siempre podía y puede confiar aún habiendo tomado caminos distintos en la vida. Mamá, Manu, Belén, Jose, Helen (agapis), Sonia, Cynthi, Vane, Marta, Mari, Patri, Nines, Ángela, Raquel, Luis, Chema, Salvi y Juanjo gracias por creer siempre en mí y por brindarme vuestro apoyo incondicional.

A esa niña siempre le llamó la atención el trabajar en un laboratorio, el descubrir nuevas cosas para ayudar a los demás, pero consideraba que ésto sólo estaba al alcance de los mejores, de personas excepcionales, entre las cuales ellas no se encontraba. Sin embargo, esta forma de pensar cambió cuando en tercero de carrera -por cierto, Farmacia (que eligió por ser una “mezcla entre Química y Medicina”)- el profesor de Química Farmacéutica, D. Antonio Espinosa Úbeda animó a todo aquel interesado en iniciarse en la investigación, a acudir a su despacho.

En aquel momento, a la niña que de pequeña abría los ojos al escuchar la palabra “científico”, le pareció estar viviendo un sueño y no se creía lo que acababa de oír... resultaba que el trabajo en el laboratorio no sólo estaba al alcance de eminencias! ¡Quizás también ella pudiera tener esa oportunidad! Pero si así era... seguro que debería de demostrar que tenía suficiente conocimiento en química como para no “ser un peligro” en el laboratorio y para saber hacer todo cuanto le mandaran... de hecho, eso fue lo primero que aquella niña le preguntó a su profesor cuando acudió a hablar con él. Concretamente, la pregunta fue: “D. Antonio, pero para formar parte de vuestro grupo ¿tendré que hacer algún examen para que decidáis si sé o no lo suficiente, verdad?” El profesor, muy amablemente y sin poder evitar el esbozo de una sonrisa le contestó: “No Lucía, es suficiente con que tengas interés y procures mantener tu nota de expediente a lo largo de la carrera. Por ahora, piénsate bien cuando puedes venir y cuando lo tengas claro, vuelve.” Para finalizar, el maestro añadió: “Y recuerda que habrá momentos difíciles, pero cuando lleguen afróntalos con alegría porque lo más importante que tienes que aprender es que hay que ser feliz SIEMPRE.” Gracias D. Antonio por poner al alcance de mi mano, lo que parecía inalcanzable.

A partir de ese momento y con aquellas palabras grabadas a fuego en su mente, salió del despacho de la tercera planta de la facultad de Farmacia con alegría e ilusión desbordantes y con la satisfacción de haber encontrado, aunque fuera por casualidad, las directrices que marcarían sus próximos años en la vida. Sus amigas Nieves, Ali, Isa, Rocío y Gema le

proporcionaron durante los cinco años de Licenciatura el cariño suficiente que ella necesitaba para esforzarse cada día un poquito más. Fueron muchas las experiencias que junto a ellas vivió y que hicieron que esa niña, cada vez mayor, se sintiera a las mil maravillas en Granada. Cómo olvidar esos paseos en el Seat Marbella morado de Ali, cargado hasta los topes con las seis magníficas, o las risas inaguantables en Química Orgánica debidas a motivos que no se pueden revelar, los “vendajes de pies con papel de baño y poder de ultrasecado” antes de entrar a un examen tras una considerable nevada, las prendas de ropa que Ali se ponía del revés en ciertas ocasiones, y en definitiva las innumerables historias con las que podría llenar páginas y páginas... que contribuyeron a llenar de felicidad cada momento que juntas compartimos.

Una vez terminada la carrera, la recompensa llegó, no sin antes haberse librado de los malos ratos cada vez que veía errores a subsanar en la solicitud de su beca-contrato FPU. La adjudicación de esta beca supuso para la niña, ya convertida en mujer, el mayor de sus logros conseguido hasta el momento... la posibilidad de dedicarse seriamente a lo que desde pequeña había soñado. Pero lo que nunca se había imaginado era que la FPU significaría también una ventana de apertura al mundo... de traspasar fronteras haciendo ciencia y de conocer al resto del elenco de personajes de este cuento. De hecho, han sido muchas las personas que esta niña ha ido encontrando en la maravillosa andadura que decidió iniciar hace unos años, y la cual volvería a recorrer si tuviera la oportunidad de dar marcha atrás en el tiempo.

Directores de Tesis, D. Miguel Ángel, Antonio y Carlota, gracias por todo cuanto me habéis enseñado, por tratarme siempre con cariño, por ayudarme en todo cuanto ha estado en vuestra mano y por haber puesto en mi camino a personas como Antonio Macchiarulo y Ramón Hurtado, los cuales me aceptaron desde el primer momento como un miembro más de su equipo, me trataron con cariño, me enseñaron nuevas formas de hacer ciencia y me guiaron en la tarea de “traducir” a artículo el trabajo realizado en el laboratorio. Mi más sincero agradecimiento al resto de profesores y compañeros del Departamento, Joaquín, Encarna, Dori, María José, Ana, Pepe, Santi, Vero, Meriem, Fátima, Nawal, Belén y Lourdes, gracias por prestarme vuestra ayuda cada vez que ha sido necesario, tanto en el laboratorio, como en las prácticas con los chiquillos. Compañeros, ¡espero que os vaya a todos genial en el futuro!, y en especial a ti Antonia (Eugenia)... por lo de veces que nos hemos reído dentro y fuera del laboratorio, por haber mantenido siempre nuestra amistad y por tener ese niño tan precioso que hace que estés cada día más guapa. Gracias también a vosotros, Antonio y Luis, por todos los sellos, bolígrafos, tizas, rotuladores, botellas de hielo seco, tiras de pH,... que he necesitado y de los que siempre tan amablemente, me habéis provisto.

No encuentro palabras suficientes para describir las inolvidables experiencias vividas en Italia, en el “Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco” junto a compañeros y amigos como Roberto, Chiara, Giacomo, Alessia, Andrea, Nicola, Gabriele, Marco, Albert y Hayriye. Las “pausas-café” al aire libre en la entrada del departamento y los “pranzo” en la “menza” repletos de pasta con “il nostro cuoco favorito” eran momentos de discusión, intercambio de conocimiento, aprendizaje y también de relax y risas que me hicieron crecer en el terreno de la Química Computacional y vivir cada nuevo reto intelectual con la máxima

motivación que se pueda tener. Gracias a todos, os llevaré siempre en mi corazón... ¡y en alguna que otra foto que en varias ocasiones se escapó!

Si inolvidable fueron los ocho meses de estancias en Italia, también mereció la pena y de qué manera, el viaje emprendido junto a mi Quetzal del Carmen (Erandi), mi flor de loto (Ángela), Jessi, Cris, Ainoa, Peter Jackson (Pedro), mi Darling (Alan), Juan, Pilar y Rafa. Entre todos contribuisteis a ampliar mi vocabulario con la creación de un diccionario maño que ya quisiera para sí la RAE... palabras como “zamugazo” y “chipiarse” eran incluidas diariamente en él. Gracias también por haberme hecho partícipe de grandes momentos a nivel profesional (como los viajes al Diamond con Erandi, la difracción de cristales junto a Jessi, la fluorescencia junto a Ángela y los clonajes... ¡los clonajes junto a todos!). Pero como no todo iba a ser trabajar, también compartimos muy buenos ratos de zumba-relax entre MiniPrep y PCR, en nuestras noches de Lizarrán y Tubo, y cómo no... ¡en los BIFI-chucks awards!, con tanta medalla todavía estoy comiendo chocolate... Mi recuerdo también para los “señores esposos” de Erandi y Jessi (Jorge y Noel), y cómo no para los pequeños Leo e Iyari.

Este cuento se aproxima a su fin, no sin antes hacer balance de una etapa que ha merecido la pena en todos los sentidos y en la que el aprendizaje de nuevas técnicas de investigación y las relaciones personales se han aunado para formar el pilar sobre el que se sustentan los resultados de la presente Memoria... porque felicidad y rendimiento van de la mano... porque sin ilusión no se consigue nada en la vida, y porque para que todo lo anterior funcione, es preciso que nos sintamos bien en el plano afectivo.

Es por eso que os la dedico a todos aquellos que sois conscientes de que sin vuestra ayuda, ánimo y apoyo, no habría sido posible llegar hasta aquí. Debéis ser conscientes de que hemos formado un equipo y de que el título que al final consiga, aunque lleva mi nombre, también es vuestro.

Colorín colorado, este cuento...

Continuará...

¡Gracias!

*A mi madre, mi hermano y a mi tía Belén, a Jose y
a mi más querido ausente....nunca te olvido.*

ÍNDICE

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Cáncer	
2.1.1. Epidemiología.....	3
2.1.2. Etiología.....	4
2.1.3. Tratamiento.....	5
2.1.4. Metabolismo lipídico en cáncer y ChoK.....	6
2.1.5. Mecanismo catalítico de ChoK.....	8
2.1.6. ChoK en humanos	
2.1.6.1. Isoformas.....	10
2.1.6.1.1. Isoforma α	11
2.1.6.1.1.1. Isoforma α en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del	
cáncer.....	12
2.1.6.2. Inhibidores de <i>HsChoK</i>	13
2.1.6.2.1. Derivados del HC-3.....	14
2.1.6.2.1.1. Inhibidores biscatiónicos simétricos.....	15
2.1.6.2.1.2. Inhibidores triscatiónicos.....	19
2.1.6.2.1.3. Inhibidores macrocíclicos (ciclofanos y bisciclofanos).....	20
2.1.6.2.1.4. Inhibidores bispíridínicos y bisquinolínicos acíclicos y	
bispíridínicos cíclicos.....	21
2.1.6.2.2. Diseño de inhibidores basados en la estructura 3D de	
<i>HsChoK</i> α 1	21
2.1.6.2.2.1. Inhibidores monocatiónicos derivados de adenina y	
derivados biscatiónicos asimétricos.....	22
2.1.6.2.2.2. Inhibidores monocatiónicos derivados de aminofenol y	
biscatiónicos simétricos derivados de 1,2-bis(<i>p</i> -	
metilfenoxi)etano.....	23
2.1.6.2.2.3. Inhibidores biscatiónicos simétricos derivados de 2,2'-	
bipiridina.....	24
2.1.6.2.2.4. Cribado virtual y cribado de alto rendimiento.....	25
2.1.6.2.3. Conclusiones.....	26
2.1.6.3. Estructuras cristalinas de ChoK.....	27
2.1.6.3.1. Estructuras cristalinas de <i>HsChoK</i> α	29
2.1.6.3.1.1. <i>HsChoK</i> apo: isoformas α 1, α 2 y β	30
2.1.6.3.1.2. <i>HsChoK</i> α 2-holo: con sus productos de reacción (ADP y	
PCho.....	31
2.1.6.3.1.3. <i>HsChoK</i> α , β -holo: con inhibidores (HC-3).....	33
2.1.6.3.1.4. <i>HsChoK</i> α 1-holo: inhibidores derivados del HC-3 o de	
diversa naturaleza química.....	35
2.1.6.3.1.4.1. Derivados del HC-3: compuestos 1, 2 y 14.....	35
2.1.6.3.1.4.2. Otros inhibidores NO derivados del HC-3.....	40
2.1.6.3.1.5. Conclusiones.....	40
2.2. Malaria	42

2.2.1. Epidemiología.....	42
2.2.2. Etiología.....	43
2.2.3. Tratamiento.....	45
2.2.4. ChoK en el metabolismo lipídico de <i>Plasmodium sp.</i>	48
2.2.4.1. ChoK en otros organismos.....	50
2.2.5. Inhibidores de <i>PfChoK</i>	50
2.2.5.1. Derivados de amonio mono y biscuaternarios.....	51
2.2.5.2. HC-3 y derivados.....	52
2.2.6. Estructuras cristalinas de ChoK en parásitos.....	53
3. Objetivos.....	55
4. Resultados y Discusión	60
4.1. Parte 1: Diseño computacional del farmacóforo.....	62
4.1.1. Estudios computacionales sugieren un modelo de farmacóforo incluido en el fragmento de 1-bencil-4-(<i>N</i> -metilnilino)piridinio.....	62
4.2. Parte 2: Primera aplicación del farmacóforo: Cribado virtual (Virtual screening, VS).....	68
4.2.1. Experimentos de cribado virtual basados en el farmacóforo proporcionan nuevos prototipos con afinidad por <i>HsChoK</i> α 1 que han sido validados mediante fluorescencia de triptófanos.....	68
4.2.2. Los ensayos biológicos muestran que el compuesto 5664997 es el más activo como agente antiproliferativo, mientras que el compuesto 5145780 es el mejor inhibidor de <i>HsChoK</i> α 1.....	72
4.2.3. El compuesto 5217714 se une a los sitios del ATP y de la colina.....	76
4.2.4. Conclusiones.....	82
4.3. Parte 3: Segunda aplicación del farmacóforo: optimización mediante síntesis química; obtención de nuevos derivados de HC-3.....	84
4.3.1. Consideraciones generales.....	84
4.3.2. Metodología sintética.....	93
4.3.3. Análisis espectroscópico.....	94
4.3.3.1. Análisis espectroscópico de los derivados de bencilo. Familia A.....	96
4.3.3.1.1. Análisis espectroscópico de ^1H -RMN.....	96
4.3.3.1.2. Análisis espectroscópico de ^{13}C -RMN.....	99
4.3.3.1.3. Análisis de espectrometría de masas HRMS.....	101
4.3.3.2. Análisis espectroscópico de los derivados de bifenilo. Familia B.....	103
4.3.3.2.1. Análisis espectroscópico de ^1H -RMN.....	103
4.3.3.2.2. Análisis espectroscópico de ^{13}C -RMN.....	105
4.3.3.2.3. Análisis de espectrometría de masas HRMS.....	107
4.3.3.3. Análisis espectroscópico de los derivados de bifenilo con aminas terciarias. Familia C.....	108
4.3.3.3.1. Análisis espectroscópico de la subfamilia C.1.....	109
4.3.3.3.1.1. Análisis espectroscópico de ^1H -RMN.....	110
4.3.3.3.1.2. Análisis espectroscópico de ^{13}C -RMN.....	115
4.3.3.3.1.3. Análisis de espectrometría de masas HRMS.....	117
4.3.3.3.2. Análisis espectroscópico de la subfamilia C.2.....	119

4.3.3.3.3.	Análisis espectroscópico de la subfamilia C.2.....	119
4.3.3.3.3.1.	Análisis espectroscópico de ¹ H-RMN.....	120
4.3.3.3.3.2.	Análisis espectroscópico de ¹³ C-RMN.....	122
4.3.3.3.3.3.	Análisis de espectrometría de masas HRMS.....	124
4.3.3.3.4.	Análisis espectroscópico de la subfamilia C.3.....	125
4.3.3.3.4.1.	Análisis espectroscópico de ¹ H-RMN.....	126
4.3.3.3.4.2.	Análisis espectroscópico de ¹³ C-RMN.....	135
4.3.3.3.4.3.	Análisis de espectrometría de masas HRMS.....	139
4.3.3.3.5.	Análisis espectroscópico de la subfamilia C.4.....	141
4.3.3.3.5.1.	Análisis espectroscópico de ¹ H-RMN.....	142
4.3.3.3.5.2.	Análisis espectroscópico de ¹³ C-RMN.....	144
4.3.3.3.5.3.	Análisis de espectrometría de masas HRMS.....	147
4.3.4.	Ensayos biológicos.....	148
4.3.4.1.	Consideraciones generales.....	148
4.3.4.2.	Ensayos de espectroscopía de fluorescencia sobre <i>HsChoK</i>	148
4.3.4.3.	Ensayos de inhibición de <i>HsChoK</i>	154
4.3.4.4.	Ensayos de actividad antiproliferativa.....	162
4.3.5.	Estudios de cristalografía.....	173
4.3.5.1.	Las estructuras cristalinas demuestran que los compuestos se unen al sitio de la colina.....	173
4.3.5.2.	Comparativa de los cristales de las familias A, B y C -entre sí y con otros previamente publicados- en función de la naturaleza de la cabeza catiónica de los compuestos.....	182
4.4.	Parte 4: Estudio computacional comparativo de los sitios activos de <i>HsChoKα1</i>, <i>PfChoK</i>, <i>PkChoK</i> y <i>CpChoK</i>.....	189
4.4.1.	El sitio activo de <i>Cryptosporidium parvum</i> y <i>Plasmodium</i> ChoKs está muy conservado con el de <i>HsChoKα1</i>	190
4.4.2.	La MD muestra que en el reconocimiento de los ligandos intervienen interacciones conservadas/no conservadas entre las especies.....	192
4.4.3.	Los derivados del HC-3 pueden comportarse como inhibidores de <i>HsChoKα1</i> , <i>PfChoK</i> y <i>CpChoK</i> simultáneamente.....	196
4.4.4.	Efecto antiproliferativo y antimalárico del compuesto C.4.4.....	200
4.4.5.	Conclusiones.....	201
4.5.	Parte 5: Actividad antimalárica de los derivados de síntesis.....	203
5.	Parte Experimental.....	209
5.1.	Química Computacional.....	209
5.1.1.	Diseño del farmacóforo.....	209
5.1.1.1.	Primera aproximación: Estudio inicial de docking	209
5.1.1.2.	Segunda aproximación: Hipótesis farmacofórica basada en el HC-3.....	212
5.1.1.3.	Tercera aproximación: Búsqueda del farmacóforo en el fragmento de 1-bencil-4-(<i>N</i> -metilanilino)piridinio.....	213
5.1.2.	Cribado virtual (Virtual screening, VS).....	215
5.1.3.	Estudio comparativo de los sitios activos de <i>HsChoKα1</i> , <i>PfChoK</i> , <i>PkChoK</i> y <i>CpChoK</i>	216

5.1.3.1. Preparación de las estructuras.....	216
5.1.3.2. Simulaciones de Dinámica Molecular.....	221
5.2. Síntesis Orgánica.....	223
5.2.1. Condiciones generales.....	223
5.2.2. Síntesis de las materias primas.....	224
5.2.3. Síntesis de los productos intermedios.....	226
5.2.4. Síntesis de los productos finales.....	230
5.2.4.1. Método general de síntesis para los productos finales derivados del bencilo. Familia A.....	230
5.2.4.2. Método general de síntesis para los productos finales derivados del bifenilo. Familia B.....	232
5.2.4.3. Método general de síntesis para los productos finales derivados del bifenilo con amina terciaria. Familia C.....	235
5.2.4.3.1. Subfamilia C.1. Derivados de bifenilo y dimetilaminopiridina.....	236
5.2.4.3.2. Subfamilia C.2. Derivados de bifenilo y pirrolidinopiridina.....	241
5.2.4.3.3. Subfamilia C.3. Derivados de bifenilo y 7-cloro-4-(<i>N</i> -metilanilinio)quinolina.....	244
5.2.4.3.4. Subfamilia C.4. Derivados de bifenilo y 7-cloro-4-(azepan-1-il)quinolina.....	252
5.3. Clonaje, expresión y purificación de proteínas.....	256
5.3.1. Clonaje, expresión y purificación de <i>HsChoK</i> α 1 y <i>HsChoK</i> β	256
5.3.1.1. Clonaje de <i>HsChoK</i> α 1 y <i>HsChoK</i> β	256
5.3.1.2. Expresión de <i>HsChoK</i> α 1 y <i>HsChoK</i> β	256
5.3.1.3. Purificación de <i>HsChoK</i> α 1 y <i>HsChoK</i> β	257
5.3.2. Clonaje, expresión y purificación de <i>PfChoK</i>	259
5.3.2.1. Clonaje de <i>PfChoK</i>	259
5.3.2.2. Expresión de <i>PfChoK</i>	260
5.3.2.3. Purificación de <i>PfChoK</i>	260
5.3.3. Clonaje, expresión y purificación de <i>CpChoK</i>	262
5.3.3.1. Clonaje de <i>CpChoK</i>	262
5.3.3.2. Expresión de <i>CpChoK</i>	263
5.3.3.3. Purificación de <i>CpChoK</i>	263
5.4. Ensayos de afinidad proteína-inhibidor: fluorescencia de triptófanos.....	265
5.5. Análisis estructural mediante cristalografía de Rayos X.....	267
5.5.1. Condiciones de cristalización.....	267
5.5.2. Determinación de las estructuras cristalográficas por difracción de rayos-X.....	270
5.6. Ensayos biológicos.....	271
5.6.1. Ensayos de inhibición de la actividad de ChoK.....	271
5.6.1.1. Cultivo celular de HepG2.....	271
5.6.1.2. Obtención de <i>HsChoK</i> a partir de células HepG2.....	271
5.6.1.3. Ensayo de la actividad enzimática de <i>HsChoK</i> en el homogeneizado de HepG2.....	272

5.6.1.4. Ensayo de actividad enzimática de <i>HsChoK</i>	272
5.6.2. Ensayos de inhibición de la proliferación celular en las líneas tumorales HepG2, A549, HT29, HCT116, MCF7 y Jurkat.....	273
5.6.3. Actividad antimalárica.....	276
5.6.3.1. Eritrocitos infectados con <i>Plasmodium falciparum</i>	276
5.6.3.2. Estudios de citotoxicidad.....	277
6. Summary	278
7. Conclusions	311
8. Bibliografía	315

ANEXO: Análisis espectroscópico bidimensional

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

La falta de selectividad de la mayoría de los tratamientos anticancerígenos usados en la actualidad, la pérdida de eficacia de los mismos a medida que el tumor evoluciona debido a las variaciones genéticas que tienen lugar y el desarrollo de resistencias como consecuencia de estrategias celulares capaces de evadir la acción del agente antitumoral, hacen necesario el desarrollo de nuevos fármacos para combatir esta enfermedad cada vez más prevalente.

Dada la naturaleza genética del **cáncer**, las nuevas estrategias terapéuticas se fundamentan en el conocimiento de los genes que aparecen alterados durante el proceso tumoral y de las proteínas que codifican, con el objetivo de utilizarlas como blanco de acción de los nuevos fármacos. Uno de los protooncogenes que se encuentra mutado en más de la mitad de tumores humanos es el protooncogén *ras*, el cual participa en cascadas de señalización celular donde está involucrada una amplia gama de proteínas que suponen puntos de control para la activación de la proliferación celular y, por lo tanto, de la progresión tumoral. Una de esas proteínas es la colina quinasa, que está involucrada en la biosíntesis de uno de los fosfolípidos más importantes para la formación de las membranas celulares, la fosfatidilcolina (PC).

A pesar de la diversa etiología de la **malaria** en relación con el cáncer, ambas enfermedades muestran ciertas similitudes. La primera de ellas es su alta incidencia entre la población mundial que las sitúa como un problema de salud pública de grandes

dimensiones y, en segundo lugar, el fallo terapéutico de los tratamientos actuales debido a la aparición de resistencias. En este sentido, la investigación de nuevos fármacos antimaláricos se está centrando en dianas implicadas en la formación de componentes estructurales esenciales para el desarrollo del parásito. Un ejemplo de estas dianas lo constituye la ChoK, que satisface la elevada demanda de lípidos (entre los que destaca de nuevo la PC) que experimenta el plasmodio durante su multiplicación.

Es en este punto, por tanto, donde encontramos el **nexo de unión** entre ambas enfermedades, y aunque la ChoK haya sido utilizada a lo largo de las últimas décadas sobre todo como diana para el diseño de nuevos fármacos anticancerígenos, más recientemente, tras haberse demostrado que el metabolismo lipídico es un proceso esencial para la supervivencia, desarrollo y proliferación de *Plasmodium sp.*, también ha sido propuesta como diana en este campo. En consecuencia, su inhibición ha sido utilizada como estrategia para frenar su actividad catalítica en ambos procesos, encontrándonos hoy día con una gran cantidad de inhibidores, algunos de los cuales han conseguido llegar hasta la fase de ensayos clínicos. Varios ejemplos los constituyen los compuestos **TCD-717** y **albitiazolium**. El primero de ellos fue diseñado por nuestro grupo de investigación y actualmente se encuentra en fase I de ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos bajo una patente explotada por la empresa TCD-Pharma. El segundo, a su vez, está en fase II como antimalárico.

Dada la relevancia que tienen el cáncer y la malaria sobre la salud pública mundial, en la presente tesis doctoral se utilizan técnicas de síntesis química, química computacional, biología molecular y cristalografía para plantear el diseño de nuevos inhibidores de ChoK que, además, puedan utilizarse como herramienta para profundizar en el conocimiento de ChoK a nivel mecanístico. Por otro lado, se pretenden identificar no sólo los grupos funcionales indispensables para conseguir una unión eficaz a la enzima (farmacóforo), sino también los residuos con los que todo inhibidor de esta enzima debe interactuar para bloquear su actividad catalítica.

2. ANTECEDENTES

2. Antecedentes

2.1. Cáncer

2.1.1. Epidemiología

Según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) , se define el cáncer como un amplio conjunto de enfermedades que tienen en común la rápida creación de células anormales capaces de crecer fuera de sus límites habituales, y que mediante el proceso conocido como metástasis, pueden invadir tanto zonas adyacentes como órganos distantes utilizando los sistemas sanguíneo y linfático. La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer debido a que origina pérdida de la función ordinaria del órgano invadido.

En 2013, el cáncer ya figuraba entre las primeras causas de muerte a nivel mundial tras las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y las infecciones respiratorias, habiéndosele atribuido 8,2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012.¹

Del total de casos anuales de cáncer, un 60% se dan en África, Asia y América Central y Latina, siendo los de pulmón, hígado, estómago, colon y mama, los más frecuentes a nivel mundial.¹

La OMS señala que el tabaco, el alcohol, la mala dieta y la inactividad física son los principales factores de riesgo de cáncer en todo el mundo y estima que aproximadamente un 30% de las muertes mundiales por esta causa podrían evitarse corrigiendo hábitos de vida poco saludables.¹

Según las estimaciones de la misma organización, los casos anuales de cáncer tenderán a seguir aumentando, pasando de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas.¹

2.1.2. Etiología

A pesar de la gran cantidad de información con la que actualmente se cuenta sobre la biología del cáncer, la falta de modelos animales y celulares que reflejen su extrema complejidad, hacen que aún exista incertidumbre sobre sus mecanismos de génesis y desarrollo.^{2,3} Así, por ejemplo, la falta de conocimiento sobre transducción de señales, regulación del ciclo celular, apoptosis, biología de telómeros y angiogénesis, supone un reto aún por superar para el tratamiento y la erradicación del cáncer. Además, los cambios geno- y fenotípicos que se dan a lo largo del proceso tumoral y la gran diversidad que se observa en la aparición y el avance de dicha enfermedad por las características individuales de cada paciente,⁴ impiden que puedan generalizarse los tratamientos.

No obstante, a pesar de la gran plasticidad de las células cancerosas, se observan patrones comunes de comportamiento que han sido ampliamente estudiados. Así, por ejemplo, se conoce que la transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico caracterizado por la inestabilidad genómica.⁵ El proceso de malignización se inicia por acumulación de al menos seis mutaciones (según el “Cancer Research UK”)⁶ en los genes supresores de tumores y en los protooncogenes. En consecuencia, ocurre un desequilibrio entre las tasas de proliferación y muerte celular que se traduce en un potencial replicativo ilimitado. Las células cancerígenas cuentan, además, con mecanismos de evasión de las señales apoptóticas⁷ y del sistema inmune,⁸ con una desregulación del metabolismo energético⁹ y con una capacidad angiogénica¹⁰ suficiente como para invadir otros tejidos y originar metástasis.¹¹

Según la OMS, las mutaciones están ocasionadas por interacción entre los factores genéticos del paciente y los agentes carcinógenos de tipo físico, químico o biológico.¹² Además, se ha observado que con la edad aumenta la incidencia de casos de cáncer, lo cual parece deberse al acúmulo de mutaciones adquiridas a lo largo de la vida que no han podido ser reparadas y a fallos en los mecanismos de reparación del material genético. Por otro lado, los cambios epigenéticos que afectan al ADN, al ARN o a las

histonas, junto con los cambios genéticos juegan un papel fundamental en la progresión tumoral.¹³

2.1.3. Tratamiento

Son varias las estrategias usadas en la actualidad para tratar el cáncer, como la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la terapia biológica, la terapia hormonal, la fototerapia y la crioterapia.¹⁴ Sin embargo, las más frecuentemente aplicadas en la práctica clínica diaria son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Las dos primeras tienen éxito en caso de que el tumor se encuentre muy localizado y esté en una etapa temprana de su desarrollo.¹⁵ La quimioterapia, sin embargo, se aplica a la mayoría de los pacientes con cáncer en cualquiera que sea la etapa en la que se encuentra el tumor. Dicha herramienta presenta ciertos inconvenientes que deben ser solucionados por la comunidad científica. Entre ellos cabe destacar su efímera efectividad y el empeoramiento de la calidad de vida del paciente.¹⁵

Con respecto a la efectividad, transcurrido un determinado período de tiempo del inicio del tratamiento, se desarrollan resistencias a los fármacos empleados debido a la inherente inestabilidad genética del tumor. Esta es la razón por la que la mayoría de los tratamientos quimioterápicos se administran en forma de cócteles donde se incluyen fármacos que actúan a diferentes niveles celulares.¹⁶

Por su parte, la pérdida de calidad de vida se debe a los efectos adversos sistémicos que se desencadenan como consecuencia de la falta de selectividad o toxicidad de la mayoría de las terapias actuales.¹⁷

Dado el carácter genético del cáncer, una de las estrategias empleadas actualmente en el desarrollo de nuevas terapias antitumorales, se basa primero en el conocimiento de los genes que pueden aparecer mutados durante la génesis y el desarrollo de la enfermedad y luego, se investigan las proteínas que son codificadas por dichos genes para usarlas como diana.¹⁵ El objetivo de dicha aproximación es el diseño de fármacos selectivos que permitan reducir la toxicidad de los tratamientos actuales. Un ejemplo lo constituye el **imatinib**,¹⁸ que se usa para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y que muestra una gran selectividad por la tirosina quinasa.

En consecuencia, el gran avance experimentado en las últimas décadas sobre el conocimiento de la fisiopatología del cáncer, aunque sea todavía insuficiente, está permitiendo el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas. De este modo, se alienta

la esperanza de encontrar tratamientos con mejor actividad antitumoral y menor toxicidad que tengan además, aplicabilidad en las distintas fases del proceso tumoral.

2.1.4. Metabolismo lipídico en cáncer y ChoK

Uno de los protooncogenes que se encuentra mutado en más de la mitad de tumores humanos es el protooncogén *ras*,¹⁹ el cual participa en cascadas de señalización celular donde están involucradas una amplia gama de proteínas que suponen puntos de control para la activación de la proliferación celular y, consecuentemente, de la progresión tumoral. Una de esas proteínas es la colina/etanolamina quinasa (ChoK),²⁰ que es una enzima citosólica de amplia distribución en la naturaleza cuyo nombre se debe a su capacidad para fosforilar tanto a colina (Cho) como a etanolamina en presencia de ATP y Mg^{2+} . Esta transformación catalítica constituye la primera etapa de la ruta metabólica de Kennedy (**Figura 2.1**), conocida también con el nombre de ruta de la CDP-colina²¹ y tiene una gran importancia en el metabolismo lipídico de células eucariotas y de algunos procariotas. En ella, se biosintetiza la fosfatidilcolina (PC, **Figura 2.1**) que junto con la fosfatidiletanolamina (PtdEtn) representan el 50% del contenido total de fosfolípidos de las membranas celulares de animales y plantas. Además, en mamíferos la PC es el fosfolípido más abundante en el plasma, donde es el componente principal de las lipoproteínas (AOCS Lipids Library).²²

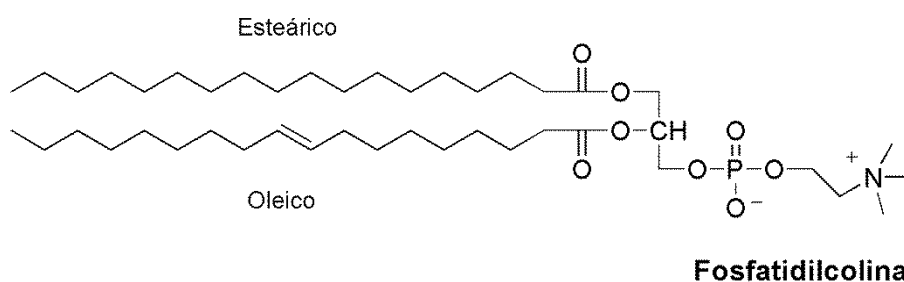


Figura 2.1. Estructura química de la fosfatidilcolina.

Aunque en la célula la ruta de Kennedy supone la principal fuente de PC, ésta también puede obtenerse tras catabolismo de la lisofosfatidilcolina (liso-PC) (por la 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa; AGPAT) o por metilación de la PdEtn (mediada por la enzima hepática fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa (PEMTC, en el hígado).^{21,23} En concreto, la ruta de Kennedy (que se encuentra activa principalmente

durante la fase S del ciclo celular) se inicia una vez que la Cho (**Figura 2.2**) atraviesa la membrana plasmática.

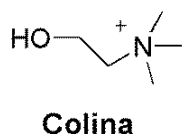


Figura 2.2. Estructura química de la colina.

La colina procede principalmente de la dieta y su penetración a la célula es un proceso altamente regulado que se da mediante difusión pasiva o transporte activo²³. En este último caso, intervienen tres tipos de transportadores con distinta afinidad por la Cho: a) los transportadores de cationes orgánicos (*Organic Cation Transporters*; OCTs), de baja afinidad; b) los transportadores de afinidad intermedia (*Choline-specific Transporter-Like protein*; CTL1); c) la de gran afinidad dependiente de Na⁺ (*High-affinity Choline Transporter*; CHT1), que son especialmente abundantes en las neuronas. Tanto los transportadores de afinidad intermedia (CTL1) como los de gran afinidad (CHT1) son inhibidos por hemicolinio-3 (**HC-3**), motivo por el que este primer inhibidor de ChoK presenta toxicidad respiratoria.²⁴

Una vez que la Cho se halla en el interior celular, ChoK cataliza su conversión a PCho en presencia de ATP y Mg²⁺ (**Figura 2.3**). A continuación, la PCho se convierte en citidina 5'-difosfocolina (CDP-Cho) tras la transferencia de un fosfato procedente de citidina trifosfato (CTP). Dicha reacción se cataliza por la enzima CTP: fosfocolina citidiltransferasa. Posteriormente, CDP-Cho es transformada en PC por acción de CDP-colina: 1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa (CPT), que incorpora diacilglicerol (DAG). Por último, PC es hidrolizada por la enzima fosfolipasa D específica de PC (PC-PLD), generando ácido fosfatídico (PA) y Cho, que cierra el ciclo. A su vez, el PA puede desacetilarse para generar DAG por parte de la enzima ácido fosfatídico fosfohidrolasa (PAP), o ser desacilado por la enzima fosfolipasa A2 (PLA2) para generar ácido lisofosfatídico (LPA) y ácido araquidónico. Tanto DAG como LPA son metabolitos lipídicos con actividad mitogénica.²⁵

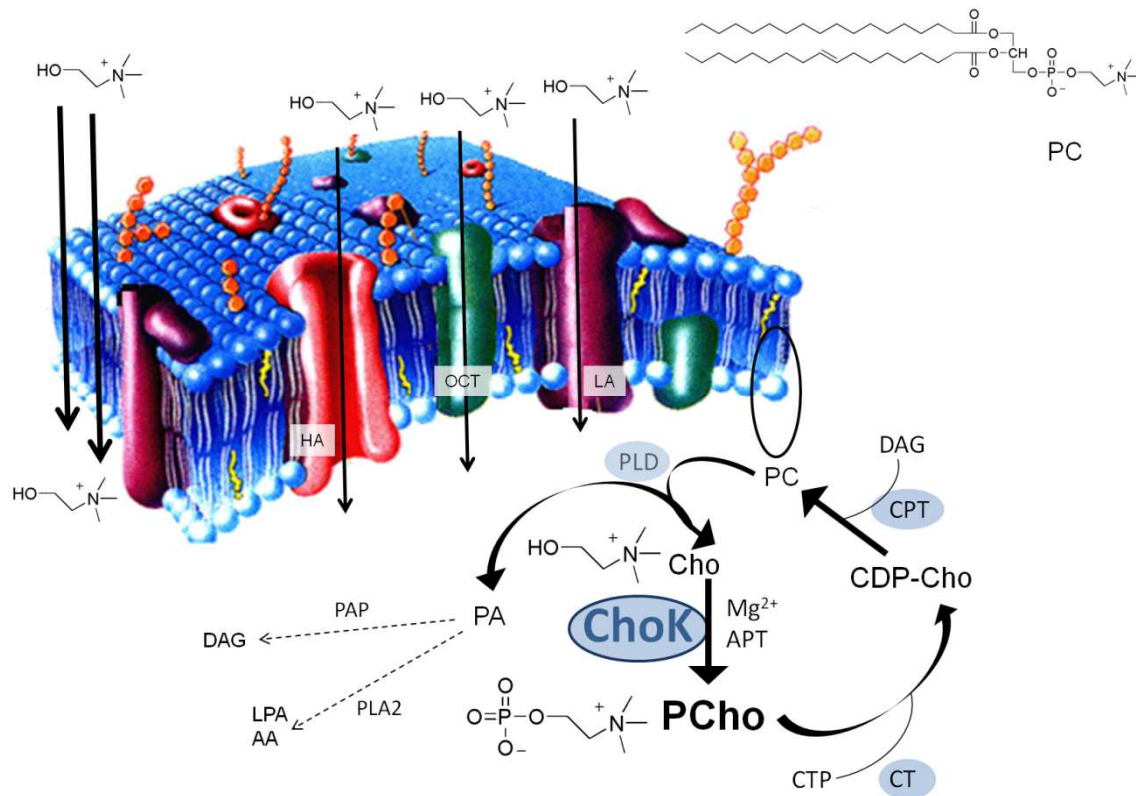


Figura 2.3. Ruta de Kennedy para la biosíntesis de fosfatidilcolina (PC).

En células eucariotas, existe una ruta metabólica similar a la CDP-colina donde se biosintetiza PtdEtn a partir de etanolamina. Esta ruta recibe el nombre de CDP-etanolamina y su enzima principal es la etanolamina quinasa (EK).²¹

2.1.5. Mecanismo catalítico de ChoK

A pesar de la gran cantidad de información que se tiene respecto al papel biológico y las rutas metabólicas donde participa ChoK, existe controversia en relación a cómo lleva a cabo la reacción de transferencia del fosfato desde el ATP hasta la colina.

La primera aproximación al mecanismo catalítico de la ChoK fue propuesta por Konrad y col. en el año 2006.²⁶ Su hipótesis se sustentó por un lado, en el mecanismo de fosforilación que se daba en la mayoría de las quinasas, dada la notable conservación de residuos con la ChoK y, por otro, en los estudios de mutagénesis que previamente se habían realizado con la ChoK de *C.elegans*. Dicho mecanismo de catálisis, según Konrad, implicaba la participación de un complejo ternario de la ChoK con sus sustratos. Sin embargo, debido a la inexistencia de estructura cristalográfica de dicho complejo, se construyó computacionalmente un modelo en el que la enzima estaba

unida simultáneamente a ADP, Mg^{2+} y PCho (**Figura 2.4**). En tal escenario, se postuló que ciertos residuos serían responsables del correcto posicionamiento de los sustratos en el sitio activo (Asn311, Ser121, Asn122, Arg146 y Gln308) mientras que otros, debido a su carácter nucleofílico iniciarían la catálisis (Asp306 y Asp330). No obstante, no se indicaba la sucesión de ataques nucleofílicos necesarios para la transferencia del fosfato desde el ATP hasta la colina.

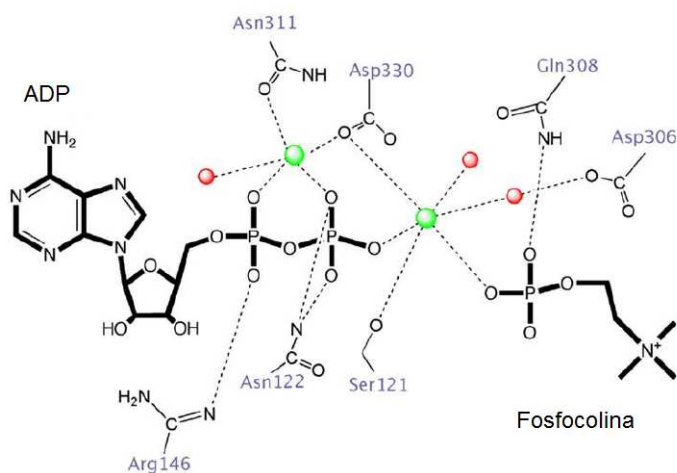


Figura 2.4. Primer mecanismo catalítico propuesto para ChoK. Es un mecanismo típico de proteínas quinasas que implica la formación de un complejo ternario.²⁶

Más recientemente, en el año 2013, Pollard y col.²⁷ basándose en estudios cinéticos, presentaron un mecanismo de doble desplazamiento (**Figura 2.5**) según el cual el fosfato γ - del ATP se transfiere a la colina en dos etapas que implican la formación de un intermedio fosforilado de ChoK. Así, lo primero que se plantea es la unión del ATP a la enzima, la cual inmediatamente quedaría fosforilada en el Asp306 tras el ataque nucleofílico de éste al fosfato γ - del ATP. Tras la formación del intermedio fosforilado, el ADP saldría del sitio activo y entraría la colina, la cual sería fosforilada por el Asp306, formándose un enlace covalente entre ambos. Por último, ChoK sufriría un cambio conformacional que disminuiría el pKa del Asp306 y que sería la causa de la interrupción del enlace covalente antes de la liberación de la PCho.

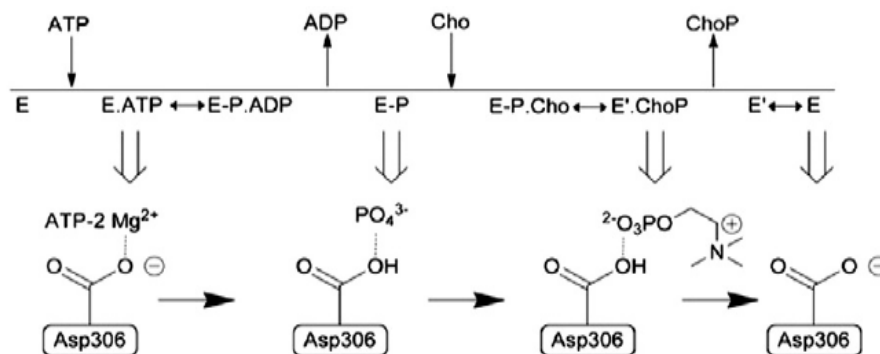


Figura 2.5. Segundo mecanismo catalítico propuesto para ChoK. Se propone la formación de un complejo intermedio fosforilado.²⁷

A pesar de la falta de consenso entre ambos mecanismos, tanto uno como otro han sido observados en la superfamilia de las quinasa, si bien es cierto que el más extendido es el que implica la formación de un complejo ternario antes del inicio de los ataques nucleofílicos. El motivo por el que la formación de un intermedio fosforilado queda prácticamente reducida a ciertas tirosina-fosfatasa es la falta de posicionamiento adecuado de nucleófilos con potencia suficiente para atacar a los grupos salientes de los sustratos.²⁸ No obstante, esto no se observa para el caso de la ChoK dada la cercanía entre el fosfato γ - del ATP y el Asp306. Precisamente, es en la importancia de este residuo en la catálisis, el único punto donde coinciden ambos mecanismos.

2.1.6. ChoK en humanos

2.1.6.1. Isoformas

La familia de la colina/etanolamina quinasa en humanos comprende dos genes *choK- α* y *choK- β* , que codifican tres isoformas, ChoK α 1 (457 aminoácidos, 52 kDa), ChoK α 2 (439 aminoácidos, 50 kDa) y ChoK β (395 aminoácidos, 45 kDa).²⁹ Las isoformas ChoK α y ChoK β pueden expresarse de forma diferencial gracias a que los promotores de los genes *choK- α* y *choK- β* difieren entre sí. De esta forma, su transcripción está sometida a distintos mecanismos de control, lo cual sugiere un papel fisiológico diferente para cada isoforma. Así, en roedores la isoforma ChoK β se expresa mayoritariamente en el corazón y en el hígado, mientras que la ChoK α es especialmente abundante en los testículos.³⁰ La homología global entre ChoK α y ChoK β alcanza el 60% y es mayor en el dominio colina/etanolamina.²⁹ En la célula completa, ChoK α tiene la capacidad de fosforilar tanto a la colina como a la etanolamina, mientras que la

isoforma ChoK β sólo afecta a la producción de PEtn.³¹ ChoK no es activa como monómero, de tal forma que en el medio fisiológico se encuentra como homo o heterodímeros.²⁹ Como ha sido demostrado por el grupo de Ishidate³⁰ en roedores, la actividad *in vitro* de los distintos dímeros es diferente en función de la isoforma constituyente. Así, se ha postulado que el oligómero más activo es el α/α , seguido por el α/β , siendo el β/β el menos activo. Además, la distribución de tales dímeros depende del tejido, siendo el α/β el más abundante a nivel general.³⁰

ChoK α es una diana de señales oncogénicas procedentes de los oncogenes *ras* y *rhoA*. Así, mientras que Ras activa a ChoK α mediante los efectores Ral-GDS (*Ral Guanine Nucleotide Dissociation stimulator*) y PI3K (Phosphoinositide 3-kinase),³² y RhoA la activa mediante las ROCK quinasas (*Rho-associated protein kinase*),³³ ninguna de estas GTPasas oncogénicas afectan a ChoK β . Por tanto, la sobreexpresión de ChoK α *in vitro* induce transformación oncogénica, mientras que la sobreexpresión/sobreestimulación de ChoK β no parece ser suficiente para inducir proliferación celular.³¹ Es por ello que todos los esfuerzos destinados a dilucidar el papel de ChoK en el diagnóstico (mediante anticuerpos monoclonales anti-ChoK), pronóstico y tratamiento del cáncer deben de focalizarse en la isoforma ChoK α . Debido a la homología estructural que presentan ambas isoformas, la búsqueda de nuevos agentes anticancerígenos capaces de interrumpir la actividad de ChoK debe de estar centrada en la especificidad frente a ChoK α , ya que en caso de afectar también a la isoforma ChoK β , se producirían deformidades óseas y distrofia muscular³⁴. La aparición de dichos efectos adversos ha sido demostrada por Aoyama y col. tras delección del gen *choK- β* en roedores.³⁴

2.1.6.1.1. Isoforma α

La isoforma α de humanos (*HsChoK α*) aparece sobreexpresada en el 40-60% de los cánceres de mama,³⁵ próstata,³⁶ pulmón,³⁷ colon,³⁸ ovario³⁹ y vejiga,⁴⁰ los cuales representan más del 70% del total de casos de cáncer en países desarrollados.⁴¹ Debido a tal sobreexpresión, los niveles de fosfocolina (PCho) se elevan de 10-20 veces por encima de los niveles basales, según ha sido demostrado para adenocarcinomas.⁴² Las causas de la sobreexpresión/estimulación de ChoK α son dos: a) activación continua por parte de las RhoGTPasas Ral-GDS, PI3K y ROCK-quinasa, las cuales a su vez se encuentran activas de manera permanente por acción de los oncogenes *ras* y *rhoA*; b)

insulina,^{43,44} prolactina,⁴⁵ estrógenos,^{46,47} los factores de crecimiento⁴⁸ derivados de plaquetas (PDGF), fibroblastos (FGF) y epidermis (EGF),^{42, 49,50} el factor-1 α inducible por hipoxia⁵¹ y tóxicos como el CCl₄.³⁰ En consecuencia, no sólo se proporciona más cantidad de PC para la formación de membranas plasmáticas, endosomas y exosomas, sino que además, se exacerbaban rutas de señalización responsables de la proliferación celular, ya que PC actúa como sustrato de la fosfolipasa D (PLD), la cual genera ácido fosfatídico. Dicho producto actúa como factor de crecimiento en base a tres acciones principales: a) reclutando al factor SOS⁵² (*Son of Sevenless*) y a la serina/reonina quinasa Raf-1;⁵³ b) estimulando la formación de endosomas necesarios para la activación de la MAP quinasa;⁵⁴ c) en mamíferos, activando a la rapamicina quinasa (mTOR).⁵⁵

2.1.6.1.1.1. Isoforma α en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer

Las implicaciones de la isoforma *HsChoK α* en la transformación oncogénica, hacen que pueda ser utilizada como medio para el pronóstico,⁵⁶ diagnóstico⁴¹ y tratamiento de tumores donde se encuentre sobreexpresada o hiperactivada (mama, pulmón, vejiga, colon y próstata).⁵⁷

Entre los años 2005 y 2009 Lacal y colaboradores demostraron que los tumores de pulmón³⁷ y vejiga⁴⁰ donde existiera sobreexpresión de *HsChoK α* tenían un mal pronóstico.

En 2006, el mismo grupo de investigación postuló⁴¹ que el desarrollo de metodologías apropiadas para la detección de la sobreexpresión de *HsChoK α* en tumores humanos, podría representar un avance importante en el diagnóstico temprano del cáncer y que, por tanto, podría usarse como estrategia para conseguir un aumento de la esperanza de vida de los pacientes. De este modo, el mismo grupo diseñó anticuerpos monoclonales anti-*HsChoK α* de gran especificidad frente a esta isoforma.⁴¹ Cinco años más tarde (2011), Barwick y col.⁵⁸ presentaron la técnica de [¹¹C]choline-PET-CT como un método no invasivo para el estudio de los niveles de *HsChoK* en cáncer de próstata y en los nódulos linfáticos adyacentes cuando el tumor todavía no alcanza un centímetro de tamaño, siendo indicadores del estadio del tumor y de la respuesta al tratamiento. Apuntaban además que esta técnica permitía un diagnóstico más preciso que otras técnicas convencionales, como la Resonancia Magnética por Imagen (MRI) o la tomografía de emisión de positrones (*Positron emission tomography*; PET).

Por último, la utilidad de *HsChoK α* en el tratamiento de ciertos tipos de tumores se debe a la necesidad extra de fosfolípidos que tienen las células neoplásicas como resultado tanto de una rápida proliferación, como de una elevada formación de endosomas (involucrados en la señalización mediada por factores de crecimiento)⁵⁹ y secreción de microvesículas o exosomas (responsables de la inmunosupresión y de la comunicación intercelular).^{60,61} Por lo tanto, la terapia antitumoral se basa en una interrupción de la actividad de *HsChoK α* para reducir la concentración de PC, implicada tanto en la formación de las membranas plasmáticas como en la generación de segundos mensajeros responsables de la proliferación celular incontrolada.⁶² La estrategia más frecuente para conseguir la interrupción de la actividad de *HsChoK α* consiste en el uso de inhibidores;⁶³ y tal y como ha sido demostrado mediante ARN silenciante (*short hairpin RNA*; shRNA) capaz de unirse al ARN mensajero (mRNA) de la *HsChoK α* 1, con tal estrategia se induce apoptosis en células tumorales, mientras que la viabilidad de las células sanas no se ve afectada.⁶⁴ Estas observaciones indican que la inhibición de la *HsChoK α* es una estrategia antitumoral *per se*, y proporcionan una clara evidencia sobre su potencialidad como diana selectiva de fármacos en la lucha contra el cáncer.

2.1.6.2. Inhibidores de *HsChoK*

Tal y como ha sido demostrado a lo largo de las últimas décadas, la inhibición de la ChoK es una estrategia terapéutica válida para evitar procesos cancerígenos.⁶² Como ha sido expuesto en los apartados anteriores, el privar a las células eucariotas y de ciertos procariontes del producto catalítico de ChoK, la fosfocolina, supone un freno no sólo para la formación de membranas plasmáticas, sino también para la transmisión de la señal mitogénica al núcleo de las células de mamíferos. En consecuencia, han sido muchos los inhibidores obtenidos a lo largo de los últimos tiempos. Los primeros de ellos, se diseñaron basándose en las relaciones estructura-actividad (SAR) de moléculas derivadas de la colina o del **HC-3**. No obstante, la publicación en el 2006 de la primera estructura cristalina de la *HsChoK* ayudó a racionalizar el proceso de selección de grupos funcionales.²⁶ De este modo, el conocimiento cristalográfico ha supuesto un notable avance en el desarrollo de inhibidores cuya estructura difiere de forma considerable con la de las moléculas diseñadas en los primeros años en los que se abordó la estrategia de inhibición de la ChoK.

2.1.6.2.1. Derivados del HC-3

El hemicolinio-3 (**HC-3**) fue el primer inhibidor específico de la *HsChoK α* que se descubrió. Este hallazgo se produjo tras comprobarse que la fosforilación de Cho en el cerebro de ratón se inhibía en su presencia, de modo que se estudió primero su efecto sobre la enzima ChoK de ratón aislada y posteriormente, sobre la humana.⁶⁵ Previamente, los análogos estructurales de la colina⁶⁶ habían demostrado ser inhibidores de la enzima pero con una escasa potencia e inespecificidad.

Se trata de una molécula compuesta por un anillo central de tipo bifenílico que separa a dos cadenas similares a la colina, que en disolución ciclan dando lugar a dos anillos de oxazonio (**Figura 2.6**). Ambos anillos incluyen un amonio cuaternario cargado positivamente y un grupo hidroxilo, que le confieren a la molécula una gran polaridad en los extremos.

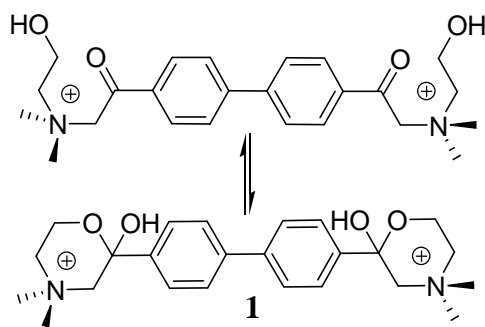


Figura 2.6. Estructura química del **HC-3** en equilibrio entre las formas abiertas y ciclohemiacetálica (1).

A pesar de su capacidad para inhibir a la *HsChoK α* , tanto la afinidad que muestra por la proteína ($CI_{50} = 57 \mu M$),⁶⁷ como su actividad antiproliferativa ($EC_{50} = 500 \mu M$) son muy bajas. En consecuencia, las grandes concentraciones a las que debe usarse el **HC-3** para hacer patente su efecto, son la causa de la toxicidad que genera a nivel neuronal y respiratorio,⁶⁷ lo cual lo hace inviable para su uso como agente antitumoral *in vivo*.

No obstante, a pesar de su toxicidad, nuestro grupo de investigación consideró que el **HC-3** era un prototipo válido para diseñar mediante farmacomodulación nuevos inhibidores más potentes y menos tóxicos. Así, se han sintetizado en las últimas décadas más de 200 compuestos cuya actividad como agentes antiproliferativos ha sido

ensayada en diversas líneas tumorales y su potencia como inhibidores ha sido determinada frente al enzima, ya sea en extracto crudo o bien pura, tras expresarla en levaduras o en bacterias.

Aproximadamente la mitad de estos inhibidores están recogidos en la base de datos electrónica “Binding Database”, que puede consultarse para obtener información tanto acerca de su estructura química como de su CI_{50} no sólo frente a la proteína aislada sino también frente a diferentes líneas tumorales.⁶⁸

2.1.6.2.1.1. Inhibidores biscatiónicos simétricos

En una primera fase del proceso de farmacomodulación, se decidió mantener el anillo bifenílico del **HC-3**, al que se le introdujeron un par de grupos ceto a ambos lados y sales de amonio cuaternarias alifáticas y aromáticas,⁵⁷ que sustituían a los anillos de oxazonio (**Figura 2.7**).

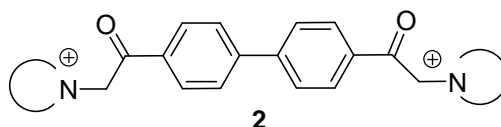


Figura 2.7. Estructura general de los derivados de **HC-3** obtenidos en la primera etapa de farmacomodulación.

Tras llevar a cabo los ensayos de inhibición y de actividad antiproliferativa pertinentes, se concluyó que los grupos piridinio eran responsables de una mejor actividad antiproliferativa que los restos de 3-hidroxiquinuclidino, debido a su mayor lipofilia.

A continuación, se sintetizaron “compuestos mitad” del **HC-3**, como por ejemplo el **HC-15**⁶⁹ (**Figura 2.8**), con objeto de investigar si las dos cabezas cationicas eran necesarias para la actividad inhibitoria. Se trataba de compuestos monocuaternizados mediante los que se concluyó que aunque la segunda carga no era necesaria para la actividad, en caso de estar presente, la mejoraba considerablemente.

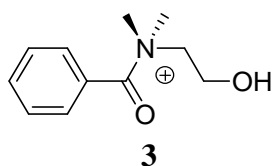


Figura 2.8. Estructura del prototipo para el diseño de los “compuestos mitad”, **HC-15**.⁷⁰

Posteriormente, se realizaron modificaciones que afectaban al mismo tiempo tanto al espaciador como a la cabeza catiónica, manteniendo el número de átomos entre los nitrógenos cuaternizados. Se utilizaron anillos de piridinio y quinolinio sustituidos o no en la posición 4 por diversos grupos funcionales (**Figura 2.9**).⁷¹

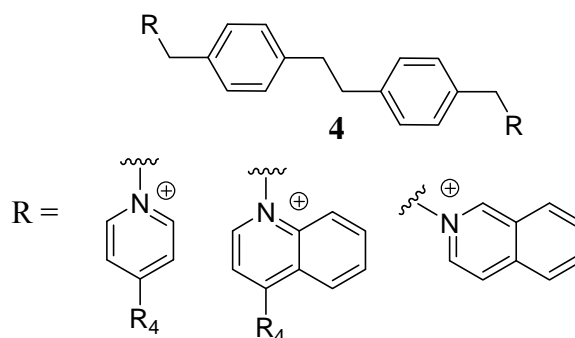


Figura 2.9. Estructura general de los compuestos biscatiónicos (4) de la tercera etapa de farmacomodulación.

Finalmente, se concluyó que los resultados eran más satisfactorios cuando los sustituyentes eran sales de piridinio sustituidas en posición 4 por grupos electrón donantes, como los grupos amino disustituidos debido a la deslocalización de la carga positiva del anillo heteroaromático. En consecuencia, cuanto más electrón-donante fuera R₄, más potente sería el compuesto como inhibidor de *Hs*ChoK, y también como agente antiproliferativo.

En la siguiente fase del proceso de farmacomodulación, se quiso averiguar cuál era la distancia óptima que debía de haber entre las cabezas catiónicas (anillos de piridinio sustituidos en posición 4 por grupos amino disustituidos) para conseguir máxima actividad biológica (**Figura 2.10**).⁷²

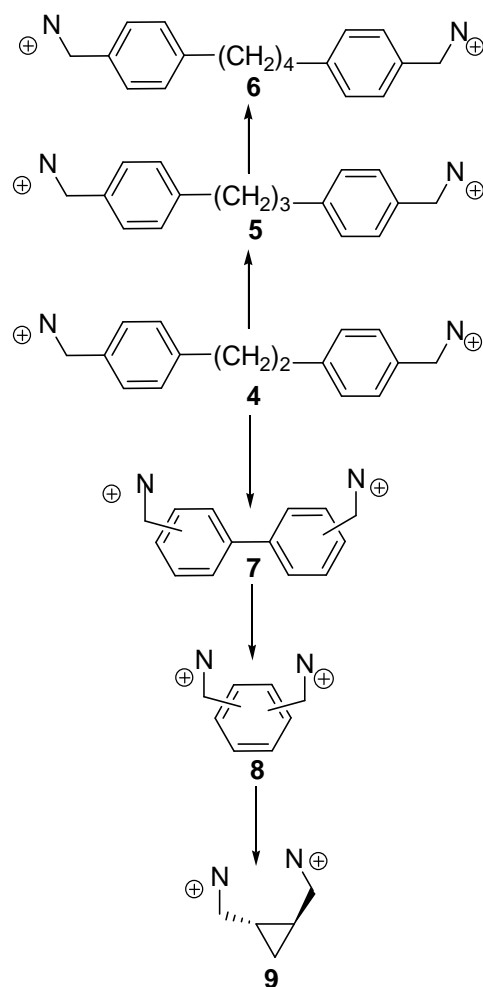


Figura 2.10. Modificaciones del espaciador realizadas en la cuarta etapa de la investigación a partir del compuesto prototipo 4.

Tras la síntesis de 6 series de compuestos cuya longitud del espaciador variaba entre 4-0 metilenos entre los bifenilos del **HC-3**, o incluso un único fenilo o un grupo cíclico no aromático de tipo ciclopropano, se estimó que la longitud óptima para conseguir tanto una buena inhibición del enzima como una actividad antiproliferativa significativa, venía dada por el grupo bifenilo (sustituido en las posiciones 3 y 3' o en las 4 y 4').

De todos los compuestos sintetizados en esta etapa de la investigación, el **MN58b** mostró una actividad antiproliferativa inferior a 2 μM no sólo a nivel de tumores hepáticos (HT-29), sino también de carcinoma de cérvix (HeLa), carcinoma epidermoide (A431), carcinoma de mama (MCF-7), linfoma histocítico (U937) y leucemia mieloide crónica (K562).⁷³ Dada su buena actividad *in vivo*, se completó su caracterización biológica mediante estudios de toxicidad y de mecanismo de acción

tanto a nivel de células sanas, como en tumorales. Así, se comprobó que **MN58b** inhibía tanto a la isoforma $\alpha 1$ ($CI_{50} = 5 \mu M$) como a la β ($CI_{50} = 107.5 \mu M$), y que dicha inhibición en células sanas conducía a un descenso de los niveles intracelulares de PCho, que provocaba una parada reversible del ciclo celular en la fase G_0/G_1 por defosforilación de la proteína pRb. Dicha parada, se traducía en una reducción de los requerimientos de fosfolípidos mientras existiera la inhibición y por tanto, no se afectaba el metabolismo lipídico. Sin embargo, en células tumorales, el compuesto **MN58b** (**Figura 2.11**) producía la activación de las vías de apoptosis por acción de ceramidas que se sintetizaban por las células durante su desarrollo para suplir los defectos de PCho, al no detenerse la fase G_0/G_1 del ciclo celular.⁶³

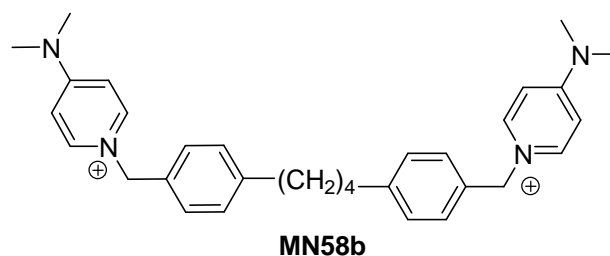


Figura 2.11. Estructura química del compuesto **MN58b**.

En la última etapa del diseño de análogos de **HC-3** con estructura biscatiónica, se emplearon espaciadores de tipo 3,3'-bifenilo, 4,4'-bifenilo y 4,4'-bibencilo, combinados con una cabeza catiónica de tipo quinolinio donde se modificó tanto la naturaleza, como la posición de sus sustituyentes (**Figura 2.12**).⁷⁴ El grupo quinolinio se eligió por ser análogo al fragmento de piridinio previamente empleado con éxito, para estudiar el efecto del aumento de lipofilia sobre la viabilidad celular.

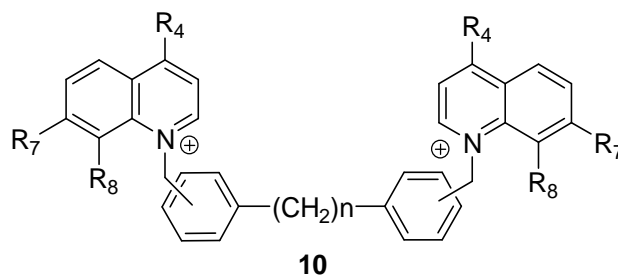


Figura 2.12. Estructura general de los compuestos derivados de quinolinio (**10**).

Las conclusiones que se extrajeron al final del proceso de evaluación biológica indicaban que la quinolina proporcionaba un incremento extra de lipofilia a la molécula, en comparación con la piridina, que mejoraba de forma notable la actividad antiproliferativa de los compuestos, como era predecible. Además, al igual que se había observado previamente para los derivados de piridina, la introducción de grupos electrón donantes en posición 4 en el anillo de quinolinio tenía una vez más, un efecto positivo en la inhibición de ChoK, por la razón previamente expuesta.

El compuesto más relevante de esta fase de investigación fue el **RSM-932A** (CI_{50} de 2.0 μ M frente a la enzima humana purificada),¹⁴ que carece de toxicidad en ratones cuando se utiliza una dosis que inhibe el crecimiento de tumores sólidos en un 77%. Actualmente ha alcanzado la fase I de ensayos clínicos (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01215864>) con el nombre de **TCD-717** (**Figura 2.13**)⁷⁵ e incluso está siendo utilizado en estudios para escalar a humanos la dosis máxima tolerada en ratones y poder así, pasar a ensayos de fase II.⁷⁶

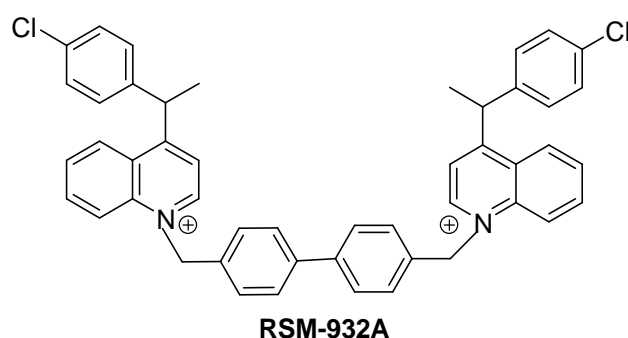


Figura 2.13. Compuesto **RSM-932A**.

2.1.6.2.1.2. Inhibidores triscatiónicos

La introducción de una tercera carga positiva en forma de una nueva cabeza catiónica (**Figura 2.14**), dio como resultado una mejor inhibición del enzima que se atribuyó a la interacción con un nuevo sitio o a una mayor probabilidad estadística de unión. Sin embargo, la actividad antiproliferativa disminuía notablemente debido a una disminución de la lipofilia que se traducía en una mayor dificultad para atravesar las membranas celulares.⁷⁷

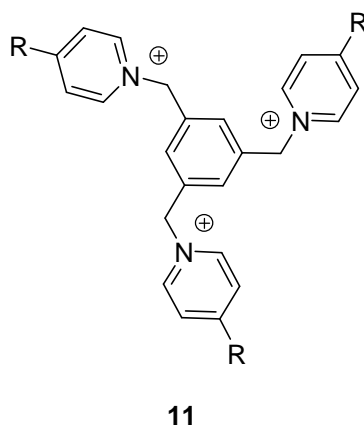


Figura 2.14. Estructura general de los compuestos triscatiónicos (**11**).

2.1.6.2.1.3. Inhibidores macrocíclicos (ciclofanos y bisciclofanos)

Como la totalidad de los derivados preparados con anterioridad eran estructuras abiertas flexibles, se diseñaron varias series de ciclofanos y bisciclofanos (**Figura 2.15**) para estudiar el efecto de la rigidez en la inhibición de la proteína y a nivel celular.⁷⁸

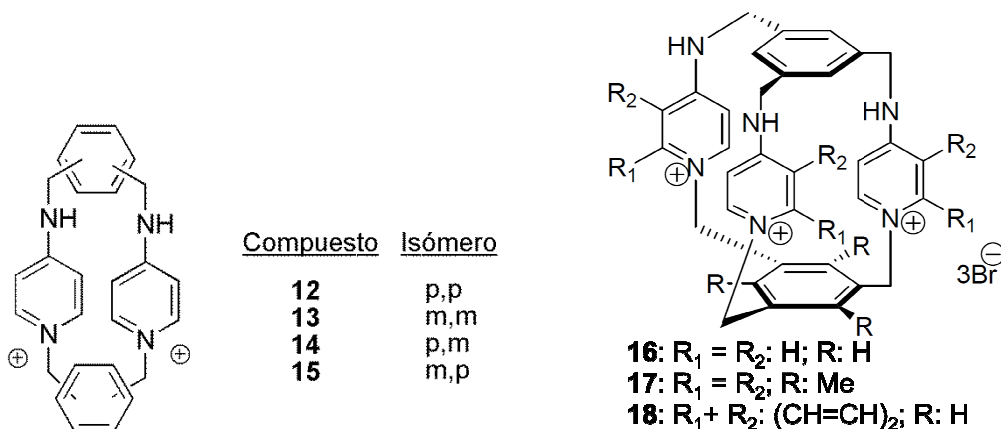


Figura 2.15. Estructura general de los ciclofanos (**12-15**) y bisciclofanos (**16-18**).

En este caso, los mejores datos de inhibición de la proteína y de actividad antiproliferativa fueron obtenidos para los compuestos que presentaban el anillo bencénico inferior disustituido en las posiciones 1,4.

Los compuestos de estructura bisciclofánica resultaron ser inactivos como inhibidores de *Hs*ChoK y como agentes antiproliferativos, debido a que la tercera carga positiva los convierte en demasiado polares.

2.1.6.2.1.4. Inhibidores bispiridínicos y bisquinolínicos acíclicos, y bispiridínicos cíclicos

Una de las aportaciones más reciente por nuestro grupo de investigación al arsenal de inhibidores de *HsChoK* se realizó en Junio del 2013 en forma de derivados de piridina o de quinolina simétricos biscatiónicos acíclicos y como ciclofanos bispiridínicos con espaciador alifático (**Figura 2.16**).⁷⁹

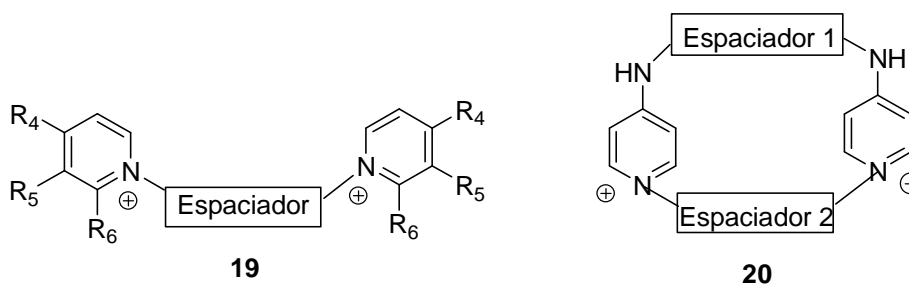


Figura 2.16. Estructura general de los compuestos acíclicos (**19**) y bispiridínicos cíclicos (**20**).

Los primeros, resultaron ser muy buenos inhibidores de *HsChoK α 2* mostrando un mecanismo de competencia mixto y unos valores de CI_{50} en el rango de 0.08-1.35 μ M. Además, presentaban muy buena actividad antiproliferativa frente las líneas celulares SKBR-3 y MCF-7 (EC_{50} = 1-10 μ M). Por su parte, los derivados cíclicos no mostraron actividad antiproliferativa.

No obstante, la aportación más interesante e innovadora de ambas familias de compuestos es su actividad leishmanicida frente a *Leishmania major* y *L.donovani*. En este caso, aunque la potencia de los compuestos bispiridínicos cíclicos era menor que la de los derivados abiertos, la toxicidad que presentaban frente a células de mamífero era menos acusada y por lo tanto, su margen de seguridad más amplio, que el de incluso la anfotericina B y la miltefosina. Estudios del mecanismo de acción de los dos representantes más activos de ambas familias (**VGP-106** y **VGP-318**) revelaron que los dos se acumulaban en la mitocondria de *Leishmania sp.*, produciendo una alteración del potencial de membrana y en consecuencia, una disfunción de la misma.

2.1.6.2.2. Diseño de inhibidores basados en la estructura 3D de *HsChoK α 1*

La publicación de la estructura cristalina de la isoforma *HsChoK α 1* tanto en su forma apo (sin sustrato) como holo (con sustrato), unida tanto a sus productos de

reacción como al **HC-3**, proporcionó una herramienta útil y eficaz para el diseño de nuevos inhibidores de *HsChoK α* . Hasta entonces, el diseño de inhibidores había estado basado en relaciones estructura-actividad de tal manera que se incluían en las nuevas moléculas, grupos que ya habían demostrado ser eficaces en etapas anteriores.

Las estructuras cristalinas evidenciaron la naturaleza de los sitios de unión del ATP y de la colina, lo cual permitió diseñar inhibidores dirigidos únicamente hacia un sitio o hacia los dos. Así, en los últimos cuatro años se han sintetizado derivados monocatiónicos de adenina con capacidad para unirse a los dos sitios activos y derivados bis- o monocatiónicos asimétricos que interaccionan exclusivamente con el sitio de la colina. Además, técnicas computacionales de cribado virtual (*Virtual screening*; VS) y de cribado farmacológico de alto rendimiento (*Highthroughput screening*; HTS) han proporcionado dos inhibidores de *HsChoK α 1* de estructura química diversa a todos los descritos con anterioridad a su fecha de publicación, que carecen incluso, de carga positiva fija.

2.1.6.2.2.1. Inhibidores monocatiónicos derivados de adenina y derivados biscatiónicos asimétricos

En esta reciente etapa del desarrollo racional de inhibidores de ChoK, se optó por introducir en la estructura química, un grupo de adenina que hiciera las veces del nucleótido presente en el ATP (**Figura 2.17**).⁸⁰

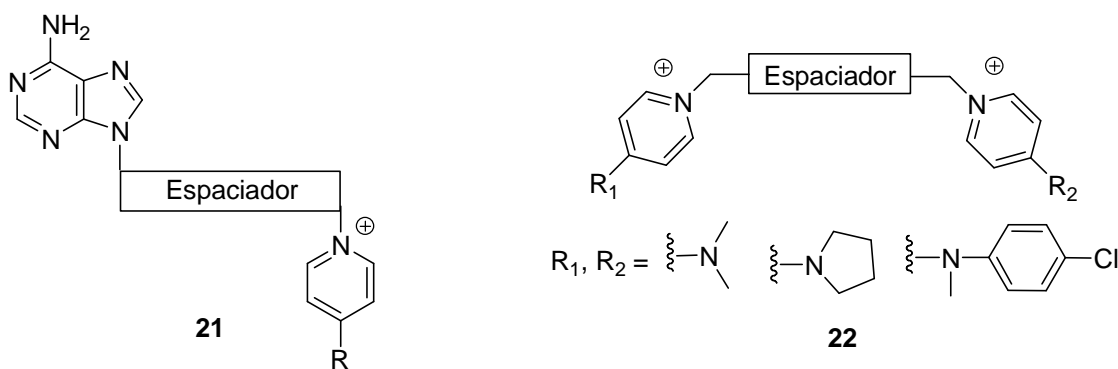


Figura 2.17. Estructura general de los derivados de adenina (**21**) y biscatiónicos asimétricos (**22**).

Sin embargo, la inhibición de la proteína y la actividad antiproliferativa que mostraban eran peores que las obtenidas con los derivados biscatiónicos asimétricos⁸¹. Este hecho junto con las evidencias cristalográficas obtenidas recientemente para el

compuesto **BR33** (compuesto **14**, PDB ID: **4CG8**), parecía indicar que la estrategia de diseño por la que se pretende ocupar también el sitio del ATP, aún no está lo suficientemente depurada como para mejorar la actividad biológica de los compuestos biscatiónicos (simétricos o asimétricos) dirigidos exclusivamente al sitio de la colina. Dicho de otro modo, la inhibición de *HsChoK α* con compuestos que se introduzcan sólo en el sitio de la colina (derivados biscatiónicos) es suficiente para inhibir de forma adecuada a la proteína.

2.1.6.2.2.2. Inhibidores monocatiónicos derivados de aminofenol y biscatiónicos simétricos derivados de 1,2-bis(*p*-metilfenoxi)etano

Su diseño, al igual que el de los derivados de adenina anteriores tenía por objeto ocupar el sitio de unión del ATP, pero esta vez con grupos aminofenol y afines que habían demostrado mimetizar al resto de adenina del ATP en estudios preliminares de docking. Además de estos grupos, también se incluyeron en su estructura los restos de quinuclidina, dimetilaminopiridina y pirrolidinopiridina para conseguir unión con el bolsillo hidrofóbico de la colina (**Figura 2.18**).⁸¹

Otro grupo interesante de compuestos es el constituido por derivados biscatiónicos simétricos del grupo funcional 1,2-bis(*p*-metilfenoxi)etano, donde se utilizaron como cabezas catiónicas restos de quinuclidina, quinuclidinol, dimetilaminopiridina y quinolina. El aspecto más destacable en el diseño de estos inhibidores fue la introducción de oxígeno por primera vez en los espaciadores con un doble objetivo. Por un lado, aumentar el carácter polar de los compuestos y por tanto, su solubilidad sin modificar partes de la molécula fundamentales para su unión al enzima, y por otro lado, dotar a tales compuestos de donadores de puentes de hidrógeno para mejorar el perfil de interacciones con la proteína (**Figura 2.18**).⁸¹

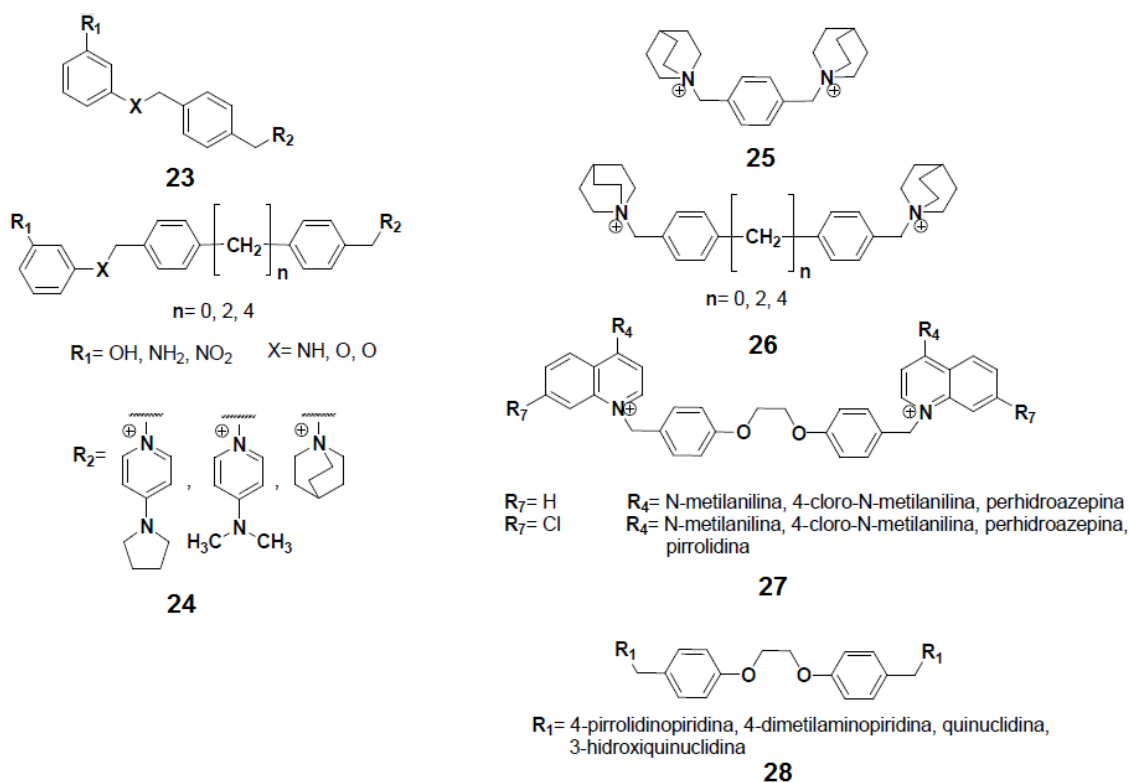


Figura 2.18. Derivados de aminofenol (23-24) y compuestos biscatiónicos simétricos (25-28).

Los estudios biológicos evidenciaron una vez más, la idoneidad del espaciador bifenílico y de los restos de dimetilaminopiridina o quinolina para conseguir unos buenos resultados de inhibición de ChoK y de actividad antiproliferativa. Por su parte, los estudios computacionales de unión al enzima (docking) mostraron que todos los compuestos de estas series, se unían al sitio de la colina, y en concreto los derivados biscatiónicos simétricos derivados de quinolina adoptaban una conformación sinclinal gracias al efecto gauche de los oxígenos sobre el esqueleto O-C-C-O del espaciador.

2.1.6.2.2.3. Inhibidores biscatiónicos simétricos derivados de 2,2'-bipiridina

Una vez más, la estructura cristalina de la *Hs*ChoK α 1 fue utilizada por nuestro grupo de investigación para el diseño de un nuevo grupo de inhibidores derivados del compuesto **RSM-932A**. Esta vez, los estudios preliminares de docking mostraron que el espaciador de tipo bipiridina podría resultar más favorable para conseguir una unión de gran afinidad al enzima puesto que se observó la formación de puentes de hidrógeno entre los pares electrónicos libres de los nitrógenos de los ligandos y ciertos residuos del sitio activo. En consecuencia, se realizó un cambio bioisostérico de los carbonos en posiciones 2 y 2' del bifenilo por dos átomos de nitrógeno, para conseguir además

aumentar la solubilidad de las moléculas (**Figura 2.19**). Los resultados biológicos mostraron que a pesar de los puentes de hidrógeno formados, la inhibición de la proteína no se mejoró con respecto al compuesto **RSM-932A**, pero sí la actividad antiproliferativa frente a dos líneas celulares (HL-60 y HT-29) y el perfil de seguridad frente a células sanas.

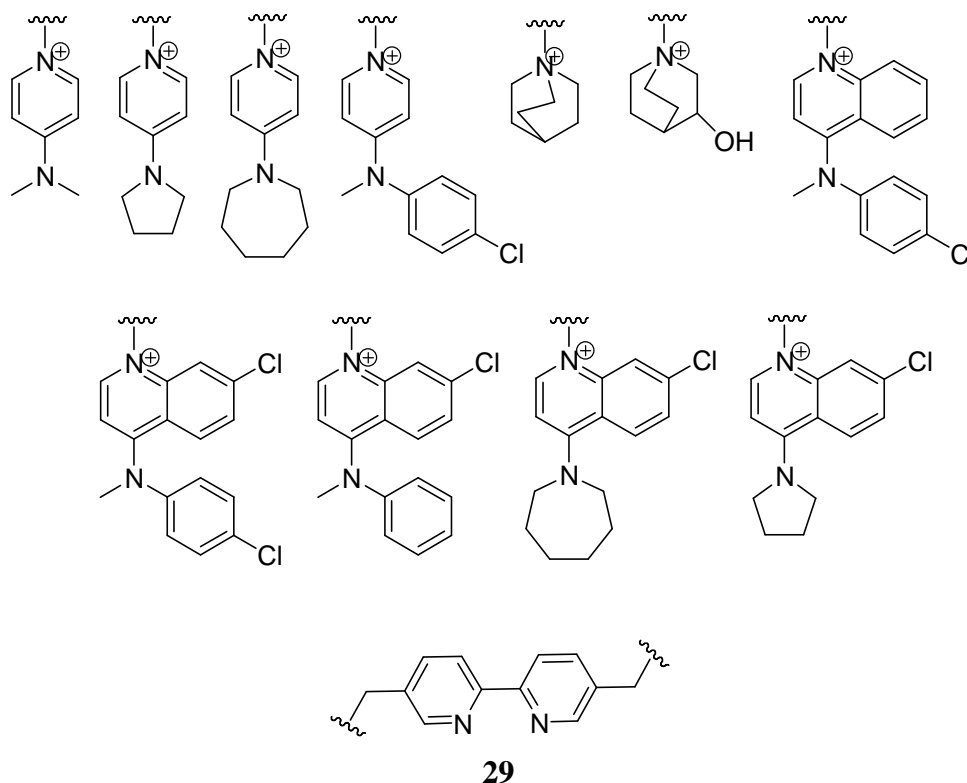


Figura 2.19. Derivados de 2,2'-bipiridina (**29**).

2.1.6.2.2.4. Cribado virtual y cribado de alto rendimiento

Los compuestos **CK37** y **V-11-023907** (**Figura 2.20**), además de haber sido descubiertos en el 2012 y 2013 respectivamente, haciendo uso de técnicas computacionales, presentan otras peculiaridades con respecto a los inhibidores tradicionalmente diseñados por nuestro grupo de investigación. Su naturaleza química es totalmente diversa debido a su reducido tamaño (que junto con una buena actividad, los hace ser mucho más eficientes), a la carencia de carga positiva permanente y a la inclusión en su estructura de grupos funcionales nunca antes utilizados en inhibidores de *HsChoK*.

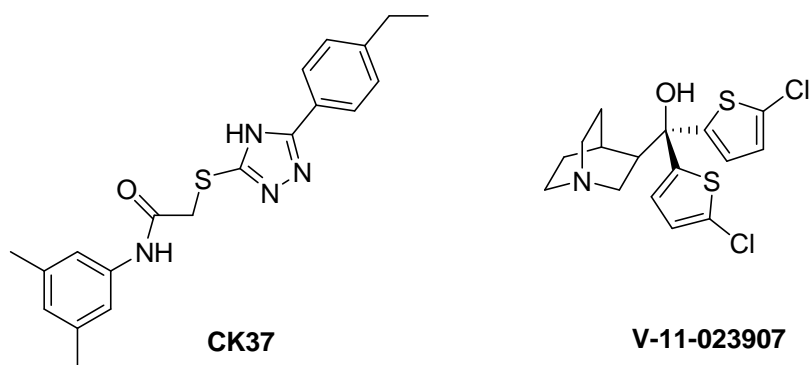


Figura 2.20. Inhibidores de *HsChoK* descubiertos con técnicas computacionales.

En el caso del compuesto **CK37**,⁴² además de ser inhibidor competitivo para la colina (50% inhibición de *HsChoK α* a 10 μ M; 67% inhibición de la proliferación de HeLa a 10 μ M), suprime la cascada de señalización de MAPK y de PI3K/AKT, desorganiza el citoesqueleto de actina y reduce el plegamiento de la membrana plasmática. Además, **CK37** bloquea de forma notable el crecimiento de tumores de pulmón en ratones por disminuir los niveles de fosfocolina y afecta a la fosforilación de ERK y AKT *in vivo*.

Por su parte, el compuesto **V-11-023907**²⁷ presenta como principal característica la formación de un puente de hidrógeno con el Asp306 que contribuye a bloquear la acción de dicho residuo, impidiéndose su ataque nucleofílico al fosfato γ - del ATP. Por este motivo, este compuesto se comporta como inhibidor de *HsChoK α* (CI₅₀ frente a la proteína: 0.47 μ M), pero a pesar de unirse al sitio de la colina, no compete por dicho sustrato. La explicación a este hecho se basa en el mecanismo de acción de tipo ping-pong propuesto en el mismo trabajo y se postula que **V-11-023907** se une exclusivamente a la forma no fosforilada del enzima y no al intermedio fosforilado al que se une la colina.

2.1.6.2.3. Conclusiones

En definitiva, los inhibidores más potentes de todos los descritos previamente, contienen dos cabezas catiónicas derivadas del piridinio que están conectadas entre sí mediante un espaciador de naturaleza hidrofóbica, como en el caso del **HC-3**. En general, todos sus análogos tienen una estructura más extendida que él mismo y relaciones de estructura química-actividad han mostrado que la potencia inhibitoria de

HsChoK se correlaciona bien tanto con la carga positiva del anillo nitrogenado, como con el tamaño del espaciador hidrofóbico.

2.1.6.3. Estructuras cristalinas de ChoK

Desde el año 2006 se han publicado una gran cantidad de estructuras cristalinas de ChoK en diversas especies de organismos, no sólo en humanos (*HsChoK*) sino también en *Caenorhabditis elegans* y las de sus homólogos en *P.knowlesi*, *P.falciparum* y *C. parvum* (**Figura 2.21**). No obstante, es la estructura de la ChoK humana la que más veces ha sido resuelta tanto en su forma apo como holo, dadas sus implicaciones en cáncer. Dichas evidencias cristalográficas proporcionan una gran cantidad de información tridimensional a nivel estructural del sitio activo que sin duda alguna, facilita el diseño de nuevos inhibidores.

La primera vez que se observó la estructura tridimensional de ChoK fue en el año 2003, cuando Peisach y col. consiguieron cristalizar la ChoK de *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*, PDB ID: **1NW1**),⁸² la cual mostraba un 42% de identidad con la isoforma *HsChoK α 2*. Con anterioridad a esta fecha, tan sólo se tenía información de las regiones conservadas con proteínas afines de la familia de las proteínas quinasas. Se habían identificado en su secuencia los aminoácidos conservados que conformaban los motivos Brenner y colina quinasa, cuya función había sido previamente descrita en las quinasas y en las aminoglicósido fosfotransferasas.²⁸ De este modo ya se conocía que ambos motivos participaban en la fosforilación y en la unión de un sustrato específico (en este caso la colina), respectivamente. Además, los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la ChoK en distintas especies y con ciertas quinasas, habían evidenciado residuos altamente conservados a los que se le asignó una hipotética participación en: a) la unión de los sustratos al sitio activo; b) en la catálisis; c) en la estabilización de una conformación catalíticamente activa de otros residuos implicados en la catálisis.⁸² No obstante, no se tenía información sobre cómo ni dónde podrían estar situados en la estructura tridimensional no sólo los motivos Brenner y colina, sino también los residuos conservados.

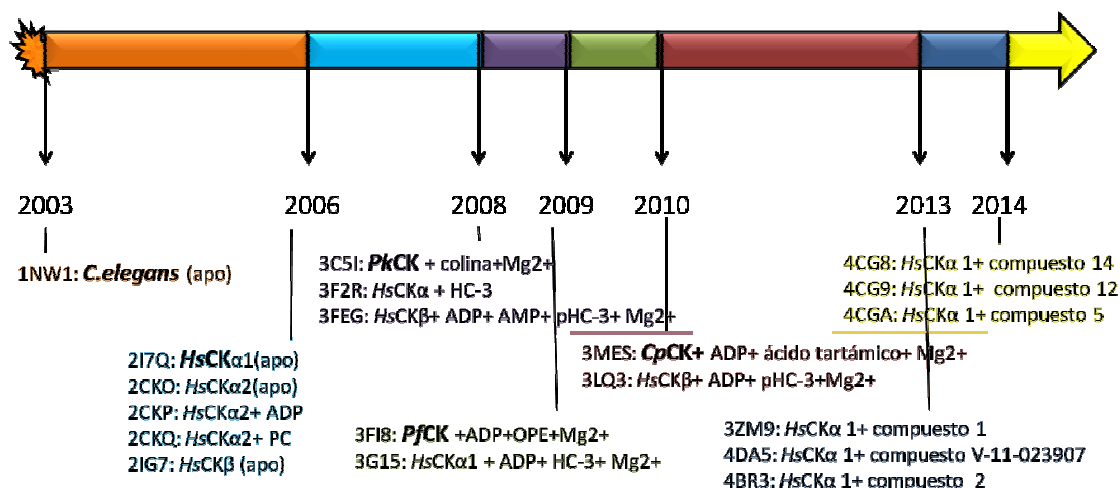


Figura 2.21. Cronograma de las aportaciones cristalográficas para **ChoK** (apo y holo) tanto en humanos, como en otras especies de parásitos (**PkCK**: *Plasmodium knowlesi*, **PfCK**: *Plasmodium falciparum*, **CpCK**: *Cryptosporidium parvum*).

Tras la resolución del patrón de rayos X de la ChoK de *C.elegans*, se dio respuesta a todas estas dudas y además, se vio que el plegamiento que presentaba dicha enzima era típico de las quinasas. Así, se describió por primera vez el carácter oligomérico de ChoK, los dominios N- y C-terminal, se localizaron los hipotéticos sitios de unión del ATP y de la colina y se describió la interfaz entre monómeros⁸² (**Figura 2.22**).

Se vio que la interfaz estaba compuesta principalmente por dos α -hélices idénticas pertenecientes cada una a un monómero que se disponían en paralelo y cuya unión estaba mediada principalmente por interacciones de tipo hidrofóbico entre residuos de la misma naturaleza y por unos pocos puentes salinos que se establecían entre glutamatos y argininas.

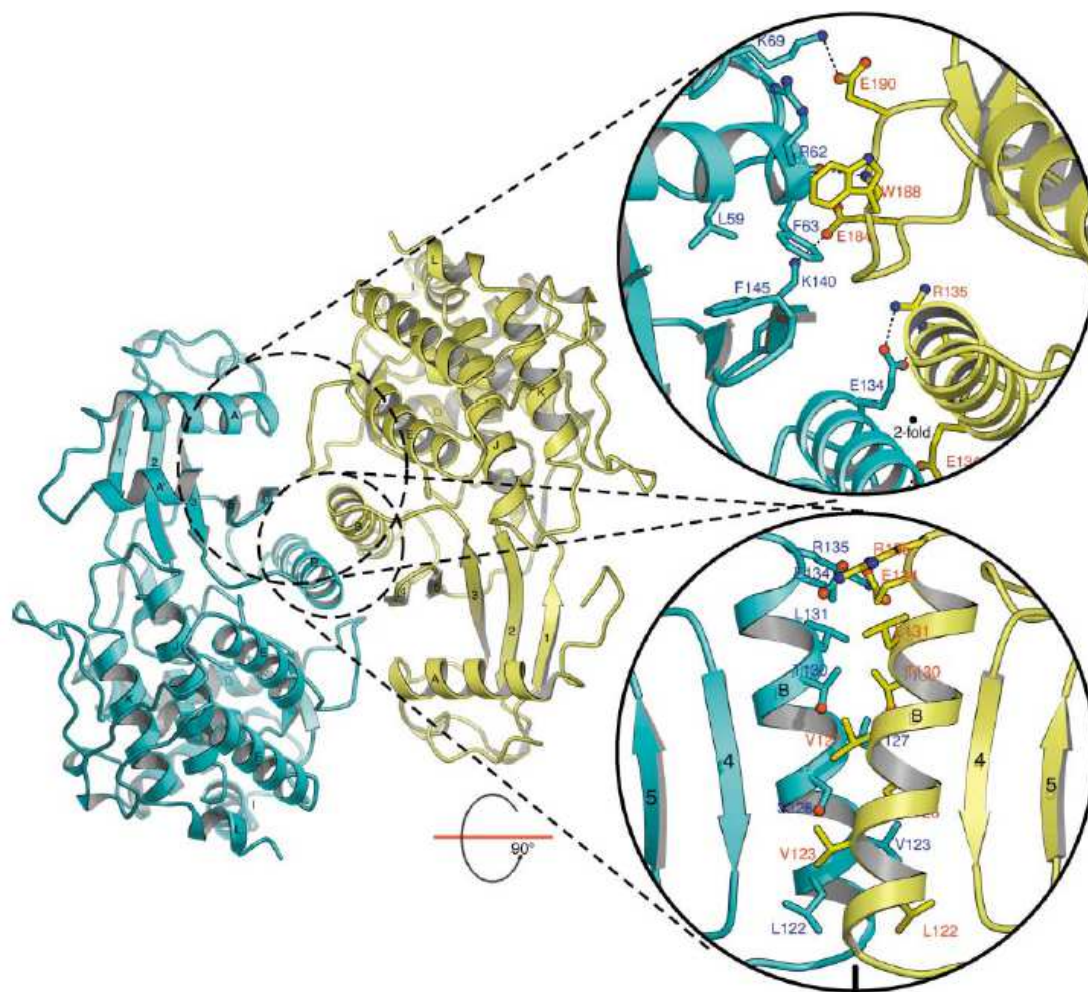


Figura 2.22. Estructura cristalina de *C.elegans* (PDB ID: 1NW1) con detalle de la interfaz entre los dos monómeros.⁸²

Un año más tarde de la cristalización de ChoK en *C.elegans*, se realizaron estudios de mutagénesis en la misma proteína con el objetivo de identificar residuos críticos para su actividad catalítica a nivel del sitio del ATP y de la colina.⁸³

2.1.6.3.1. Estructuras cristalinas de *HsChoK α*

Usando las coordenadas de la ChoK proporcionadas por el cristal de *C.elegans* y las del ATP, Mg²⁺ y colina presentes en los cristales de otras quinasas, nuestro grupo de investigación construyó en el año 2006 un modelo de homología de la ChoK humana con el objetivo de identificar mediante dinámica molecular (MD) los residuos que participaban en la estabilización del ATP, del Mg²⁺ y de la colina.⁸⁴ Los resultados obtenidos en la MD mostraban que las interacciones más estables entre los sustratos y el enzima se establecían a través de los residuos que producían pérdida de actividad de la

ChoK cuando se mutaban en *C.elegans*. De este modo se postuló que la localización de los sitios de unión del ATP y de la colina en humanos era la misma que en el cristal de *C.elegans*.

Será en este mismo año cuando empiezan a surgir los primeros cristales de las isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β de la *HsChoK*, tanto en su forma apo como holo. Así, actualmente nos encontramos cristales de la *HsChoK* donde la proteína aparece en complejo con sus productos de reacción (sin llegar a haberse obtenido nunca un complejo ternario) o con diversos inhibidores, como el **HC-3** o derivados, u otros recientemente descubiertos por técnicas de cribado de alto rendimiento (HTS).

2.1.6.3.1.1. *HsChoK* apo: isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β

A finales del año 2006, Malito y col. por un lado y el Consorcio de Genómica Estructural (*Structural Genomics Consortium*) por otro, depositaron en la Base de Datos de Proteínas (*Protein Data Bank*; PDB) las estructuras cristalinas de todas las isoformas apo de *HsChoK* (*HsChoK* $\alpha 1$, PDB ID: **2I7Q**; *HsChoK* $\alpha 2$, PDB ID: **2CKO**,²⁶ y *HsChoK* β , PDB ID: **2IG7**). En todos estos cristales, excepto en el de la *HsChoK* $\alpha 1$, la proteína aparecía como homodímeros. Además, se observó que las diferencias estructurales más importantes con respecto a la forma apo de la ChoK de *C.elegans* afectaban a residuos que no eran importantes desde el punto de vista catalítico. Por tanto, en todas ellas se observaban nuevamente los dominios N- y C-terminal típicos de las quinasas, los motivos Brenner y colina y por primera vez, pudo determinarse la composición en α -hélices y láminas β de una ChoK humana. No obstante, las diferencias encontradas en 2004 por Aoyama y col. a nivel de la secuencia de aminoácidos de las tres isoformas,²⁹ no pudieron ser observadas en estos cristales debido a que su gran movilidad imposibilitó obtener sus mapas de densidad. Dichas diferencias hacían referencia al número de aminoácidos constitutivos de cada isoforma, de tal manera que ya se había establecido que la *HsChoK* $\alpha 1$ se diferenciaba de la *HsChoK* $\alpha 2$ únicamente en un conjunto de 18 aminoácidos. Esta pequeña secuencia comenzaba en la posición 155 de la isoforma *HsChoK* $\alpha 1$ y era el motivo por el cual ésta se componía de 457 residuos, mientras que la *HsChoK* $\alpha 2$ presentaba 439. Además, también se sabía que la *HsChoK* β difería de las dos isoformas anteriores en un 40% de su secuencia y que estaba constituida por 395 aminoácidos.

Por tanto, no fue hasta la publicación de la estructura cristalina de la isoforma *HsChoK* $\alpha 2$ en complejo con ADP y colina cuando se obtendrían nuevos datos relativos

a los verdaderos sitios de unión de ambos sustratos. Esto permitió estudiar los aminoácidos constitutivos del sitio activo y validó el modelo de homología publicado unos meses antes por nuestro grupo de investigación.

2.1.6.3.1.2. *HsChoKa2*-holo: con sus productos de reacción (ADP y PCho)

Las estructuras cristalinas de la isoforma *HsChoKa2* en complejo con sus productos de reacción ADP (PDB ID: **2CKP**)²⁶ y PCho (PDB ID: **2CKQ**)²⁶ revelaron detalles estructurales sobre los sitios de unión de los sustratos (**Figura 2.23**). Por primera vez se tuvo evidencia inequívoca de que el ATP se unía a una cavidad localizada en la conjunción de los dominios *N*- y *C*- terminal, mientras que la colina lo hacía en un bolsillo constituido por aminoácidos de carácter hidrofóbico (Tyr333, Tyr354, Trp420, Trp423, Tyr440) circundado por residuos cargados negativamente (Glu215, 217, 218, 309, 349, 357, 434 y Asp353) en el dominio *C*-terminal.

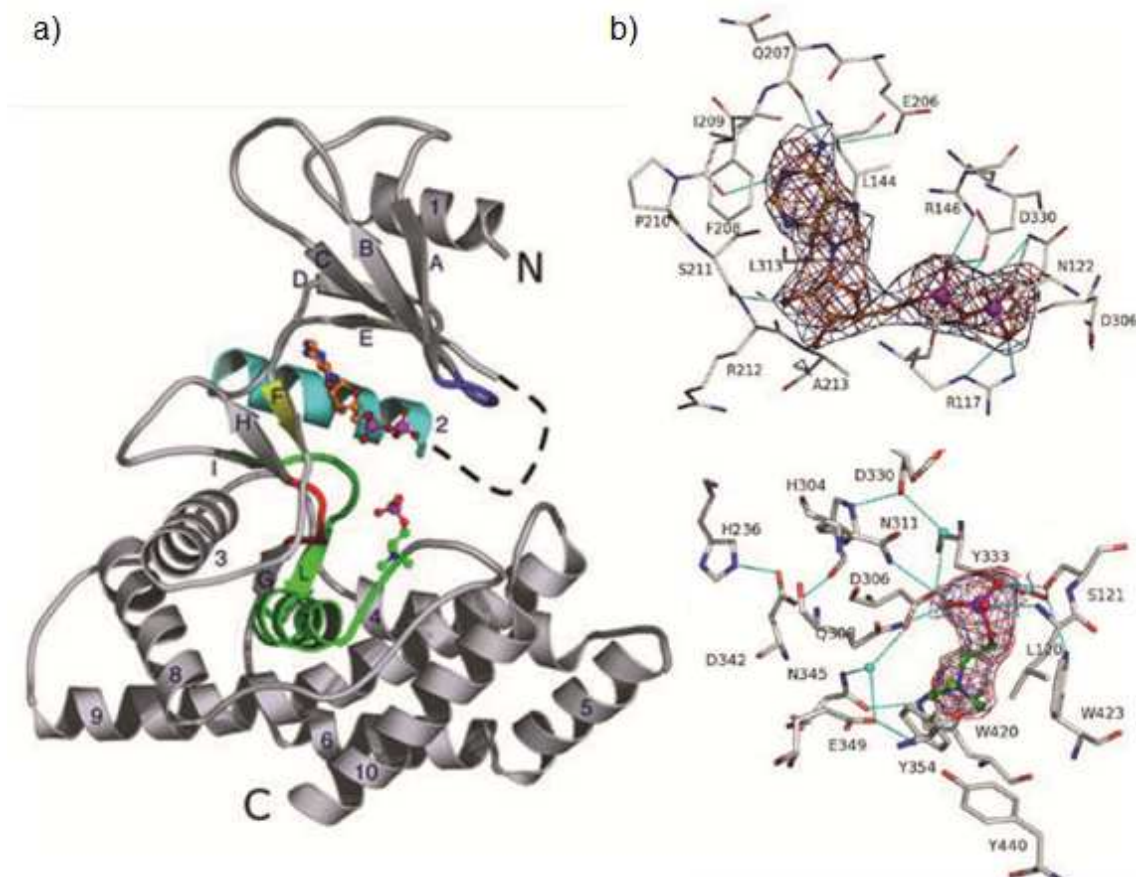


Figura 2.23. a) Superposición de las estructuras cristalinas de *HsChoKa2* en complejo con ADP (PDB ID: **2CKP**) y PCho (PDB ID: **2CKQ**). b) Residuos constitutivos de los sitios de unión de ambos sustratos.²⁶

Fue entonces cuando se describieron por primera vez los residuos más relevantes que participan tanto en el correcto posicionamiento de los sustratos, como en la reacción catalítica. Así, se observó que el resto de adenina del ADP o ATP se estabiliza mediante puentes de hidrógeno (formados con los residuos Glu206, Gln207 e Ile209), interacciones hidrofóbicas (Leu144 y Leu313) e interacciones de tipo π - π (con la Phe208). Por su parte, el resto de ribosa también interacciona con el sitio activo mediante enlaces de hidrógeno (Ser211 y Arg213) e interacciones hidrofóbicas (Leu124 y Leu313). Por último, los grupos fosfato son reconocidos por la enzima principalmente mediante puentes de hidrógeno (con los residuos Arg117, Asn122 y Arg146) y enlaces metálicos donde se coordinan a dos moléculas de Mg^{2+} (Asp330).

En el caso del sitio de la colina, dado que la mayoría de los residuos que lo forman tienen carácter aromático, se establecen mayoritariamente interacciones de tipo π -catión con la carga positiva del grupo trimetilamonio del sustrato. El grupo fosfato de la PCho se encuentra orientado hacia el ADP y forma enlaces de hidrógeno con ciertos residuos que lo anclan en este bolsillo hidrofóbico (Leu120, Ser121, Gln308 y Asn311). Dentro del sitio de la colina, en 2006 Konrad y su grupo de investigación presentaron al residuo Asp306 como potencial base catalítica.²⁶ Esta función ha sido nuevamente confirmada en 2013 por Pollard y col.²⁷ en el mecanismo catalítico de ping-pong que han propuesto.

Según los estudios de mutagénesis llevados a cabo en la ChoK de *C.elegans* por Kent y col. en 2004,⁸³ únicamente se produce pérdida total de la actividad catalítica cuando los residuos Asp330, Trp420 o Asp306 son mutados, debiendo de ser por tanto, especialmente relevantes durante la catálisis enzimática.

Además, tras superposición de la forma apo con la holo unida a PCho pudo observarse un cambio conformacional que afectaba al dominio *N*-terminal y por el que se producía una aproximación de 10 Å del mismo hacia el dominio *C*-terminal (**Figura 2.24**). Dicho desplazamiento sólo ocurría para cerrar el sitio activo tras la unión de la PCho, motivo por el que se postuló su relevancia en el proceso catalítico. De esta forma, los sustratos accederían al sitio activo en una conformación abierta del dominio *N*-terminal, y una vez dentro, dicho dominio permanecería cerrado mientras estuviese desarrollándose la catálisis. Este cambio conformacional representa una modificación postraduccional y también se observa en la superfamilia de las quinasas. En la mayoría de ellas, se ha identificado una apertura del lóbulo de activación tras la fosforilación de

uno de sus aminoácidos que aumenta la actividad catalítica de la proteína en más de 3 veces, puesto que se facilita el acceso del sustrato al sitio activo.

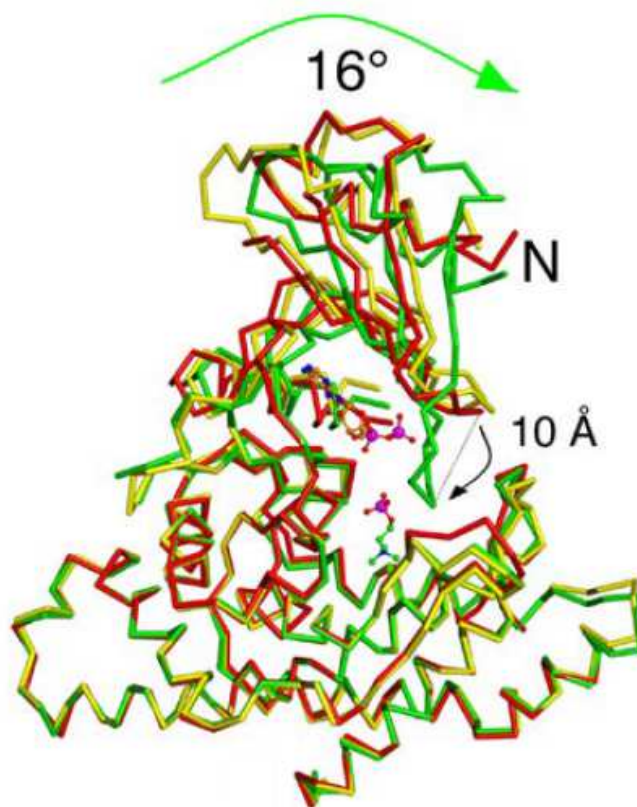


Figura 2.24. Superposición de la forma apo (PDB ID: 2CKO) con la holo unida a PCho (PDB ID: 2CKQ) donde se observa el cierre del dominio *N*-terminal tras unión de la PCho.²⁶

2.1.6.3.1.3. *HsChoK* α , β -holo: con inhibidores (HC-3)

Una vez descritos los residuos que participaban en la estabilización de los productos de la reacción catalítica en los sitios de unión del ATP y de la colina, posteriormente se consiguió cristalizar la *HsChoK* con su primer inhibidor, el **HC-3** (**Figura 2.25**). Esto se consiguió entre los años 2008 y 2010 no sólo con la isoforma *HsChoK* α 1 (PDB ID: **3G15**),⁸⁵ sino también con la *HsChoK* β (PDB ID: **3LQ3** ó **3FEG**).⁸⁵

El estudio comparativo de ambos cristales, aportó nuevos datos sobre la enzima y al diferente comportamiento de ambas isoformas frente a un mismo ligando. Así, se observó que en ambas estructuras, el **HC-3** se unía al bolsillo hidrofóbico del dominio *C*-terminal. Uno de sus anillos de oxazonio ocupaba el mismo sitio de unión que la PCho, proporcionando una explicación a su acción inhibitoria, mientras que el otro por el contrario, estaba parcialmente expuesto al disolvente (**Figura 2.25.a**).

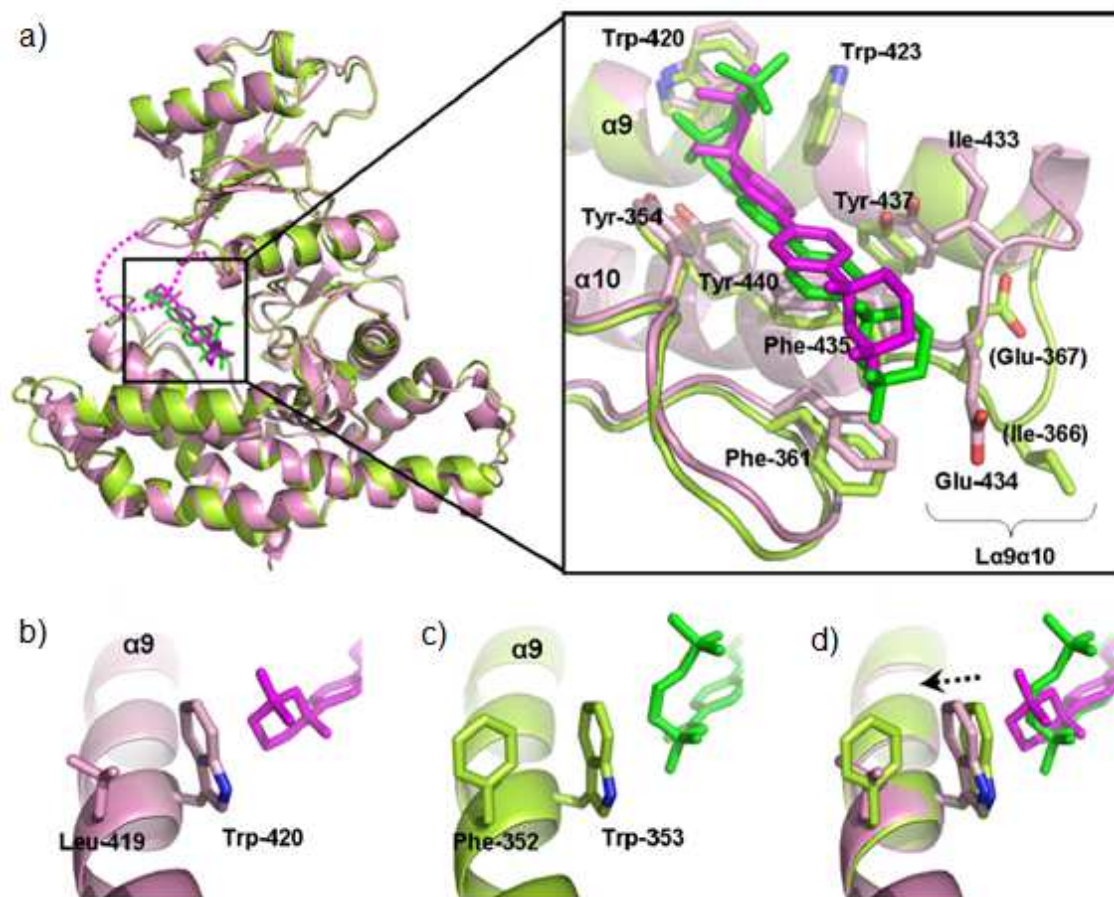


Figura 2.25. a) Superposición de la isoforma *HsChoK α 1* co-cristalizada con **HC-3** (mostrada en verde, PDB ID: 3G15) y de la *HsChoK β* en complejo con **P-HC-3** (mostrada en rosa, PDB ID: 3LQ3 ó 3FEG). b) Sitio de la colina en *HsChoK α 1*. d) Sitio de la colina en *HsChoK β* . d) Superposición de los sitios de la colina en ambas isoformas.⁸⁵

Sorprendentemente, la molécula de **HC-3** co-cristalizada con *HsChoK β* se fosforiló durante el proceso de cristalización (**Figura 2.25.a**), sugiriendo que ambas isoformas tienen distinta capacidad catalítica. A esta observación junto con al hecho de la mayor potencia como inhibidor del **HC-3** en las isoformas *HsChoK α 1* y *HsChoK α 2* que en *HsChoK β* , se le pudo dar una explicación basada en estudios de mutagénesis. Así, se demostró que el sitio de unión de la colina presenta una mayor flexibilidad en las isoformas α debido a la existencia de una leucina (Leu401 en $\alpha 1$ ó Leu419 en $\alpha 2$), que se corresponde con fenilalanina (Phe352) en el caso de la isoforma β (**Figuras 2.25.b** y **2.25.c**). Dicha leucina permite el desplazamiento hacia atrás del Trp420 (numeración de la isoforma $\alpha 1$) para acomodar al **HC-3**, motivo que justifica la mayor afinidad de **HC-3** por las isoformas α . Por otra parte, se indicó que la fosforilación del **HC-3** en la isoforma β estaba debida a una interacción más débil del anillo de oxazonio con los

residuos del bolsillo hidrofóbico de la colina. La causa de dicha evidencia radicaba no sólo en la menor flexibilidad del sitio de la colina, sino también en la conformación abierta que el loop localizado entre las α -hélices 9 y 10 ($L\alpha 9\alpha 10$, **Figura 2.25.a**) adoptaba en la isoforma *HsChoK β* , siendo responsable de la interrupción de las fuerzas de van der Waals entre el inhibidor y los residuos Ile433 y Glu434. De este modo, se favorecería un equilibrio entre las formas de hemiacetal (cíclico) e hidroxicetona (abierto) del **HC-3** que dejaría accesibles grupos hidroxilo para el ataque nucleofílico del Asp242 de la isoforma *HsChoK β* , que es el residuo propuesto como posible base catalítica (Asp306 en *HsChoK α 1*).

2.1.6.3.1.4. *HsChoK α 1*-holo: inhibidores derivados del **HC-3** o de diversa naturaleza química

Como a continuación se muestra, durante los años 2013 y 2014, la isoforma *HsChoK α 1* ha sido cristalizada con diversos inhibidores; todos excepto uno, sintetizados por nuestro grupo de investigación. Dichas moléculas muestran una amplia diversidad estructural, siendo algunas de ellas, derivadas del **HC-3**.

2.1.6.3.1.4.1. Derivados del **HC-3**: compuestos 1, 2 y 14

Sin duda alguna, una de las aportaciones cristalográficas más relevantes que se ha producido en relación a la *HsChoK α 1*, se hizo en el año 2013 con un inhibidor diseñado racionalmente por nuestro grupo de investigación (PDB ID: **3ZM9**).⁸⁰ Dicho inhibidor, conocido como compuesto **1 (BR-7)**,⁸⁶ ocupaba tanto el sitio del ATP mediante un resto de adenina, como el de la colina a través de un resto de dimetilaminopiridina conectado a la adenina por un espaciador flexible (**Figura 2.26.a**), explicándose así su gran afinidad por la enzima. Los estudios de dinámica molecular (MD) y “Elastic Network Model”⁸⁷ que se realizaron, indicaron que ChoK era capaz de experimentar fenómenos de alosterismo con cooperatividad negativa y asimetría entre sus dos monómeros. Esto implicaba por una parte que la unión del inhibidor al primer monómero del enzima, inducía un cambio conformacional desde la interfaz hasta el sitio activo del segundo monómero (sobre todo al del ATP) por el que se producía una unión de menor afinidad del inhibidor, en relación a su unión al primero. Además, implicaba la existencia de tres posibles estados conformacionales (abierto/semiabierto, cerrado, supercerrado)

rápida e interconvertibles entre sí que se diferenciaban en el tamaño del sitio activo (Figura 2.26.b).

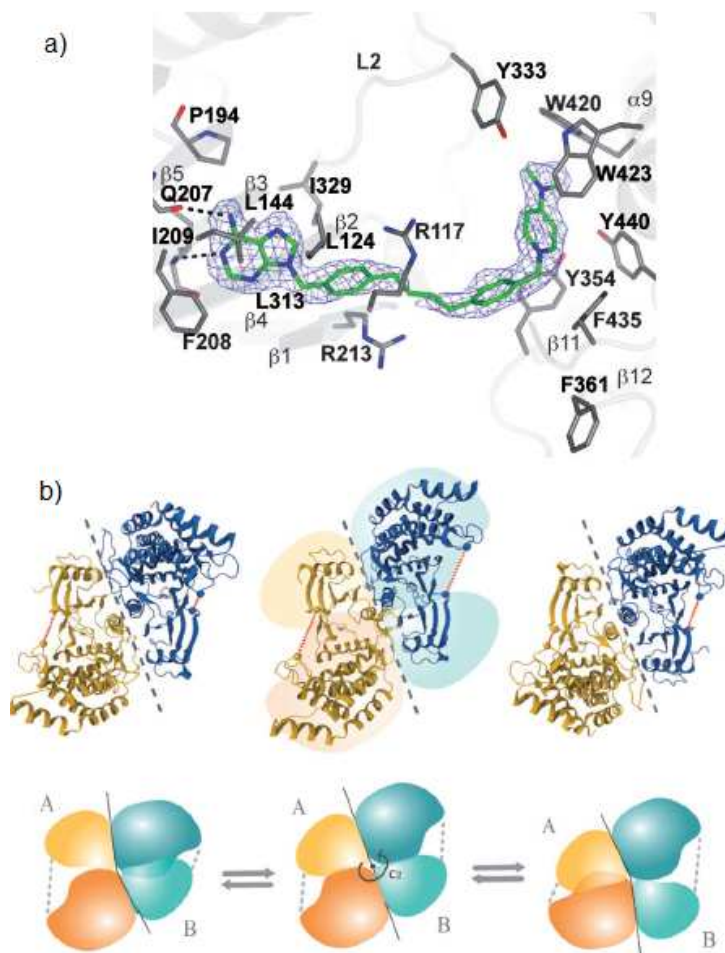


Figura 2.26. a) Modo de unión del compuesto **1**. b) Estados abierto-cerrado, semiabierto-semiabierto y cerrado-abierto que muestran la asimetría de los dos monómeros.⁸⁰

En consecuencia, la causa del debilitamiento de las interacciones del inhibidor con el segundo monómero era una apertura del sitio activo a nivel del ATP que aumentaba la distancia de los puentes de hidrógeno con los residuos Glu207 e Ile209, lo cual se veía reflejado en un peor valor de constante de asociación.

En definitiva, en presencia del compuesto **1** coexistían los estados conformacionales asimétricos de los dos monómeros (por ejemplo, abierto/cerrado), y este era el motivo por el que el inhibidor presentaba diferente afinidad por cada uno de ellos. A su vez, dichos estados eran inducidos por los profundos cambios conformacionales que tenían que producirse en el primer monómero para albergar al compuesto **1**.

Después de esta estructura cristalina, se han publicado cuatro cristales de compuestos diseñados y sintetizados por nuestro grupo de investigación que han permitido por una parte, dilucidar por primera vez los grupos funcionales que podrían ser más relevantes en el diseño de nuevos inhibidores (PDB ID: **4BR3**)⁸⁸ y por otra, proponer un nuevo sitio de unión localizado en el bolsillo hidrofóbico de la colina (PDB IDs: **4CG8**, **4CG9**, **4CGA**).⁸⁹

De este modo, en el primer caso, se mostró por primera vez al compuesto **2** (**BR-3**)⁸⁶ y se evidenció el modo de unión de los fragmentos de adenina y 1-bencil-4-(dimetilamino)piridinio, que según los resultados aportados por calorimetría isotérmica de titulación (ITC), eran los que presentaban una unión más eficiente a la isoforma *HsChoK α 1*. En relación a la propia enzima, las estructuras cristalográficas presentadas en este estudio demostraron una gran flexibilidad a nivel del sitio de la colina por la notable rotación que experimentaban los residuos Tyr333 y Trp420 para permitir la unión de los ligandos (**Figura 2.27**).

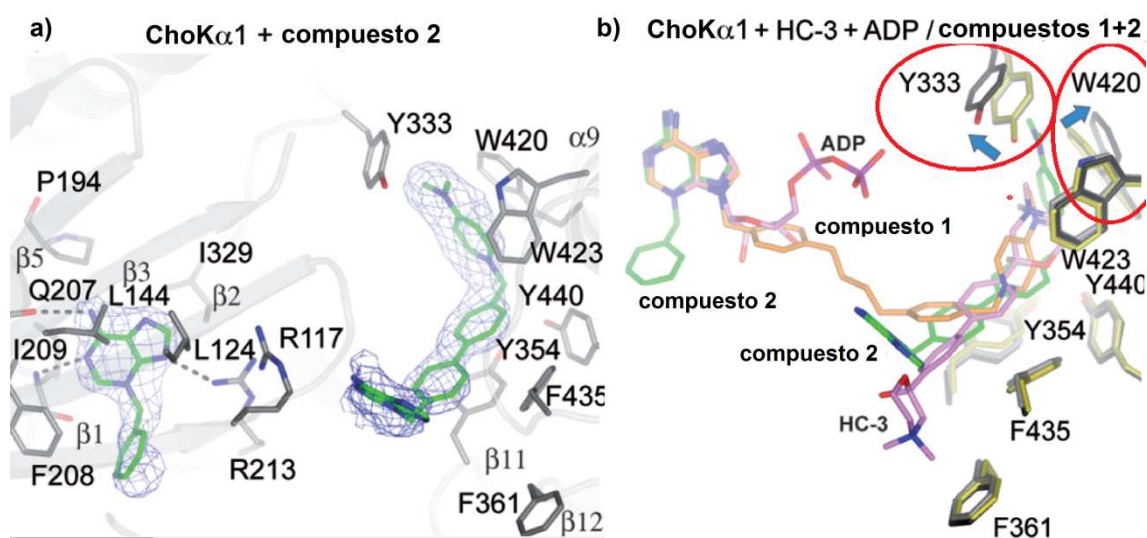


Figura 2.27. a) Modo de unión del compuesto 2. b) Cambios conformacionales de los residuos Tyr333 y Trp420 tras unión del compuesto 2.⁸⁸

El compuesto que permitió dilucidar un nuevo sitio de unión dentro del sitio activo de la colina, fue el compuesto **14** (**BR-33**,⁸⁶ PDB ID: 4CG8).⁸⁹ Dicho sitio estaba formado por los residuos Trp248, Thr252, Tyr256, Tyr333, Leu419, Trp420 y Trp423 (**Figuras 2.28.a** y **2.28.c**), la mayoría de los cuales experimentaban una notable rotación para

permitir el acceso del compuesto **14** (**Figura 2.28.b**). De todas estas rotaciones, resultaban críticas las de la Tyr333 (20°), la de la Tyr256 (90°) y la del Trp420 (45°-62°), evidenciándose nuevamente que la flexibilidad del sitio de la colina era debida en gran parte a la gran facilidad para rotar de estos residuos.

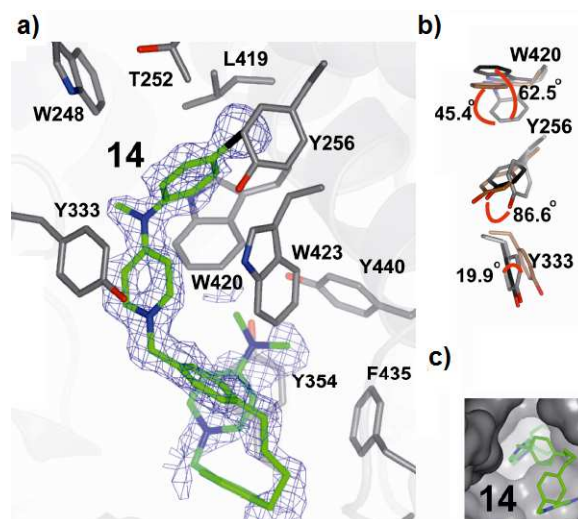


Figura 2.28. a) Conformación torcida adoptada por el compuesto **14** en el sitio de la colina de *HsChoKa1*. b) Rotación de los residuos para albergar al compuesto **14**. c) Nuevo subsitio que se abre en el sitio de la colina tras unión del compuesto **14**.⁸⁹

Ésta no ha sido la única ocasión en la que se han descrito nuevos subsitios de unión dentro de los sitios activos principales ya que en 2009 P.Srivani y col.⁹⁰ estudiaron computacionalmente el modo de unión de 39 inhibidores biscatiónicos simétricos. Observaron que una de las dos cabezas catiónicas se insertaba profundamente en el bolsillo hidrofóbico, mientras que la segunda ocupaba otra posición dentro del sitio de la Cho en función de la naturaleza del espaciador. De este modo, describieron 3 posibles formas de unión y por tanto, 3 subsitios dentro del sitio de la Cho (**Figura 2.29**).

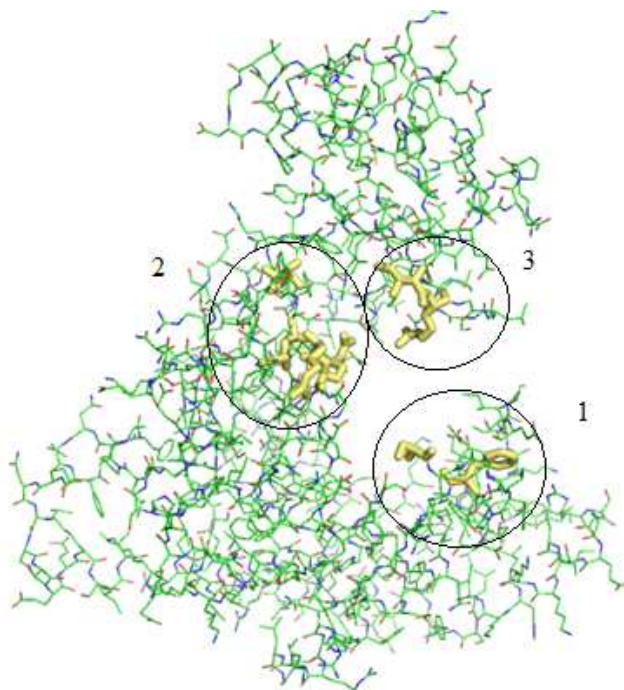


Figura 2.29. Posibles sitios de unión de los compuestos biscatiónicos según P. Srivani.

Por lo tanto, superponiendo el nuevo sitio de unión propuesto por el doctor R.Hurtado en el 2014 y los tres postulados por P.Srivani, se identifican en la proteína diversos puntos con capacidad de anclaje de inhibidores (**Figura 2.30**).

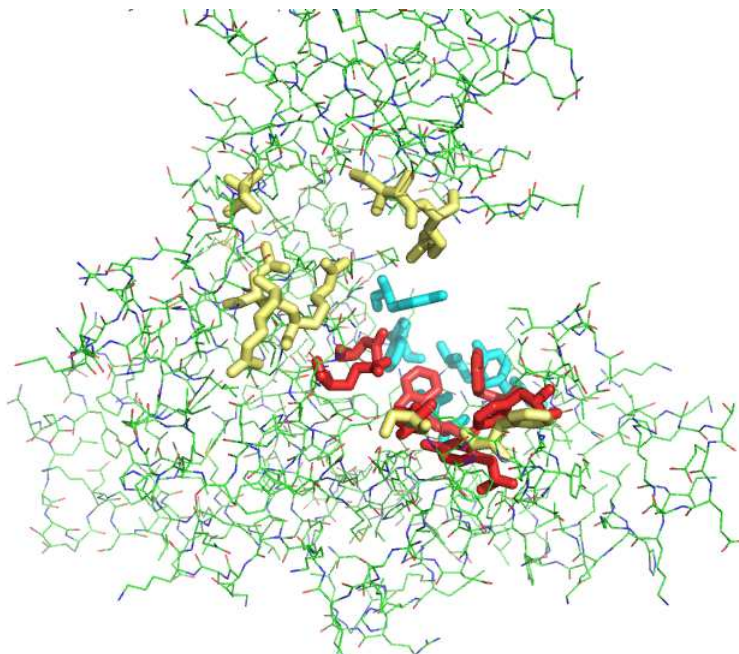


Figura 2.30. Posibles sitios de unión dentro del sitio activo de *HsChoKa1* (amarillo: sitios propuestos por Srivani; rojo: sitio ordinario de unión de la colina; azul: nuevo subsitio descubierto por R.Hurtado para el compuesto **14**).

2.1.6.3.1.4.2. Otros inhibidores NO derivados del HC-3

En el año 2013, la técnica del HTS (cribado de alto rendimiento) permitió descubrir el compuesto **V-11-023907** como nuevo inhibidor de *HsChoK α 1, y además, con dicha molécula se corroboró el mecanismo catalítico de ping-pong propuesto por Pollard y col. para la enzima.²⁷ La particularidad que muestra el cristal de este compuesto (PDB ID: **4DA5**) es la formación de un puente de hidrógeno entre el Asp306 y el hidrógeno del nitrógeno cuaternario de la quinuclidina (**Figura 2.31**). Este residuo ha sido siempre propuesto como la base catalítica que usa ChoK para iniciar los ataques nucleofílicos. Otro dato curioso que se observó fue que, a pesar de que el compuesto **V-11-023907** aparecía unido en el cristal al sitio de la colina, mostraba un perfil de inhibición no competitivo con dicho sustrato. La explicación que se le dio a esta aparente dicotomía fue que el compuesto podría unirse a una forma de la enzima diferente a la que se unía la colina. De tal manera que la colina se uniría al intermedio fosforilado de la enzima, mientras que el compuesto **V-11-023907** lo haría a la forma libre.*

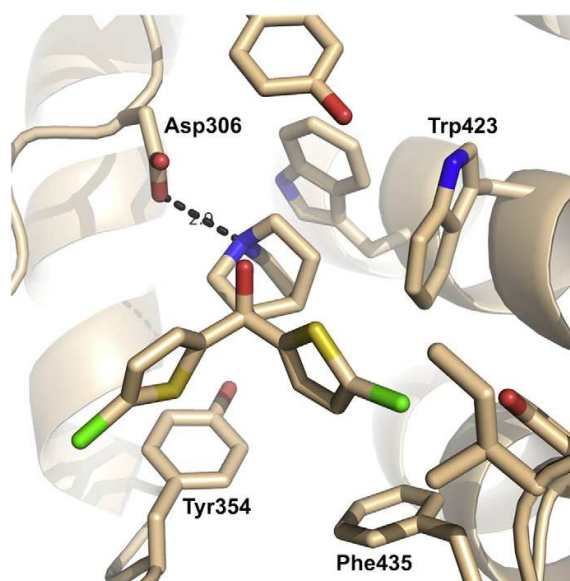


Figura 2.31. Estructura cristalina de *HsChoK α 1 co-cristalizada con el compuesto **V-11-023907**.*

2.1.6.3.1.5. Conclusiones

Las evidencias cristalográficas obtenidas a lo largo de más de diez años sobre la ChoK de diversas especies han permitido profundizar en su conocimiento. De este

modo, actualmente se tiene certeza de cuáles son los residuos que participan en la estabilización de los sustratos en el sitio activo, de la comunicación entre monómeros a través de fenómenos de alosterismo con cooperatividad asimétrica y de la gran flexibilidad que muestra *HsChoK α* a nivel del sitio de la colina. Esto último es una pequeña muestra de la gran versatilidad de la enzima para aceptar ligandos de muy diversa naturaleza, llegando incluso a explorarse nuevos sitios de unión en el de la colina, que han sido recientemente descritos. Todos estos datos proporcionan una valiosa información para el diseño racional de nuevos inhibidores de *HsChoK α* que muestren una mayor afinidad por la enzima y que tengan por tanto, una mayor potencia.

2.2. Malaria

2.2.1. Epidemiología

La malaria es la enfermedad protozoaria más importante a nivel mundial puesto que en 2012, contagió a 207 millones de personas y causó la muerte de 627000 de ellas, siendo la segunda causa de muerte en África y una de las enfermedades infecciosas más prevalentes.⁹¹ Es una enfermedad parasitaria evitable y curable que ocupa el primer puesto en la lista de enfermedades debilitantes y el segundo en el de las enfermedades olvidadas.

Aproximadamente la mitad de la población mundial está en riesgo, ya que es endémica en 108 países. Aunque la mayoría de muertes tienen lugar en el África subsahariana, existen otras zonas endémicas como Asia, América Latina, Oriente Medio y algunas regiones de Europa (**Figura 2.32**).⁹² El sector de la población donde se detectan un mayor número de muertes debidas a malaria es en el de los niños, los cuales mueren uno a cada minuto en África, según la OMS.⁹¹



Figura 2.32. Distribución mundial de la malaria. Fuente: World Malaria Report 2013.⁹²

Dada la movilidad actual entre países, pueden detectarse casos de paludismo en regiones del mundo donde no existen condiciones favorables para el desarrollo del vector. Concretamente, según datos de la OMS, en el año 2010 se detectaron 125000 casos en la Unión europea, de los cuales 3793 se dieron en España.⁹² De este total, se produjeron más de 500 muertes en el continente y se elevaron a 27 las defunciones contabilizadas en España. Sin embargo, las medidas de prevención y control para malaria, están reduciendo significativamente los más de 200 millones de casos de infección que anualmente se detectan y por tanto, se vaticina una reducción del 75 % durante el período 2005-2015.⁹¹

2.2.2. Etiología

La malaria en humanos está producida por cuatro especies de parásitos del género *Plasmodium* (*P.falciparum*, *P.vivax*, *P.malariae* y *P.ovale*) que se transmiten mediante las picaduras del mosquito *Anopheles sp.* Al participar un hospedador intermediario (hombre) y otro definitivo (mosquito), la intensidad de la transmisión no sólo depende de factores relacionados con el parásito, sino también de aquellos que afectan al ser humano y al vector, como por ejemplo las condiciones climáticas.⁹¹ De este modo, una humedad superior al 52% y una temperatura de entre 20-25° favorece el número y la supervivencia de los mosquitos, motivo por el cual el pico de infección suele coincidir justo con el fin de la estación lluviosa. Por otro lado, los agentes causales más frecuentes son *P.falciparum* y *P.vivax* puesto que ambos son responsables de aproximadamente el 80% de infecciones. *P.falciparum* además, es el agente más letal.⁹¹ La inmunidad adquirida en humanos es otro factor importante a tener en cuenta, puesto que cuantos más años se haya estado expuesto a la infección, menor será la intensidad con la que se padezca la enfermedad. Por eso la mayoría de muertes por malaria se producen en niños.

A diferencia del cáncer, tanto la etiología de la malaria, como los cambios fisiopatológicos a los que da lugar en el ser humano, están perfectamente descritos. Así, en el ciclo vital de *Plasmodium sp.* la fase de reproducción sexual se da en el mosquito *Anopheles sp.*, mientras que las formas sexualmente inactivas se encuentran en el ser humano (**Figura 2.33**).⁹³

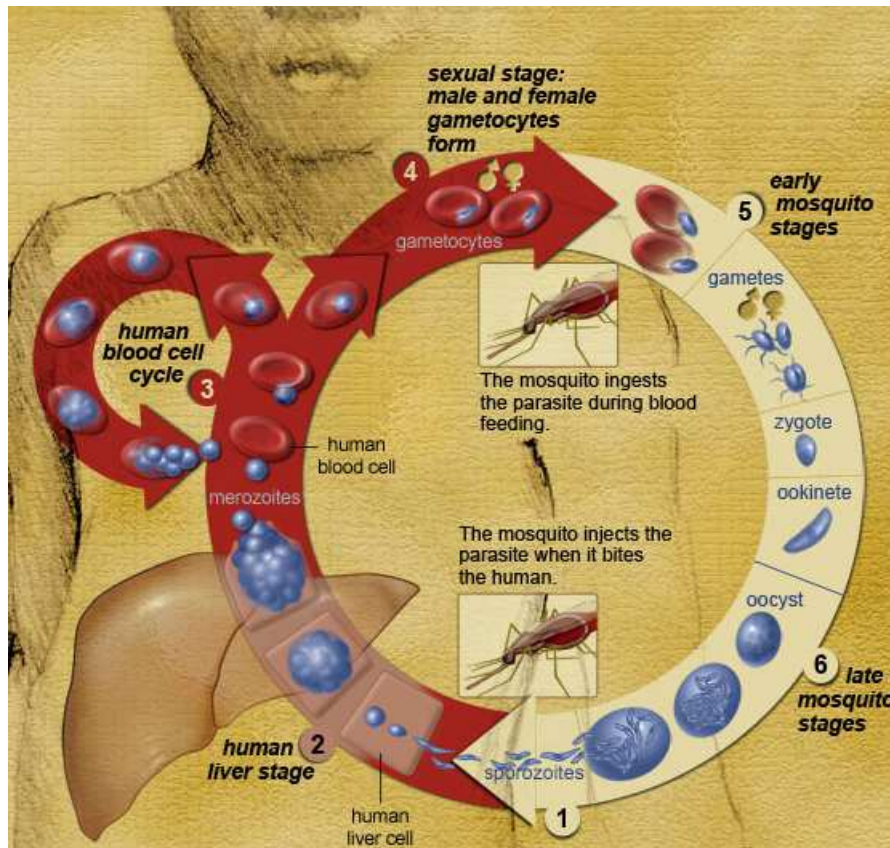


Figura 2.33. Ciclo biológico de *Plasmodium* sp. Fuente: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID).⁹⁴

El ciclo de infección se inicia con una etapa exoeritrocítica tras la inoculación de esporozoítos (ten preparado que sabes lo que es cada término) contenidos en la saliva de la hembra del *Anopheles*. Transcurridos 30-60 minutos de la picadura, los esporozoítos alcanzan el hígado, donde se multiplican por esquizogonia dentro de los hepatocitos, dando lugar a merozoítos que al cabo de 6-15 días entran en el torrente sanguíneo tras ruptura del hepatocito. En el caso de *P.vivax* y *P.ovale* los esporozoítos pueden quedar latentes en el interior de las células hepáticas durante largos períodos, recibiendo el nombre de hipnozoítos. Cuando se reactivan, se replican y por lo tanto, dan recidivas varios meses después. Una vez en el torrente sanguíneo, comienza el ciclo eritrocítico del parásito que tiene una duración de 48h en el caso de *P.falciparum*, *P.ovale* y *P.vivax* o de 72h cuando la infección es producida por *P.malariae*. En esta fase, los merozoítos se unen por su extremo apical a la superficie del glóbulo rojo produciendo una escisión de proteínas que facilita su entrada.

Una vez en el interior del eritrocito, los merozoítos maduran para convertirse en trofozoítos que se dividen nuevamente por esquizogonia para generar esquizontes que

pueden romper el eritrocito para liberarse como merozoítos al torrente sanguíneo o bien permanecen en el interior para transformarse en gametocitos femeninos (macrogametocitos) y masculinos (microgametocitos). En esta fase intraeritrocítica, comienzan las manifestaciones clínicas de la enfermedad, caracterizadas por anemia y fiebres recurrentes cada 2 días en el caso de infección por *P.falciparum*, *P.ovale* y *P.vivax* ó 3 días si se trata de *P.malariae*. Además, las formas intraeritrocíticas de *Plasmodium sp.* expresan proteínas capaces de migrar a la superficie del eritrocito para adherirse al endotelio vascular. De este modo, no sólo se evita la eliminación de los glóbulos rojos infectados por el bazo, sino que también se impide el reconocimiento por parte del sistema inmune. Como consecuencia, se producen complicaciones hemorrágicas y aparecen esplenomegalia e incluso rotura esplénica.

En caso de que una hembra de *Anopheles* no infectada pique a un enfermo, adquiere los gametocitos, y así se inicia el ciclo sexual de *Plasmodium*. Los gametocitos maduran en su intestino hasta convertirse en gametos que se fusionan para formar un huevo primero móvil (ooquineto) y luego fijo (ooquiste). En ellos se generan miles de esporozoítos que migran a las glándulas salivares para infectar a un nuevo individuo tras picadura del vector. En regiones donde la malaria es altamente endémica, las personas se infectan tan a menudo que desarrollan inmunidad adquirida, es decir, son portadores asintomáticos.

2.2.3. Tratamiento

Un exitoso control de la malaria que contribuya a reducir la transmisión del parásito no sólo depende de un diagnóstico temprano que ayude a prevenir el número de muertes, sino también del control del vector mediante mosquiteras e insecticidas y el uso de tratamientos eficaces.⁹¹

En todos los países endémicos, la OMS ha puesto en marcha una “Política Nacional para el Tratamiento de la Malaria” donde se especifican los fármacos que deben usarse en casos de malaria sin complicaciones o severos, durante el embarazo y cuando el tratamiento de primera línea falla.⁹⁵ Sin embargo, a pesar de que las pautas establecidas en dichas políticas nacionales son claras, las resistencias a los antimaláricos en ciertas zonas endémicas se están convirtiendo en un serio problema.⁹¹ La resistencia más representativa es la que ha desarrollado *P.falciparum* a las primeras generaciones de fármacos derivados de la cloroquina y de la sulfadoxina-pirimetamina.⁹⁶

El descubrimiento del primer tratamiento antimalárico se realizó hace casi 400 años en el Amazonas, después de que se observara la curación de los pacientes que tomaban infusiones de corteza de *Cinchona sp.* (*C. calisaya* y *C. succirubra*). Dicha actividad fue posteriormente atribuida al alcaloide quinina (Quinimax[®]), que se caracterizó por primera vez por los químicos franceses Pelletier y Caventou en el año 1820.⁹⁷ Posteriormente, varias 4-aminoquinolinas fueron sintetizadas basándose en el anillo de la quinina. Sin embargo, dado su reducido precio y elevada seguridad, fue la cloroquina (**Figura 2.34**) la única elegida como componente esencial de la “Global Malaria Eradication Campaign”, lanzada en el 1955.⁹⁸ A finales del 1960, comenzaron a aparecer las primeras resistencias a la cloroquina por parte de *P. falciparum* en América Latina y el sudeste asiático y gradualmente se fueron propagando por las regiones endémicas.

Actualmente, para asegurar una elevada tasa de curación, acortar la duración del tratamiento y retrasar la aparición de resistencias, la OMS recomienda la cloroquina (Resochin[®]) y otros antimaláricos de diferente clase en combinación con artemisina (**Figura 2.34**) en un cocteles que forman parte de la ACT o “Artemisinin-based Combination Therapy”.⁹¹

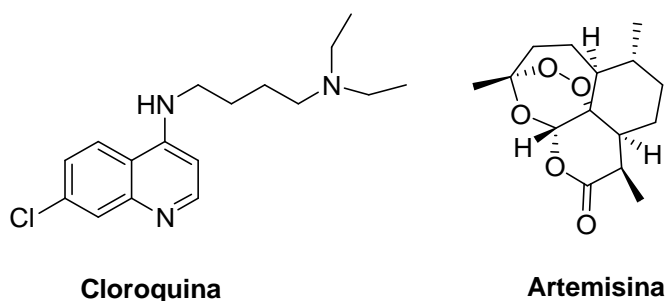


Figura 2.34. Fórmulas químicas de la cloroquina y de la artemisina.

La artemisina es un endoperoxido sesquiterpénico natural que se aísla de la *Artemisia annua*, la cual ha sido usada como planta medicinal en China durante miles de años.^{99,100}

Entre los derivados de artemisina más frecuentemente usados (**Figura 2.35**) destacan la dihidroartemisina, el artesunato y el artemeter, mientras que los fármacos que comúnmente los acompañan son la lumenfantrina (Riamet[®]), la mefloquina

(Lariam[®]), la atovacuona/proguanil (Malarone[®]), la primaquina (Primaquine[®]), la sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar[®]) y la piperacuina (Eurartesim[®]).

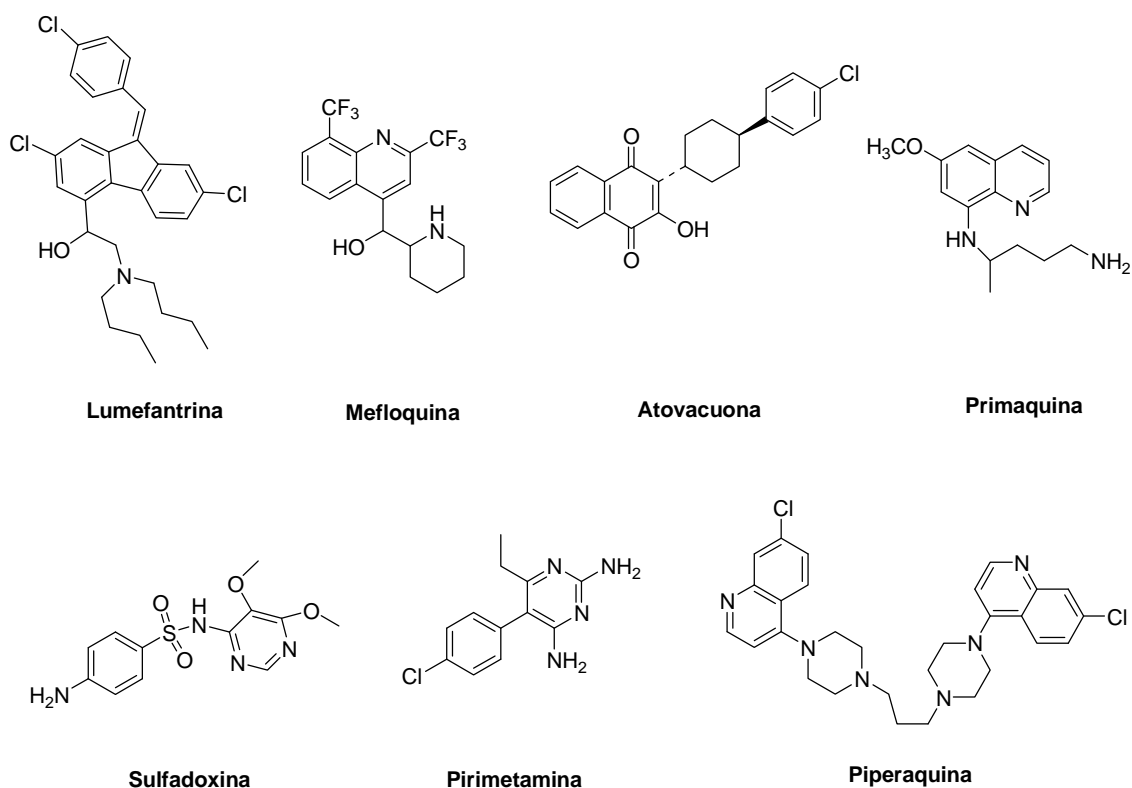


Figura 2.35. Estructura química de los antimaláricos lumefantrina, mefloquina, atovacuona, primaquina, sulfadoxina, pirimetamina y piperacuina.

Esta terapia se caracteriza por una rápida acción y se usa en casos de infección severa por cualquier especie de *Plasmodium*, tanto de *P.falciparum* como del resto de especies que aún siguen siendo sensibles a los antimaláricos de primera generación. No obstante, la ACT presenta tres problemas responsables de fallo terapéutico.

En primer lugar, su poca accesibilidad debida a su elevado coste¹⁰¹ y a la existencia de pocas co-formulaciones en países con pocos recursos económicos.¹⁰² En segundo lugar, la falta de adherencia al tratamiento por complicados regímenes terapéuticos.⁹² Y en tercer lugar, la aparición de resistencias como consecuencia del uso de la artemisina como monoterapia en algunas regiones endémicas tales como Camboya, Tailandia y Vietnam.^{92,103}

La falta de alternativas terapéuticas eficaces, es la causa de que la malaria se esté convirtiendo en una seria amenaza para la salud pública. Si con el paso de los años la

resistencia a la artemisina y sus derivados continúa desarrollándose y se propaga a otras zonas endémicas, se pondrá en riesgo la salud pública a nivel mundial.⁹¹

La vacunación contra las diferentes especies de *Plasmodium sp.* es la mejor opción terapéutica para la prevención de la enfermedad y para evitar la transmisión del parásito. Esto justifica los grandes esfuerzos que en las últimas décadas ha dedicado la comunidad científica para conseguir su desarrollo, y aunque actualmente existen 20 vacunas en fase experimental, aún no hay ninguna autorizada. No obstante, la investigación sobre RTS, S/AS01 (GlaxoSmithKline)⁹¹ contra *P. falciparum*, está muy avanzada. Se trata de un antígeno diseñado por ingeniería genética con un epítipo constituido por secuencias de la proteína CSP del esporozoíto de *P. falciparum* y del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) que se han incluido en un adyuvante químico (AS01) capaz de impulsar e intensificar la respuesta inmune¹⁰⁴. En concreto, en este momento dicha vacuna es objeto de evaluación mediante un gran ensayo clínico de fase III que se está llevando a cabo en niños de siete países africanos (Burkina Faso, Gabon, Ghana, Kenya, Malawi, Mozambique, y Tanzania). La OMS recomendará su uso en función de los resultados finalmente obtenidos en los ensayos clínicos. Se prevé que esos resultados estén listos a finales de este mismo año y que la OMS formule una recomendación acerca de si la vacuna debe incluirse entre los medios de lucha antipalúdica en 2015.

2.2.4. ChoK en el metabolismo lipídico de *Plasmodium sp.*

Al igual que en humanos, la ChoK en *Plasmodium sp.* (*PfChoK*) cataliza la fosforilación de colina o etanolamina en presencia de ATP y Mg^{2+} , no obstante la afinidad por la etanolamina es muchísimo menor¹⁰⁵. No obstante, a diferencia de en humanos debido a que en el genoma de este parásito sólo existe un gen que codifica a *PfChoK*, ésta carece de isoformas y es activa como monómero.¹⁰⁵

En *Plasmodium sp.* la PC es junto con la PtdEtn, el fosfolípido más abundante de la membrana celular, representando entre un 40-50% del contenido lipídico total.¹⁰⁶ Concretamente, durante la multiplicación intraeritrocítica del plasmodio, se produce un aumento de su contenido fosfolipídico de 6 veces,¹⁰⁶ dada la intensa neogénesis de membranas.

Al igual que en humanos, la ruta de Kennedy o de la CDP-colina es la vía más común para la síntesis de fosfatidilcolina (PC) y en consecuencia, las enzimas

involucradas (*PfChoK*, *PfCCT*, *PfCEPT*) han sido validadas como diana de nuevas terapias antimaláricas (**Figura 2.36**).¹⁰⁶ No obstante, existe además una ruta alternativa conocida con el nombre de ruta de la serina descarboxilasa–fosfoetanolamina metiltransferasa (SDPM) que se inicia con una metilación repetida de la fosfoetanolamina (PEtn) hasta dar lugar a PCho (**Figura 2.36**). Esta ruta también merece especial atención para el desarrollo de antimaláricos selectivos porque no está presente en mamíferos.

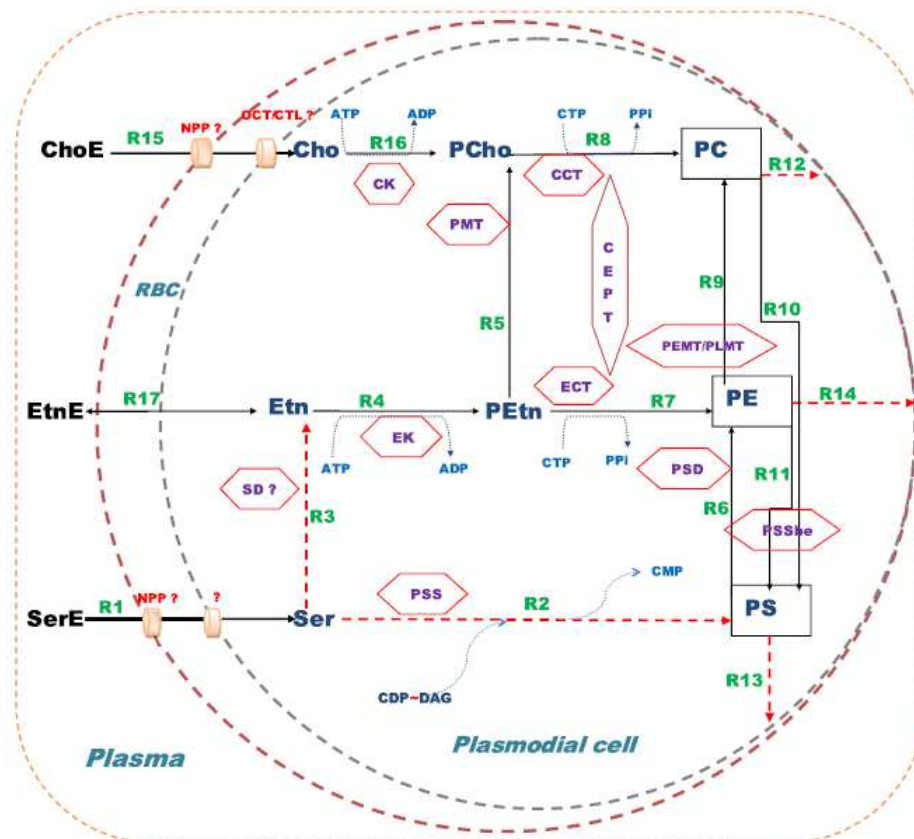


Figura 2.36. Rutas de Kennedy y de la serina descarboxilasa–fosfoetanolamina metiltransferasa (SDPM) para la síntesis de fosfatidilcolina en *Plasmodium sp.*¹⁰⁶

En el caso de *Plasmodium sp.* la penetración de la colina desde el plasma del hospedador hasta el interior del parásito también se ve facilitada por transporte activo.¹⁰⁷ Sin embargo, a diferencia de en humanos, dicho metabolito antes de pasar al citoplasma del plasmodio ha de atravesar la membrana plasmática del eritrocito. En el primer caso, su flujo hacia el interior se ve facilitado por transportadores denominados PPM (*Parasite Plasma Membrane Carrier*), mientras que los localizados en el eritrocito se conocen con el nombre de NPP (*New Permeation Pathway*). Según evidencias aportadas por estudios cinéticos, los transportadores PPM son más rápidos que los NPP

y son funcionalmente parecidos a los transportadores de cationes orgánicos de humanos y otros organismos eucariotas (OCT, *Organic Cation Transporters*). Recientemente se ha demostrado que existen antimaláricos cuya acción se debe entre otros motivos, a un bloqueo de ambos o uno solo de dichos transportadores. Por ejemplo, el antimalárico T16 es capaz de inhibirlos a los dos, mientras que el **HC-3** bloquea principalmente al PPM.¹⁰⁸

2.2.4.1. ChoK en otros organismos

ChoK tiene una amplia distribución en la naturaleza y aunque hasta ahora la mayor cantidad de información que se tiene en relación a ella está referida a células de humanos y *Plasmodium sp.*, también ha sido estudiada aunque en menor profundidad en otros eucariotas y en algunos procariotas. De todas estas especies, las más relevantes desde el punto de vista de la utilidad que pueda tener ChoK como target son ciertos parásitos de humanos, plantas y animales, así como algunos microorganismos responsables de infecciones. Varios ejemplos los constituyen hongos epidermófitos de humanos y animales como *Candida albicans*,^{109,110} *Microsporium gypseum*,^{111,112} *Epidermophyton floccosum*,¹¹³ bacterias que causan enfermedades respiratorias como *Streptococcus pneumoniae*,¹¹⁴ algunas especies parásitas de plantas tales como *Cuscuta reflexa*,¹¹⁵ protozoos pertenecientes al género *Cryptosporidium sp.*, del que se tiene su estructura cristalina o también *Toxoplasma sp.*¹¹⁶ y *Trypanosoma sp.*¹¹⁷

Dadas sus implicaciones en el metabolismo lipídico, además de en humanos y *Plasmodium sp.*, ChoK ha sido propuesta como diana terapéutica en *Trypanosoma sp.* y *Toxoplasma gondii*. No obstante, para estos últimos dos casos aún no se han hecho estudios con inhibidores, abriéndose un extenso campo de investigación para la química farmacéutica.

2.2.5. Inhibidores de PfChoK

Las crecientes resistencias a la cloroquina por parte de las diferentes cepas de *Plasmodium sp.* y en especial de *P.falciparum* (responsable del 80% de los casos de malaria), han sido la causa de una intensa investigación para la renovación del arsenal terapéutico de los antimaláricos haciendo uso de diversas estrategias.¹¹⁸ Entre ellas se incluyen las siguientes: a) cribado de moléculas procedentes de fuentes naturales (como la planta medicinal *Cecropia pachystachya*, que también tiene actividad

antileishmanica);^{119,120} b) modificaciones químicas de los antimaláricos existentes (cloroquina o artemisina);¹²¹ c) ensayo de la actividad antimalárica de fármacos aprobados para el tratamiento de otras enfermedades (como el lopinavir, para el tratamiento del HIV);¹²² d) modelado molecular usando cribado virtual y docking (en enzimas como la SHMT, LDH, ENR, proteínas quinasas, topoisomerasas y la espermidina sintasa).¹²³ El objetivo es encontrar fármacos no sólo potentes y seguros, sino también asequibles desde el punto de vista económico para conseguir adherencia al tratamiento y garantizar así su eficacia.

Todas las estrategias previamente mencionadas, tienen por objetivo encontrar moléculas capaces de interrumpir rutas metabólicas esenciales para la supervivencia del parásito en los diferentes estadios de su ciclo reproductivo, prestando especial atención a las formas infectivas hepáticas (que tienen especial importancia en las recidivas de *P.vivax*). Entre ellas, las rutas anabólicas de lípidos implicados en el crecimiento del plasmodio constituyen un ejemplo, ya que pueden abordarse mediante el empleo de inhibidores de sus diversas proteínas validadas como diana. Más concretamente, la interferencia con la síntesis *de novo* de PtdCho y PtdEtn ha demostrado ser una estrategia antimalárica válida.¹²⁴

2.2.5.1. Derivados de amonio mono y biscuaternarios

Aunque han sido varios los compuestos que deben su actividad al bloqueo de la síntesis *de novo* de PtdCho y PtdEtn, como el PG12 (que inhibe a la PfCCT) o la amodiaquina (que inhibe a la PfPMT), sin duda, los avances más notables en este sentido se han producido con el diseño de análogos de la colina. Estas moléculas, incluyen en su estructura uno o dos amonios cuaternarios¹²⁵ y la mayoría, no sólo interrumpen el metabolismo lipídico por interferencia con las enzimas implicadas en la ruta de la CDP-colina, sino que también impiden el transporte de colina a través de la membrana del parásito. Entre ellas, algunas de las moléculas más representativas son la **G25**,^{126,127,128} el **albitiazolium** (también conocido como compuesto T3)^{129,130} y el **HDTAB**.¹³¹

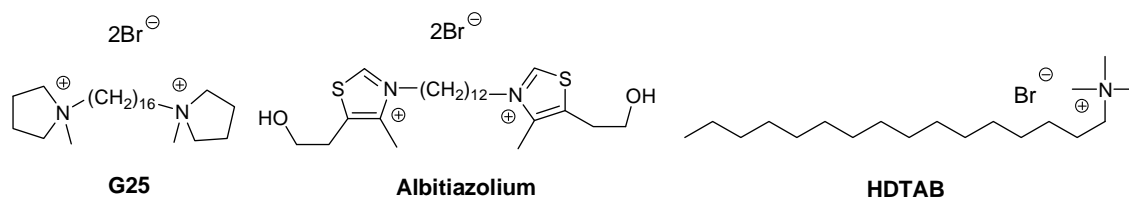


Figura 2.37. Estructuras químicas de los compuestos G25, albitiazolium y HDTAB.

El compuesto **G25** se encuentra actualmente en fase II de ensayos clínicos y además de inhibir el crecimiento *in vitro* de cepas de *P.falciparum* fármaco-resistentes, demostró revertir el proceso infeccioso en modelos de roedores y primates. Aun teniendo un mecanismo de acción poco claro, parece deber su potencia como antimalárico no sólo al bloqueo del transporte de colina, sino también a la interrupción de la síntesis *de novo* de la PtdCho y de la PtdEtn.¹²⁸

En el caso del **albitiazolium**, también se encuentra en fase II de ensayos clínicos (SAR97276) y debe principalmente su actividad al bloqueo de transporte de colina tanto hacia el eritrocito (por los transportadores NPP), como al interior del parásito (a través de los transportadores de cationes orgánicos). No obstante, a dosis mucho mayores de las necesarias para el bloqueo de los transportadores, inhibe a las tres enzimas principales de la ruta de la CDP-colina (*PfChoK*, *PfCEPT* y *PfCCT*), así como a la *PfEK*, afectando principalmente a la biosíntesis de PtdCho.¹²⁹

El **HDTAB** por su parte, demostró ser especialmente eficaz durante el estadio de trofozoíto ya que además de inhibir el transporte de colina hacia el interior del parásito, su acción se centra principalmente en la inhibición de la *PfChoK*, la cual se sobreexpresa durante dicha etapa intraeritrocítica.¹³¹

No obstante, a pesar de su marcada actividad antimalárica, estas moléculas son eficaces exclusivamente durante la etapa intraeritrocítica del parásito.

2.2.5.2. HC-3 y derivados

Como ya había sido demostrado previamente para células humanas, el **HC-3** es un agente capaz de bloquear los transportadores de colina. En el caso de los eritrocitos infectados por *Plasmodium sp.*, el **HC-3** conserva esta misma actividad, pero además, inhibe a la *PfChoK*. Para demostrar su actividad antimalárica se hacen necesarios estudios de actividad *in vivo* que aún no han sido desarrollados. No obstante, los

compuestos derivados del **HC-3** sintetizados por nuestro grupo de investigación en las dos últimas tesis doctorales (**Figuras 2.13** y **2.14**)^{86,132} han demostrado inhibir a baja dosis la proliferación del parásito durante su etapa intraeritrocítica. Los mecanismos por los que se observa dicha actividad antimalárica están siendo estudiados hoy día, habiéndose hipotetizado la *PfChoK* como diana más probable. Además, no se descarta la existencia de otros mecanismos involucrados, dada la mejor actividad de tales derivados de **HC-3** en el parásito que en células cancerígenas humanas.¹³³

Para los compuestos derivados del **HC-3**, **MN58b** y **RSM-932A** sin embargo, ya se ha demostrado su capacidad inhibitoria frente a *PfChoK*.¹³⁴ A tal respecto conviene destacar que ambos son inhibidores competitivos. No obstante, **MN58b** compite con la colina, mientras que **RSM-932A** es sinérgico con respecto a colina y ATP. Además, parece ser que **RSM-932A** impide la transferencia del fosfato a la colina una vez que se forma el intermedio fosforilado de la enzima que Pollard y col.¹³⁴ proponían. Por otro lado, ambos compuestos se comportan como potentes agentes antimaláricos frente a cepas resistentes y no resistentes a la cloroquina, induciendo la acumulación de trofozoítos y esquizontes. Por tanto, impiden el desarrollo intraeritrocítico del parásito y retrasan su etapa de maduración.

2.2.6. Estructuras cristalinas de ChoK en parásitos

Dado que ChoK no sólo está implicada en procesos cancerígenos, sino también en el desarrollo y proliferación de múltiples organismos, en los años 2008, 2009 y 2010, fue cristalizada en *Plasmodium knowlesi* (PDB ID: **3C5I**), *P.falciparum* (PDB ID: **3F18**) y *C.parvum* (PDB ID: **3MES**), respectivamente (**Figura 2.38**).

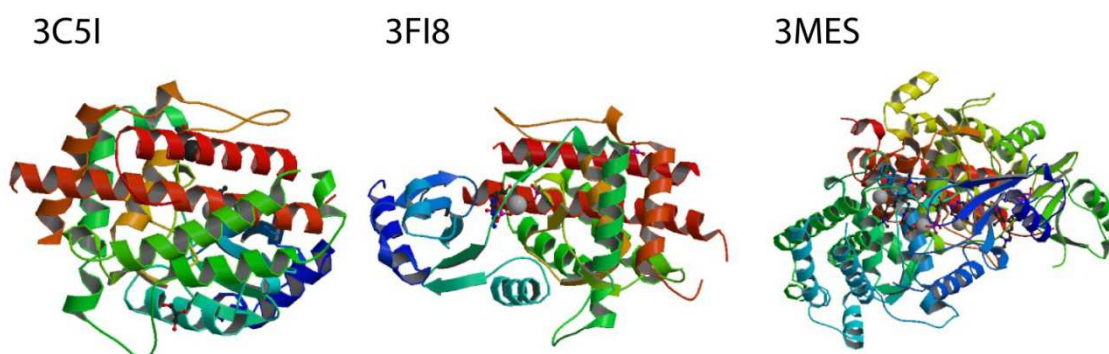


Figura 2.38. Estructuras cristalinas de ChoK en *P.knowlesi* (PDB ID: **3C5I**), *P.falciparum* (PDB ID: **3F18**) y *C.parvum* (PDB ID: **3MES**).

A diferencia de las distintas isoformas de la *HsChoK*, ChoK en estos tres parásitos es monomérica, tal y como queda reflejado en las estructuras cristalinas. En todas ellas se observa el plegamiento típico de los dominios *N*- y *C*-terminal, donde aparecen unidos sus sustratos de reacción. No obstante, a pesar de la aparente similitud que estos homólogos guardan con la *HsChoKα1*, aún no se han descrito con detalle las tres estructuras cristalinas de los parásitos, así como tampoco se han comparado con la *HsChoKα1*. Esto podría ser de interés para la química farmacéutica, puesto que si se demostrara una alta conservación de sus secuencias a nivel del sitio activo, los inhibidores que hasta ahora han sido diseñados tomando como referencia la estructura cristalina de la *HsChoKα1*, también podrían emplearse para inhibir a la ChoK en estos parásitos.

3. OBJETIVOS

3. Objetivos

Entre los objetivos de la presente Tesis Doctoral se encuentran los siguientes:

1. Diseño de nuevos inhibidores de *HsChoK* α 1

Han sido muchos los inhibidores de ChoK humana (*HsChoK*), de estructura triscatiónica, biscatiónica (simétrica o asimétrica), monocatiónica y ciclofánica propuestos hasta la fecha. Sin embargo, poca es la información que se tiene en relación a los grupos funcionales que se deben mantener en todos los casos para conservar la afinidad de los compuestos por la enzima.

Con objeto de establecer cuáles son dichos grupos funcionales, se aplicarán técnicas de modelado molecular (docking y cribado virtual) para proponer un modelo de farmacóforo que además, se utilizará con dos finalidades:

- Cribar librerías de moléculas comercialmente disponibles para encontrar nuevos prototipos de estructura química diferente a los inhibidores convencionales de *HsChoK*, que a su vez sean más eficientes desde el punto de vista de su unión a la enzima, es decir, conseguir que cada átomo del ligando interaccione con el receptor de una forma más energéticamente favorable.
- Obtener nuevos derivados monocatiónicos asimétricos del hemicolinio-3 (**HC-3**) que presenten buena afinidad por la *HsChoK* y que en consecuencia, se comporten como inhibidores de la misma. De este modo, se plantea la síntesis y caracterización inequívoca mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN, ^{13}C , HMBC y HSQC) y espectrometría de masas de tres familias de nuevas

moléculas (familias A, B y C), donde se incluyen un total de 35 compuestos (**Figura 3.1**). En la estructura química de la primera familia, se distinguirán dos zonas: una cabeza catiónica y un espaciador de tipo fenilo; en la segunda familia, además de la cabeza catiónica, se incluirá un espaciador bifenílico y por último, en la familia C, se podrán distinguir una cabeza catiónica, un espaciador bifenílico y una amina terciaria.

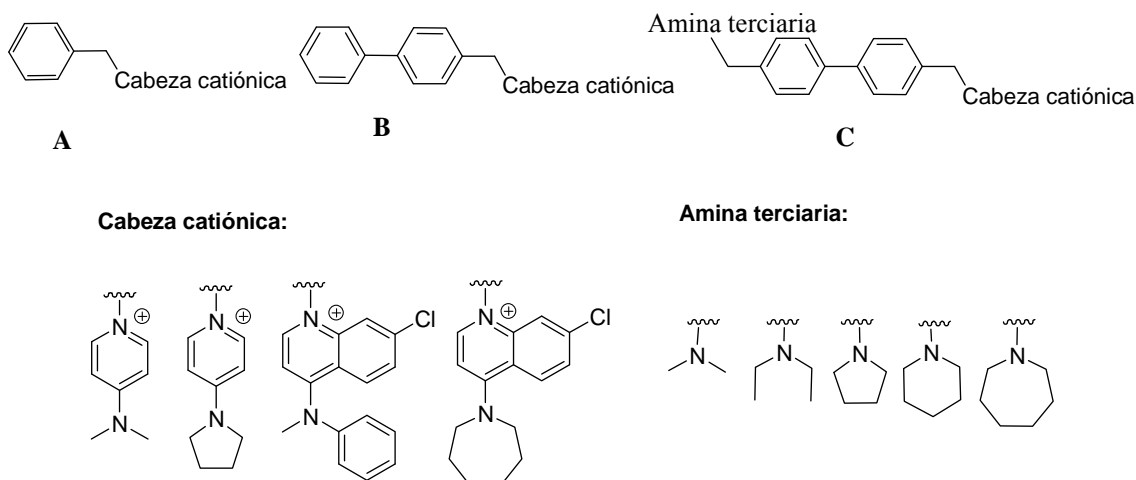


Figura 3.1. Estructura química general de los compuestos de las familias A, B y C.

Las cabezas catiónicas de los tres grupos anteriores, han sido elegidas en base al farmacóforo y a las relaciones estructura química-actividad establecidas previamente por nuestro grupo de investigación. En consecuencia, se han seleccionado grupos funcionales derivados de la piridina (dimetilamino/pirrolidinopiridina) y de las quinolinas (quinolina-fenilo/quinolina-azepina). Por otro lado, las aminas terciarias en la familia C se han incluido como parte de los compuestos para dotarlos de potenciales donadores de puentes de hidrógeno. Las aminas terciarias elegidas mostrarán un peso molecular creciente (dimetilamina, dietilamina, pirrolidina, piperidina y perhidroazepina) para entender el efecto de un aumento gradual de la lipofilia en la actividad inhibitoria y antiproliferativa.

2. Determinación de la afinidad por *HsChoKα1*

La evaluación de la afinidad por la *HsChoKα1* tanto de los potenciales inhibidores procedentes del cribado virtual como de los derivados monocatiónicos, se llevará a cabo

mediante espectroscopía de fluorescencia. Dicha técnica es muy útil en el caso de ChoK debido a la presencia de triptófano en el sitio de la colina. Todos los compuestos finales serán ensayados frente a *HsChoK* α 1 y algunos también frente a *HsChoK* β para estudiar su selectividad. Para ello, previamente se clonarán, expresarán y purificarán ambas enzimas.

3. Determinación de la actividad biológica en células cancerígenas

La afinidad que un compuesto muestra por una proteína es un parámetro que se mide en ausencia de los sustratos naturales de dicha enzima. Por tanto, aunque está relacionado con la actividad inhibitoria, no tiene por qué correlacionarse en todos los casos. Basta con que el compuesto que se está evaluando se una a un sitio de la proteína distinto al sitio activo, para obtener un buen parámetro de afinidad y ninguna inhibición.

En consecuencia, los compuestos de la presente Tesis Doctoral, serán ensayados en presencia de los sustratos naturales de la *HsChoK* para determinar su actividad inhibitoria *in vitro* (CI_{50}). Se usará la fracción citosólica de células tumorales de la línea HepG2 (donde está contenida la *HsChoK* α 1) para la evaluación de todos los compuestos y la enzima recombinante pura expresada en *E.coli* para ensayar solamente aquellos derivados que hayan demostrado ser más activos en el primer ensayo.

Por último, se llevarán a cabo estudios de actividad antiproliferativa en células cancerígenas de diversas líneas tumorales como HepG2 (cáncer de hígado) para el caso de todos los compuestos, y en Jurkat (leucemia), MCF7 (cáncer de mama), HCT116 (cáncer de colon), HT29 (adenocarcinoma de colon) y A549 (cáncer de pulmón) sólo para los compuestos que muestren mejor actividad antiproliferativa frente a HepG2.

4. Cristalización de las moléculas más afines a *HsChoK* α 1

La cristalografía es una herramienta de vital importancia para el diseño racional de fármacos, ya que permite conocer cuáles son los residuos del sitio activo que quedan más accesibles para la interacción con los ligandos. En consecuencia, proporciona información sobre la bioconformación que el ligando debe adoptar para interrumpir la actividad catalítica de la enzima. Además, variaciones en la estructura química del compuesto compatibles con su unión al sitio activo, pueden incluso inducir cambios conformacionales de los residuos que pueden aprovecharse para explorar nuevos sitios de unión.

Así, en la presente Tesis Doctoral, se co-cristalizarán los compuestos sintetizados que muestren una mayor afinidad por el enzima (*HsChoK α 1*) y unas buenas características de solubilidad. De este modo, los compuestos serán utilizados como herramientas para indagar en: a) el mecanismo de reconocimiento de diversos grupos funcionales por parte de la enzima; b) identificación de nuevos sitios o modos de unión que puedan ser explorados para conseguir una inhibición más selectiva de la ChoK en futuros proyectos.

5. Estudio computacional comparativo de los sitios activos de ChoK en las especies donde hasta ahora ha sido cristalizada: humanos, *Plasmodium sp.* y *Cryptosporidium parvum*.

A pesar de la amplia distribución en la naturaleza de ChoK y de sus implicaciones en el metabolismo lipídico en múltiples especies, su inhibición sólo ha sido utilizada como estrategia para el diseño de fármacos en el caso de humanos y *Plasmodium sp.* Nada se sabe sobre las consecuencias que tendría la interrupción de su actividad catalítica en otras especies donde también ha sido estudiada, como por ejemplo *Toxoplasma gondii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Leishmania sp.*, hongos dermatofitos (*Mycrosporidim gypseum*) o *Cryptosporidium parvum*. En todos ellos, en caso de resultar viable la inhibición de ChoK, ésta podría utilizarse como estrategia para evitar su proliferación y se abriría un nuevo campo hasta ahora inexplorado para la química farmacéutica.

Por eso, en la presente Tesis Doctoral, se han usado técnicas de modelado molecular (alineamientos de secuencia y dinámica molecular) para estudiar la conservación de los sitios activos entre las ChoK homólogas que actualmente han sido cristalizadas (humanos, *Plasmodium sp.* y *Cryptosporidium parvum*). Nuestro objetivo es dilucidar si los inhibidores de la ChoK humana (*HsChoK α*) y de *Plasmodium sp.*, lo son también de la ChoK de otras especies, como de *C.parvum* para aportar la primera evidencia sobre su potencial utilidad en el tratamiento de otras enfermedades.

6. Determinación de la actividad biológica de los derivados de **HC-3** en eritrocitos infectados por *Plasmodium sp.*

Basándonos en antecedentes previos de actividad antimalárica de algunos derivados de **HC-3**, tales como los compuestos **MN58b** y **RSM-932A**, así como en los resultados de los estudios comparativos de los sitios activos de las homólogas (objetivo 5), algunos

de los compuestos de la presente Tesis Doctoral, serán también ensayados *in vitro* frente a *PfChoK* mediante espectroscopía de fluorescencia. Para ello, también será necesario realizar el clonaje, la expresión y la purificación de la enzima recombinante pura (*PfChoK*).

Además, se medirá la inhibición del crecimiento de *P.falciparum* en eritrocitos infectados para conocer la actividad como agentes antimaláricos de los compuestos que hayan mostrado una mayor afinidad por *PfChoK*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión

Resumen.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral pueden englobarse dentro de cuatro categorías. La primera incluye resultados de química computacional, la segunda de química sintética, la tercera de bioquímica y biología celular, y la cuarta de cristalografía.

- **Resultados de química computacional:** gracias a la aplicación de técnicas computacionales, tales como docking, cribado virtual y dinámica molecular, se ha propuesto un modelo de farmacóforo que ha contribuido al descubrimiento de nuevos prototipos de estructura química novedosa y de reducido peso molecular, que presentan afinidad por la *HsChoK α 1* del orden de micromolar bajo y una selectividad por dicha enzima de 3-160 veces superior que por *HsChoK β* . Además, se ha llevado a cabo un estudio comparativo entre ChoK homólogas (humanos, *P.falciparum* y *C.parvum*) que ha puesto de manifiesto grandes similitudes a nivel de sus sitios activos. Los ensayos de inhibición realizados con un derivado del **HC-3** evidencian que la CI_{50} de dicho compuesto frente a las tres proteínas es muy similar, lo cual valida el estudio computacional llevado a cabo y señala la potencialidad de tales derivados para el tratamiento de cáncer, la malaria y la criptosporidiosis, usando como diana terapéutica la ChoK.

- **Resultados de química sintética:** el modelo de farmacóforo previamente propuesto, se ha optimizado con grupos funcionales que han mostrado su idoneidad para la inhibición de la *HsChoK α 1* durante años en nuestro grupo de investigación. Finalmente se han obtenido nuevos derivados de **HC-3** que presentan mejor actividad biológica que los compuestos del cribado virtual frente a *HsChoK α 1* y también frente a distintas líneas celulares tumorales. Se trata de treinta y cinco sales monocatiónicas de bromo derivadas de fenilo (familia A) y bifenilo (familias B y C) donde se observa un incremento gradual de afinidad, potencial inhibitorio y actividad antiproliferativa a medida que se va aumentando la complejidad de la estructura química. Además de las rutas sintéticas utilizadas, en este apartado se presenta un estudio

espectroscópico para la identificación inequívoca de los átomos de hidrógeno y de carbono de los compuestos finales.

- **Resultados de biología celular y bioquímica:** la evaluación biológica tanto de los compuestos del cribado virtual como de los obtenidos tras optimización del farmacóforo se ha realizado mediante técnicas de fluorescencia de triptófanos frente a las enzimas recombinantes *HsChoK α 1*, *HsChoK β* (en el caso de ambos grupos de compuestos), *PfChoK* (sólo para los derivados de **HC-3**) y *CpChoK* (únicamente para el compuesto empleado para validar el estudio comparativo de sitios activos entre homólogas). En todos los casos, se ha llevado a cabo el clonaje, la expresión y la purificación de dichas enzimas, que también han servido para realizar los ensayos de inhibición enzimática y los experimentos de cristalografía. Por otro lado, también se presentan los resultados obtenidos de los ensayos antiproliferativos realizados *in vitro* sobre las líneas tumorales HepG2, Jurkat, MCF7, HCT116, HT29 y A549. Por último, los resultados sobre inhibición de *PfChoK* obtenidos con el compuesto **RSM-932A** sirvieron como punto de partida para la evaluación biológica como antimaláricos de los compuestos sintetizados sobre eritrocitos infectados por *P.falciparum*. Debido a que la actividad como agentes antipalúdicos es notablemente superior a su actividad como anticancerígenos, se plantea una posible participación de mecanismos de transporte activo típico del plasmodio o incluso, una sinergia con dianas del parásito que no se ven afectadas en las células humanas. Tales mecanismos están siendo actualmente estudiados con otros compuestos de estructura química similar.

- **Resultados de cristalografía:** algunos de los compuestos tanto del cribado virtual, como de los obtenidos tras síntesis química se han co-cristalizado con *HsChoK α 1*. De esta forma, se ha obtenido información sobre el mecanismo de reconocimiento que usa la enzima en cada caso y se ha constatado que los compuestos más potentes como inhibidores son aquellos que se estabilizan mediante un mayor número de interacciones con los residuos del sitio activo. Además, se ha observado que con independencia de los espaciadores de los inhibidores, la Tyr354, siempre establece interacciones π - π con uno de los fenilos de tales compuestos, lo cual indica la importancia de este residuo en el reconocimiento molecular. Por otro lado, en algunos de las estructuras cristalinas, la ChoK ha hecho gala de una gran flexibilidad a nivel de los residuos Trp420 y Tyr333, cuyas rotaciones han permitido la apertura de nuevas cavidades a nivel del sitio de la colina.

4.1. Parte 1: Diseño computacional del farmacóforo

Uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral es proponer nuevas estructuras químicas con capacidad para unirse e inhibir a la *HsChoKα1*, para lo cual se planteó la posibilidad de elucidar un modelo de farmacóforo que sirviera tanto para explorar librerías de compuestos comercialmente disponibles, y encontrar así, nuevos prototipos o cabeza de serie, como para diseñar y sintetizar nuevas moléculas derivadas del **HC-3**.

En este apartado se detallará el protocolo utilizado para el diseño de dicho farmacóforo (**Figura 4.1.1**) a partir de inhibidores biscatiónicos simétricos de *HsChoKα1* previamente sintetizados por nuestro grupo de investigación y de la estructura tridimensional de la enzima. En dicho protocolo se incluyen técnicas computacionales estándar (docking y dinámica molecular), estudios de afinidad frente a la proteína y cristalografía.

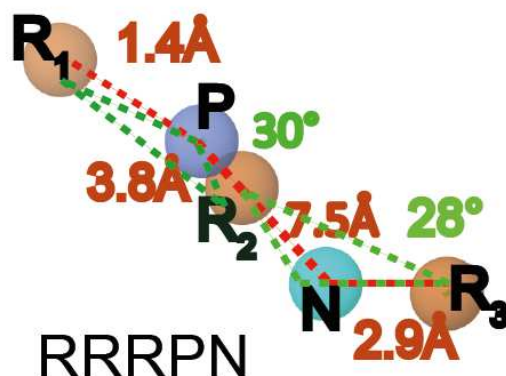


Figura 4.1.1. Modelo de farmacóforo finalmente propuesto a partir de inhibidores biscatiónicos simétricos de *HsChoKα1*.

4.1.1. Estudios computacionales sugieren un modelo de farmacóforo incluido en el fragmento de 1-bencil-4-(*N*-metilanilino)piridinio

Para iniciar los estudios computacionales, se construyó una librería de 83 derivados de **HC-3** que habían sido previamente diseñados por nuestro grupo de investigación y que se encontraban registrados en la base de datos “Binding Database”⁶⁸ (**Figura 5.2** de la Parte Experimental). En dicha plataforma web pueden consultarse de forma gratuita los datos de afinidad e inhibición de los ligandos de casi 7000 dianas terapéuticas.

La actividad biológica de las 83 moléculas de la librería variaba de poco a muy activas de acuerdo a sus valores de CI_{50} obtenidos para líneas celulares cancerosas o

frente a la *HsChoK* parcialmente purificada de extractos celulares. La mayoría de las moléculas, al igual que el **HC-3**, contenían un grupo bifenilo como espaciador entre dos cabezas catiónicas, las cuales se adoptaron como criterio para clasificar a estos compuestos en simétricos o asimétricos (**Figura 4.1.2.a**). La mayoría de ellas presentaban cabezas catiónicas derivadas de la piridina y de la quinolina, a excepción de dos fragmentos de 3-quinuclidinol y 3-dimetilamino-1-propanol menos frecuentes. Concretamente, los derivados de piridina tenían el anillo aromático covalentemente unido a un nitrógeno terciario responsable de deslocalizar sus electrones.

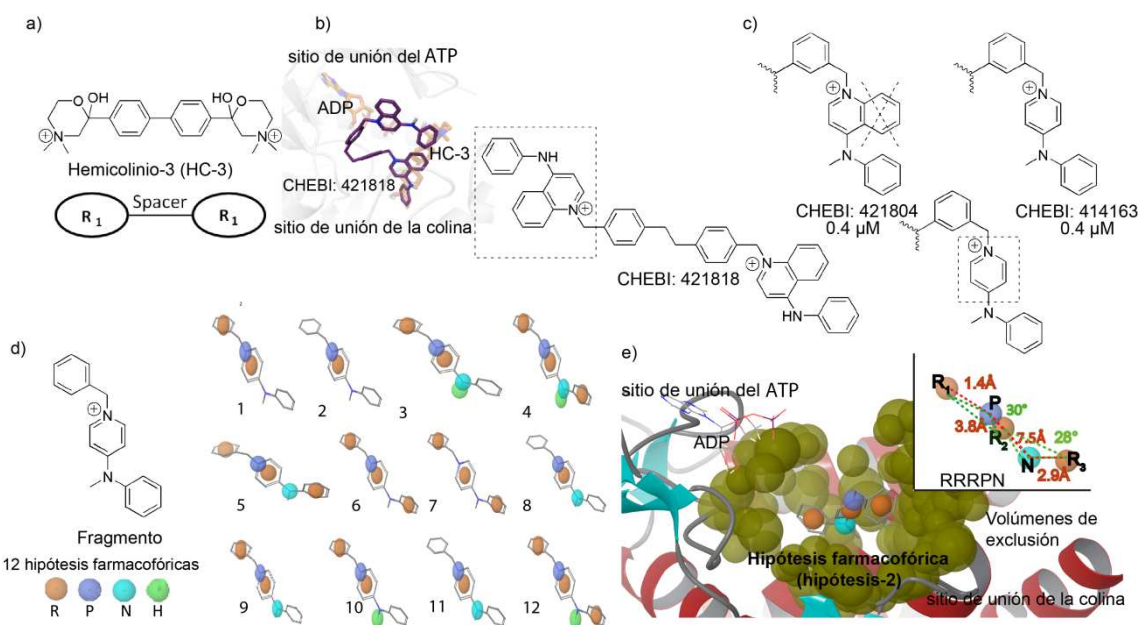


Figura 4.1.2. Diseño del farmacóforo. a) Estructura química general de los 83 derivados del **HC-3** que sirven como punto de partida del estudio. b) Pose adoptada en el estudio de docking por el compuesto **CHEBI 421818**. c) El anillo de fenilo condensado con la piridina no parece ser importante para la inhibición de la enzima. d) Combinaciones de los grupos farmacofóricos features (R: anillo, P: carga positiva, N: átomo de nitrógeno y H: resto hidrofóbico) para encontrar la mejor hipótesis farmacofórica (combinación 12, hipótesis-2). e) Farmacóforo con la nomenclatura RRRPN.

En una primera etapa, se llevó a cabo un estudio de docking de las moléculas de la librería en *HsChoKa1* (código PDB: **3G15**) para comprobar si había algún modo de unión a la enzima que fuera exclusivo de los compuestos activos, es decir, se intentaron identificar conformaciones características o residuos comunes con los que pudieran interactuar. Con esta primera aproximación, en caso de obtenerse un resultado favorable, se podrían diseñar nuevos potenciales inhibidores dirigidos hacia los residuos

diana. Sin embargo, los resultados no mostraron diferenciación alguna entre el modo de unión de los compuestos activos y de los inactivos, por lo que fue imposible relacionar las distintas actividades inhibitorias con el perfil de interacción de cada grupo.

En consecuencia, y debido al poco éxito de la estrategia anterior, se acometió una nueva aproximación basada en la identificación de un farmacóforo, que según la definición de Peter Gund del año 1977 es un “conjunto de rasgos estructurales en una molécula que son reconocidos en un receptor y que son responsables de la actividad biológica de esa molécula.”. Para esto, se intentó predecir qué grupos funcionales del **HC-3** podrían ser los responsables de su efecto inhibitorio, para lo cual se generó una primera hipótesis farmacofórica (hipótesis-1) que estaba constituida por 6 grupos químicos característicos del **HC-3** y que se denotó como RRDDAP (R: anillo aromático; D: donador de puentes de hidrógeno; A: aceptor de puentes de hidrógeno; P: carga positiva) (**Figura 4.1.3**).

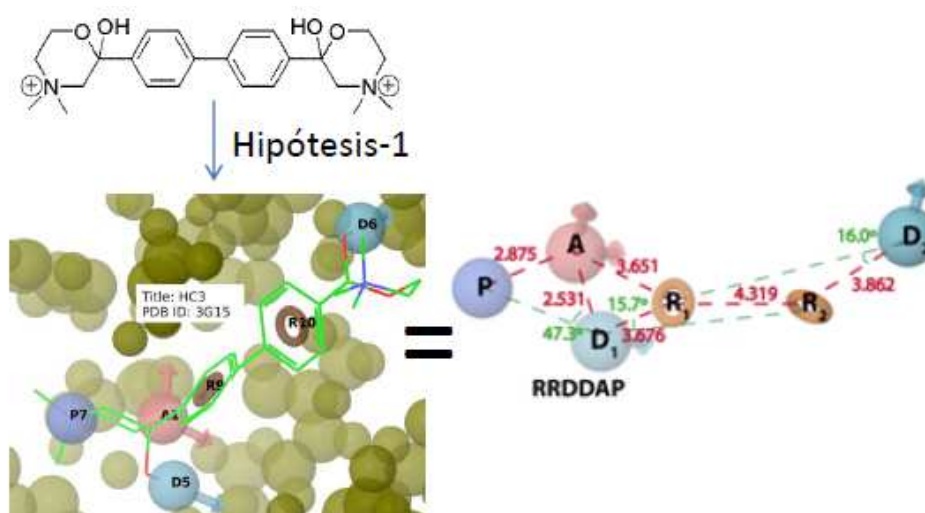


Figura 4.1.3. Esquema representativo de la hipótesis-1, basada en el **HC-3** y en los volúmenes de exclusión (representados como esferas verdes en el sitio de la colina).

Además de la definición de los hipotéticos grupos funcionales del farmacóforo, en este tipo de estudio computacional resulta conveniente incluir información relativa al sitio activo para tener en consideración a los residuos con los que interacciona el ligando y por tanto, para obtener resultados más fiables. Esto se consigue mediante la definición de volúmenes de exclusión,¹³⁵ que pueden definirse como el espacio del sitio activo donde no puede acceder ningún grupo funcional de un ligando para evitar

conflictos estéricos. En nuestro caso, los volúmenes de exclusión hacen referencia a la zona dentro del sitio de la colina que no puede ser ocupada por ningún grupo funcional de los ligandos de la librería. Tal y como se especificará en la Parte Experimental, en el cálculo computacional los volúmenes de exclusión se han definido como el espacio que queda entre una esfera de radio 5 Å con centro en el **HC-3** y los residuos del sitio activo. A pesar de tomar como precaución la definición de los volúmenes de exclusión, esta segunda estrategia resultó nuevamente infructuosa, puesto que la hipótesis sólo seleccionó 14 compuestos de la librería entre los que había además, compuestos inactivos que incluso se consideraron más similares al **HC-3** que los propios ligandos (activos) en base a su valor de *fitness score*. Este parámetro es indicativo del grado de concordancia química entre el farmacóforo propuesto y un determinado ligando, de modo que cuanto más positivo sea, más parecidos serán ambos y en consecuencia, si el farmacóforo incluye a los grupos funcionales responsables de la actividad del compuesto de referencia sobre la enzima (en nuestro caso el **HC-3**), cuanto más parecido sea el ligando que se está analizando (en nuestro caso los 83 compuestos de la librería), más probabilidad tendrá éste de ser activo. Por tanto, si una determinada hipótesis farmacofórica asigna a compuestos inactivos valores de *fitness score* mejores que los que le otorga a los compuestos activos, no será válida como hipótesis y habrá que probar con otras combinaciones de los grupos funcionales o partir de otra molécula de referencia.

En nuestro caso, dado que la hipótesis-1 fue incapaz de diferenciar a los compuestos activos de los inactivos, se llevó a cabo una tercera etapa de investigación donde se optó por elaborar una nueva hipótesis farmacofórica utilizando otra molécula de referencia. En concreto, la atención se focalizó en uno de los compuestos más activos de la librería, que demostró además tener una gran similitud química con el **HC-3**, ya que obtuvo la mejor puntuación de *fitness score* en la etapa anterior. Dicha molécula se denomina **364022**, según su código ChEMBL (Chemical European Molecular Biology Laboratory) y según la información recogida en el *Binding Database*, tiene un valor de CI_{50} de 2,3 µM (**Figura 4.1.2.b**). Además, tal y como sugirieron los estudios de docking realizados en la primera fase de este estudio, se une al sitio de la colina a través del fragmento de 1-bencil-4-(*N*-fenil)quinolinio, mientras que el resto de la molécula (la otra mitad) queda expuesta al disolvente (**Figura 4.1.2.b**). Esta observación permitió hipotetizar que probablemente el farmacóforo estuviera contenido en dicha mitad, por lo

cual se inició el estudio de la contribución de cada grupo funcional a la unión con la enzima. En primer lugar, se pretendió ver si el anillo de benceno condensado del grupo quinolina era indispensable. Para eso, se comparó el fragmento de 1-bencil-4-(*N*-fenil)quinolinio con la mitad de una pareja de compuestos similares que se diferenciaban exclusivamente en la presencia de dicho anillo. Esta pareja fue la constituida por los compuestos **CHEMBL-191595** y **CHEMBL-364145** (Figura 4.1.2.c), donde a juzgar por la igualdad de CI_{50} (0,4 μ M) dicho fenilo condensado no parecía hacer ninguna contribución a la actividad inhibitoria de los compuestos.

Por este motivo, se eligió el fragmento de 1-bencil-4-(*N*-metilanilino)piridinio para generar con sus grupos funcionales doce hipótesis (Figura 4.1.2.d) que se obtuvieron al combinar la carga positiva del anillo de piridina (grupo farmacofórico a), un grupo donador de puentes de hidrógeno (grupo farmacofórico b), un grupo alifático hidrofóbico (grupo farmacofórico c), y tres anillos aromáticos (grupos farmacofóricos d-f). De estas manipulaciones químicas saldría finalmente una segunda hipótesis farmacofórica (hipótesis-2) dotada de los elementos estructurales más importantes para la unión a la proteína (farmacóforo). Esta vez se consiguió explicar la actividad de 8 compuestos (4 activos y 4 inactivos) donde se diferenció claramente a los activos de los inactivos de acuerdo a las puntuaciones de fitness score (Tabla 4.1.1), de modo que los valores más positivos correspondieron a los compuestos de mejores valores de CI_{50} .

Tabla 4.1.1. Compuestos seleccionados por la hipótesis farmacofórica final. De acuerdo a sus valores de fitness score, los compuestos activos quedan posicionados en las primeras posiciones de la tabla, mientras que los inactivos aparecen a continuación, sin ser mezclados con los primeros.

CHEMBL, BDB	CI ₅₀ (μM)	Fitness
364145	0,400	0,366
191873	1,300	0,365
191595	0,400	0,363
364361	1,500	0,354

CHEMBL, BDB	CI ₅₀ (μM)	Fitness
349948	100,000	0,278
165437	100,000	0,204
349401	>1000,000	0,185
165570	136,700	0,185

En consecuencia, a partir de la hipótesis finalmente seleccionada, se propuso un modelo de farmacóforo a partir del fragmento de 1-bencil-4-(*N*-metilanilino)piridinio para los inhibidores de *Hs*ChoKα1. Dicho farmacóforo consta de 5 grupos funcionales que se unen de acuerdo a unos determinados valores de ángulo de enlace y distancias. Tales grupos funcionales son una carga positiva, un átomo de nitrógeno y tres grupos aromáticos, motivo por el cual el farmacóforo se designa como RRRPN (**Figura 4.1.2.e**).

4.2. Parte 2: Primera aplicación del farmacóforo: Cribado virtual (Virtual screening, VS)

Como se comentó anteriormente, el modelo de farmacóforo se usó de forma simultánea tanto para el cribado virtual de nuevos cabeza de serie en librerías de compuestos comercialmente disponibles, como para el diseño y la síntesis de nuevas moléculas con potencial capacidad inhibitoria de *HsChoK α 1* y actividad antiproliferativa en líneas tumorales caracterizadas por la sobreexpresión de nuestra diana. En este apartado se describirá el modo en el que se realizó el cribado virtual de tres librerías de compuestos comercialmente disponibles (Enamine, Chembridge y Life Chemicals) y cuáles fueron los resultados finalmente obtenidos (**Figura 4.2.1**).

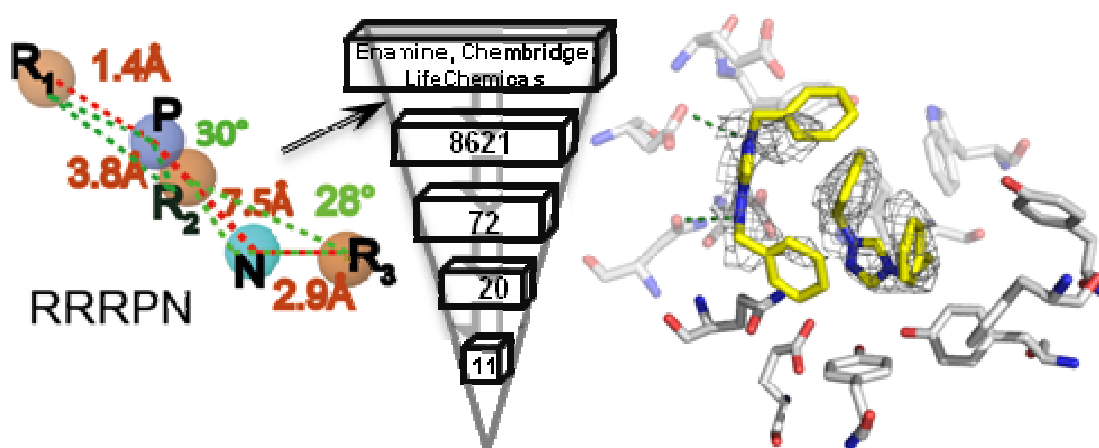


Figura 4.2.1. Aplicación del modelo de farmacóforo en el cribado virtual para la selección final de 11 compuestos y la cristalización de uno de ellos.

4.2.1. Experimentos de cribado virtual basados en el farmacóforo proporcionan nuevos prototipos con afinidad por *HsChoK α 1* que han sido validados mediante fluorescencia de triptófanos.

La mejor hipótesis farmacofórica (hipótesis-2 o farmacóforo) se utilizó en esta segunda etapa de búsqueda de compuestos simples y de reducido peso molecular con afinidad por ChoK. Para ello, se implementó un protocolo de cribado virtual^{136,137} constituido por tres fases de selección de estructuras (**Figura 4.2.2.a**).

En una primera fase, el farmacóforo se utilizó para seleccionar en las librerías Enamine, Chembridge y Life Chemicals nuevos prototipos químicamente similares a él. Como resultado de este primer cribado, se seleccionaron 8621 compuestos en total que quedaron reducidos a 72 después de elegir únicamente aquellos con un valor de fitness score superior a 0.366, que fue la puntuación obtenida por el compuesto activo más parecido al farmacóforo durante la etapa final del desarrollo de éste (**Tabla 4.1.1**).

A continuación, con estas 72 moléculas se llevó a cabo un estudio de docking en el sitio activo de la *HsChoK α 1* para seleccionar aquellas 20 cuya interacción energética con la enzima fuera la más estable. Para ello, se analizó el valor de “Prime MM-GBSA docking score” (menor de -36.790 Kcal/mol), que es un parámetro que se corresponde con un valor de energía que se le da a cada ligando en base a la intensidad de las interacciones de tipo hidrofóbico, electrostáticas, puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals que establece con los residuos del sitio activo. De esta forma, cuanto mayor sea la intensidad de dichas interacciones, menor será el valor de energía que se le asignará, puesto que mayor será la estabilidad del complejo que forma con la proteína. De este modo, cuanto más negativa sea la energía o *Prime MM-GBSA docking score*, teóricamente más afinidad mostrará el ligando por su diana.

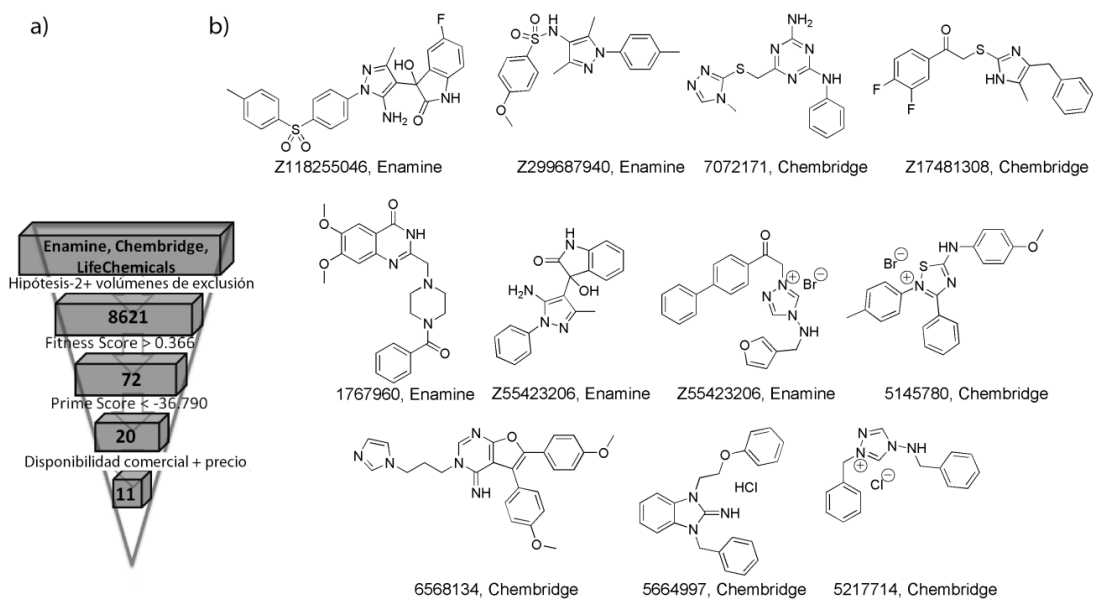


Figura 4.2.2. a) Etapas de selección de los hits. b) Compuestos finalmente seleccionados junto a sus códigos comerciales y las compañías donde fueron adquiridos.

Finalmente, de la lista resultante de 20 compuestos, sólo 11 se seleccionaron en una última fase donde se tuvo en cuenta su disponibilidad comercial y su precio (**Figura 4.2.2.b**).

En la siguiente etapa de la investigación, la actividad de los 11 compuestos finalmente seleccionados fue evaluada frente a la *HsChoKα1* usando espectroscopía de fluorescencia de triptófanos.¹³⁸ De estas moléculas, 6 se unieron a la enzima mostrando un valor de K_d s de entre 0,44 a 7,9 μM (**Figura 4.2.3** y **Tabla 4.2.1**).

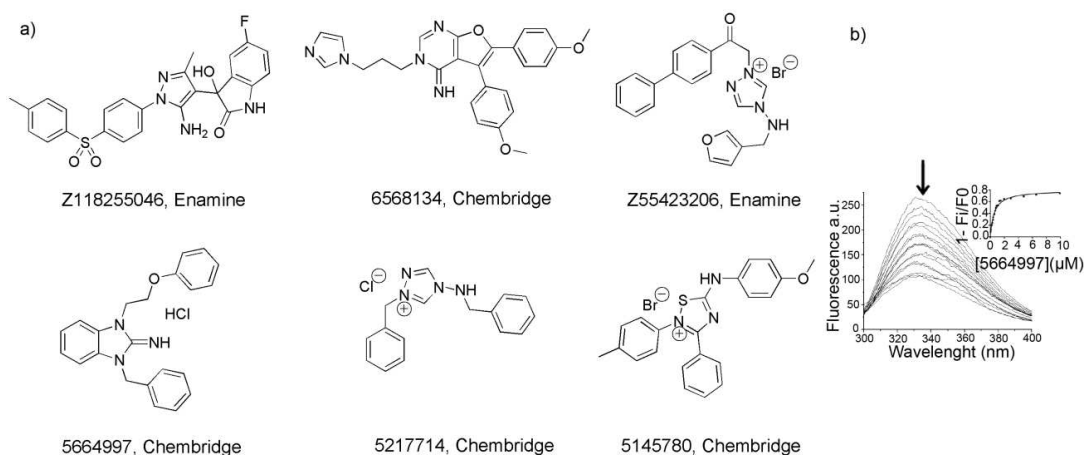


Figura 4.2.3. a) Compuestos que se unieron a *HsCKα1* con unos valores de K_d del rango de μM bajo. b) Extinción de la señal de fluorescencia de los triptófanos de *HsChoKα1* medida a concentraciones

crecientes del compuesto **5664997** como perfil representativo del resto de compuestos. La flecha negra indica la disminución de dicha señal.

Para evaluar la unión selectiva de estos compuestos a la isoforma *HsChoK α 1*, se llevaron a cabo los mismos experimentos, pero en la isoforma *HsChoK β* . Un trabajo reciente indica claramente que un efecto potente como anticancerígeno mediante la inducción de apoptosis únicamente puede conseguirse cuando se disminuye específicamente la expresión de *HsChoK α* sin afectar a los niveles de *HsChoK β* .¹³⁹ En consecuencia, es importante conseguir compuestos potentes y selectivos de *HsChoK α 1*. De acuerdo a los valores de K_d obtenidos, estos compuestos son selectivos frente a *HsChoK α 1*, siendo los compuestos **6568134** y **5664997** el menos y el más selectivo de todos, respectivamente (**Tabla 4.2.1**). La selectividad ha sido previamente explicada por una mayor flexibilidad del Trp420 en *HsChoK α 1* en comparación con una menor libertad de movimiento de su homólogo (Trp353) en *HsChoK β* .⁸⁵ Esto se debe a la localización de una leucina detrás del Trp420 en *HsChoK α 1* en vez de un residuo más voluminoso de tipo fenilalanina detrás del Trp353 en *HsChoK β* .

Otro importante rasgo característico de estos compuestos procede del análisis de sus valores de eficiencia (*Ligand efficiency*, L.E.)¹³⁷ en comparación con los que se les atribuyen a los derivados de **HC-3**. Esta propiedad se define como el cociente de la energía libre de Gibbs (ΔG) y el número de átomos distintos a hidrógeno de las moléculas e indica la contribución energética de cada uno de ellos en la unión a la enzima. Por este motivo, al tratarse de un término energético, cuanto más negativa sea la eficiencia, más contribuirán todos los átomos a la unión y en consecuencia, a la actividad del ligando. La mayoría de las moléculas de este estudio presentan mejor valor de eficiencia que compuestos previos más voluminosos y pesados, como el **HC-3**, el compuesto **1** (código PDB: **3ZM9**)⁸⁰ o el compuesto **2** (código PDB: **4BR3**)⁸⁸ (**Tabla 4.2.1**). En concreto, el compuesto **5664997** que es el que presenta mejor valor de K_d es la segunda molécula más eficiente con un valor de L.E. de -0,34 $K_{cal}/mol*\acute{a}tomo$ mientras que el compuesto **5217714** a pesar de tener un valor moderado de K_d , presenta una L.E. de -0,38 $K_{cal}/mol*\acute{a}tomo$, y en consecuencia es la molécula más eficiente (**Tabla 4.2.1**) de los prototipos. Una posible explicación al hecho de que tanto el **HC-3** como sus derivados muestren un peor valor de L.E., es que una parte considerable de su estructura se encuentra expuesta al disolvente sin establecer interacción con ningún residuo del sitio activo (**Figura 4.1.2.b**), tal y como indicaban el estudio de docking

realizado en la primera fase del diseño del farmacóforo y las estructuras cristalinas de los compuestos **1** y **2**.

Tabla 4.2.1 Valores de K_d de los 6 prototipos frente a *HsChoK α 1* y *HsChoK β* . Todos ellos son de 3 a 160 veces más selectivos para *HsChoK α 1* que frente a *HsChoK β* . El compuesto **566997** muestra la unión de mayor intensidad a la *HsChoK α 1*, la mayor selectividad para esta isoforma y es también uno de los compuestos con la mejor L.E. Si los prototipos se comparan con el **HC-3**, la mayoría de ellos son más eficientes en su unión a la proteína porque presentan el mejor valor de L.E.

	<i>HsChoKα1</i>	<i>HsChoKβ</i>	<i>HsChoKα1</i>	<i>HsChoKα1</i>
Compuesto (Proveedor)	K_d (μ M)	K_d (μ M)	Selectividad (K_d ChoK β) / (K_d ChoK α 1)	L.E. ($K_{cal}/mol^*\acute{a}tomo$)
5664997 (Chembridge)	0,438 \pm 0,1	70 \pm 9	160	- 0,34
Z744582706 (Enamine)	0,526 \pm 0,1	36,5 \pm 3,2	69	- 0,32
5217714 (Chembridge)	2,60 \pm 0,7	59,5 \pm 3,7	23	- 0,38
5145780 (Chembridge)	4,14 \pm 1,3	41,3 \pm 7,8	10	- 0,27
6568134 (Chembridge)	7,4 \pm 1,6	23 \pm 0,8	3	- 0,21
Z118255046 (Enamine)	7,9 \pm 0,5	68,3 \pm 2,3	9	- 0,20
HC-3	0,180 \pm 0,05			-0,26

4.2.2. Los ensayos biológicos muestran que el compuesto **5664997** es el más activo como agente antiproliferativo, mientras que el compuesto **5145780** es el mejor inhibidor de *HsChoK α 1*.

Los ensayos de fluorescencia detectan la unión de un ligando a su diana en base a la disminución de la señal fluorescente que emiten los residuos de triptófano, tirosina o fenilalanina cercanos al sitio donde el compuesto se una. A su vez, dicho decrecimiento es la manifestación de un cambio conformacional que dichos residuos sufren como consecuencia de la unión del ligando. No obstante, el ligando puede unirse a zonas accesibles de la proteína que sean ricas en los residuos anteriores o bien, en regiones alejadas que se comuniquen mediante alosterismo con las primeras (**Figura 4.2.4**).

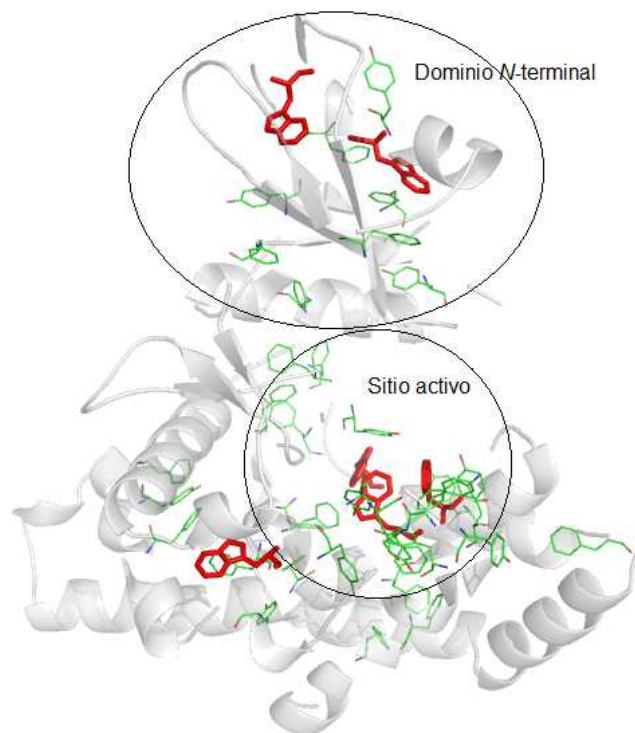


Figura 4.2.4. Zonas de *HsChoKα1* donde existen restos de triptófano, fenilalanina y tirosina. El aminoácido triptófano se muestran en rojo.

En nuestro caso, la espectroscopía de fluorescencia ha sido elegida como técnica para determinar la capacidad de unión de los compuestos candidatos a inhibidores de la *HsChoKα1* en el bolsillo hidrofóbico de la colina dada la abundancia de restos de triptófano, tirosina y fenilalanina en el sitio activo del enzima (Trp420, Trp423, Trp248, Tyr333, Tyr354, Tyr440, Phe437, Phe437). Los resultados mostrados en el apartado anterior, indican que para el caso de seis moléculas, existe disminución de la señal de fluorescencia, y en consecuencia, estas moléculas se unen a la *HsChoKα1*.

Para determinar si la unión se produce en el sitio activo y por tanto, para descartar que se dé en otras regiones donde existan residuos aromáticos o incluso en zonas carentes de los mismos donde tras la unión del ligando se produzca un cambio en el plegamiento de la proteína que se traduzca en una modificación conformacional del triptófano de cualquier parte, es necesario realizar ensayos de inhibición enzimática y cristalografía. La principal diferencia que la inhibición enzimática muestra con la espectroscopía de fluorescencia es que se realiza en presencia de los sustratos naturales del enzima y por tanto, una disminución de los niveles del producto de reacción será

debida a la interrupción de la catálisis por parte del ligando, que obviamente, estará ocupando el sitio activo o ejercerá un efecto alostérico sobre el mismo.

Los ensayos de inhibición enzimática frente a *HsChoK α 1* que se llevaron a cabo con los seis compuestos anteriores, indican que la máxima inhibición a la que dan lugar a una concentración de 50 μ M alcanza el 41 % para el compuesto **5145780**. En el resto de los casos, excepto para el compuesto de mayor K_d , se ronda el 20 % de inhibición a esta misma concentración (**Tabla 4.2.2**).

Tabla 4.2.2. Inhibición de **ChoK** (en el homogeneizado) y actividad antiproliferativa frente a la línea celular **HepG2** de los compuestos que mostraron unión a la enzima en los estudios de fluorescencia. Los datos de inhibición y de actividad antiproliferativa fueron calculados frente a concentraciones de 10 y 50 μ M del compuesto, no obstante, los datos a 10 μ M no se muestran debido a que no se observó ningún efecto.

Compuesto (Proveedor)	Inhibición <i>HsChoKα1</i> (%)	Actividad antiproliferativa HepG2 (%)	EC ₅₀ antiproliferativa (μ M)
5664997 (Chembridge)	23,25 \pm 5,27	Tóxico	
Z744582706 (Enamine)	18,85 \pm 3,15	47,43 \pm 0,70	74,27 \pm 4,71
5217714 (Chembridge)	15,24 \pm 4,75	nd	nd
5145780 (Chembridge)	40,58 \pm 0,21	48,05 \pm 4,63	72,88 \pm 8,41
6568134 (Chembridge)	11,71 \pm 3,92	37,80 \pm 2,00	88,78 \pm 11,27
Z118255046 (Enamine)	nd	nd	nd
nd: no detectable; el compuesto no mostró ningún efecto en el ensayo.			

Estos resultados junto con los valores de K_d en el rango de μ M bajo (**Tabla 4.2.1**), parecen indicar que los prototipos podrían haberse unido a una zona de la proteína distinta al sitio activo y que no son capaces de producir por alosterismo un cambio conformacional que impida la reacción catalítica. No obstante, otra explicación posible podría ser la existencia de estados intermedios de fosforilación de la enzima en presencia de ATP y Mg^{2+} que supongan un impedimento estérico para la unión de los compuestos al sitio activo. Esta segunda explicación estaría en concordancia con el segundo mecanismo de acción catalítico que Pollard y col. han propuesto recientemente para la *HsChoK α 1*.²⁷ En él se plantea una catálisis en varios pasos que se iniciaría con la unión del ATP y del Mg^{2+} al sitio activo y el posterior ataque del Asp306 al fosfato γ del nucleótido, quedando así la enzima fosforilada. En nuestro caso, como el ensayo implica una primera etapa de preincubación a 37°C de la enzima con el ATP, el Mg^{2+} y el inhibidor, y a continuación se inicia con la adición de [metil-¹⁴C]colina, antes de que

se añade la colina marcada (ver Parte Experimental, **sección 5.6.1.4**), el Asp306 ya habría desplazado al ligando del sitio activo en una determinada población de la proteína, con lo cual, la reacción catalítica tendría lugar y el efecto inhibitorio no sería muy notable. Con el objetivo de dilucidar cuál de las dos explicaciones podría ser la causa de la poca inhibición enzimática que se observa, se llevaron a cabo experimentos de cristalografía. La actividad antiproliferativa frente a HepG2 de los seis prototipos, a excepción de la del compuesto **5664997**, aunque es mayor que su potencia inhibitoria, ronda el 50 % de disminución de viabilidad celular a una concentración de 50 μM (**Tabla 4.2.2**). El compuesto **5664997** por su parte, muestra toxicidad en esta línea celular, pero sin embargo, se comporta como un agente antiproliferativo de EC_{50} en el rango de μM bajo en las líneas tumorales A549 (adenocarcinoma de pulmón), HT29 y HCT116 (adenocarcinoma colorrectal), MCF7 (adenocarcinoma de mama) y Jurkat (leucemia aguda de células T). En concreto, es especialmente potente frente a A549 y HT29 con una EC_{50} de $9,59 \pm 2,64 \mu\text{M}$ y $7,44 \pm 0,72 \mu\text{M}$, respectivamente (**Tabla 4.2.3** y **Figura 4.2.5**). La notable potencia como agente antiproliferativo del compuesto **5664997** frente a las líneas celulares A549 y HT29, no concuerda con los reducidos valores de inhibición enzimática obtenidos (23 % a 50 μM), lo cual indica un efecto inespecífico (*off-target*) sobre otras proteínas involucradas en procesos de muerte celular. El resto de compuestos no mostraron efecto en ninguna de las cinco líneas celulares cancerígenas previamente citadas.

Tabla 4.2.3. Estudios de actividad antiproliferativa del compuesto **5664997** en varias líneas celulares. Los valores de EC_{50} aparecen expresados como la media de tres experimentos independientes \pm S.D.

Compuesto	EC_{50} (μ M)				
	A549	HT29	HCT116	MCF7	Jurkat
5664997	$9,59 \pm 2,64$	$7,44 \pm 0,72$	$19,96 \pm 1,66$	$17,89 \pm 1,95$	$17,37 \pm 0,46$

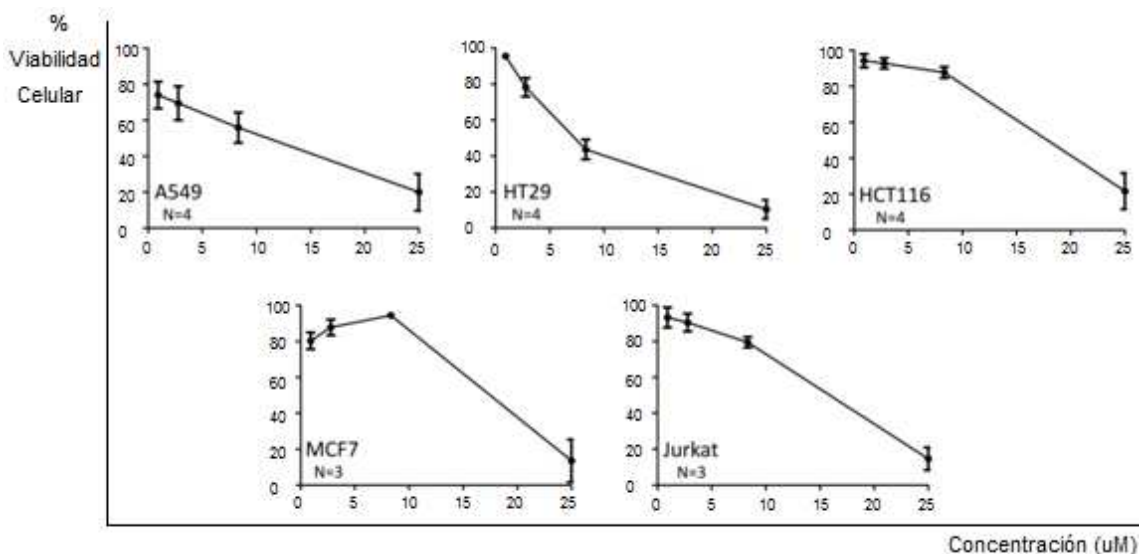


Figura 4.2.5. Disminución de la viabilidad celular en distintas líneas celulares frente a concentraciones crecientes del compuesto **5664997**.

4.2.3. El compuesto **5217714** se une a los sitios del ATP y de la colina.

A pesar de que los estudios de docking llevados a cabo durante el cribado virtual sugirieron claramente que los compuestos que muestran afinidad por la *HsChoKα1* se unían al sitio de la colina (**Figura 4.2.6**), los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición del enzima, plantearon dudas al respecto. En consecuencia, se llevaron a cabo estudios de cristalografía con los seis prototipos para tener evidencias experimentales sobre su sitio de unión.

A pesar del gran número de intentos llevados a cabo con cada uno de los seis compuestos anteriores, sólo se consiguió la estructura cristalina de *HsChoKα1* en complejo con el compuesto **5217714** con una resolución de 2,25 Å (**Figura 4.2.7** y **Tabla 4.2.4**).

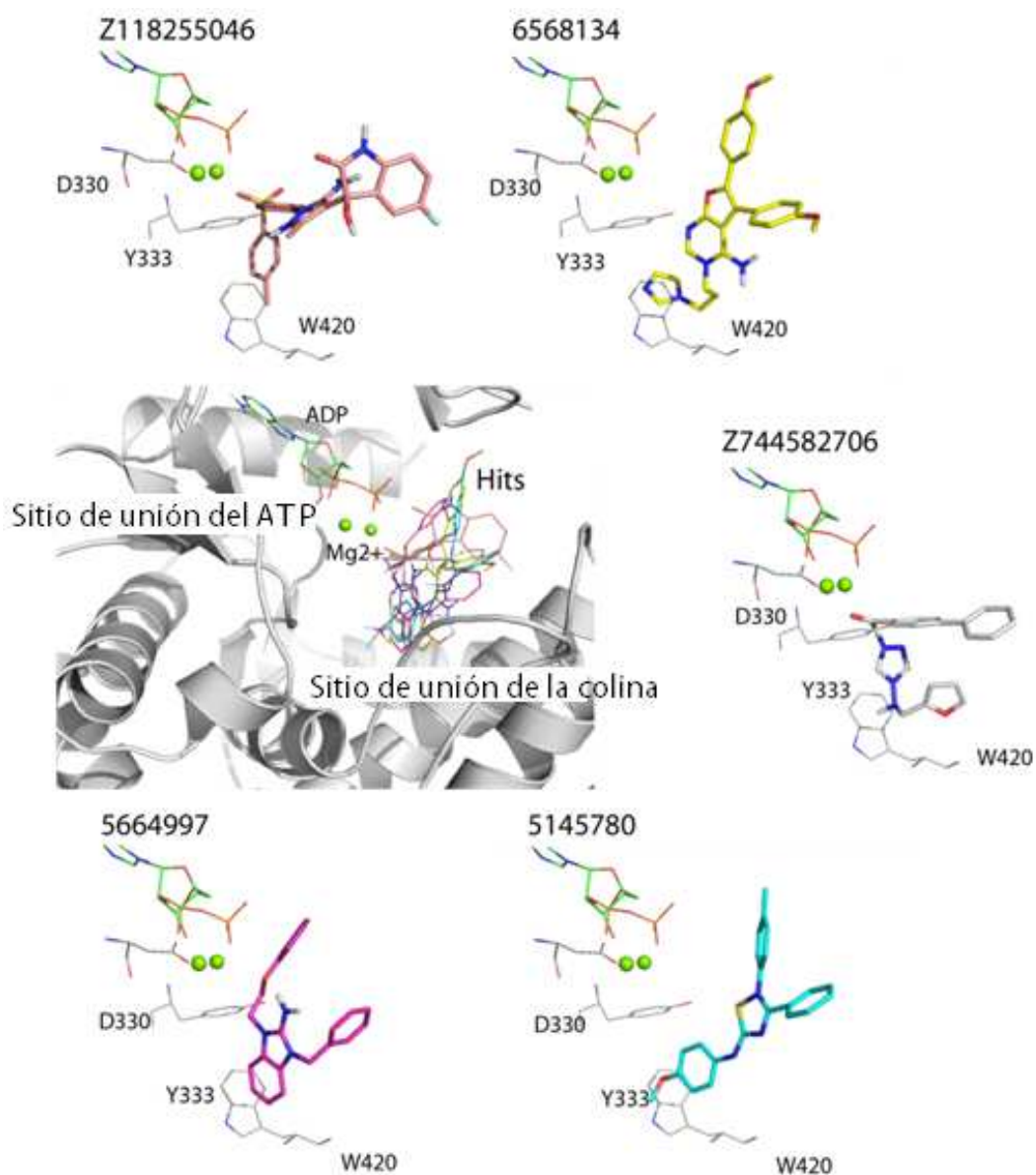


Figura 4.2.6. Pose adoptada en los estudios de docking por los prototipos. De acuerdo con los resultados obtenidos, todos parecen unirse al sitio de la colina.

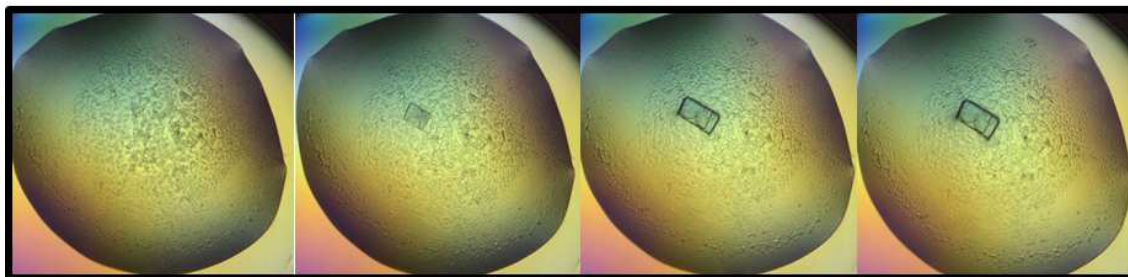


Figura 4.2.7. Imagen del crecimiento progresivo del cristal de *HsChoKα1* en complejo con el compuesto **5217714**.

El modelo final se obtuvo con una buena estadística ($R = 0,224$, $R_{\text{free}} = 0,268$ para *HsChoKα1/5217714*, **Tabla 4.2.4**) después de un proceso iterativo de construcción y refinado. La estructura cristalina es un dímero en el que cada monómero está constituido por un dominio pequeño *N*-terminal y un dominio *C*-terminal más grande. Mientras que el sitio de unión del ATP está localizado en una hendidura formada por los residuos de ambos dominios *N*- y *C*-terminal, el sitio de la colina se encuentra en un bolsillo profundo e hidrofóbico del dominio *C*-terminal. Sorprendentemente, dos moléculas del compuesto **5217714** fueron visualizadas en los sitios de la colina y del ATP en uno de los monómeros, mientras que sólo una molécula se identificó en el sitio de la colina del segundo monómero (**Figura 4.2.8.a**). Estas evidencias confirman que los prototipos procedentes del cribado virtual se unen al sitio activo de la *HsChoKα1*.

Tabla 4.2.4. Parámetros que caracterizan a la estructura cristalina de rayos X y estadísticas del proceso de refinado. Los valores entre paréntesis están referidos a la celdilla de mayor resolución.

<i>CKa1-5217714</i>		
Grupo espacial	P212121	<p><u>NOTA:</u> Las estadísticas del Ramachandran plot fueron determinadas con PROCHECK. El test de Ramachandran permite realizar la validación de la estructura 3D de una proteína en base a los ángulos diedros del esqueleto carbonado de los aminoácidos; cuando su valor no está permitido hay que modificar la conformación del aminoácido hasta dar con el ángulo diedro correcto. PROCHECK es una web de validación de la estereoquímica de las estructuras cristalinas que proporciona de forma gratuita el Instituto Europeo de Bioinformática.</p>
Longitud de onda (Å)	1,0507	
Resolución (Å)	132,39-2,25 (0,00006-0,19753)	
Dimensiones de la celda (Å)	$a = 56,13$ $b = 120,18$ $c = 132,39$	
Reflexiones	43397	
Completeness	99,9 (99,4)	
R_{sym}	0,058 (0,672)	
$I/s(I)$	34,8 (5,0)	
Redundancia	23,2 (14,0)	
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0,2242/ 0,2675	
RMSD de la geometría ideal, enlaces (Å)	0,013	
RMSD de la geometría ideal, ángulos (°)	1,544	
$\langle B \rangle$ proteína (Å ²)	44,30	
$\langle B \rangle$ 5217714 (Å ²)	83,27	
$\langle B \rangle$ disolvente (Å ²)	46,10	
$\langle B \rangle$ Etilenglicol (Å ²)	52,63	
Ramachandran plot:		
Más favorecidos (%)	96,38	
Permitidos (%)	2,61	
Prohibidos (%)	1,01	
Código PDB	5fav	

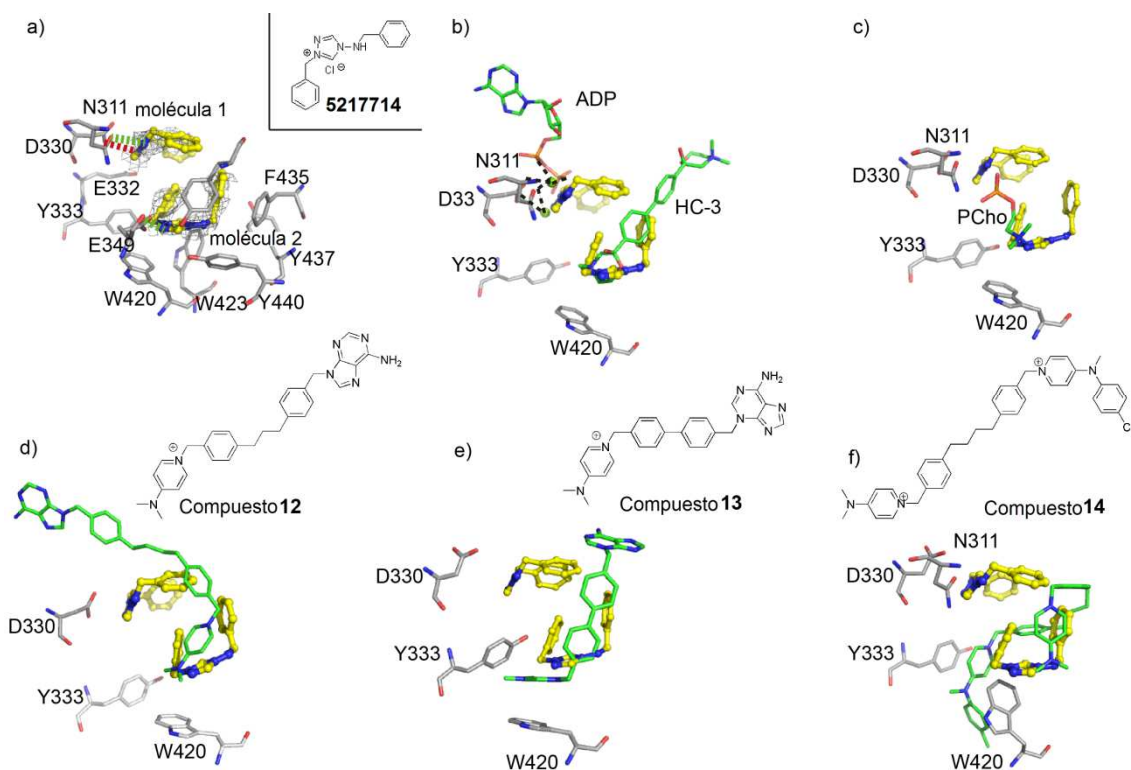


Figura 4.2.8. Estructura cristalina del complejo *HsChoKα1*/5217714. a) b) c) d) e) y f) Vistas de los compuestos 5217714, HC-3 y ADP (código PDB: 3G15), fosfocolina (código PDB: 2CKQ), compuesto 1 (código PDB: 3ZM9), compuesto 2 (código PDB: 4BR3) y compuesto 14 (código PDB: 4CG8) unidos al sitio activo de *HsChoKα1*, respectivamente. Los puentes de hidrógeno y las interacciones electrostáticas están representadas en líneas discontinuas verde y rosa, respectivamente.

La molécula 1, que es la que ocupa una localización profunda en el sitio de unión de la colina, también tiene una densidad electrónica mejor definida que la molécula 2 (Figura 4.2.8.a). La molécula 1 establece interacciones de tipo π - π con el Trp423 y la Phe435, una interacción catión- π con el Trp420 y un puente de hidrógeno con el Glu349 (Figure 4.10.a). La molécula 2 por su parte, establece interacciones electrostáticas con el Asp330 y un puente de hidrógeno con la Asn311 (Figura 4.2.8.a).

Gracias a estas interacciones, el compuesto 5217714 presenta dos modos de unión que permiten por un lado, competir con los átomos de magnesio (este metal se coordina por los residuos Asp330 y Asn311 y por los grupos fosfato del sustrato) y con los grupos fosfato del ADP (Figura 4.10.b), y por el otro, mimetizar la carga positiva presente en el HC-3⁸⁵, la colina/fosfocolina, y los derivados del HC-3 tales como el compuesto 1,⁸⁰ el compuesto 2⁸⁸ y el compuesto 14⁸⁹ (Figuras 4b, 4c, 4d, 4e y 4f). En todos estos compuestos la carga positiva es clave para mantener la interacción catión- π

con el Trp420. El compuesto **1** al igual que el compuesto **5217714** también se localiza en los sitios de unión del ATP y de la colina, y en consecuencia, según los cristales, ambos actuarían como inhibidores competitivos de ambos sustratos. Sin embargo, los ensayos de inhibición llevados a cabo con *HsChoK* α 1 demuestran que la potencia inhibitoria del compuesto **5217714** es muy débil, sugiriendo que su desplazamiento del sitio activo se produce tras la formación del intermedio enzimático fosforilado propuesto por Pollard y col. cuando la enzima se encuentra en presencia de ATP y Mg^{2+} .

A pesar de la precisión que los estudios de docking mostraron al indicar que los prototipos se unían al sitio de la colina, se observaron algunas desviaciones tras analizar una superposición de la pose adoptada en el docking del compuesto **5217714** con la que se obtuvo por cristalografía (**Figura 4.2.9**). Estas desviaciones hacen referencia al número de moléculas del compuesto que están presentes en el sitio activo, a la bioconformación del prototipo, como a la localización de su carga positiva dentro del bolsillo hidrofóbico, y a la rotación de algunos residuos importantes que están involucrados en la unión. En concreto, los estudios de docking son incapaces de predecir: a) la presencia de dos moléculas de compuesto **5217714** al sitio de la colina (**Figura 4.2.9.a**); b) su bioconformación *cis*, donde la distancia real entre los restos aromáticos es de 5,242 Å en vez de los 8,003 Å observados en el docking (**Figura 4.2.9.b**); c) la localización del nitrógeno cuaternario, que en la estructura cristalina está desviada 2,971 Å de la pose del docking (**Figura 4.2.9.b**) y d) la notable rotación de más de 40° que algunos residuos como el Asp330 (**Figura 4.2.9.c**) y el Trp420 (**Figura 4.2.9.d**) adoptan en la estructura cristalina. Todos estos datos tomados en conjunto son evidencias de las limitaciones actuales que presentan los programas de docking, y en consecuencia, deben de ser consideradas en la interpretación de cualquier resultado teórico.

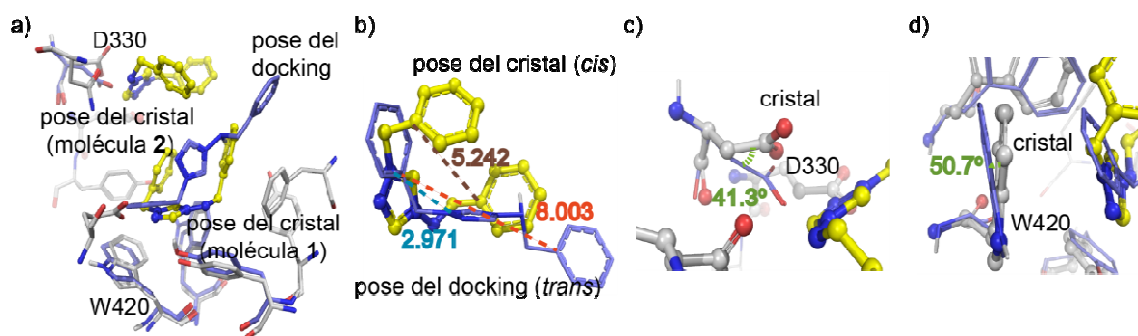


Figura 4.2.9. Diferencias en la pose del compuesto **5217714** obtenida tras los experimentos de docking y de cristalografía. Los residuos en la estructura cristalina están coloreados en gris, mientras que las poses predecidas por docking y cristalografía se muestran en azul y amarillo, respectivamente.

4.2.4. Conclusiones

ChoK juega un papel esencial en la biosíntesis de los fosfolípidos de la membrana celular durante la proliferación celular. En humanos la isoforma α se ha validado como diana terapéutica para el tratamiento del cáncer y en consecuencia, durante los últimos años un gran número de derivados del **HC-3** con actividad inhibitoria de *HsChoK α 1* han sido descubiertos. En general, estos compuestos tienen un elevado peso molecular, pero los grupos funcionales que son realmente importantes para la unión a la enzima y para su actividad biológica, aún no han sido dilucidados. Con el objeto de analizar los grupos químicos claves para la actividad de dichos derivados de **HC-3**, se ha llevado a cabo un estudio computacional donde se ha propuesto un modelo de farmacóforo formado por cinco entes químicos incluidos en el fragmento de 1-bencil-4-(*N*-metilnilino)piridinio. En una etapa posterior, este farmacóforo se ha usado para llevar a cabo un cribado virtual de varias librerías comerciales de compuestos que ha concluido con el descubrimiento de seis compuestos monocatiónicos de reducido peso molecular que presentan mejores eficiencias que los inhibidores previamente publicados. Aunque los estudios de docking sugieren la unión de estas seis moléculas al sitio de la colina, la estructura cristalina del complejo *HsChoK α 1*/**5217714** obtenida en la última fase del estudio, evidencia para este compuesto un mecanismo dual de competencia por ATP/Mg⁺² y colina. Sin embargo, la potencia como inhibidores frente a *HsChoK α 1* de los prototipos descubiertos es escasa, proponiéndose como causa, el desplazamiento del sitio activo que sufren por acción del Asp306 una vez que éste se fosforila. En conclusión, se ha propuesto un modelo de farmacóforo donde se incluyen los entes químicos esenciales que todo inhibidor de *HsChoK α 1* derivado del **HC-3** debe tener. Sin embargo, aunque el farmacóforo es condición necesaria en la búsqueda de nuevos inhibidores de *HsChoK α 1* simples y eficientes, parece no ser condición suficiente, y por

tanto, en el descubrimiento de nuevos ligandos que sean cabezas de serie para desarrollar nuevos agentes anticancerígenos también hay que tener en cuenta la fosforilación del Asp306.

4.3. Parte 3: Segunda aplicación del farmacóforo: optimización mediante síntesis química; obtención de nuevos derivados de HC-3

4.3.1. Consideraciones generales

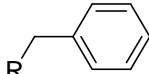
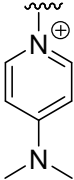
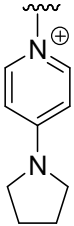
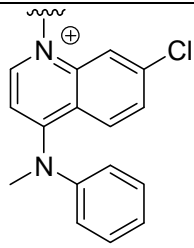
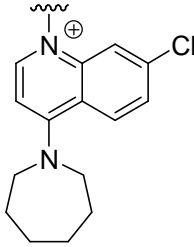
De forma paralela al cribado virtual, se sintetizaron nuevos compuestos derivados del farmacóforo donde están presentes todos o algunos de los cinco entes químicos (tres anillos aromáticos, carga positiva y nitrógeno disustituido) que lo definen y donde se introducen nuevos grupos funcionales mediante los que se mejora. La finalidad de este estudio es doble. Por un lado, se pretende optimizar el farmacóforo estudiando si alguno de los cinco grupos funcionales que lo definen es prescindible, para lo cual, se farmacomodulará el fragmento de 1-bencil-4-(*N*-metilanilino)piridinio. Por otra parte, se quiere conseguir un mayor grado de afinidad por la *HsChoK α 1* y en consecuencia, una mejor potencia inhibitoria y antiproliferativa que la mostrada por los prototipos procedentes del cribado virtual. En total, se han sintetizado 35 productos finales diseñados para interaccionar con la enzima a través del sitio de la colina, tal y como sucede con el farmacóforo. Se trata de sales de piridinio o quinolinio, de acuerdo a la naturaleza de su cabeza catiónica, que se engloban en tres familias, denominadas familia **A**, familia **B** y familia **C** en función de su espaciador y de la presencia o no de aminas terciarias como sustituyentes del mismo.

A continuación, se detallan las estructuras de los compuestos finales.

- *Familia A*

Dentro de esta familia (**Tabla 4.3.1**) distinguimos los derivados del bencilo y se contabilizan cuatro compuestos en función de si la cabeza catiónica sea derivada de piridina (4-(*N,N*-dimetilamino)piridina o 4-pirrolidinopiridina) o de quinolina (7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina o 7-cloro-4-(perhidrozepin-1-il)quinolina). Son los compuestos más sencillos sintetizados en la presente Tesis Doctoral y también los de estructura química más parecida al fragmento de 1-bencil-4-(*N*-metilanilino)piridinio.

Tabla 4.3.1. Compuestos finales de la familia A.

Compuesto	Espaciador	R
A.1		
A.2		
A.3		
A.4		

Las cabezas catiónicas son comunes para el resto de las familias y fueron elegidas en base a que: a) nos permiten estudiar si puede prescindirse del grupo fenilo unido al nitrógeno exocíclico del farmacóforo y si la fusión de un anillo de fenilo al de piridina optimiza el farmacóforo; b) han demostrado su idoneidad para el diseño de inhibidores de ChoK a lo largo de los últimos años (ver sección de “Antecedentes”). De este modo, se usarán cuatro cabezas catiónicas que son análogas entre sí (**Figura 4.3.1**).

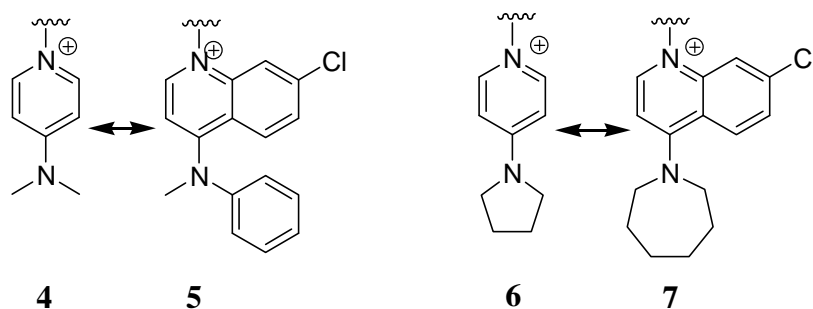


Figura 4.3.1. Cabezas catiónicas seleccionadas.

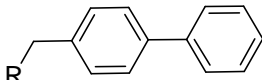
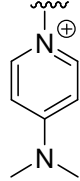
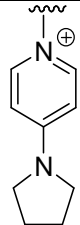
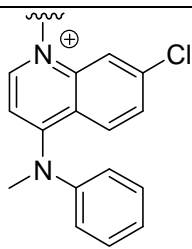
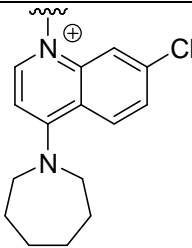
En consecuencia, con los compuestos derivados de piridina se llevará a cabo una farmacomodulación modulativa del farmacóforo, puesto que el fenilo del grupo *N*-metilanilino se sustituye por grupos saturados cíclicos. Sin embargo, en los derivados de quinolina, se realiza una mejora del farmacóforo mediante farmacomodulación conjuntiva, ya que se fusiona un grupo fenilo al anillo de piridinio. No obstante, la introducción de la 7-cloro-4-(perhidroazepin-1-il)quinolina como cabeza catiónica, implica además un proceso de farmacomodulación modulativa, ya que al igual que en los derivados de piridina, se sustituye el grupo fenilo del *N*-metilanilino del farmacóforo por un resto de perhidroazepino. Como resultado de todas estas transformaciones, de los cuatro compuestos finales de esta serie, los cinco grupos funcionales del farmacóforo se mantienen únicamente en el compuesto **A.3**, en el resto de los casos, son 4 los entes químicos conservados, puesto que no está presente el fenilo previamente mencionado.

Por un lado, se pretende estudiar si estas sencillas estructuras muestran afinidad por la enzima tal y como apuntaba el farmacóforo o si por el contrario, requieren de la introducción de más grupos funcionales para mejorar su unión. En caso de que se unan, otro de los objetivos es determinar las diferencias de afinidad entre los derivados de piridina y los de quinolina tanto en base al anillo de fenilo fusionado con la piridina, como a los sustituyentes del amino exocíclico en posición 4. El modo de unión de los compuestos de esta familia a la *HsChoKα1* se detallará en el apartado de cristalografía, donde se realiza el estudio del compuesto **A.2**. Por último, se quiere determinar su actividad inhibitoria *in vitro* tanto frente a la enzima como a distintas líneas celulares cancerosas.

- **Familia B**

En esta familia se incluyen los derivados del bifenilo y al usarse las mismas cabezas catiónicas que en la familia **A**, se obtuvieron cuatro compuestos finales (**Tabla 4.3.2**). En este caso, las estructuras se optimizaron mediante la introducción de un grupo fenilo más en el espaciador, con la intención de aumentar la afinidad por la enzima mediante interacciones de tipo π - π con los residuos aromáticos presentes en el sitio de la colina. Esta pequeña modificación, permitirá comparar la afinidad, la actividad inhibitoria y la capacidad antiproliferativa de estos derivados con los de la familia **A**. Los residuos del sitio activo con los que se establecen interacciones se detallarán en el apartado de cristalografía, donde se estudia el modo de unión del compuesto **B.2** a la *HsChoK α 1*.

Tabla 4.3.2. Compuestos finales de la familia **B**.

Compuesto	Espaciador	R
B.1		
B.2		
B.3		
B.4		

- *Familia C*

En la familia **C** también se engloban compuestos de estructura bifenílica, pero a diferencia de la familia B, en los compuestos de esta serie se ha insertado además una amina terciaria en posición *para* respecto a la cabeza catiónica (**Tablas 4.3.3-4.3.6**). De este modo, se han obtenido derivados bifenílicos asimétricos estructuralmente similares al **HC-3**, diseñados para que inserten los entes químicos del farmacóforo en el sitio de la colina y expongan la amina terciaria hacia el exterior del sitio activo (**Figura 4.3.2**). Así, se facilitaría la solvatación por el agua del medio y se formaría un complejo enzima-ligando de mayor estabilidad que en las familias anteriores.

De este modo, se distinguen cuatro subfamilias de compuestos, que son los estructuralmente más complejos de la presente Tesis Doctoral. Así, nos encontramos con las subfamilias: **C.1** para derivados de 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina; **C.2**, para los derivados de 4-pirrolidinopiridina; **C.3**, para la 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina; y **C.4**, para la 7-cloro-4-(perhidroazepin-1-il)quinolina.

Tabla 4.3.3. Compuestos finales de la subfamilia C.1.

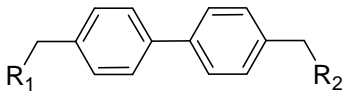
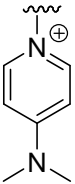

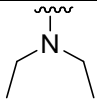
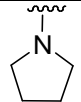
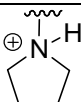
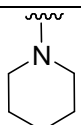
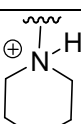
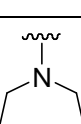
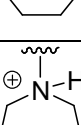
Compuesto	Espaciador	R ₁	R ₂
C.1.1			
C.1.2			
C.1.3			
C.1.4			
C.1.5			
C.1.6			
C.1.7			
C.1.8			

Tabla 4.3.4. Compuestos finales de la subfamilia C.2.

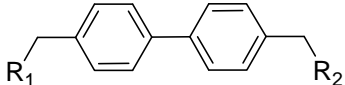

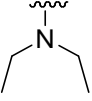
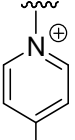
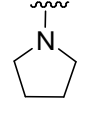

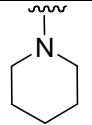
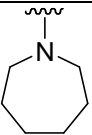
Compuesto	Espaciador	R ₁	R ₂	
C.2.1				
C.2.2				
C.2.3				
C.2.4				
C.2.5				

Tabla 4.3.5. Compuestos finales de la subfamilia C.3.

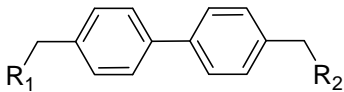
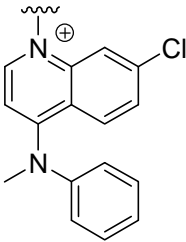


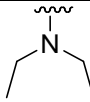
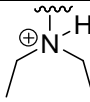
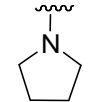
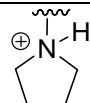
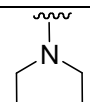
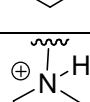
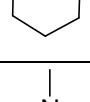
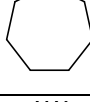
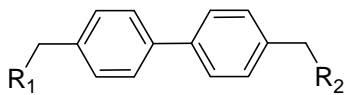
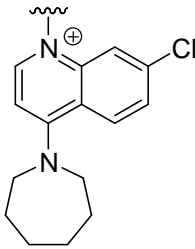


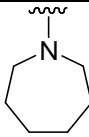
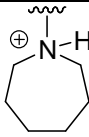
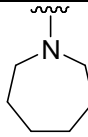
Compuesto	Espaciador	R ₁	R ₂
C.3.1			
C.3.2			
C.3.3			
C.3.4			
C.3.5			
C.3.6			
C.3.7			
C.3.8			
C.3.9			
C.3.10			

Tabla 4.3.6. Compuestos finales de la subfamilia C.4.

Compuesto	Espaciador	R ₁	R ₂	R
C.4.1				-Cl
C.4.2				-OCH ₃
C.4.3				-Cl
C.4.4				

En las subfamilias **C.1**, **C.2** y **C.3**, se incluyen cinco compuestos diferentes en función de la amina terciaria empleada (dimetilamina, dietilamina, pirrolidina, piperidina, perhidroazepina), mientras que en la subfamilia **C.4** sólo se sintetizaron los derivados de dimetilamina y de perhidroazepina. Durante la purificación de algunos compuestos de la familia **C**, se obtuvieron además los derivados protonados en la amina terciaria cuya formación fue espontánea durante el proceso de síntesis. En este caso, los compuestos son bifenílicos biscatiónicos y el efecto de la segunda carga positiva será estudiado en los apartados de fluorescencia y actividad biológica (inhibitoria de ChoK y antiproliferativa de distintas líneas celulares cancerígenas).

En el apartado de cristalografía, se detallará el modo de unión de los compuestos **C.2.1**, **C.3.1** y **C.3.4** a la *HsChoKα1*.

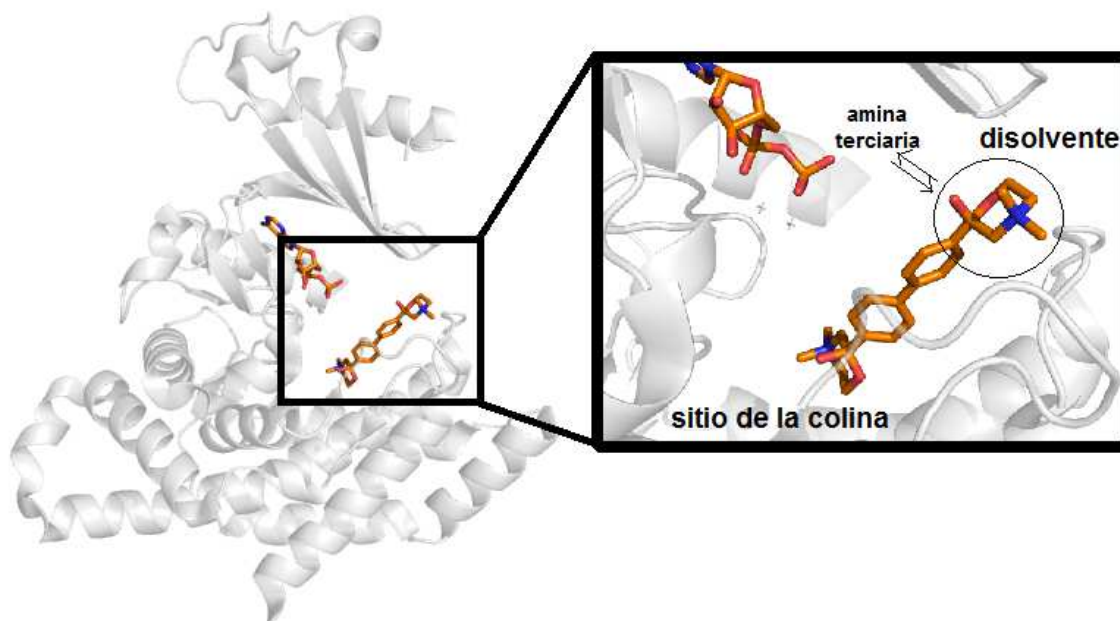


Figura 4.3.2. Estructura cristalina de *HsChoKa1* en complejo con **HC-3** (PDB ID: **3G15**).⁸⁵ Uno de los anillos de oxazonio está insertado en el sitio de la colina, mientras que el otro se dirige hacia el disolvente. Es este último el que se sustituye por una amina terciaria en los compuestos finales de la familia C.

4.3.2. Metodología sintética

Como se ha mencionado en las consideraciones generales, en el caso de las familias **A** y **B** las moléculas sintetizadas constan de dos partes bien diferenciadas: a) el espaciador; b) la cabeza catiónica; mientras que para el caso de la familia **C**, son tres las partes en que pueden dividirse: a) el espaciador; b) la cabeza catiónica y c) la amina terciaria.

El análisis retrosintético para las familias **A** y **B** es distinto al de la familia **C**, pero en los tres casos para la obtención del producto final se hace necesario sintetizar, en primer lugar, los espaciadores bromados y las cabezas catiónicas. Seguidamente, en el caso de la familia **C**, ambos se unirán con la amina terciaria correspondiente por uno de los dos restos bromados libres. Tanto la introducción de la cabeza catiónica, como de la amina terciaria, se llevan a cabo mediante una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2), la cual debe ser específica para un solo bromo en el caso de la familia **C**.

A continuación, se detallan los principales aspectos a considerar en el procedimiento sintético utilizado en cada familia.

- **Familias A y B:** el intermedio bromado comercial (bromometilfenilo o bromometilbifenilo) se pone en contacto unos 28 ó 33 minutos a elevada temperatura con el derivado de quinolina o piridina, respectivamente, usando 2-butanona como disolvente. La 2-butanona es el disolvente de elección porque gracias a su carácter aprótico evita que el nitrógeno heterocíclico de los anillos de piridina o quinolina forme puentes de hidrógeno con el disolvente que disminuyan su potencia nucleofílica y que reduzcan en consecuencia, el rendimiento de la reacción.
- **Familia C:** en este caso, la síntesis implica primero la formación del intermedio monocatiónico según el protocolo especificado con anterioridad por nuestro grupo de investigación⁷⁷ para posteriormente, introducir la amina terciaria en el bromo libre. Según el protocolo anterior, el intermedio monocuaternizado se obtiene usando como disolvente 2-butanona a temperatura ambiente en presencia de dos equivalentes del espaciador bisbrometilado por cada equivalente de la piridina o de la quinolina sustituida. Por otro lado, para la formación del producto final se usa como disolvente la dimetilformamida anhidra (DMF) en medio básico (carbonato potásico), a 70° C. Es este el disolvente de elección porque solubiliza totalmente al intermedio monocatiónico y a la amina, facilitando el ataque nucleofílico de la amina al grupo saliente. Por su parte, el carbonato potásico actúa como base débil, neutralizando las moléculas de ácido bromhídrico liberadas tras la S_N2.

4.3.3. Análisis espectroscópico

Todos los compuestos finales se han identificado por espectroscopía de RMN, tanto de ¹H (300, 400, 500 y 600 MHz) como de ¹³C (75, 125 ó 150 MHz) y espectrometría de masas de alta resolución (HRMS). Se han realizado también para cada familia, estudios de RMN bidimensional tipo HSQC y HMBC.

Para facilitar el análisis espectroscópico, los compuestos aparecen organizados por familias, tal y como se describe en el **apartado 4.3.1**. Los datos espectroscópicos de todos los compuestos finales aparecen recogidos en las **Tablas 4.3.1- 4.3.16** en ellas se muestran los valores de desplazamiento químico (δ) en ppm y entre paréntesis, la multiplicidad y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. La multiplicidad de señales se indica mediante las abreviaturas: s, singlete; d, doblete; dd, doble doblete; t, triplete; q, cuadruplete y m, multiplete.

Para cada familia se incluye un esquema con las estructuras y numeración de los productos finales. De esta forma, y para facilitar el análisis de los mismos, la estructura general de los compuestos de las familias **A** y **B** se divide en: a) cabeza catiónica y b) espaciador, mientras que para el caso de los compuestos de la familia **C**, su estructura se divide en tres fragmentos: a) la cabeza catiónica, b) el espaciador y c) la amina terciaria. La sal de piridinio se establece como la función principal de los compuestos y, por tanto, la numeración y nomenclatura se hace acorde a las reglas establecidas por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) en este caso.

4.3.3.1. Análisis espectroscópico de los derivados de bencilo. Familia A.

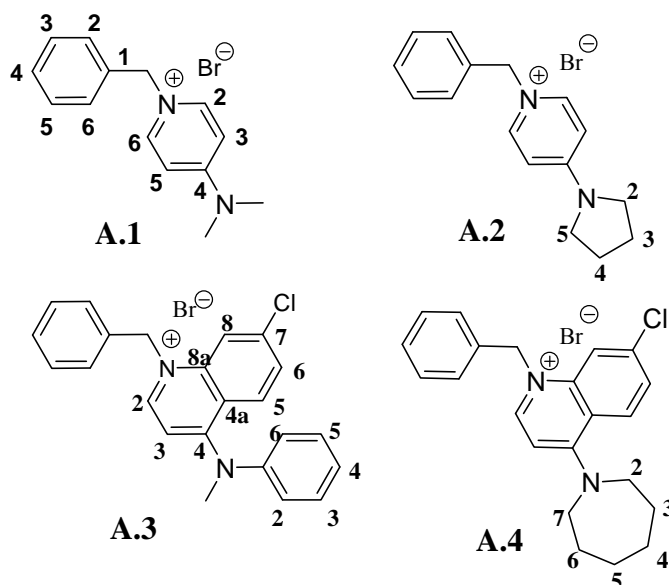


Figura 4.3.1. Estructura química de los compuestos de la familia A.

4.3.3.1.1. Análisis espectroscópico de ^1H -RMN.

Dentro de esta familia se presentan los compuestos finales A.1-A.4 (Figura 4.3.1), derivados del bencilo. Los datos espectroscópicos de ^1H -RMN, se muestran resumidos en las Tablas 4.3.1 y 4.3.2. Todos estos espectros se han realizado utilizando como disolvente metanol deuterado y son concordantes con las estructuras propuestas. La caracterización inequívoca de cada protón se ha realizado utilizando la espectroscopía bidimensional de tipo HSQC y HMBC (Ver Anexo). En esta última, se han establecido correlaciones protón-carbono a una distancia de dos enlaces. Los desplazamientos químicos que a continuación se presentan para los compuestos A.1 y A.2 coinciden con las recientemente publicados para ambos.⁸⁸ En la presente Tesis Doctoral se detalla la asignación de sus átomos de hidrógeno y de carbono tanto para ambos, como para el resto de compuestos de la familia.

En general, los espectros de ^1H -RMN analizados contienen tres zonas de resonancia de protones: a) zona aromática, correspondiente a los protones pertenecientes al anillo de piridina o quinolina (cabeza catiónica) y al fenilo (espaciador); b) zona alifática, donde se registran los protones del metileno unido al nitrógeno piridínico o quinolínico; y, c) zona alifática, donde se incluyen los sustituyentes en posición 4 del anillo de

piridinio o quinolinio (-R). Por lo general, se observa una gran conservación de los parámetros espectroscópicos en los 4 productos finales pertenecientes a esta serie.

En la zona aromática, debido a la diversa naturaleza química de los anillos de piridina y quinolina entre sí y de éstos con el fenilo, se hará primero el análisis de los protones pertenecientes a la cabeza catiónica y a continuación, el de los protones del fenilo. De este modo, inicialmente se describirán los átomos de hidrógeno de la piridina incluida en los compuestos **A.1** y **A.2** y a continuación, se analizará la quinolina de **A.3** y **A.4**.

En el caso de la piridina (compuestos finales **A.1** y **A.2**), los protones H-3,5_{ph} aparecen como un doblete (δ 6,87-7,01 ppm) debido al acoplamiento a corta distancia ($J = 7,7- 7,8$ Hz) con H-2,6_{ph}, que se muestran también como un doblete a campo más bajo (δ 8,21-8,23 ppm) debido al efecto desapantallante del nitrógeno cuaternario del anillo de piridinio.

En el caso de los átomos de hidrógeno del anillo de quinolinio (compuestos **A.3** y **A.4**), resuenan en orden de campo creciente de la siguiente manera: H-2_{quin}, H-5_{quin}, H-8_{quin}, H-6_{quin} y H-3_{quin}. Por otro lado, en el caso del compuesto **A.3**, los hidrógenos del anilino resuenan como un multiplete junto a H-3,5 y H-4 (δ 7,35-7,44 ppm). En ambos compuestos, el protón H-2_{quin}, es el más desapantallado de todos, ya que está influido por la carga positiva del nitrógeno y el efecto resonante del sistema aromático, apareciendo a δ 8,51-8,63 ppm como un doblete acoplado con H-3_{quin} con una constante de acoplamiento de 7,8-9,0 Hz. H-3_{quin} es el protón más apantallado del sistema quinolinico, apareciendo como un doblete a un desplazamiento químico de 6,88-6,89 ppm. H-8_{quin} aparece como un doblete, se acopla con H-6_{quin} y resuena a δ 7,98-8,08 ppm. Con este último hidrógeno, se acopla además H-5_{quin} que también aparece como un doblete, pero a campo más bajo que el H-8_{quin} debido al efecto desapantallante que ejercen sobre él tanto la carga positiva del nitrógeno cuaternario, como el nitrógeno del sustituyente en posición 4. H-6_{quin} por su parte, aparece como un doblete (δ 7,64-7,80 ppm) debido al acoplamiento a corta distancia con H-5_{quin} ($J = 1,6-1,9$ Hz) y a larga distancia con H-8_{quin} ($J = 9,0-9,2$ Hz).

Por su parte, las señales correspondientes a los átomos de hidrógeno del fenilo que actúa como espaciador, aparecen con distinta multiplicidad en función de la cabeza catiónica que incluya el compuesto final. De este modo, en los compuestos **A.1** y **A.2**, todos los protones del fenilo aparecen bajo una misma señal de tipo multiplete. Por el

contrario, en los derivados de quinolina (**A.3** y **A.4**), aparece a campos más altos una señal correspondiente a un multiplete (δ 7,28-7,30 ppm), donde se incluyen los hidrógenos H-2,6 según se muestra con la correlación a dos enlaces del grupo metileno ($-\text{CH}_2\text{N}^+$) en el espectro de HMBC (Ver Anexo). La multiplicidad de dicha señal indica que los protones H-2,6 además de acoplarse con los hidrógenos H-3,5, también pueden hacerlo con los protones del metileno vecino. El resto de átomos de hidrógeno del fenilo en ambos compuestos (H-3,5 y H-4) se engloban bajo un multiplete que aparece a campos más bajos (δ 7,35-7,44 ppm). Dado que la distancia que separa a ambos multipletes en el espectro de ^1H -RMN apenas alcanza las 0,05 ppm, se pone de manifiesto que H-2,6, H-3,5 y H-4 son protones muy parecidos, tal y como puede deducirse con el multiplete bajo el que todos quedan englobados en los compuestos **A.1** y **A.2**.

La segunda zona del espectro corresponde a los hidrógenos del metileno que une la cabeza catiónica con el espaciador ($-\text{CH}_2\text{N}^+$), los cuales resuenan como un singlete (δ 5,37- 5,82 ppm). Los desplazamientos a campos más bajos corresponden a los metilenos unidos a quinolina (δ 5,80-5,82 ppm), los cuales están más desapantallados que los unidos a piridina (δ 5,37-5,38 ppm).

Por último, en la zona alifática del espectro aparecen las señales correspondientes a los protones del sustituyente en posición 4 del anillo de piridinio o quinolinio. Los seis átomos de hidrógeno del sustituyente dimetilamino del compuesto **A.1** resuenan como un singlete a δ 3,26 ppm, de igual forma que el grupo metilo del *N*-metilanilino localizado en el compuesto **A.4** (δ 2,46 ppm); cuando el sustituyente es pirrolidino (compuesto **A.2**), H-2,5_{pirr} aparecen como un triplete por su acoplamiento a corta distancia con H-3,4_{pirr}, que resuenan como un multiplete a campo más alto (δ 2,12 ppm). De forma similar, en el caso del perhidroazepino del compuesto **A.3**, los protones H-2,7_{az}, aparecen como un triplete a campo más bajo (δ 4,09 ppm) que H-3,6_{az}, los cuales resuenan como multiplete a campo más bajo (δ 2,01- 2,08 ppm) que los protones más apantallados de este sustituyente, es decir, H-4,5_{az} (δ 1,72- 1,76).

Tabla 4.3.1. Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de ^1H -RMN de los compuestos finales derivados de bencilo **A.1-A.2**.

Comp.	H-2, ₆ _{pyr}	H-3, ₅ _{pyr}	R	H-2, ₆ _{ph}	H-3, ₅ _{ph}	H-4 _{ph}	-CH ₂ N ⁺
A.1	8,23 (d, 7,8)	7,01 (d, 7,8)	3,26 (s)	7,38- 7,44 (m)			5,38 (s)
A.2	8,21 (d, 7,7)	6,87 (d, 7,7)	2,12 (m, H-3, ₄ _{pirr}) 3,56 (t, 6,9, H-2, ₅ _{pirr})	7,38-7,45 (m)			5,37 (s)

Tabla 4.3.2. Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de ^1H -RMN de los compuestos finales derivados de bencilo **A.3-A.4**.

Comp.	H-2 _{quin}	H-3 _{quin}	H-5 _{quin}	H-6 _{quin}	H-8 _{quin}	R ₁	R ₂
A.3	8,62 (d, 9,0)	6,89 (d, 7,4)	8,55 (d, 7,5)	7,80 (dd, 1,9, 9,0)	8,08 (d, 1,9)	2,46 (s)	7,37- 7,44 (m, H- 2,6 _{ph} , H-2,3,4,5,6 _{anil})
A.4	8,51 (d, 7,8)	7,10 (d, 3,8)	8,37 (d, 9,2)	7,64 (dd, 1,6, 9,2)	7,98 (d, 2,0)	1,72- 1,76 (m, H-4,5 _{az}) 2,01- 2,08 (m, H-3,6 _{az}) 4,09 (t, 5,5, H-2,7 _{az})	

Tabla 4.3.2. Continuación.

Comp.	H-2, ₆ _{ph}	H-3, ₅ _{ph}	H-4 _{ph}	-CH ₂ N ⁺
A.3	7,29 (d, 6,9)	7,37- 7,44 (m)		5,82 (s)
A.4	7,29 (d, 6,9)	7,35- 7,43 (m)		5,80 (s)

4.3.3.1.2. Análisis espectroscópico de ^{13}C -RMN.

Los datos de desplazamiento químico de los carbonos de los compuestos **A.1-A.4** se recogen en las **Tablas 4.3.3** y **4.3.4**. Los espectros de ^{13}C y DEPT han permitido determinar los carbonos cuaternarios y secundarios, mientras que como ya se ha citado previamente, los estudios de HSQC y las correlaciones a dos enlaces en el espectro de HMBC, han posibilitado la asignación inequívoca de cada protón con su carbono en cada molécula. Al igual que los espectros de ^1H -RMN, todos los espectros anteriormente enumerados se han realizado utilizando como disolvente metanol deuterado.

En los espectros de ^{13}C -RMN, se distinguen dos zonas: a) zona aromática, correspondiente a los carbonos pertenecientes al anillo de piridina o quinolina y al fenilo; b) zona alifática, donde se incluyen el metileno unido al nitrógeno piridínico o quinolínico; y los sustituyentes en posición 4 del anillo de piridinio o quinolinio (-R; dimetilamina, pirrolidina, N-metilanilino o perhidroazepina).

En el caso de los compuestos **A.1** y **A.2**, la señal que aparece a campo más bajo se corresponde con el carbono cuaternario de la piridina. Se observa que cuando el sustituyente en dicho carbono es dimetilamino, la señal correspondiente a este carbono presenta mayor desplazamiento (156,75 ppm) que cuando el sustituyente es pirrolidino (153,84 ppm). En cuanto al resto de átomos de carbono de dicho anillo, C-2,6_{pyr} muestran menor desplazamiento (107,74-108,28 ppm) que C-3,5_{pyr}, que aparecen a campo más bajo (141,51- 141,73 ppm).

En el caso de los derivados de quinolina (compuestos **A.3** y **A.4**), se aprecia primero la señal correspondiente a los carbonos sobre los que se ejerce un mayor efecto inductivo $-I$ por parte del nitrógeno cuaternario, el cloro en posición 7 o el nitrógeno del grupo sustituyente de la posición 4. De este modo, los carbonos quinolínicos donde se ejerce un mayor efecto $-I$ por orden decreciente son: C-4_{quin} > C-2_{quin} > C-7_{quin} (8a_{quin} en el caso del compuesto **A.4**) > C-8a_{quin} (C-7_{quin} en **A.4**) > C-6_{quin} (C-5_{quin} en **A.4**) > C-5_{quin} (C-6_{quin} en **A.4**) > C-8_{quin} (C-4a_{quin} en **A.4**) > C-4a_{quin} (C-8_{quin} en **A.4**) > C-3_{quin}. En consecuencia, C-3_{quin} es el carbono más apantallado de todos los aromáticos en ambos compuestos (δ 100,48- 106,49 ppm). Todos los carbonos del grupo anilino del compuesto **A.3**, aparecen a campo más bajo (δ 129,03-138,52 ppm) que los carbonos del grupo fenilo (δ 125,17 – 134,20 ppm). Además, en este compuesto, los carbonos C-3,5 y C-3,5_{anil} pueden ser intercambiables por falta de correlaciones en el espectro de HMBC que permitan identificarlos inequívocamente (ver **Tabla 4.2.4**). En el compuesto **A.3** los carbonos cuaternarios más desapantallados son por orden decreciente: C-7_{quin} > C-8a_{quin} > C-1_{anil} > C-1 > C-4a_{quin}, mientras que en el compuesto **A.4** son: C-8a_{quin} > C-7_{quin} > C-1 > C-4a_{quin}. Como puede apreciarse, el carbono C-4a_{quin} es el menos desapantallado de todos los cuaternarios..

Respecto a los carbonos aromáticos del grupo fenilo cabe destacar que en los derivados de piridina y también en el compuesto **A.4** aparecen todos correlativamente en un rango del espectro comprendido entre 127,84 y 130,38 ppm, de tal manera que los carbonos más apantallados son los C-3,5 seguidos del C-4 y por último, de los C-2,6. En **A.1** y **A.2**, estos carbonos aparecen en la región del espectro delimitada por las señales de C-1 a campo bajo y por la de C-3,5_{pyr} a campo más alto, mientras que en **A.3**, a campos bajos se encuentra el C-5_{quin} y a campo más alto, el átomo C-6_{quin}. En el caso del compuesto **A.3**, también aparecen en este orden, pero entre las señales de los carbonos C-4 y los átomos C-2,6 se encuentra el carbono C-6_{quin}.

En la zona alifática del espectro, aparecen las señales correspondientes a los carbonos metilénicos $-\text{CH}_2\text{N}^+$ (57,64-60,38 ppm). Igualmente, se registran las señales de los átomos de carbono correspondientes a los sustituyentes en posición 4 del anillo de piridinio o quinolinio. Los dos carbonos del sustituyente dimetilamino dan una señal a δ 38,98 ppm, mientras que el carbono del grupo metilo del compuesto **A.3**, se localiza a campo más alto (δ 19,82 ppm). En el sustituyente pirrolidino, la señal correspondiente a C-2,5_{pirr}, se localiza a campo más bajo (δ 48,30 ppm) que la señal de C-3,4_{pirr} (δ 24,76 ppm). Por último, el desplazamiento químico de los carbonos del grupo perhidroazepino que aparecen a campo más bajo es de 55,23 ppm para los carbonos C-2,7_{az}, seguidos por los carbonos C-3,6_{az} (δ 28,29 ppm), siendo los carbonos C-4,5_{az} los que se localizan a campo más alto (δ 27,63 ppm).

Tabla 4.3.3. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN de los compuestos finales derivados de bencilo **A.1**-**A.2**.

Comp.	C-2,6 _{pyr}	C-4 _{pyr}	C-3,5 _{pyr}	R	C-1 _{ph}	C-2,6 _{ph}	C-4 _{ph}	C-3,5 _{ph}	$-\text{CH}_2\text{N}^+$
A.1	141,73	156,75	107,74	38,98	134,79	127,93	128,88	129,06	60,38
A.2	141,51	153,84	108,28	24,76 (C3,4 _{pirr}) 48,30 (C2,5 _{pirr})	134,96	127,84	128,81	129,00	60,38

Tabla 4.3.4. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN de los compuestos finales derivados de bencilo **A.3**-**A.4**.

Comp.	C-2 _{quin}	C-3 _{quin}	C-4 _{quin}	C-5 _{quin}	C-6 _{quin}	C-7 _{quin}	C-8 _{quin}	C-4a	C-8a
A.3	147,65	100,48	155,98	125,63	127,71	140,67	124,02	123,51	139,38
A.4	146,16	104,25	160,68	131,52	126,53	140,94	118,85	118,94	142,06

Comp.	R ₁	R ₂	C-1 _{ph}	C-2,6 _{ph}	C-4 _{ph}	C-3,5 _{ph}	$-\text{CH}_2\text{N}^+$
A.3	19,82 (CH ₃)	125,17 ^a (C-3,5 _{anil}) 129,86 (C-4 _{anil}) 130,47 (C-2,6 _{anil}) 138,52 (C-1 _{anil})	134,20	126,38	128,48	129,03 ^a	57,64
A.4		27,63 (C-4,5 _{az}) 28,29 (C-3,6 _{az}) 55,23 (C-2,7 _{az})	135,68	127,86	129,76	130,38	58,44

^a: intercambiables

4.3.3.1.3. Análisis de espectrometría de masas HRMS.

El análisis de HRMS muestra una concordancia perfecta entre los valores calculados para las fórmulas empíricas $(\text{M}-\text{Br})^+$ de los compuestos de esta familia y los correspondientes valores encontrados:

A.1: calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2^+$: 213,1392; encontrado: 213,1387.

A.2: calculado para $C_{16}H_{19}N_2^+$: 239,1548; encontrado: 239,1542.

A.3: calculado para $C_{23}H_{20}N_2Cl^+$: 359,1315; encontrado: 359,1306.

A.4: calculado para $C_{22}H_{24}N_2Cl^+$: 351,1628; encontrado: 351,1631.

4.3.3.2. Análisis espectroscópico de los derivados de bifenilo. Familia B.

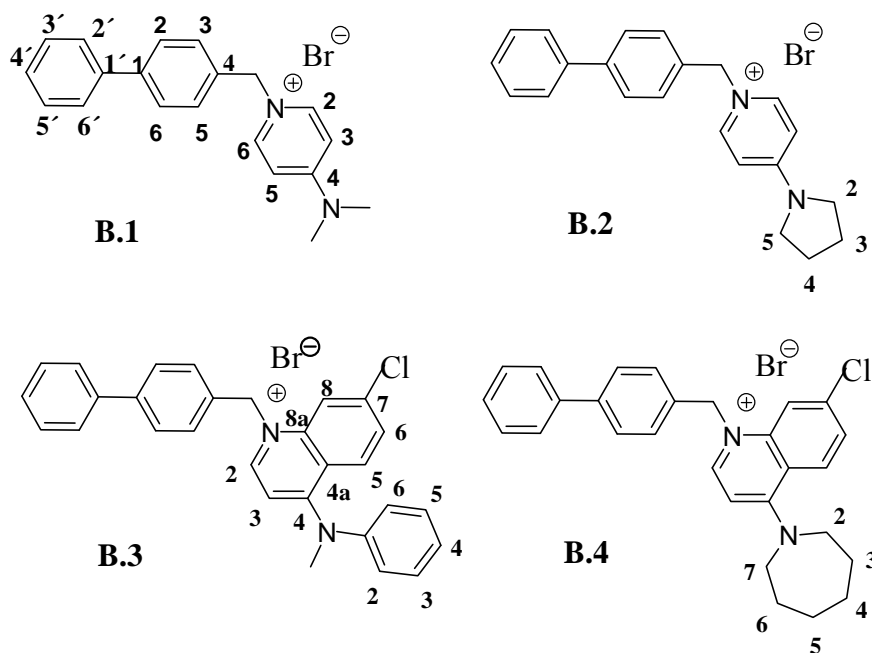


Figura 4.3.2. Estructura química de los compuestos finales de la familia B.

4.3.3.2.1. Análisis espectroscópico de ^1H -RMN.

Dentro de esta familia se presentan los compuestos finales **B.1-B.4**, derivados del bifenilo. Los datos espectroscópicos de ^1H -RMN, se muestran resumidos en las **Tablas 4.3.5** y **4.3.6**. Todos estos espectros se han realizado utilizando como disolvente metanol deuterado y son concordantes con las estructuras propuestas. La identificación de cada protón se ha realizado utilizando el análisis bidimensional de HSQC, las correlaciones a dos enlaces en el espectro de HMBC (Ver Anexo) y la asignación recientemente publicada para el compuesto **B.1**.⁸⁸

Al igual que en los compuestos finales de la familia **A**, en los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **B.1-B.4** se pueden identificar tres zonas de resonancia de protones: a) zona aromática, correspondiente a los protones pertenecientes al anillo de piridina o quinolina y al bifenilo; b) zona correspondiente al metileno unido al nitrógeno piridínico o quinolínico; y, c) zona alifática, donde se incluyen los sustituyentes en posición 4 del anillo de piridinio o quinolinio (-R). Debido a la conservación de las zonas b y c entre los compuestos finales de las familias **A** y **B**, en este apartado sólo se comentará la zona a. Para obtener datos acerca de los parámetros espectroscópicos de las zonas b y c, consultar **sección 4.2.3.1.1** y **Tablas 4.2.5** y **4.2.6**.

En el caso de los compuestos **B.1** y **B.2**, los átomos de hidrógeno del espaciador bifenílico resuenan en la zona del espectro comprendida entre las señales de tipo doblete de los hidrógenos H-2,6_{pyr} a campo más bajo (δ 8,24-8,26 ppm) y H-3,5_{pyr} a campo más alto (δ 6,87- 7,02 ppm). Sin embargo, para el caso de los compuestos **B.3** y **B.4** dichos protones aparecen en la zona del espectro delimitada por el doblete del átomo de hidrógeno H-6_{quin} a campo más bajo (δ 7,62-7,84 ppm) y por el doblete del protón H-3_{quin} a campo más alto (δ 6,94-7,12 ppm). En todos los casos, los protones del espaciador bifenílico que presentan un desplazamiento químico a campos más bajos (δ 7,66-7,69 ppm) son los más internos (H-2,6, H-2',6') y en concreto, los hidrógenos H-2,6, debido al desapantallamiento que experimentan por parte tanto del fenilo vecino como del nitrógeno cuaternario. Las señales a las que dan lugar en el espectro las dos parejas de protones anteriores son dos dobletes ($J = 8,2-8,4$ Hz), ya que ambos se acoplan con los protones vecinos (H-3,5 y H-3',5', respectivamente). No obstante, en el caso del compuesto **B.4**, H-2,6 y H-2',6' se solapan entre sí y con la señal de H-6_{quin}, dando lugar a un multiplete. Por su parte, los protones H-3,5 y H-3',5' aparecen en todos los casos como un multiplete a campos más altos que H-2,6 y H-2',6'. Tal multiplicidad es el resultado del acoplamiento de H-3,5 con los protones del metileno vecino, mientras que por su parte H-3',5' se acopla con H-4' y con H-2',6'. Por su parte, el protón más apantallado del bifenilo es el H-4' que aparece como triplete ($J = 7,4$ Hz) en los compuestos **B.1** y **B.2** o como multiplete en los dos compuestos restantes debido al solapamiento de su señal con el multiplete de H-3,5 y H-3',5'. En el compuesto **B.3**, bajo este multiplete registrado inmediatamente antes del protón H-3_{quin} también se incluyen los protones del grupo anilino. Por último, también merece la pena comentar que en **B.3** y **B.4** el resto de protones de la quinolina aparecen a campos más bajos que el H-6_{quin}, y de campos más a menos bajos, el orden sería el que se presenta a continuación: H-2_{quin} > H-5_{quin} > H-8_{quin} > H-6_{quin}. En el caso del compuesto **B.3**, el H-5_{quin} se solapa con el H-2_{quin} en el mismo doblete.

Tabla 4.3.5. Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de ^1H -RMN de los compuestos finales derivados de bifenilo **B.1-B.2**.

Comp.	H-2,6 _{pyr}	H-3,5 _{pyr}	R	H-2,6 _{ph}	H-3, 5 _{ph}
B.1	8,26 (d, 7,8)	7,02 (d, 7,8)	3,26 (s)	7,69 (d, 8,2)	7,51- 7,40 (m)
B.2	8,24 (d, 7,8)	6,87 (d, 7,8)	2,12 (q, 6,8, H-3,4 _{pirr}) 3,56 (t, 6,9, H-2,5 _{pirr})	7,68 (d, 8,4)	7,43- 7,48 (m)

Tabla 4.3.5. Continuación.

Comp.	H-2', 6 _{ph}	H-3',5' _{ph}	H-4' _{ph}	-CH ₂ N ⁺
B.1	7,61 (d, 7,4)	7,51- 7,40 (m)	7,36 (t, 7,4)	5,42 (s)
B.2	7,61 (d, 8,2)	7,43- 7,48 (m)	7,35- 7,37 (m)	5,41 (s)

Tabla 4.3.6. Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de ^1H -RMN de los compuestos finales derivados de bifenilo **B.3-B.4**.

Comp.	H-2 _{quin}	H-3 _{quin}	H-5 _{quin}	H-6 _{quin}	H-8 _{quin}	R ₁	R ₂
B.3	8,63 (d, 8,5)	6,94 (d, 7,5)	8,63 (d, 8,5)	7,84 (dd, 1,9, 9,1)	8,17 (d, 1,8)	2,47 (s)	7,37- 7,48 (m, H-3,5, H-3',5', H-4', H-2-6 _{anil})
B.4	8,55 (d, 7,8)	7,12 (d, 7,8)	8,37 (d, 9,2)	7,58- 7,66 (m)	8,06 (d, 2,0)		1,63- 1,77 (m, 4H, H-4 _{az} , H-5 _{az}) 2,06- 2,10 (m, 4H, H-3 _{az} , H-6 _{az}) 4,07 (t, 5,6, 4H, H-2 _{az} , H-7 _{az})

Tabla 4.3.6. Continuación.

Comp.	H2,6 _{ph}	H-3,5 _{ph}	H-2',6' _{ph}	H-3',5' _{ph}	H-4' _{ph}	-CH ₂ N ⁺
B.3	7,67 (d, 8,3)	7,37- 7,48 (m)	7,60 (d, 7,2)	7,37- 7,48 (m)	7,37- 7,48 (m)	5,87 (s)
B.4	7,58- 7,66 (m)	7,31- 7,44 (m)	7,58- 7,66 (m)	7,31- 7,44 (m)	7,31- 7,44 (m)	5,81 (s)

4.3.3.2.2. Análisis espectroscópico de ^{13}C -RMN.

Los datos de desplazamiento químico de los carbonos de los compuestos **B.1-B.4** se recogen en las **Tablas 4.3.7** y **4.3.8**. Los espectros de ^{13}C y DEPT han permitido determinar los carbonos cuaternarios y secundarios, mientras que los estudios de HMBC y HSQC previamente citados, han posibilitado la asignación inequívoca de cada protón con su carbono. Al igual que los espectros de ^1H -RMN, todos estos espectros se han realizado utilizando como disolvente metanol deuterado, correlaciones a dos enlaces y la asignación de protones recientemente publicada para el compuesto **B.1**.

Al igual que en los compuestos finales de la familia **A**, en estos espectros de ^{13}C -RMN, se distinguen dos zonas: a) zona aromática, correspondiente a los carbonos pertenecientes al anillo de piridina o quinolina y al bifenilo; b) zona alifática, donde se incluyen el metileno unido al nitrógeno piridínico o quinolínico; y los sustituyentes en posición 4 del anillo de piridinio o quinolinio (-R; dimetilamina, pirrolidina, N-

metilnilino o perhidroazepina). Debido a la conservación de la zona b entre los compuestos finales de las familias **A** y **B**, en este apartado sólo se comentará la zona a. Para para más información sobre la zona b, consultar **sección 4.3.3.1.2** y **Tablas 4.3.7** y **4.3.8**.

En la primera zona, existe un mayor grado de concordancia entre los espectros de **B.1** y **B.2** que en el caso de los compuestos **B.3** y **B.4**, dada la similar naturaleza de los sustituyentes de la piridina en posición 4. De este modo, para el primer subconjunto de compuestos finales de esta familia (**B.1**, **B.2**) puede observarse que todos los carbonos pertenecientes al espaciador bifenílico (a excepción del carbono cuaternario C-1') aparecen en la zona del espectro comprendida entre los carbonos C-2,6_{pyr} (δ 141,62-143,11 ppm) y C-3,5_{pyr} (δ 108,28-109,14 ppm). Lo mismo sucedía para los carbonos del grupo fenilo de la familia **A**. Dentro de este conjunto, aparecen a campo más bajo los carbonos cuaternarios (C-1>C-4). Los carbonos aromáticos por su parte, se distribuyen de manera que los átomos de carbono C-2,6 y C-3,5 se localizan entre los carbonos C-3',5' (δ 128,58-130,00 ppm) y C-4', C-2',6' (δ 126,57-127,99 ppm), según el siguiente orden de campo más bajo a más altos: C-3',5'> C-3,5> C-2,6> C-4'> C-2',6'. Dicho comportamiento también se observaba en los compuestos **A.1** y **A.2**.

En el caso de los derivados de quinolina (compuestos **B.3** y **B.4**), los átomos de carbono aromáticos pertenecientes al espaciador bifenílico se localizan en la zona del espectro delimitada por el C-6_{quin} y por el C-5_{quin} (δ 125,63-127,79 ppm en **B.3** y 125.21-130.08 ppm en **B.4**). El orden de aparición de dichos átomos en ambos compuestos es el siguiente de campo más bajo a campo más alto: C-3',5'> C-2,6> C-4'> C-3,5> C-2',6'. Por su parte, los carbonos cuaternarios C-1, C-4 y C-1', aparecen a campo más bajo que los anteriores, junto al resto de átomos de carbono de la quinolina sobre los que se ejerce un mayor efecto inductivo $-I$ por parte del nitrógeno cuaternario, el cloro en posición 7 o el nitrógeno del grupo sustituyente de la posición 4. Dicho comportamiento es también muy parecido al que se observa para los compuestos **A.3** y **A.4**. Puesto que el orden de aparición de los carbonos quinolínicos y el resto de cuaternarios es prácticamente el mismo que para el caso de los compuestos equivalentes de la familia **A**, consultar la **sección 4.2.3.1.2** y las **Tablas 4.2.7** y **4.2.8**, para mayor información sobre su desplazamiento químico.

Tabla 4.3.7. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN de los compuestos finales derivados de bencilo **B.1-B.2**.

Comp.	C-2,6 _{pyr}	C-4 _{pyr}	C-3,5 _{pyr}	R	C-1 _{ph}	C-2,6 _{ph}	C-4 _{ph}	C-3,5 _{ph}
B.1	143,11	158,04	109,14	40,36	141,36	128,92	135,07	129,90
B.2	141,62	153,77	108,28	24,71 (C-3,4 _{pirr}) 48,70 (C-2,5 _{pirr})	139,94	127,47	133,78	128,48

Tabla 4.3.7. Continuación.

Comp.	C-1' _{ph}	C-2',6' _{ph}	C-4' _{ph}	C-3',5' _{ph}	-CH ₂ N ⁺
B.1	143,48	127,99	128,86	130,00	61,47
B.2	141,98	126,57	127,43	128,58	60,08

Tabla 4.3.8. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN de los compuestos finales derivados de bencilo **B.3-B.4**.

Comp.	C-2 _{quin}	C-3 _{quin}	C-4 _{quin}	C-5 _{quin}	C-6 _{quin}	C-7 _{quin}	C-8 _{quin}	C-4a _{quin}	C-8a _{quin}	R ₁ , R ₂
B.3	147,65	100,59	156,00	125,63	127,79	140,78	118,31	117,21	139,41	19,75 (CH ₃) 125,18 (C-3,5 _{anil}) 130,48 (C-2,6 _{anil}) 133,91 (4 _{anil}) 138,58 (C-1 _{anil})
B.4	144,72	102,37	159,30	130,08	125,21	139,64	117,45	117,56	140,69	26,86 (C-4,5 _{az}) 26,99 (C-3,6 _{az}) 53,84 (C-2,7 _{az})

Tabla 4.3.8. Continuación.

Comp.	C-1 _{ph}	C-2,6 _{ph}	C-4 _{ph}	C-3,5 _{ph}	C-1' _{ph}	C-2',6' _{ph}	C-4' _{ph}	C-3',5' _{ph}	-CH ₂ N ⁺
B.3	139,93	127,51	133,11	127,00	141,69	126,55	127,37	128,54	57,36
B.4	139,93	127,44	133,18	127,09	141,57	126,52	127,32	128,51	56,79

4.3.3.2.3. Análisis de espectrometría de masas HRMS.

El análisis de HRMS muestra una concordancia perfecta entre los valores calculados para las fórmulas empíricas (M-Br)⁺ de los compuestos de esta familia y los correspondientes valores encontrados:

B.1: calculado para C₂₀H₂₁N₂⁺: 289,1705; encontrado: 289,1698.

B.2: calculado para C₂₂H₂₄N₂⁺: 315,1861; encontrado: 315,1863.

B.3: calculado para C₂₉H₂₄N₂Cl⁺: 435,1628; encontrado: 435,1626.

B.4: calculado para C₂₈H₂₈N₂Cl⁺: 427,1941; encontrado: 427,1933.

4.3.3.3. Análisis espectroscópico de los derivados de bifenilo con aminas terciarias. Familia C.

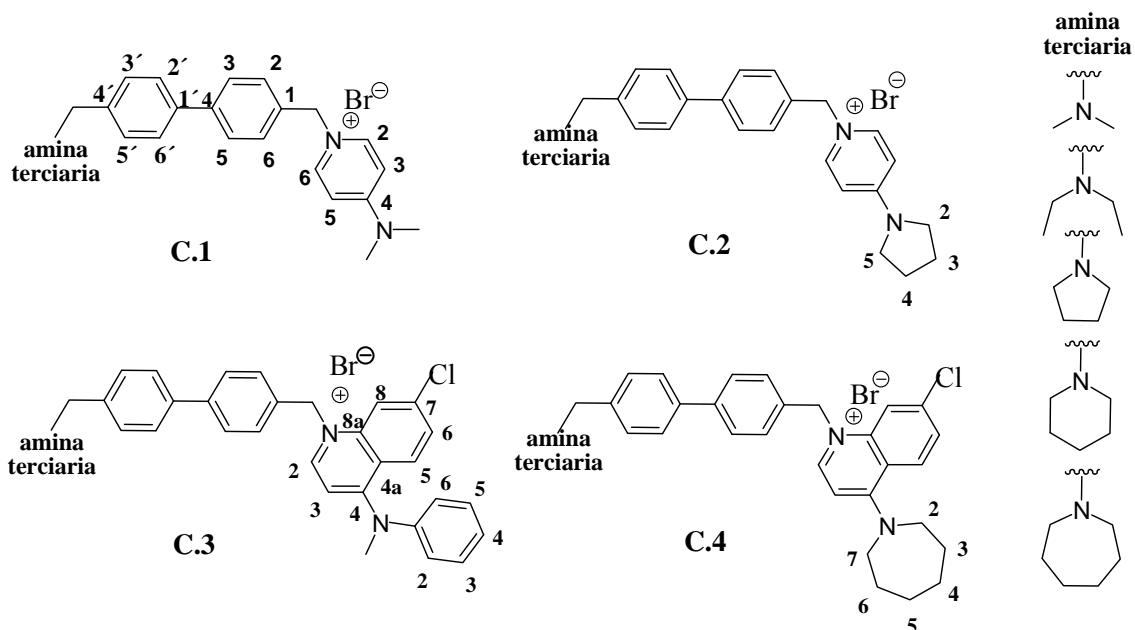


Figura 4.3.3. Estructura química de los compuestos finales de la familia C.

El análisis espectroscópico de los compuestos finales de esta familia se ha subdividido en cada una de las subfamilias (C.1, C.2, C.3 y C.4) que se han descrito en las consideraciones generales (**Figura 4.3.3**). La identificación de cada protón y de todos los carbonos se ha llevado a cabo utilizando las técnicas de espectroscopía bidimensional HSQC y HMBC (Ver Anexo). Concretamente, las correlaciones en el HMBC se han realizado a una distancia máxima de dos enlaces y el resultado obtenido en cuanto a la caracterización es concordante con el presentado en tesis anteriores para otros compuestos monocatiónicos asimétricos.¹³²

4.3.3.3.1. Análisis espectroscópico de la subfamilia C.1.

Dentro de esta familia se presentan los compuestos finales **C.1.1-C.1.8** (Figura 4.3.4), derivados del bifenilo y de la dimetilaminopiridina. Además de los compuestos finales esperados, en algunos casos también se presenta la estructura química de sus equivalentes protonados en la amina terciaria (compuestos **C.1.4**, **C.1.6** y **C.1.8**). Dichos compuestos se formaron espontáneamente durante el transcurso de la reacción debido a la liberación de ácido bromhídrico tras la sustitución nucleofílica a la que la amina terciaria da lugar (ver sección 4.2.2).

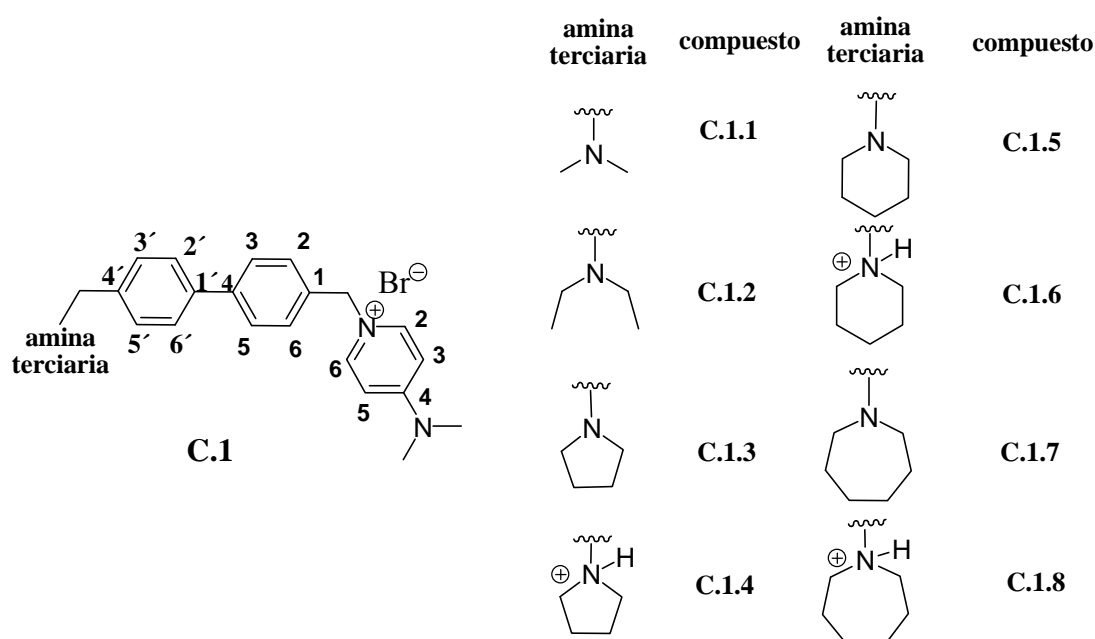


Figura 4.3.4. Estructura química de los compuestos finales de la sufamilia **C.1**.

En esta subfamilia, los compuestos que han servido como referente para asignar a partir de sus espectros bidimensionales (HSQC y HMBC) los protones y los carbonos del resto de compuestos de la serie han sido el **C.1.1** y el **C.1.4** (Ver Anexo). De esta forma, se ha analizado un representante de los compuestos no protonados y otro de los protonados para estudiar el efecto de la protonación de la amina terciaria en el desplazamiento químico de las señales correspondientes los distintos protones y carbonos de los compuestos finales.

4.3.3.1.1. Análisis espectroscópico de ^1H -RMN.

Los datos espectroscópicos de ^1H -RMN, se muestran resumidos en las **Tabla 4.3.9**. Todos estos espectros se han realizado utilizando como disolvente metanol deuterado y son concordantes con las estructuras propuestas. En general, todos los compuestos de esta subfamilia, muestran una gran conservación en cuanto al número de señales, su multiplicidad y sus desplazamientos químicos. Esto se debe a la similitud de las aminas terciarias usadas. No obstante, los compuestos protonados sí que presentan ciertas peculiaridades con respecto a sus equivalentes no protonados en las tres zonas del espectro. Dichos rasgos diferenciales, además de comentarse en el texto a continuación, aparecen indicados en la **Tabla 4.3.9**.

Al igual que en los compuestos finales de las familias **A** y **B**, en los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **C.1.1-C.1.8** se incluyen tres zonas de resonancia de protones: a) zona aromática, correspondiente a los protones pertenecientes al anillo de piridina y al bifenilo; b) zona correspondiente a los metilenos unidos al nitrógeno piridínico y a la amina terciaria; y, c) zona alifática, donde se incluyen los protones de la dimetilamina localizada en la posición 4 del anillo de piridinio (-R) y de la amina terciaria correspondiente en el caso de cada compuesto final.

La primera de las tres zonas mencionadas anteriormente, es la sección del espectro localizada entre las señales de los protones que presentan un desplazamiento químico de 8,25-8,31 ppm a campo más bajo y de 7,01-7,03 ppm a campo más alto. Al igual que en el resto de compuestos finales previamente descritos que incluían la piridina como cabeza catiónica, el desplazamiento químico más bajo en esta primera zona corresponde a los átomos de hidrógeno H-2,₆pyr, mientras que el desplazamiento más alto es de los hidrógenos H-3,₅pyr. Ambos resuenan como doblete debido al acoplamiento entre sí. El resto de señales de esta zona del espectro son las pertenecientes a los protones del espaciador bifenílico (**Figura 4.3.5**).

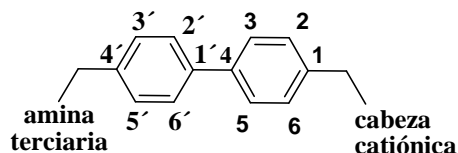


Figura 4.3.5. Protones del espaciador bifenílico.

En el caso de los compuestos finales no protonados de esta familia, tales protones resuenan como dos dobletes a campo más bajo y un multiplete a campo más alto. Los

dos primeros dobletes corresponden a los átomos de hidrógeno H-3,5 (δ 7,69-7,71 ppm) y H-2',6' (δ 7,61-7,68 ppm), es decir a los más internos del anillo de bifenilo, y deben su multiplicidad al acoplamiento a corta distancia con los protones del carbono vecino (H-2,6 y H-2',6', respectivamente). El multiplete por su parte, según las correlaciones observadas en los espectros de HSQC/HMBC, corresponde a los hidrógenos H-2,6 y H-3',5' (δ 7,45-7,55 ppm). Ambos aparecen como multiplete debido a su acoplamiento con los protones vecinos H-3,5 y H-2',6', respectivamente y con los átomos de hidrógeno localizados en el metileno adyacente. Curiosamente, para el caso de los compuestos protonados, los dos dobletes localizados a campo bajo en sus equivalentes sin protonar, se colapsan dando lugar a un multiplete (δ 7,70-7,73 ppm) (**Figuras 4.3.6-4.3.8**). Por el contrario, el multiplete que se registraba a campos más altos en los compuestos sin protonar, se desdobra en dos dobletes, de los cuales uno conserva el desplazamiento químico del multiplete inicial (δ 7,50-7,52 ppm), y el otro, migra unas 0,10 ppm a campos más bajos (δ 7,61-7,68 ppm) (**Figuras 4.3.6-4.3.8**). En este caso, según la asignación de HMBC, el multiplete localizado a campos más bajos corresponde a los átomos de hidrógeno H-3,5 y H-2',6', por su parte el doblete más desapantallado es asignado a los protones H-3',5' y por último, el doblete más apantallado es la señal a la que dan lugar los hidrógenos H-2,6 (ver **Tabla 4.3.9**).

La segunda zona del espectro, designada previamente como “zona b”, incluye los átomos de hidrógeno pertenecientes a los metilenos unidos simultáneamente al espaciador bifenílico y a la cabeza catiónica o a la amina terciaria. Ambos tipos de protones, aparecen como singlete. A campo más bajo siempre se localiza el singlete correspondiente al metileno unido a la cabeza catiónica (δ 5,41-5,46 ppm), debido al mayor efecto desapantallante del nitrógeno cuaternario de la piridina en comparación con el nitrógeno de la amina terciaria. Sin embargo, el desplazamiento químico del singlete del metileno unido a la amina terciaria, se modifica considerablemente hacia campos más bajos cuando se produce la protonación de dicha amina. Así, se pasa de un desplazamiento químico de 3,72-3,98 ppm en compuestos no protonados a 4,24-4,36 ppm. Esta observación responde a la cuaternización de dicho nitrógeno, y por tanto, a un mayor desapantallamiento de los protones vecinos.

Por último, la tercera zona del espectro incluye el singlete de los seis protones alifáticos de la dimetilamina unida a la posición 4 de la piridina (δ 3,24-3,26 ppm), y además, las señales de cada una de las aminas terciarias incluidas en cada compuesto

final, cuyas señales parecen a un desplazamiento químico de 1,18-3,25 ppm (**Tabla 4.3.9**). Cuando se compara el desplazamiento químico de los hidrógenos vecinos al nitrógeno de la amina terciaria en los compuestos sin protonar, con el que estos mismos hidrógenos muestran en el compuesto protonado, se observa que al igual que en el caso del metileno, las señales se desplazan unas 0,5 ppm a campo más bajo.

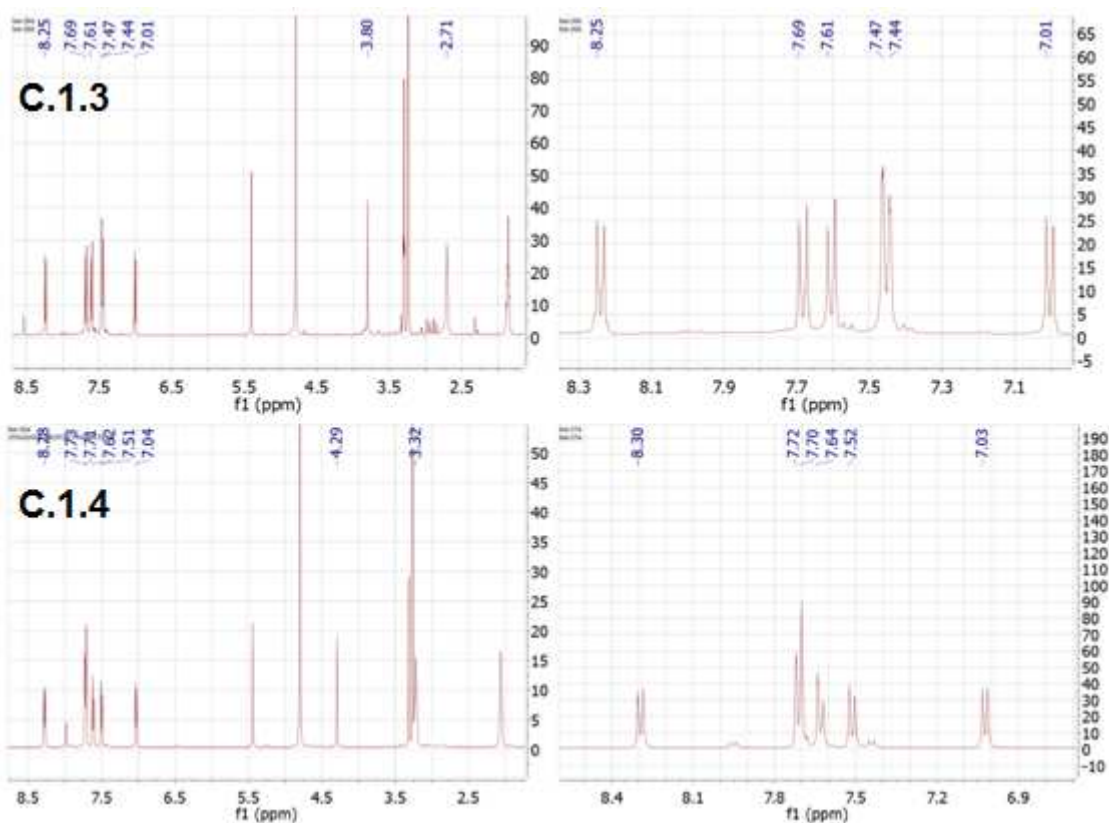


Figura 4.3.6. Cambios en los protones aromáticos del compuesto **C.1.3**, tras la protonación de la amina terciaria (**C.1.4**).

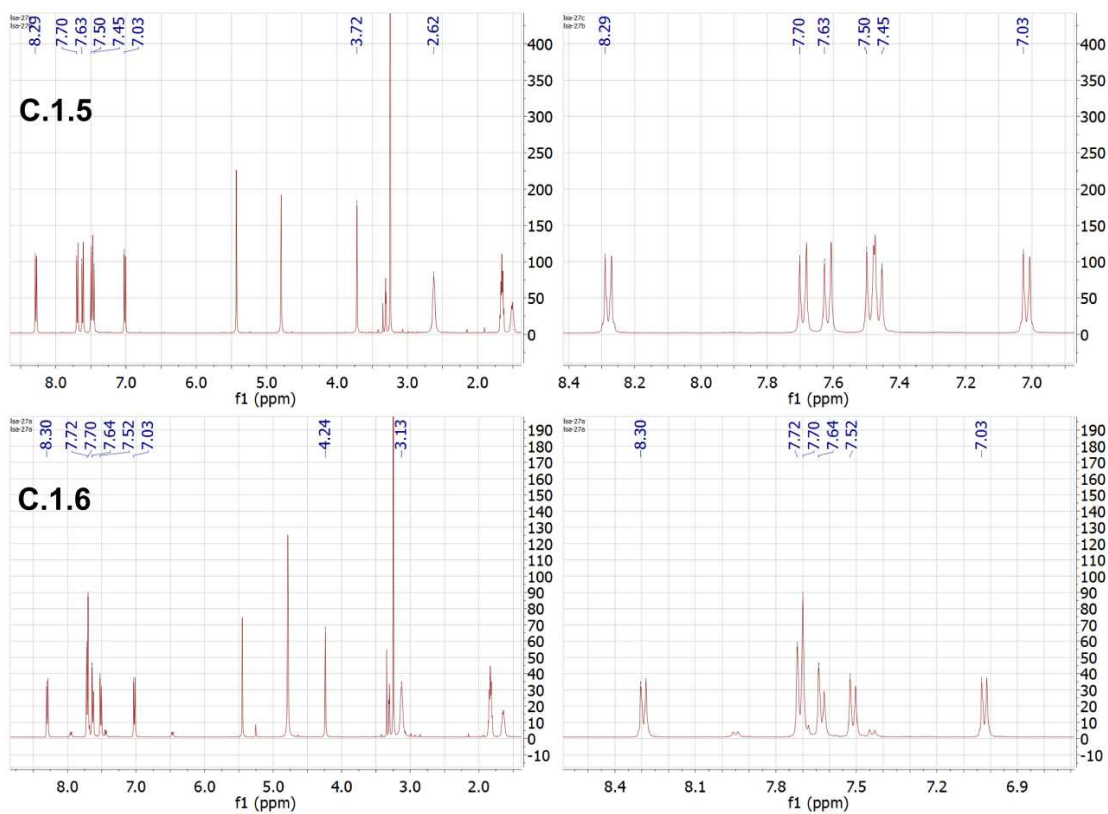


Figura 4.3.7. Cambios en los protones aromáticos del compuesto **C.1.5** tras la protonación de la amina terciaria (**C.1.5**).

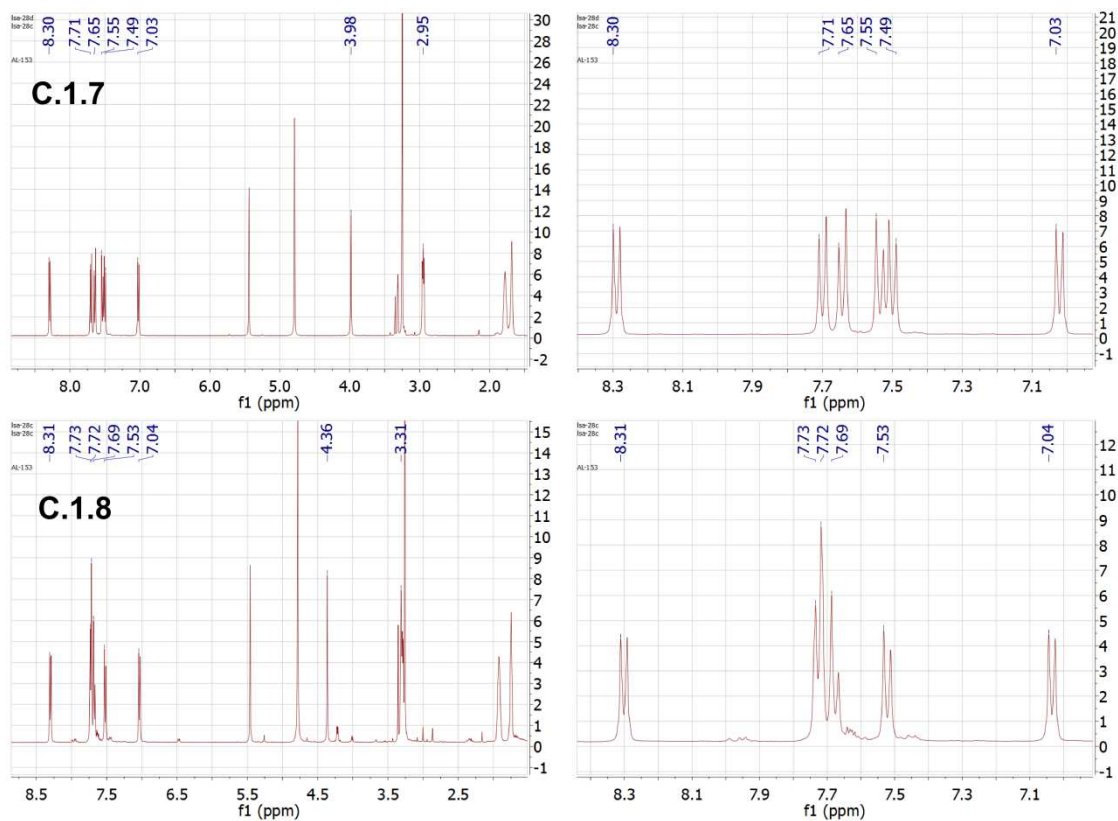


Figura 4.3.8. Cambios que la protonación de la amina terciaria (**C.1.8**) ocasiona en los protones aromáticos del compuesto **C.1.7**.

Tabla 4.3.9. Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de ^1H -RMN de los compuestos finales derivados del bifenilo y la dimetilaminopiridina **C.1.1-C.1.8**. Los cambios más significativos de los compuestos protonados respecto a los no protonados se muestran con un asterisco.

Comp.	H-2,6 _{pyr}	H-3,5 _{pyr}	R	H-2,6 _{ph}	H-3,5 _{ph}	H-2',6' _{ph}	H-3',5' _{ph}	CH ₂ N ⁺	CH ₂ N _{am}	A. terciaria
C.1.1	8,31 (d, 7,9)	7,03 (d, 7,9)	3,24 (s)	7,50- 7,53 (m)	7,71 (d, 8,4)	7,68 (d, 8,4)	7,50- 7,53 (m)	5,45 (s)	3,76 (s)	2,44 (s, 6H)
C.1.2	8,27 (d, 7,9)	7,01 (d, 7,9)	3,24 (s)	7,47- 7,51 (m)	7,70 (d, 8,4)	7,65 (d, 8,4)	7,47- 7,51 (m)	5,43 (s)	3,90 (s)	1,18 (t, 7,2 - CH ₂ CH ₃) 2,80 (c, 7,2 -CH ₂ CH ₃)
C.1.3	8,25 (d, 7,9)	7,01 (d, 7,9)	3,25 (s)	7,45- 7,47 (m)	7,69 (d, 8,3)	7,61 (d, 8,3)	7,45- 7,47 (m)	5,41 (s)	3,81 (s)	1,84-1,90 (m, H-3,4 _{pirr}) 2,67-2,77 (m, H-2,5 _{pirr})
C.1.4	8,28 (d, 6,4)	7,03 (d, 6,4)	3,27 (s)	7,50 (d, 7,2)	7,71- 7,73* (m)	7,71- 7,73* (m)	7,61 (d, 7,2)	5,44 (s)	4,29* (s)	2,00-2,11 (m, H-3,4 _{pirr}) 3,30-3,32* (m, H-2,5 _{pirr})
C.1.5	8,28 (d, 7,9)	7,01 (d, 7,9)	3,25 (s)	7,45- 7,50 (m)	7,69 (d, 8,2)	7,62 (d, 8,2)	7,45- 7,50 (m)	5,43 (s)	3,72 (s)	1,47-1,56 (m, H-4 _{pip}) 1,66 (q, 5,5, H-3,5 _{pip}) 2,62 (t, 4,9, H-2,6 _{pip})
C.1.6	8,30 (d, 7,9)	7,02 (d, 7,9)	3,24 (s)	7,51 (d, 8,2)	7,70- 7,72* (m)	7,70- 7,72* (m)	7,63 (d, 8,2)	5,45 (s)	4,24* (s)	1,58-1,70 (m, H-4 _{pip}) 1,83 (q, 5,5, H-3,5 _{pip}) 3,13* (t, 4,9, H-2,6 _{pip})
C.1.7	8,29 (d, 7,5)	7,02 (d, 7,5)	3,25 (s)	7,49- 7,55 (m)	7,70 (d, 8,2)	7,64 (d, 8,2)	7,49- 7,55 (m)	5,44 (s)	3,98 (s)	1,64-1,72 (m, H-4,5 _{az}) 1,73-1,80 (m, H-3,6 _{az}) 2,96 (t, 5,1, H-2,7 _{az})
C.1.8	8,30 (d, 7,4)	7,02 (d, 7,4)	3,26 (s)	7,52 (d, 8,1)	7,72- 7,73* (m)	7,72- 7,73* (m)	7,68 (d, 8,1)	5,46 (s)	4,36* (s)	1,73-1,77 (m, H-4,5 _{az}) 1,89-1,93 (m, H-3,6 _{az}) 3,29-3,31* (m, H-2,7 _{az})

4.3.3.3.1.2. Análisis espectroscópico de ^{13}C -RMN.

Los datos de desplazamiento químico de los carbonos de los compuestos **C.1.1-C.1.8** se recogen en la **Tabla 4.3.10**. Los espectros de ^{13}C y DEPT han permitido determinar los carbonos cuaternarios y secundarios, mientras que los estudios de HSQC y HMBC previamente citados, han posibilitado la asignación inequívoca de cada protón con su carbono (Ver Anexo). Al igual que los espectros de ^1H -RMN, todos estos espectros se han realizado utilizando como disolvente metanol deuterado.

En estos espectros de ^{13}C -RMN, se distinguen dos zonas: a) zona aromática, correspondiente a los carbonos pertenecientes al anillo de piridina y al bifenilo; b) zona alifática donde se incluyen los metilenos (unidos al nitrógeno piridínico y a la amina

terciaria), los átomos de carbono de la dimetilamina en posición 4 del anillo de piridinio y los de las aminas terciarias. Al igual que en el caso de los espectros de ^1H -RMN, existe una gran concordancia en los desplazamientos químicos que presentan los átomos de carbono en todos los compuestos finales de esta subfamilia. En el caso de los compuestos protonados, las modificaciones en el desplazamiento de los carbonos, son menos significativas que en los espectros de ^1H -RMN.

La primera zona del espectro mencionada anteriormente, está delimitada por los átomos de carbono pertenecientes a la piridina. De este modo, los carbonos que se registran a campo más bajo son el C-4_{pyr} (δ 156,36- 158,04 ppm) seguido por $\text{C-2,6}_{\text{pyr}}$ (δ 141,58-142,08 ppm), mientras que a campo más alto, se localizan los átomos $\text{C-3,5}_{\text{pyr}}$ (δ 107,62-108,12 ppm). Entre ambas parejas de átomos de carbono se encuentran por tanto, los átomos de carbono del bifenilo, tanto los aromáticos como los cuaternarios. En primer lugar aparecen los carbonos cuaternarios en un rango de desplazamiento que oscila entre 130,96 y 141,64 ppm y a continuación, a campo más alto, los átomos de los carbonos aromáticos, por pares. De este modo, inmediatamente después de la señal correspondiente a los carbonos $\text{C-2,6}_{\text{pyr}}$ aparecen por orden los siguientes carbonos hacia campo más alto: $\text{C-1}' > \text{C-4} > \text{C-4}' > \text{C-1} > \text{C-3}',5' > \text{C-2,6} > \text{C-2}',6' > \text{C-3,5}$. En los compuestos protonados, esta zona junto a la sección del espectro donde aparecen los carbonos de las aminas terciarias es la que presenta menos variaciones, si bien en el caso del compuesto **C.1.6**, como consecuencia de la protonación se observa la aproximación de los dos últimos pares de carbonos (C-3,5 y $\text{C-2}',6'$).

En la segunda zona del espectro de ^{13}C -RMN, la señal que aparece a campo más bajo en los compuestos no protonados, corresponde al metileno unido a la amina terciaria (δ 55,73-62,65 ppm). Sin embargo, cuando el compuesto final está protonado, las señales de ambos metilenos se intercambian y se aproximan, reduciéndose a más de la mitad la distancia en ppm entre ellos. Este comportamiento podría explicarse por la mayor similitud que existe entre el nitrógeno cuaternario de la amina alifática y el nitrógeno endocíclico de la piridina, que entre el nitrógeno terciario y el cuaternario. En esta zona del espectro, también se registran los átomos de carbono terciarios de la dimetilamina sustituyente del anillo de piridina. Su desplazamiento químico apenas se modifica entre los diferentes compuestos finales de esta serie, oscilando entre las 38.74 y las 39,37 ppm. Por último, en esta región alifática nos encontramos con los carbonos

de las distintas aminas terciarias (**Tabla 4.3.10**), las cuales al igual que en la zona aromática, no varían el desplazamiento químico de sus carbonos tras la protonación.

Tabla 4.3.10. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN de los compuestos finales derivados de bencilo y dimetilaminopiridina **C.1.1-C.1.8**. Los cambios más significativos de los compuestos protonados respecto a los no protonados se señalan con un asterisco.

Comp.	C-2,6 _{pyr}	C-4 _{pyr}	C-3,5 _{pyr}	R	C-1 _{ph}	C-2,6 _{ph}	C-4 _{ph}	C-3,5 _{ph}
C.1.1	142,03	156,86	108,08	39,36	134,30	128,90	140,10	127,05
C.1.2	141,58	156,36	107,62	38,90	130,96	128,55	140,54	127,03
C.1.3	141,73	156,63	108,04	39,25	132,04	128,88	141,19	127,51
C.1.4	141,79	156,66	107,83	39,03	134,09	128,60	141,13 ^a	126,76
C.1.5	141,95	156,91	108,05	39,28	134,03	128,89	139,83	126,88
C.1.6	142,08	156,91	108,12	39,37	134,66	129,02	141,12 ^a	127,49
C.1.7	141,66	156,65	107,70	38,74	134,25	128,59	139,91	126,02
C.1.8	141,80	156,65	107,85	39,08	134,39	128,73	140,80 ^a	127,31

Tabla 4.3.10. Continuación.

Comp.	C-1' _{ph}	C-2',6' _{ph}	C-4' _{ph}	C-3',5' _{ph}	CH ₂ N ⁺	CH ₂ N _{am}	A ₃ terciaria
C.1.1	141,48	127,71	135,16	130,61	60,26	62,65	43,54 (2C, -(CH ₃) ₂)
C.1.2	140,78	127,31	133,14	130,49	55,44	59,73	8,05 (2C, -CH ₂ -CH ₃) 46,69 (2C, -CH ₂ -CH ₃)
C.1.3	141,25	127,80	134,52	130,83	58,06	60,25	22,76 (2C, C-3,4 _{pirr}) 53,67 (2C, C-2,5 _{pirr})
C.1.4	141,56	127,53	141,06 ^{a,*}	129,89	60,15*	59,35*	22,76 (2C, C-3,4 _{pirr}) 53,63 (2C, C-2,5 _{pirr})
C.1.5	141,64	127,71	134,99	130,70	60,38	62,44	23,52 (1C, C-4 _{pip}) 24,81 (2C, C-3,5 _{pip}) 53,89 (2C, C-2,6 _{pip})
C.1.6	141,51	127,86	141,05 ^{a,*}	131,86	60,63*	60,27*	22,01 (1C, C-4 _{pip}) 23,39 (2C, C-3,5 _{pip}) 53,09 (2C, C-2,6 _{pip})
C.1.7	141,17	127,44	134,55	130,35	59,77	60,15	23,28 (2C, C-4,5 _{az}) 26,00 (2C, C-3,6 _{az}) 54,29 (2C, C-2,7 _{az})
C.1.8	141,31	127,59	140,73 ^{a,*}	131,47	60,29*	60,01*	23,59 (2C, C-4,5 _{az}) 26,15 (2C, C-3,6 _{az}) 54,25 (2C, C-2,7 _{az})

^a: intercambiables

4.3.3.3.1.3. Análisis de espectrometría de masas HRMS.

El análisis de HRMS muestra una concordancia perfecta entre los valores calculados para las fórmulas empíricas (M-Br)⁺ de los compuestos de esta familia y los correspondientes valores encontrados. Además, gracias a este análisis de espectrometría se confirma la protonación de los compuestos **C.1.2**, **C.1.4** y **C.1.6** encontrándose en el espectro una señal a relación $m/z = m/2$ correspondiente a la fórmula empírica (M-Br)²⁺.

C.1.1: calculado para C₂₃H₂₈N₃⁺: 346,2286; encontrado: 346,2282.

C.1.2: calculado para C₂₅H₃₂N₃⁺: 374,2596; encontrado: 374,2600.

C.1.3: calculado para C₂₅H₃₀N₃⁺: 372,2440; encontrado: 372,2444.

C.1.4: calculado para $C_{25}H_{31}N_3^{2+}$: 186,6254; encontrado: 186,6284. **C.1.5:** calculado para $C_{26}H_{32}N_3^+$: 386,2591; encontrado: 386,2595.

C.1.6: calculado para $C_{26}H_{33}N_3^{2+}$: 193,6332; encontrado: 193,6336. **C.1.7:** calculado para $C_{27}H_{34}N_3^+$: 400,2747; encontrado: 400,2749.

C.1.8: calculado para $C_{27}H_{35}N_3^{2+}$: 200,6410; encontrado: 200,6414.

4.3.3.3.2. Análisis espectroscópico de la subfamilia C.2.

Dentro de esta subfamilia se presentan los compuestos finales **C.2.1-C.2.5** (Figura 4.3.9), derivados del bifenilo y de la pirrolidinopiridina. En este caso, sólo un compuesto se protonó espontáneamente durante el transcurso de la reacción química (**C.2.1**). En esta nueva subfamilia, también existe una gran conservación en cuanto al número de señales, su multiplicidad y sus desplazamientos químicos en cada uno de los compuestos finales. Debido a la similitud del sustituyente en la posición 4 de la piridina entre la subfamilia **C.1** (dimetilaminopiridina) y **C.2** (pirrolidinopiridina), el orden en el que aparece cada átomo de hidrógeno o de carbono en los espectros de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN es el mismo según el espectro bidimensional de HSQC y las correlaciones a dos enlaces del HMBC. En consecuencia, en esta sección sólo se comentarán las diferencias más significativas en cuanto a la multiplicidad o los desplazamientos químicos de las señales entre ambas subfamilias.

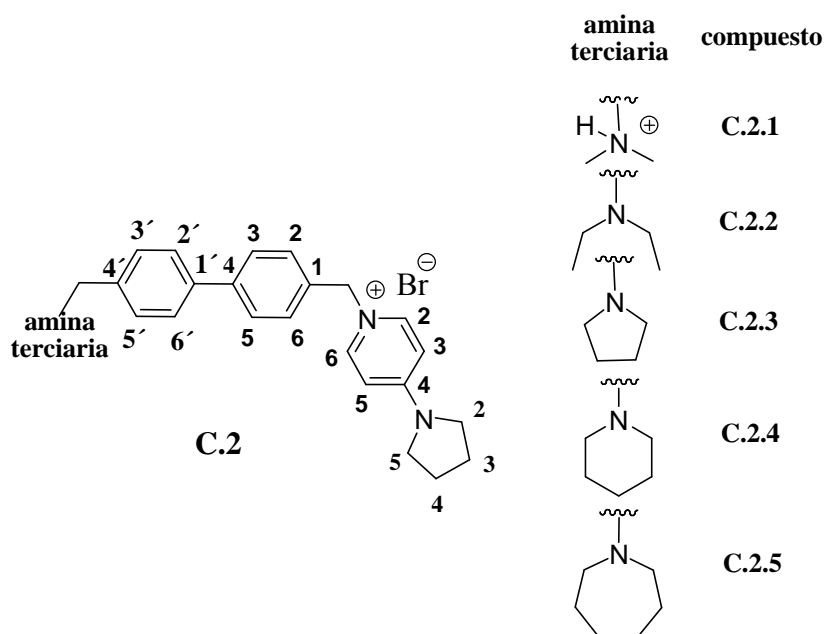


Figura 4.3.9. Estructura química de los compuestos finales de la subfamilia C.2.

Los compuestos que se han usado como referencia para asignar a partir de sus bidimensionales (HSQC y HMBC) los protones y los carbonos del resto de compuestos de la serie han sido el **C.2.1** y el **C.2.5** por analizar el orden de aparición de las señales

en el compuesto protonado y en el representante más complejo de los no protonados (Ver Anexo). De esta forma se asignan las señales de forma inequívoca en presencia o ausencia de protonación en la amina terciaria.

4.3.3.3.2.1. Análisis espectroscópico de ^1H -RMN.

Los datos espectroscópicos de ^1H -RMN, se muestran resumidos en las **Tabla 4.3.11**. Todos estos espectros se han realizado utilizando como disolvente metanol deuterado y son concordantes con las estructuras propuestas. Al igual que en el caso de todas las familias anteriores, en los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **C.2.1-C.2.5** se incluyen tres zonas de resonancia de protones: a) zona aromática, correspondiente a los protones pertenecientes al anillo de piridina y al bifenilo; b) zona correspondiente a los metilenos unidos al nitrógeno piridínico y a la amina terciaria; y, c) zona alifática, donde se incluyen los protones de la pirrolidinopiridina localizada en la posición 4 del anillo de piridinio (-R) y de la amina terciaria correspondiente en el caso de cada compuesto final.

En la primera de las tres zonas mencionadas anteriormente, la principal diferencia que presentan los compuestos de esta subfamilia con los de la subfamilia **C.1** es la multiplicidad de los átomos de hidrógeno correspondientes al bifenilo. Mientras que en la subfamilia **C.1** aparecen dos dobletes y un multiplete en la zona del espectro delimitada por los protones H-2,6_{pyr} y H-3,5_{pyr}, en este caso, en todos los compuestos a excepción del **C.2.1**, se muestran dos multipletes (uno a δ 7,60-7,78 ppm y otro a δ 7,38-7,55 ppm). Cada uno de estos multipletes integran por cuatro átomos de hidrógeno en todos los compuestos excepto en el **C.2.4** y **C.2.5**, donde el primer multiplete engloba a seis protones y el segundo, a dos. No obstante, tal y como se ha mencionado con anterioridad, los espectros de HMBC y HSQC, revelan que el orden de aparición de los átomos de hidrógeno en esta subfamilia es el mismo que el de la subfamilia **C.1** a pesar de la diferente multiplicidad de sus señales (ver **Tabla 4.3.9**). La multiplicidad de ambas señales se debe posiblemente a que los hidrógenos más cercanos al metileno, es decir, los incluidos bajo el multiplete que aparece a campo más alto (H-2,6 y H-3',5'), podrían acoplarse además de con los protones adyacentes del fenilo, con los hidrógenos del metileno vecino. Por el contrario, el multiplete correspondiente a los protones más internos del espaciador (H-3,5 y H-2',6') podría ser debido al acoplamiento no sólo con

los átomos de hidrógeno vecinos del anillo de fenilo donde se incluyen, sino también con los protones más cercanos del anillo de fenilo vecino. Así por ejemplo, según este razonamiento, los hidrógenos H-3,5 se acoplarían a los H-2,6 y a los H-2',6'. Las razones por las que aparecen más desapantallados los protones internos del espaciador, ya han sido expuestas en la **sección 4.3.3.3.1.1**.

Para el caso del compuesto protonado (el **C.2.1**), en la zona aromática correspondiente al espaciador bifenílico, las señales que aparecen son idénticas a las que muestran los compuestos protonados de la **subfamilia C.1**, es decir, primero un multiplete a campos más bajos (δ 7,68-7,75 ppm) y a continuación, un doblete (δ 7,52 ppm, $J = 8,2$ Hz). Al igual que para el caso de los compuestos protonados de la subfamilia **C.1**, y según la asignación por HMBC y HSQC, el primero corresponde a los hidrógenos H-3,5 y H-2',6', mientras que el segundo, se relaciona con H-2,6 y con H-3',5'. Como consecuencia de esta analogía las razones de la multiplicidad y el desplazamiento observados de cada señal son las mismas que para los compuestos protonados de la subfamilia **C.1** (ver **sección 4.2.3.3.1.1**).

En la segunda zona del espectro, correspondiente a los átomos de hidrógeno metilénicos, aparecen al igual que en la subfamilia **C.1**, dos singletes. El de campo más bajo es el singlete del metileno unido a la pirroldinopiridina (δ 5,40-5,43 ppm), mientras que el de campo más alto es el del metileno unido a la amina terciaria (δ 4,28-4,64 ppm). En este caso, no podemos comparar la variación de desplazamiento químico que experimenta el metileno unido a la amina terciaria protonada del compuesto **C.2.1**, ya que en la reacción sólo se formó el producto protonado.

Por último, la tercera zona del espectro incluye las señales de la pirrolidinopiridina localizada en la posición 4 de la piridina y del resto de las aminas terciarias de los compuestos de esta subfamilia. En todos los casos, los protones H-2,5_{pirr} se muestran como un triplete a campo más bajo (δ 3,53-3,55 ppm, $J = 6,9$ Hz) que el multiplete correspondiente a los átomos de hidrógeno H-3,4_{pirr} (δ 2,08-2,14 ppm, $J = 6,8-7,0$ Hz). El desplazamiento químico y la multiplicidad de las señales de las aminas terciarias incluidas en cada compuesto final de esta serie pueden consultarse en la **Tabla 4.3.11**. Tal y como puede apreciarse, existen mínimas modificaciones de desplazamiento químico con respecto a las aminas de la subfamilia **C.1**.

Tabla 4.3.11. Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de ^1H -RMN de los compuestos finales derivados del bifenilo y la pirrolidinopiridina **C.2.1-C.2.5**.

Comp.	H-2,6 _{pyr}	H-3,5 _{pyr}	R	H-2,6 _{ph}	H-3,5 _{ph}	H-2',6' _{ph}	H-3',5' _{ph}	CH ₂ N ⁺	CH ₂ N _{am}	A.terciaria
C.2.1	8,24 (d, 7,7)	6,90 (d, 7,6)	2,10 (m, H- 3,4 _{pirr}) 3,54 (t, 6,9, H- 2,5 _{pirr})	7,52 (d, 8,2)	7,68- 7,75 (m)	7,68- 7,75 (m)	7,66 (d, 8,2)	5,42 (s)	4,41 (s)	2,80 (s)
C.2.2	8,28 (d, 7,7)	6,88 (d, 7,7)	2,09 – 2,13 (m, H- 3,4 _{pirr}) 3,53 (t, 6,9, H- 2,5 _{pirr})	7,38 – 7,48 (m)	7,65 – 7,71 (m)	7,65 – 7,71 (m)	7,38 – 7,48 (m)	5,40 (s)	4,63 (s)	1,37 (t, 6,0, - CH ₂ CH ₃) 3,23 (q, 7,4, -CH ₂ CH ₃)
C.2.3	8,23 (d, 7,7)	6,86 (d, 7,7)	2,08 – 2,12 (m, H- 3,4 _{pirr}) 3,55 (t, 6,9, H- 2,5 _{pirr})	7,42 – 7,52 (m)	7,60 – 7,72 (m)	7,60 – 7,72 (m)	7,42 – 7,52 (m)	5,40 (s)	4,64 (s)	1,82 – 1,87 (m, 4H, H- 3,4 _{pirram}) 2,56 (t, 6,8, H-2,5 _{pirram})

Tabla 4.3.11. Continuación.

Comp.	H-2,6 _{pyr}	H-3,5 _{pyr}	R	H-2,6 _{ph}	H-3,5 _{ph}	H-2',6' _{ph}	H-3',5' _{ph}	CH ₂ N ⁺	CH ₂ N _{am}	A.terciaria
C.2.4	8,24 (d, 7,8)	6,86 (d, 7,8)	2,10 – 2,14 (m, H- 3,4 _{pirr}) 3,55 (t, 6,9, H- 2,5 _{pirr})	7,49- 7,55 (m)	7,65 – 7,78 (m)	7,65 – 7,78 (m)	7,65 – 7,78 (m)	5,42 (s)	4,28 (s)	1,61 – 1,72 (m, H-4 pipe _{am}) 1,82 – 1,90 (m, H- 3,5 _{pipeam}) 3,17 – 3,28 (m, H- 2,6 _{pipeam})
C.2.5	8,26 (d, 7,7)	6,87 (d, 7,7)	2,10 (m, H- 3,4 _{pirr}) 3,55 (t, 6,9, H- 2,5 _{pirr})	7,44- 7,51 (m)	7,66 - 7,74 (m)	7,66 - 7,74 (m)	7,66 - 7,74 (m)	5,43 (s)	4,40 (s)	1,72 – 1,76 (m, H-4,5 _{az}) 1,89 – 1,96 (m, H-3,6 _{az}) 3,31 (t, 3,3, H- 2,7 _{az})

4.3.3.3.2. Análisis espectroscópico de ^{13}C -RMN.

Los datos de desplazamiento químico de los carbonos de los compuestos **C.1.1-C.1.8** se recogen en las **Tabla 4.3.12**. Los espectros de ^{13}C y DEPT han permitido determinar los carbonos cuaternarios y secundarios, mientras que los estudios de HMBC (a dos enlaces) y HSQC previamente citados, han posibilitado la asignación

inequívoca de cada protón con su carbono (Ver Anexo). Al igual que los espectros de ^1H -RMN, todos estos espectros se han realizado utilizando como disolvente metanol deuterado. Debido a que no se encuentra ninguna diferencia en la asignación de los carbonos de esta familia con respecto a la subfamilia **C.1**, para obtener más información acerca del orden en el que aparecen, ver **sección 4.2.3.3.1.2**. Los desplazamientos químicos de cada átomo de carbono, pueden consultarse en la **Tabla 4.3.12**.

Las únicas diferencias en los espectros de ^{13}C -RMN de los compuestos de esta subfamilia con los de la subfamilia **C.1**, son: a) en el compuesto **C.2.5** los carbonos cuaternarios C-4 y C-4' se registran bajo una misma señal, a diferencia de lo que ocurre en la subfamilia **C.1** y en el resto de compuestos finales de esta serie donde aparecen como señales independientes y consecutivas; b) las señales de los carbonos de la pirrolidina unida a la posición 4 de la piridina son dos picos correspondientes a los carbonos C-2,5_{pirr} (δ 48,27-52,40 ppm) y C-3,4_{pirr} (δ 22,80-26,13 ppm).

En el caso del compuesto **C.2.1**, al igual que para los compuestos protonados de la subfamilia **C.1**, es significativa la poca diferencia de desplazamiento químico entre los carbonos de sus dos grupos metileno (0,39 ppm), puesto que en general, para los compuestos de esta serie (no protonados), existen más de 3 ppm de diferencia entre ambos.

Tabla 4.3.12. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN de los compuestos finales derivados de bencilo y pirrolidinopiridina **C.2.1-C.2.5**.

Comp.	C-2,6 _{pyr}	C-4 _{pyr}	C-3,5 _{pyr}	R	C-1 _{ph}	C-2,6 _{ph}	C-4 _{ph}	C-3, 5 _{ph}
C.2.1	141,67	153,73	108,37	24,72 (2C, C-3,4 _{pirr}) 48,35 (2C, C-2,5 _{pirr})	134,60	128,62	140,62	127,59
C.2.2	142,01	153,90	108,40	24,88 (2C, C-3,4 _{pirr}) 48,69 (2C, C-2,5 _{pirr})	134,03	128,72	139,60	126,31
C.2.3	141,93	153,90	108,58	22,89 (2C, C-3,4 _{pirr}) 48,27 (2C, C-2,5 _{pirr})	134,03	127,73	139,60	126,72
C.2.4	141,77	153,69	108,22	22,80 (2C, C-3,4 _{pirr}) 52,40 (2C, C-2,5 _{pirr})	134,39	128,55	139,41	127,19
C.2.5	141,75	153,66	108,45	26,13 (2C, C-3,4 _{pirr}) 49,79 (2C, C-2,5 _{pirr})	136,98	128,84	139,45	127,43

Tabla 4.3.12. Continuación.

Comp.	C-1' _{ph}	C-2',6' _{ph}	C-4' _{ph}	C-3', 5' _{ph}	CH ₂ N ⁺	CH ₂ N _{am}	A.terciaria
C.2.1	140,85	127,49	129,02	131,35	59,98	60,37	41,65 -(CH ₃) ₂
C.2.2	140,81	127,51	129,27	131,61	55,65	60,26	8,00 (2C, -CH ₂ CH ₃) 46,08 (2C, -CH ₂ CH ₃)
C.2.3	140,81	127,47	128,02	128,31	53,67	60,26	21,13 (2C, C-3,4 _{pirr}) 25,31 (2C, C-2,5 _{pirr})
C.2.4	140,66	127,45	130,90	131,61	54,68	59,96	20,68 (1C, C-4 _{pipe}) 21,13 (2C, C-3,5 _{pipe}) 24,64 (2C, C-2,6 _{pipe})
C.2.5	140,69	127,67	130,85	131,93	61,49	61,61	55,72 (2C, C-2,7 _{az}) 27,49 (2C, C-4,5 _{az}) 24,48 (2C, C-3,6 _{az})

4.3.3.3.2.3. Análisis de espectrometría de masas HRMS.

El análisis de HRMS muestra una concordancia perfecta entre los valores calculados para las fórmulas empíricas (M-Br)⁺ de los compuestos de esta familia y los correspondientes valores encontrados. Además, al igual que para los compuestos de la subfamilia C.1, gracias a este análisis de espectrometría se confirma la protonación del compuesto C.2.1, encontrándose en su espectro una señal a relación m/z = m/2 correspondiente a la fórmula empírica (M-Br)²⁺.

C.2.1 [M- Br]⁺/2: calculado para C₂₅H₃₁N₃⁺: 186,1220; encontrado: 186,1223.

C.2.2: calculado para C₂₇H₃₄N₃⁺: 400,2753; encontrado: 400,2748

C.2.3: calculado para C₂₇H₃₂N₃⁺: 398,2596; encontrado: 398,2590.

C.2.4: calculado para C₂₈H₃₄N₃⁺: 412,2753; encontrado: 412,2740.

C.2.5: calculado para C₂₉H₃₆N₃⁺: 426,2913; encontrado: 426,2909.

4.3.3.3.3. Análisis espectroscópico de la subfamilia C.3.

Dentro de esta subfamilia se presentan los compuestos finales **C.3.1-C.3.10** (Figura 4.3.10), derivados del bifenilo y de la 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina.

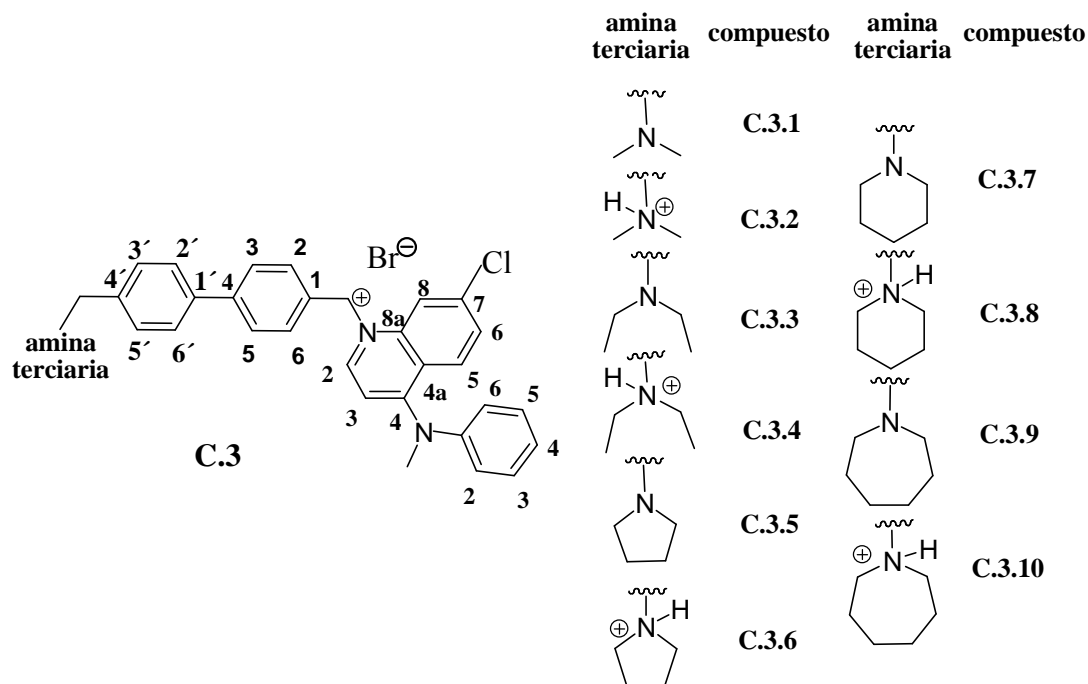


Figura 4.3.10. Estructura química de los compuestos finales de la subfamilia C.3.

Los compuestos **C.3.2**, **C.3.4**, **C.3.6**, **C.3.8** y **C.3.10** se formaron espontáneamente durante el transcurso de la reacción tras la protonación de la amina terciaria de sus compuestos equivalentes (**C.3.1**, **C.3.3**, **C.3.5**, **C.3.7** y **C.3.10**). En consecuencia, al igual que en la subfamilia **C.1**, en esta pueden apreciarse dos subgrupos de compuestos finales. En uno de ellos, se engloban los compuestos sin protonar y en el otro, los protonados. Las diferencias estructurales existentes dentro de cada subgrupo son debidas a la amina terciaria empleada en cada caso, pero tal y como se ha demostrado para las subfamilias anteriores, dicha amina no introduce variaciones importantes en cuanto al número de señales, su multiplicidad o los desplazamientos químicos. Sin embargo, cuando se realiza la comparación de las señales a las que dan lugar los compuestos protonados con respecto a los no protonados, se observan modificaciones, sobre todo en el espectro de ^1H -RMN, de multiplicidad y de desplazamiento químico.

Por otro lado, según el espectro bidimensional de HSQC y las correlaciones a dos enlaces observadas en el HMBC el orden en el que aparecen los protones bifenílicos, de los metilenos y los protones de las aminas en cada subgrupo, es el mismo entre sí y también igual al expuesto previamente para las subfamilias **C.1** y **C.2**. No obstante, dicho orden se altera para algunos carbonos aromáticos y cuaternarios.

En esta subfamilia, los compuestos que se han usado como referencia para asignar a partir de sus bidimensionales (HSQC y HMBC) los protones y los carbonos del resto de compuestos de la serie han sido el **C.3.1** y el **C.3.2** por su mayor sencillez en comparación al resto de compuestos finales, y para contar con un representante de cada subgrupo (protonados/no protonados).

4.3.3.3.1. Análisis espectroscópico de ^1H -RMN.

Los datos espectroscópicos de ^1H -RMN, se muestran resumidos en la **Tabla 4.3.13**. Todos estos espectros se han realizado utilizando como disolvente metanol deuterado y son concordantes con las estructuras propuestas. Al igual que en el caso de todas las familias anteriores, en los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **C.3.1-C.3.10** se incluyen tres zonas de resonancia de protones: a) zona aromática, correspondiente a los protones pertenecientes al anillo de quinolina, anilino y al bifenilo; b) zona correspondiente a los metilenos unidos al nitrógeno quinolínico y a la amina terciaria (o terciaria protonada); y, c) zona alifática, donde se incluyen los protones del metilo perteneciente al grupo N-metilanilino de la posición 4 del anillo de quinolina (-R) y de la amina correspondiente en cada compuesto final.

En la primera de las tres zonas, los protones del anillo quinolínico, los del grupo anilino y los del espaciador bifenílico ocupan diferentes secciones. De esta forma, la zona del espectro que ocupan los protones del anillo bifenílico está delimitada a campo más bajo por los hidrógenos del anillo quinolínico (todos excepto el H-3_{quin}) y a campo más alto por los del grupo anilino. Así, los protones que aparecen en la “zona a” a campo más bajo son todos los del anillo de quinolina (a excepción del H-3_{quin}) en el mismo orden de desplazamiento químico que el que presentaban en los derivados quinolínicos de las familias **A** (compuesto **A.3**) y **B** (compuesto **B.3**), es decir: H-2_{quin}, H-5_{quin}, H-8_{quin}, H-6_{quin}. No obstante, en este caso, en todos los compuestos a excepción de **C.3.5** y **C.3.6** los protones H-2_{quin} y H-5_{quin} aparecen juntos bajo el mismo

multiplete, que es a su vez el que se registra a campo más bajo (δ 8,55-8,73 ppm). En **C.3.5** y **C.3.6** aparecen como doblete, pero su señal también es la más desapantallada de todos los protones. Los átomos de hidrógeno del grupo anilino ocupan una sección del espectro menos desapantallada que los del anillo de bifenilo, pero localizada a campo más bajo que el H-3_{quin} (δ 6,80-6,89 ppm). Por ello, los protones del espaciador bifenílico se ubican en la sección delimitada a campo más bajo por el H-6_{quin} y a campo más alto por los átomos de hidrógeno del anillo de anilino. Dentro de esta sección, los protones del espaciador que aparecen más desapantallados según las correlaciones a dos enlaces en el espectro de HMBC, son los más internos del anillo (H-3,5 y H-2',6'). Dichos hidrógenos aparecen como un multiplete en todos los compuestos de esta subfamilia, a excepción del compuesto **C.3.1**, donde cada uno aparece como un doblete. Tal y como se desprende del compuesto **C.3.1**, el multiplete al que H-3,5 y H-2',6' dan lugar, corresponde en realidad un par de dobletes colapsados debido a la similitud del entorno en el que ambas parejas de protones se localizan. El mayor desapantallamiento de los protones internos del bifenilo también se observa para la familia **B** y en las subfamilias **C.1** y **C.2**, de tal manera que puede consultarse su justificación en la **sección 4.2.3.3.1.1**. En cuanto se refiere a los átomos de hidrógeno H-2,6 y H-3',5', ambos aparecen a campo más alto que los protones internos del espaciador. A diferencia de lo observado en las subfamilias **C.1** y **C.2**, en este caso ambas parejas de protones no aparecen como dobletes en todos los compuestos. H-2,6 suele aparecer colapsado con los protones del anillo de anilino (a excepción de en los compuestos **C.3.1**, **C.3.4**, **C.3.5** y **C.3.7**), mientras que H-3',5' no se registra como un doblete en la mayoría de los compuestos protonados (**C.3.2**, **C.3.4** y **C.3.6**) y en el caso de **C.3.5**, ya que se colapsa con las señales de H-3,5 y H-2',6'. En el caso de los compuestos protonados, las principales variaciones en esta zona con respecto a sus equivalentes no protonados, se localizan sobre todo en la sección correspondiente a los protones del espaciador bifenílico. En ella, se observa que los átomos de hidrógeno que experimentan una mayor modificación tras la protonación de la amina terciaria son H-3',5' y H-2,6. Tal y como puede observarse en las **Figuras 4.3.11-4.3.15**, las mayores migraciones corresponden a los protones H-3',5', que tras la protonación se desplazan a campo más bajo en todos los compuestos. Dicho comportamiento tiene justificación si consideramos que la protonación de la amina terciaria, la convierte en una amina cuaternaria alifática más electrón atrayente que la amina terciaria de partida. De esta

forma, H-3',5' queda más desapantallado que sus equivalentes en los compuestos no protonados.

En la segunda zona del espectro, correspondiente a los átomos de hidrógeno metilénicos, aparecen dos singletes, que al igual que en las subfamilias **C.1** y **C.2**, el de campo más bajo es el singlete del metileno unido a la quinolina (δ 5,82-5,90 ppm), mientras que el de campo más alto es el del metileno unido a la amina terciaria (δ 3,95-4,71 ppm, para los compuestos no protonados). Como también se advierte en las subfamilias **C.1** y **C.2**, la protonación de la amina terciaria inicial lleva consigo un notable desplazamiento de entre 0,18-0,70 ppm a frecuencias mayores que la señal perteneciente al metileno directamente unido a ella.

Por último, la tercera zona del espectro incluye las señales del metilo del resto de N-metilnilino y de las aminas de los compuestos de esta subfamilia. En todos los casos, los protones del metilo aparecen como un singlete entre las 2,35 y 2,43 ppm. El desplazamiento químico y la multiplicidad de las señales de las aminas terciarias incluidas en cada compuesto final de esta serie pueden consultarse en la **Tabla 4.3.13**. Tal y como puede apreciarse, existen mínimas modificaciones de desplazamiento químico con respecto a las aminas de las subfamilias **C.1** y **C.2**. Sin embargo, la protonación de la amina lleva consigo un notable desapantallamiento de los protones del carbono directamente unido al nitrógeno cuaternizado (**Figuras 4.3.11-4.3.15**). Dicha migración a campos más bajos ronda las 0,3-0,5 ppm, tal y como puede observarse en la **Tabla 4.3.13**.

Tabla 4.3.13. Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de ^1H -RMN de los compuestos finales derivados del bifenilo y la 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina **C.3.1-C.3.10**.

Comp.	H-2 _{quin}	H-3 _{quin}	H-5 _{quin}	H-6 _{quin}	H-8 _{quin}	R ₁	R ₂	H-2,6
C.3.1	8,68-8,70 (m)	6,85 (d, 7,4)	8,68-8,70 (m)	7,65 (dd, 1,8, 9,0, H-4 _{anil} , H-6 _{quin})	8,09 (d, 1,7)	2,35 (s)	7,31 (d, 8,3, H-2,6 _{anil}) 7,35 (d, 8,3, H-3,5 _{anil}) 7,65 (dd, 1,8, 9,0, H-4 _{anil} , H-6 _{quin})	7,40 (d, 8,3)
C.3.2	8,61-8,64 (m)	6,89 (d, 7,4)	8,61-8,64 (m)	7,78-7,79 (m, H-6 _{quin} , H-2,6)	8,12 (d, 1,7)	2,43 (s)	7,37-7,38 (d, 8,3, H-2,6 _{anil}) 7,40-7,42 (m, 4H, H-3,5, H-3,5 _{anil}) 7,69-7,73 (m, H-3',5', H-2',6', H-4 _{anil})	7,40-7,42 (m, H-2,6, H-3,5 _{anil})
C.3.3	8,58-8,60 (m)	6,84 (d, 7,4)	8,58-8,60 (m)	7,72 (dd, 8,3, 9,0)	8,07 (d, 1,7)	2,38 (s)	7,32-7,37 (m, 7H, H-2,6, H-2-6 _{anil})	7,32-7,37 (m, H-2,6, H-2-6 _{anil})
C.3.4	8,70-8,73 (m)	6,87 (d, 7,4)	8,70-8,73 (m)	7,69 (dd, 8,3, 9,0)	8,11 (d, 1,7)	2,36 (s)	7,33-7,38 (m, H-2-6 _{anil})	7,40 (d, 8,2)
C.3.5	8,67 (d, 9,1)	6,80 (d, 7,4)	8,60 (d, 7,5)	7,62 (dd, 8,3, 9,0)	8,06 (d, 1,7)	2,36 (s)	7,32-7,34 (m, H-2-6 _{anil})	7,38 (d, 8,3)
C.3.6	8,66 (d, 9,1)	6,88 (d, 7,4)	8,63 (d, 7,5)	7,74 (dd, 8,3, 9,0)	8,10 (d, 1,7)	2,39 (s)	7,36-7,39 (m, H-2,6, H-2-6 _{anil})	7,36-7,39 (m, H-2,6, H-2-6 _{anil})
C.3.7	8,55-8,58 (m)	6,84 (d, 7,4)	8,55-8,58 (m)	7,75 (dd, 8,3, 9,0)	8,09 (d, 1,7)	2,39 (s)	7,32-7,34 (m, H-2-6 _{anil})	7,37 (d, 8,1)
C.3.8	8,62-8,64 (m)	6,89 (d, 7,4)	8,62-8,64 (m)	7,78 (dd, 8,3, 9,0)	8,12 (d, 1,7)	2,42 (s)	7,36-7,41 (m, H-2,6, H-2-6 _{anil})	7,36-7,41 (m, H-2,6, H-2-6 _{anil})
C.3.9	8,58-8,62 (m)	6,87 (d, 7,4)	8,58-8,62 (m)	7,77 (dd, 8,3, 9,0)	8,11 (d, 1,7)	2,43 (s)	7,35-7,41 (m, H-2,6, H-2-6 _{anil})	7,35-7,41 (m, H-2,6, H-2-6 _{anil})
C.3.10	8,65-8,68 (m)	6,88 (d, 7,4)	8,65-8,68 (m)	7,79 (dd, 8,3, 9,0)	8,11 (d, 1,7)	2,39 (s)	7,36-7,43 (m, 7H, H-2,6, H-2-6 _{anil})	7,36-7,43 (m, H-2,6, H-2-6 _{anil})

Tabla 4.3.13. Continuación. Los cambios de los compuestos protonados con respecto a los no protonados se señalan con un asterisco.

Comp.	H-3,5	H-2',6'	H-3',5'	CH ₂ N ⁺	CH ₂ Nam	A.terciaria
C.3.1	7,60 (d, 8,3)	7,58 (d, 8,3)	7,50 (d, 8,3)	5,89 (s)	4,02 (s)	2,61 (s)
C.3.2	7,78-7,79 (m)	7,69-7,71 (m)	7,69-7,71* (m)	5,89 (s)	4,71 (s)	3,30 (s)
C.3.3	7,63-7,64 (m)	7,63-7,64 (m)	7,51 (d, 8,1)	5,83 (s)	4,11 (s)	1,25 (t, 7,4, -CH ₂ CH ₃) 2,98* (c, 7,2, -CH ₂ CH ₃)
C.3.4	7,62-7,66 (m)	7,62-7,66 (m)	7,62-7,66* (m)	5,90 (s)	4,37 (s)	1,33 (t, 7,4, -CH ₂ CH ₃) 3,20* (c, 7,2, -CH ₂ CH ₃)
C.3.5	7,50-7,62 (m)	7,50-7,62 (m)	7,50-7,62 (m)	5,84 (s)	4,08 (s)	1,94 (q, 3,3, H-3,4 _{pirr}) 3,00* (t, 6,9, H-2,5 _{pirr})
C.3.6	7,59-7,68 (m)	7,59-7,68 (m)	7,59-7,68* (m)	5,88 (s)	4,38 (s)	2,06 (q, 3,3, H-3,4 _{pirr}) 3,32* (t, 6,9 H-2,5 _{pirr})
C.3.7	7,61-7,65 (m)	7,61-7,65 (m)	7,47 (d, 8,1)	5,82 (s)	3,95 (s)	1,59 (m, H-4 _{pip}) 1,70 (q, 6,1, H-3,5 _{pirr}) 2,79-2,95* (m, H-2,6 _{pip})
C.3.8	7,67-7,70 (m)	7,67-7,70 (m)	7,58* (d, 8,2)	5,88 (s)	4,23 (s)	1,58-1,70 (m, H-4 _{pip}) 1,82 (q, 6,1, H-3,5 _{pirr}) 3,06-3,19* (m, H-2,6 _{pip})
C.3.9	7,67-7,68 (m)	7,67-7,68 (m)	7,56 (d, 8,2)	5,86 (s)	4,18 (s)	1,69-1,73 (m, H-4,5 _{az}) 1,82-1,86 (m, H-3,6 _{az}) 3,11-3,16* (m, H-2,7 _{az})
C.3.10	7,68-7,74 (m)	7,68-7,74 (m)	7,62* (d, 8,2)	5,89 (s)	4,36 (s)	1,69-1,73 (m, H-4,5 _{az}) 1,86-1,91 (m, H-3,6 _{az}) 3,28-3,34* (m, H-2,7 _{az})

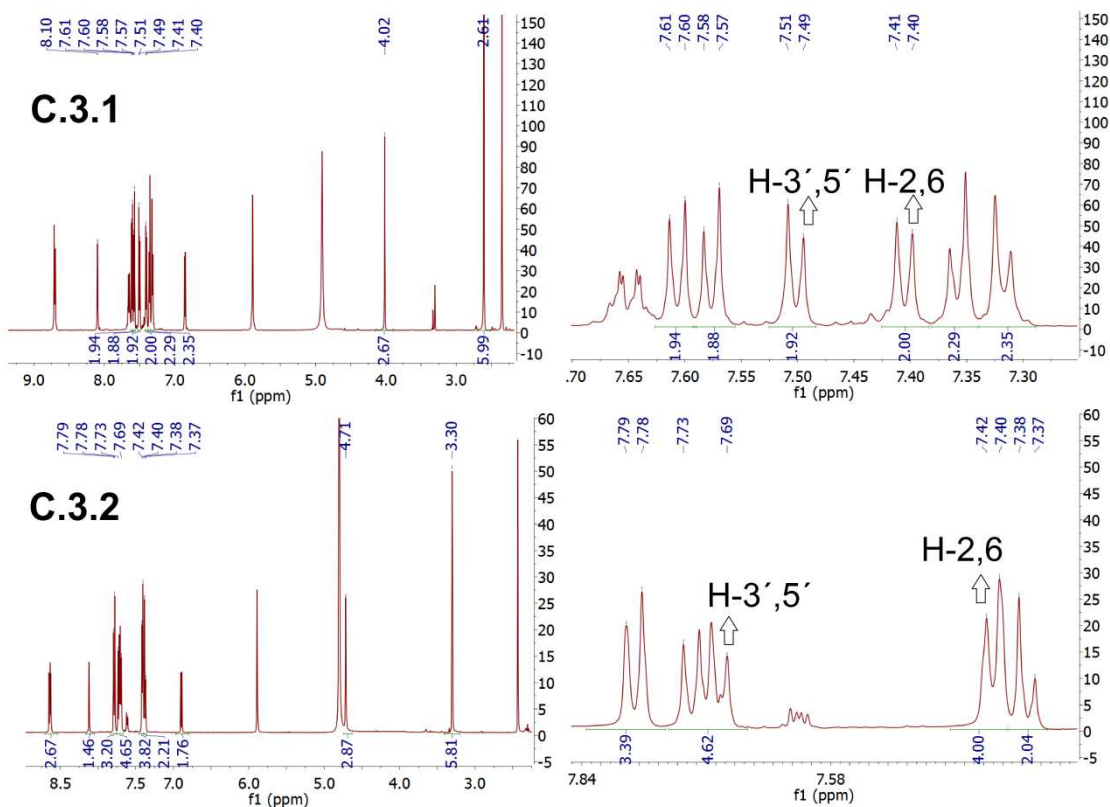


Figura 4.3.11. Cambios en las zonas aromática y alifática tras protonación de la amina de C.3.1.

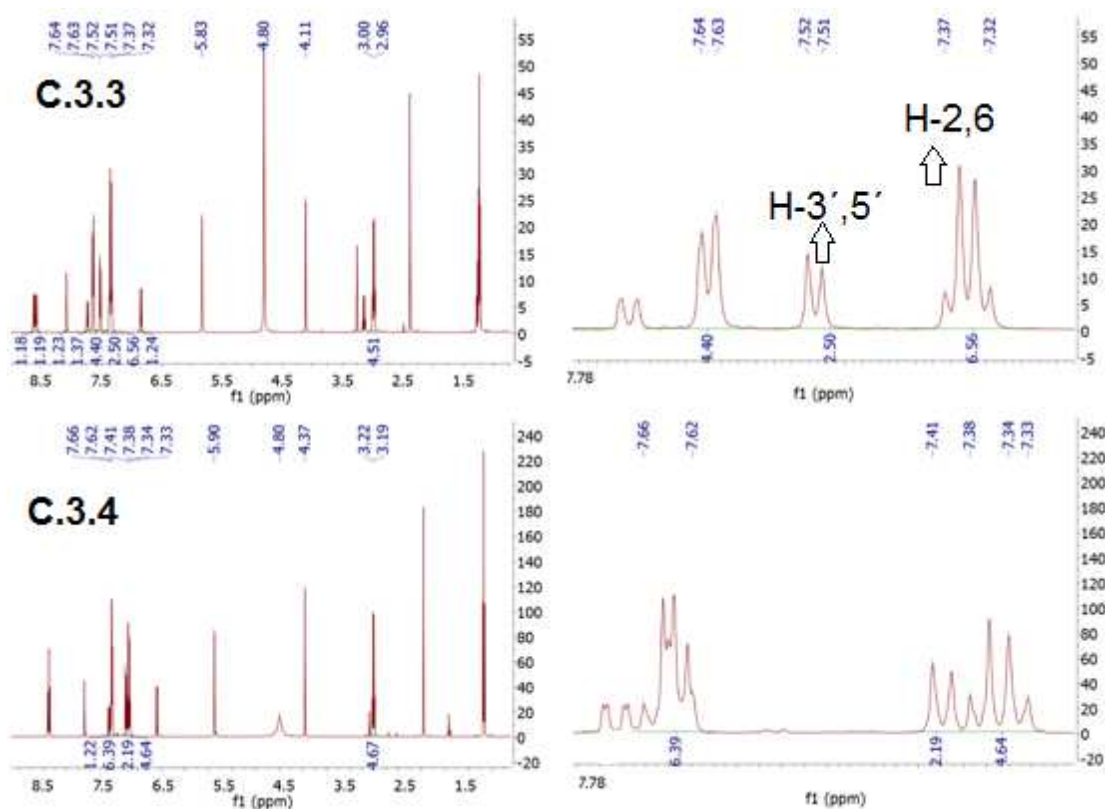


Figura 4.3.12. Cambios en las zonas aromática y alifática tras protonación de la amina de C.3.3.

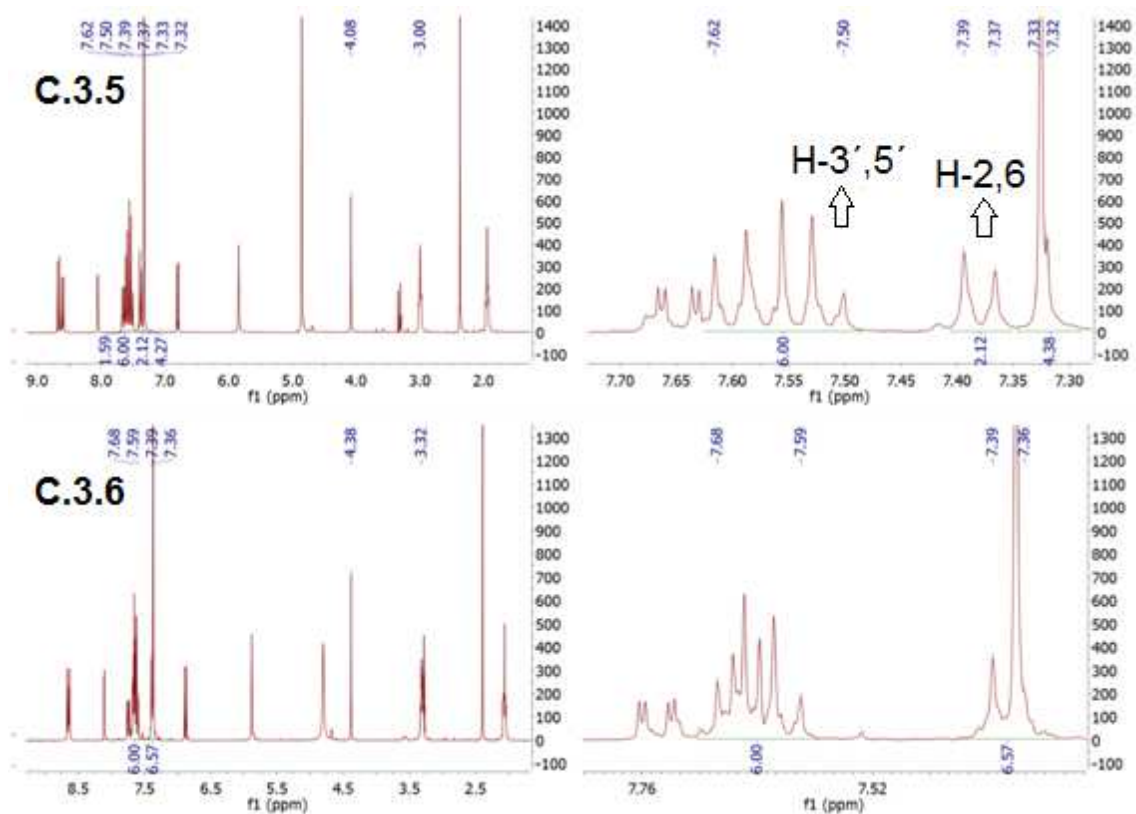


Figura 4.3.13. Cambios en las zonas aromática y alifática tras protonación de la amina de C.3.5.

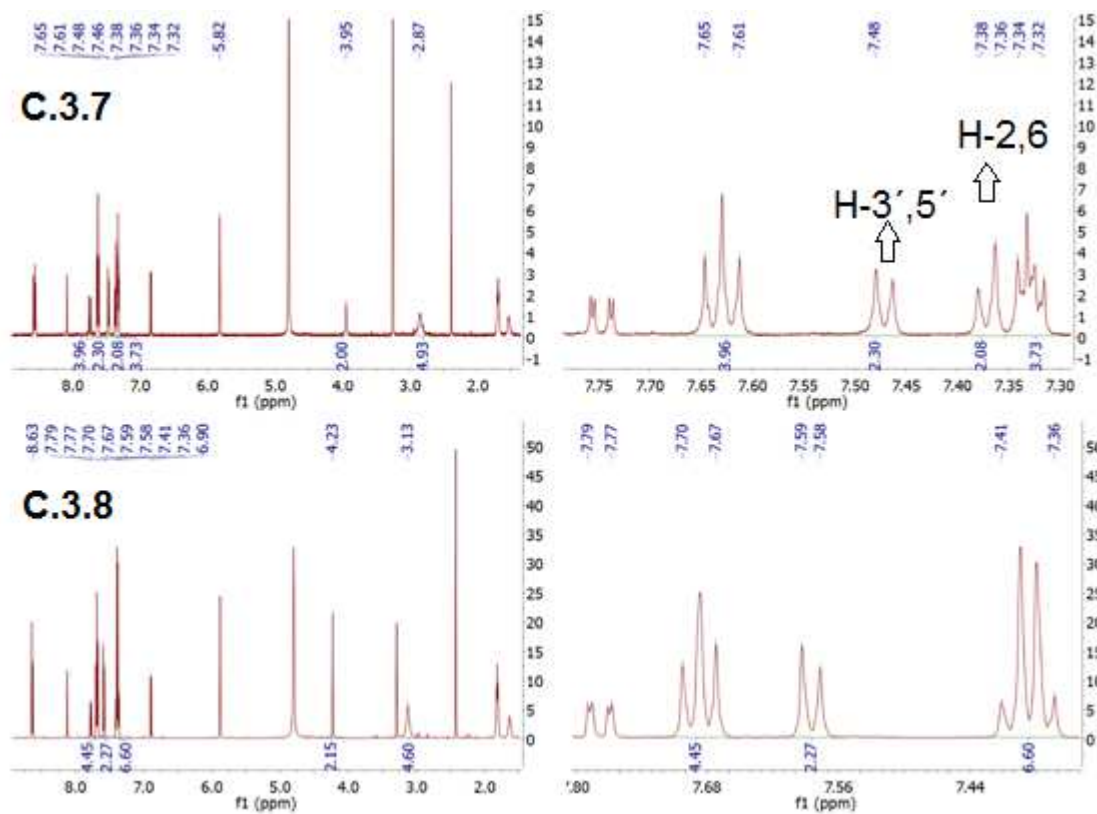


Figura 4.3.14. Cambios en las zonas aromática y alifática tras protonación de la amina de C.3.7.

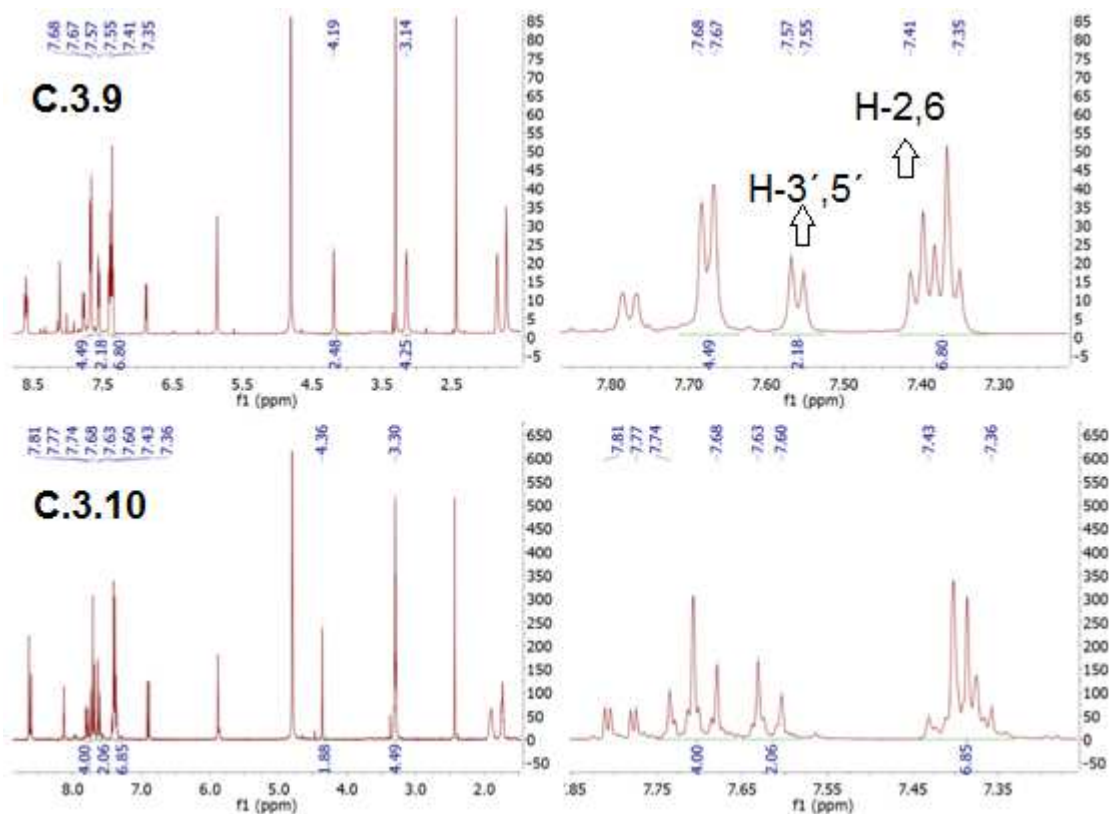


Figura 4.3.15. Cambios en las zonas aromática y alifática tras protonación de la amina de C.3.9.

4.3.3.3.2. Análisis espectroscópico de ^{13}C -RMN.

Los datos de desplazamiento químico de los carbonos de los compuestos C.3.1-C.3.10 se recogen en las Tablas 4.3.14 y 4.3.15. Los espectros de ^{13}C y DEPT han permitido determinar los carbonos cuaternarios y secundarios, mientras que los estudios de HMBC (a dos enlaces) y HSQC previamente citados, han posibilitado la asignación inequívoca de cada protón con su carbono. Al igual que los espectros de ^1H -RMN, todos estos espectros se han realizado utilizando como disolvente metanol deuterado.

En estos espectros de ^{13}C -RMN, se distinguen dos zonas: a) zona aromática, correspondiente a los carbonos pertenecientes al anillo de quinolina, anilino y al bifenilo; b) zona alifática donde se incluyen los metilenos (unidos al nitrógeno quinolinico y a la amina terciaria o cuaternaria alifática), los átomos de carbono del metilo en posición 4 del anillo de quinolinio y los de las aminas terciarias. A diferencia de las subfamilias C.1 y C.2, en los compuestos protonados de esta subfamilia, se observan modificaciones de los desplazamientos químicos de los carbonos que se

registran en la zona aromática, reflejando, por tanto, que la protonación también se detecta en el espectro de ^{13}C -RMN.

La primera zona del espectro mencionada anteriormente, está delimitada por los átomos de carbono C-4_{quin} a frecuencias mayores y C-3_{quin} a campo más alto. A diferencia de lo que ocurría en el espectro de ^1H -RMN, no existen secciones claramente definidas e independientes para los átomos de carbono de quinolina, del anilino o del espaciador bifenílico. No obstante, al igual que en los compuestos **A.3** y **B.3**, sí que se aprecia que los carbonos cuaternarios de todo el sistema, a excepción de $\text{C-4a}_{\text{quin}}$, aparecen antes (a campo más bajo) que los átomos de carbono aromáticos. El orden en el que se registran en los compuestos no protonados es el que sigue: $\text{C-4}_{\text{quin}} > \text{C-7}_{\text{quin}} > \text{C-4} > \text{C-1}' > \text{C-8a}_{\text{quin}} > \text{C-1} > \text{C-4}'$. No obstante, en los compuestos protonados, se cambia el orden de los carbonos C-4 , C-7_{quin} y $\text{C-1}'$, tal que así: $\text{C-4}_{\text{quin}} > \text{C-1}' > \text{C-7}_{\text{quin}} > \text{C-4} > \text{C-8a}_{\text{quin}} > \text{C-1} > \text{C-4}'$. Por otro lado, los carbonos aromáticos del bifénilo en los compuestos no protonados, se registran en la sección del espectro localizada entre $\text{C-4}'$ y C-5_{quin} según el siguiente esquema: $\text{C-3}',5' > \text{C-2},6 > \text{C-2}',6' > \text{C-3},5$. Concretamente, $\text{C-2}',6'$ y $\text{C-3},5$ se localizan tan próximos en el espectro, que casi colapsan. Dicha observación, pone de manifiesto la similitud de su entorno químico, al estar localizados más internamente en el espaciador bifenílico. En los compuestos protonados, los carbonos aromáticos bifenílicos se registran en la zona del espectro localizada entre C-1 (a campo más bajo) y $\text{C-4}'$ (a campo más alto) siguiendo el orden que a continuación se detalla: $\text{C-3}',5' > \text{C-2}',6' > \text{C-3},5 > \text{C-2},6$.

En definitiva, tanto para el caso de los carbonos cuaternarios bifenílicos como para los aromáticos localizados en tal espaciador, se dan respectivamente variaciones notables de desplazamiento químico y de orden de aparición en el espectro. De este modo, para el caso de los compuestos protonados se observa la aparición a frecuencias menores de los carbonos aromáticos directamente unidos a la cabeza catiónica ($\text{C-2},6$). Por su parte, los átomos de carbono cuaternarios experimentan un cambio en el desplazamiento químico, siendo especialmente evidente en el caso del carbono cuaternario $\text{C-4}'$, que migra unas 2-11 ppm a campos más altos.

Los átomos de carbono del anillo de anilino por su parte, aparecen distribuidos por toda la zona "a".

En la segunda zona del espectro de ^{13}C -RMN, la señal que aparece a campos más bajos, corresponde al metileno unido a la amina terciaria (δ 57,25-67,38 ppm). En esta

zona, sólo para los compuestos **C.3.5**, **C.3.7** y **C.3.9** se observa una aproximación de las señales de los carbonos metilénicos tras la protonación de la amina terciaria en sus compuestos equivalentes **C.3.6**, **C.3.8** y **C.3.10**.

En la “zona c”, también se registra el átomo de carbono terciario del metilo del grupo *N*-metilanilino. Su desplazamiento químico apenas se modifica entre los diferentes compuestos finales de esta serie, oscilando entre las 19,22 y las 20,85 partes por millón (ppm).

Por último, en esta región alifática nos encontramos con los carbonos de las distintas aminas, tanto cuando el compuesto está protonado, como cuando no lo está (ver **Tabla 4.3.15**). La protonación no afecta al desplazamiento químico de ninguno de los carbonos de dichas aminas.

Tabla 4.3.14. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN de los compuestos finales derivados de bencilo y 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina **C.3.1-C.3.10**.

Comp.	C-2 _{quin}	C-3 _{quin}	C-4 _{quin}	C-5 _{quin}	C-6 _{quin}	C-7 _{quin}	C-8 _{quin}	C-4 _a	C-8 _a	R ₁	R ₂
C.3.1	148,68	101,59	155,45	127,13	128,60	141,52	119,13	118,07	140,21	20,85	125,84 (C-3 _{anil} , C-5 _{anil}) 131,34 (C-2 _{anil} , C-6 _{anil}) 135,05 (C-4 _{anil}) 139,12 (C-1 _{anil})
C.3.2	147,05	100,06	155,45	126,10	127,11	140,11	117,63	116,77	138,83	19,22	124,54 (C-3,5 _{anil}) 129,88 (C-2,6 _{anil}) 135,58 (C-4 _{anil}) 137,87 (C-1 _{anil})
C.3.3	147,57	100,60	155,97	125,88	127,65	140,72	118,17	117,39	139,40	19,88	125,10 (C-3,5 _{anil}) 129,88 (C-2,6 _{anil}) 134,31 (C-4 _{anil}) 138,34 (1C, C-1 _{anil})

Tabla 4.3.14. Continuación.

Comp.	C-2 _{quin}	C-3 _{quin}	C-4 _{quin}	C-5 _{quin}	C-6 _{quin}	C-7 _{quin}	C-8 _{quin}	C-4a	C-8a	R ₁	R ₂
C.3.4	148,15	100,91	155,97	126,38	129,24	140,93	118,51	117,46	139,55	20,13	125,45 (C-3,5 _{anil}) 130,67 (C-2,6 _{anil}) 134,07 (1C, C-4 _{anil}) 138,62 (C-1 _{anil})
C.3.5	147,60	100,90	155,93	126,43	130,63	140,73	118,32	117,86	139,60	20,14	125,15 (C-3,5 _{anil}) 130,63 (C-2,6 _{anil}) 135,26 (C-4 _{anil}) 138,12 (C-1 _{anil})
C.3.6	147,84	100,91	155,93	122,85	127,80	140,75	118,31	117,28	139,40	19,85	125,24 (C-3,5 _{anil}) 130,49 (C-2,6 _{anil}) 133,94 (C-4 _{anil}) 138,50 (C-1 _{anil})
C.3.7	145,40	100,85	155,98	126,33	127,45	140,98	119,57	117,42	139,47	19,89	123,93 (C-3,5 _{anil}) 130,28 (C-2,6 _{anil}) 136,25 (C-4 _{anil}) 139,28 (C-1 _{anil})
C.3.8	147,73	100,61	155,98	125,78	129,35	140,74	118,25	117,30	139,38	19,76	125,19 (C-3,5 _{anil}) 133,99 (C-4 _{anil}) 138,52 (C-1 _{anil}) 130,46 (C-2,6 _{anil})
C.3.9	147,55	100,67	155,98	125,72	127,68	140,84	118,19	117,39	140,57	19,74	125,09 (C-3,5 _{anil}) 138,43 (C-4 _{anil}) 139,41 (C-1 _{anil})
C.3.10	147,73	100,57	156,02	125,78	129,52	140,78	118,32	117,28	140,41	19,74	125,25 (C-3,5 _{anil}) 138,62 (C-4 _{anil}) 139,45 (C-1 _{anil})

Tabla 4.3.15. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN de los compuestos finales derivados de bencilo y 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina **C.3.1-C.3.10**.

Comp.	C-1	C-2,6	C-4	C-3, 5	C-1'	C-2',6'	C-4'	C-3',5'	CH ₂ N ⁺	CH ₂ am	A.terciaria
C.3.1	134,67	128,40	141,39	127,92	141,35	128,29	133,14	131,76	58,28	62,19	43,51 (CH ₃)
C.3.2	134,38	126,60	139,53	126,82	141,85	127,08	126,40	132,97	56,67	67,38	46,78 (CH ₃)
C.3.3	133,75	127,51	140,64	127,11	140,57	127,13	130,84	130,42	55,70	57,25	8,08 (- CH ₂ CH ₃) 46,37 (- CH ₂ CH ₃)
C.3.4	134,23	127,61	140,38	127,61	141,62	127,80	128,00	131,59	55,72	57,62	8,13 (- CH ₂ CH ₃) 46,95 (- CH ₂ CH ₃)
C.3.5	134,03	127,69	140,64	127,19	140,47	127,54	133,57	130,63	57,43	58,55	22,89 (C- 3,4 _{pirr}) 53,90 (C- 2,5 _{pirr})
C.3.6	133,94	127,31	140,37	127,37	141,35	127,60	125,93	130,82	57,37	57,52	22,52 (C- 3,4 _{pirr}) 53,99 (C- 2,5 _{pirr})
C.3.7	136,18	127,09	139,78	126,54	139,60	126,54	133,99	130,30	56,55	62,85	23,76 (C- 4 _{pip}) 25,11 (C- 3,5 _{pip}) 53,99 (C- 2,6 _{pip})
C.3.8	133,85	127,16	140,50	127,21	141,34	127,57	127,76	131,49	57,31	60,18	21,58 (C- 4 _{pip}) 22,97 (C- 3,5 _{pip}) 52,74 (C- 2,6 _{pip})
C.3.9	134,22	127,52	140,74	127,10	140,69	127,10	133,73	130,95	57,31	60,54	24,04 (C- 4,5 _{az}) 26,17 (C- 3,5 _{az}) 54,54 (C- 2,7 _{az})
C.3.10	133,99	127,20	140,67	127,41	140,81	127,64	127,83	131,46	57,20	60,22	23,03 (C- 4,5 _{az}) 26,21 (C- 3,5 _{az}) 54,47 (C- 2,7 _{az})

4.3.3.3.3. Análisis de espectrometría de masas HRMS.

El análisis de HRMS muestra una concordancia perfecta entre los valores calculados para las fórmulas empíricas (M-Br)⁺ de los compuestos de esta familia y los correspondientes valores encontrados. Además, al igual que para los compuestos de la **subfamilia C.1**, gracias a este análisis de espectrometría se confirma la protonación de los compuestos **C.3.2**, **C.3.4**, **C.3.6**, **C.3.8** y **C.3.10** encontrándose en su espectro una señal a relación $m/z = m/2$ correspondiente a la fórmula empírica (M-Br)²⁺.

- C.3.1:** calculado para $C_{32}H_{31}N_3Cl^+$: 492.2207; encontrado: 492.2196.
- C.3.2:** calculado para $C_{32}H_{32}N_3Cl^{2+}$: 246.6104; encontrado: 246.6083. También aparece el pico del producto sin protonar, pero según espectros de RMN, la cantidad en la que se encuentra no es apreciable.
- C.3.3:** calculado para $C_{34}H_{35}N_3Cl^+$: 520.2520; encontrado: 520.2513.
- C.3.4:** calculado para $C_{34}H_{36}N_3Cl^{2+}$: 260.6260; encontrado: 260.6253. También aparece el pico del producto sin protonar, pero según espectros de RMN, la cantidad en la que se encuentra no es apreciable.
- C.3.5:** calculado para $C_{34}H_{33}N_3Cl^+$: 518.2363; encontrado: 518.2349.
- C.3.6:** calculado para $C_{34}H_{34}N_3Cl^{2+}$: 259.6182; encontrado: 259.6207. También aparece el pico del producto sin protonar, pero según espectros de RMN, la cantidad en la que se encuentra no es apreciable.
- C.3.7:** calculado para $C_{35}H_{35}N_3Cl^+$: 532.2520; encontrado: 532.2508.
- C.3.8:** calculado para $C_{35}H_{36}N_3Cl^{2+}$: 266.6260; encontrado: 266.6287. También aparece el pico del producto sin protonar, pero según espectros de RMN, la cantidad en la que se encuentra no es apreciable.
- C.3.9:** calculado para $C_{36}H_{37}N_3Cl^+$: 546.2676; encontrado: 546.2626.
- C.3.10:** calculado para $C_{36}H_{38}N_3Cl^{2+}$: 273.6388; encontrado: 273.6373. También aparece el pico del producto sin protonar, pero según espectros de RMN, la cantidad en la que se encuentra no es apreciable.

4.3.3.3.4. Análisis espectroscópico de la subfamilia C.4.

Dentro de esta subfamilia se presentan los compuestos finales **C.4.1-C.4.4**, derivados del bifeniilo y de la 7-cloro-4-(perhidroazepin-1-il)quinolina (**Figura 4.3.16**).

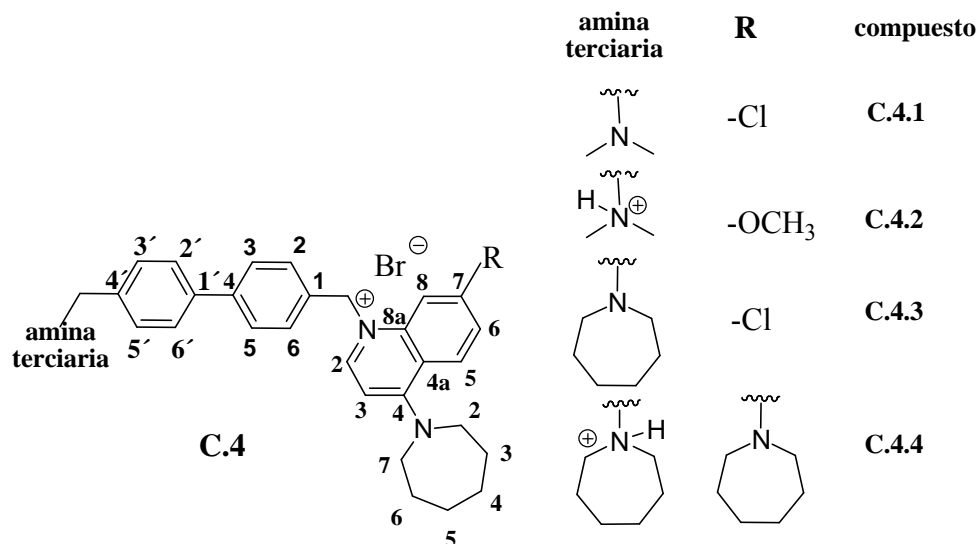


Figura 4.3.16. Estructura química de los compuestos finales de la subfamilia C.4.

En esta subfamilia, sólo se sintetizaron los derivados de la dimetilamina y de la perhidroazepina, puesto que los ensayos biológicos sobre la actividad antiproliferativa con los compuestos finales del resto de subfamilias indicaron que los cambios en los resultados obtenidos eran más significativos entre los derivados con amina menos y más voluminosa, respectivamente. Los compuestos **C.4.2** y **C.4.4** se formaron espontáneamente durante el transcurso de la reacción tras la protonación de la amina terciaria y la sustitución del cloro en la posición 7 de la quinolina de sus compuestos equivalentes (**C.4.1** y **C.4.3**). De esta forma, el compuesto **C.4.2** incluye en la posición 7 un grupo metoxilo y la dimetilamina, se encuentra protonada. Por su parte, el compuesto **C.4.4** se caracteriza por presentar una azepina en la posición 7 de la quinolina y protonación en la azepina del otro extremo de la molécula. Las sustituciones del halógeno en 7 (-Cl) se produjeron por un mecanismo de tipo S_N2 por parte de la amina utilizada en la reacción y el metanol que se emplea durante la purificación del producto final. Por ello, las diferencias más significativas que se observan en los espectros de RMN de esta subfamilia aparecen como consecuencia de si haya o no sustitución en dicha posición. En base a esto pueden crearse dos subgrupos de

compuestos finales. En uno de ellos, se engloban los compuestos con el cloro en 7 sustituido (ya sea por la amina o por el grupo metoxilo; compuestos **C.4.2** y **C.4.4**) y en el otro, los compuestos que se esperaba obtener al plantearse la síntesis, es decir, los derivados no sustituidos (**C.4.1** y **C.4.3**). Las diferencias estructurales existentes entre los compuestos **C.4.1** y **C.4.3** son debidas a la amina terciaria empleada en cada caso, mientras que para los compuestos **C.4.2** y **C.4.4** además de encontrarnos distintas aminas protonadas, existen también diferencias en el sustituyente de la posición 7 (R). Como se observa en las subfamilias anteriores, dicha amina no introduce variaciones importantes en cuanto al número de señales, su multiplicidad o los desplazamientos químicos. No obstante, cuando se produce la sustitución en la posición 7 por un grupo distinto al halógeno inicial (ya sea metoxilo o azepina), se observan modificaciones de desplazamiento químico tanto en el espectro de ^1H -RMN como en el de ^{13}C -RMN en comparación con los compuestos sin sustituir. No obstante, según el espectro bidimensional de HSQC y las correlaciones a dos enlaces observadas en el HMBC el orden en el que aparecen los protones bifenílicos, los metilenos y los protones de las aminas con sus carbonos correspondientes en cada subgrupo, es muy parecido entre sí y en el caso de los compuestos clorados, también igual al expuesto previamente para las subfamilias **C.1**, **C.2** y **C.3**.

En esta subfamilia, los compuestos que se han usado como referencia para asignar a partir de sus bidimensionales (HSQC y HMBC) los protones y los carbonos del resto de compuestos de la serie han sido el **C.4.3** y el **C.4.4**. Como puede observarse en la **Figura 4.3.16**, se eligió un compuesto donde el cloro de la posición 7 de la quinolina se conservó (**C.4.3**) y otro con sustitución de dicho halógeno (**C.4.4**) para asignar inequívocamente todas las señales. De esta forma, las señales del compuesto **C.4.1** se establecen extrapolando los datos obtenidos en la asignación de los átomos de hidrógeno y de carbono del producto final **C.4.3**, mientras que los del compuesto **C.4.2** se asignan a partir de los resultados obtenidos para el **C.4.4** (Ver Anexo).

4.3.3.3.4.1. Análisis espectroscópico de ^1H -RMN.

Los datos espectroscópicos de ^1H -RMN, se muestran resumidos en la **Tabla 4.3.15**. Todos estos espectros se han realizado utilizando como disolvente metanol deuterado y son concordantes con las estructuras propuestas. Al igual que en el caso de todas las familias anteriores, en los espectros de ^1H -RMN de los compuestos **C.4.1-C.4.4** se

incluyen tres zonas de resonancia de protones: a) zona aromática, correspondiente a los protones pertenecientes al anillo de quinolina y al bifenilo; b) zona correspondiente a los metilenos unidos al nitrógeno quinolínico y a la amina terciaria (o terciaria protonada); y, c) zona alifática, donde se incluyen los protones de sustituyente en la posición 7 (R) y de la amina correspondiente en cada compuesto final.

En la primera de las tres zonas, los protones del anillo quinolínico y los del espaciador bifenílico ocupan diferentes secciones en ambos subgrupos. De esta forma, la zona del espectro que ocupan los protones del anillo bifenílico está delimitada a frecuencias mayores por los hidrógenos H-2_{quin} y H-5_{quin} y a frecuencias menores por H-3_{quin}. A diferencia de lo que ocurría en la subfamilia **C.3** con los protones H-2_{quin} y H-5_{quin}, éstos aparecen como dobletes independientes uno inmediatamente a continuación del otro y no como multiplete. Por otro lado, es destacable la modificación del desplazamiento químico del protón H-8_{quin} tras la sustitución del cloro en posición 7 por perhidroazepina o por metoxilo. Dicho átomo sufre un apantallamiento que lo desplaza 1.5 ppm a campo más alto en los compuestos **C.4.2** y **C.4.4**, con lo que en vez de registrarse inmediatamente después del H-5_{quin} en los compuestos clorados (**C.4.1** y **C.4.3**), se sitúa detrás del H-3_{quin}. En los dos subgrupos, H-8_{quin} resuena como doblete. Por su parte, H-6_{quin} se solapa con los hidrógenos aromáticos H-3',5' en los compuestos con cloro (**C.4.1** y **C.4.3**), y por el contrario aparece como doblete a campo inmediatamente más bajo que H-3_{quin} cuando existe sustitución del halógeno.

Dentro de la sección que ocupan los protones del espaciador bifenílico, el orden de aparición de las señales se conserva en ambos subgrupos (**Tabla 4.3.15**) y también en los compuestos no protonados del resto de las subfamilias de la familia **C** (**Tablas 4.3.9**, **4.3.11** y **4.3.13**). Por lo que respecta a los átomos de hidrógeno H-2,6 y H-3',5', ambos aparecen a frecuencias menores que los protones internos del espaciador. Al igual que en las subfamilias **C.1** y **C.2**, H-2,6 resuena como doblete en todos los compuestos de esta serie (a excepción del **C.4.1**) debido a su acoplamiento a corta distancia con H-3,5. Por su parte, H-3',5' se registra como multiplete en todos los compuestos ya que se acopla con H-2',6' y con los hidrógenos del metileno unido a la amina.

En la segunda zona del espectro, correspondiente a los átomos de hidrógeno metilénicos (δ 4,27-5,83 ppm), aparecen dos singletes y al igual que en el resto de las subfamilias el de campo más alto es el correspondiente al metileno unido a la amina terciaria.

Por último, la tercera zona del espectro incluye las señales de los sustituyentes en la posición 7 y las de las aminas localizadas en el otro extremo de la molécula. El desplazamiento químico y la multiplicidad de las señales de los sustituyentes en la posición 7 y de las aminas terciarias incluidas en cada compuesto final de esta serie pueden consultarse en la **Tabla 4.3.15**.

Tabla 4.3.15. Desplazamientos químicos, multiplicidad y constantes de acoplamiento de ^1H -RMN de los compuestos finales derivados del bifenilo y la 7-cloro-4-(perhidroazepin-1-il)quinolina **C.4.1-C.4.4**.

Comp.	H-2 _{quin}	H-3 _{quin}	H-5 _{quin}	H-6 _{quin}	H-8 _{quin}	azepina	R
C.4.1	8,58 (d, 7,8)	7,13 (d, 7,8)	8,38 (d, 9,3)	7,60-7,63 (m)	8,00 (d, 2,0)	1,66-1,73 (m, H-4,5 _{az}) 2,01-2,09 (m, H-3,6 _{az}) 4,06 (t, 5,5, H-2,7 _{az})	-
C.4.2	8,34 (d, 7,8)	6,82 (d, 7,8)	8,12 (d, 9,3)	7,06 (dd, 2,5, 9,7)	6,54 (d, 7,8)	1,65-1,73 (m, H-4,5 _{az}) 1,96-2,08 (m, H-3,6 _{az}) 3,96 (t, 5,5, H-2,7 _{az})	2,99 (s, 3H, -OCH ₃)
C.4.3	8,56 (d, 7,8)	7,12 (d, 8,8)	8,37 (d, 9,2)	7,61-7,63 (m)	8,02 (d, 2,0)	1,65-1,73 (m, H-4,5 _{az} , H-4,5 _{az} am) 2,04-2,07 (m, H-3,6 _{az}) 4,07 (t, 5,5, H-2,7 _{az})	-
C.4.4	8,34 (d, 7,8)	6,86 (d, 7,8)	8,16 (d, 9,8)	7,12 (dd, 2,5, 9,7)	6,54 (d, 2,6)	1,74-1,78 (m, H-4,5 _{az} , H-4,5 _{az} am) 2,05-2,09 (m, H-3,6 _{az}) 4,02 (t, 5,6, H-2,7 _{az})	1,38-1,44 (m, H-4,5 _{az}) 1,59-1,64 (m, H-3,6 _{az}) 3,57 (t, 5,9, H-2,7 _{az})

Tabla 4.3.15. Continuación.

Comp.	H-2,6	H-3,5	H-2',6'	H-3',5'	CH ₂ N ⁺	CH ₂ Nam	A.terciaria
C.4.1	7,38-7,40 (m)	7,68-7,73 (m)	7,68-7,73 (m)	7,60-7,63 (m)	5,83 (s)	4,36 (s)	2,85 (s, (-CH ₃) ₂ am)
C.4.2	7,39 (d, 8,2)	7,64-7,69 (m)	7,75 (d, 2,0)	7,64-7,69 (m)	5,69 (s)	4,70 (s)	3,02 (s, (-CH ₃) ₂ am)
C.4.3	7,39 (d, 8,4)	7,69-7,73 (m)	7,69-7,73 (m)	7,61-7,63 (m)	5,83 (s)	4,34 (s)	1,65-1,73 (m, H-4,5 _{az} , H-4,5 _{az} am) 1,87- 1,90 (m, H-3,6 _{az} am) 3,21 (t, 5,1, H-2,7 _{az} am)
C.4.4	7,36 (d, 8,2)	7,68-7,72 (m)	7,68-7,72 (m)	7,58-7,62 (m)	5,71 (s)	4,27 (s)	1,74-1,78 (m, H-4,5 _{az} , H-4,5 _{az} am) 1,89-2,00 (m, H-3,6 _{az} am) 3,25-3,29 (m, H-2,7 _{az} am)

4.3.3.3.4.2. Análisis espectroscópico de ^{13}C -RMN.

Los datos de desplazamiento químico de los carbonos de los compuestos **C.4.1-C.4.4** se recogen en las **Tabla 4.3.16**. Los espectros de ^{13}C y DEPT han permitido determinar los carbonos cuaternarios y secundarios, mientras que los estudios de

HMBC (a dos enlaces) y HSQC previamente citados, han posibilitado la asignación inequívoca de cada protón con su carbono. Al igual que los espectros de ^1H -RMN, todos estos espectros se han realizado utilizando como disolvente metanol deuterado.

En estos espectros de ^{13}C -RMN, se distinguen dos zonas: a) zona aromática, correspondiente a los carbonos pertenecientes al anillo de quinolina y al bifenilo; b) zona alifática donde se incluyen los metilenos (unidos al nitrógeno quinolínico y a la amina terciaria o cuaternaria alifática), los átomos de carbono de las aminas terciarias y los de los sustituyentes en posición 7. En general, puede afirmarse que existe una gran concordancia en los desplazamientos químicos que presentan los átomos de carbono en los dos subgrupos de esta subfamilia. Sin embargo, existen ciertas diferencias a nivel de los carbonos cuaternarios que merecen ser comentadas.

En la primera zona del espectro, las señales de los átomos de carbono aromáticos del bifenilo están delimitados por aquellas de los carbonos quinolínicos (C-8_{quin} a campo bajo y C-3_{quin} a campo alto, en los derivados clorados) o cuaternarios bifenílicos (C-1 a campo bajo y C-4a a campo alto, en **C.4.2** y en **C.4.4**), según el siguiente esquema: $\text{C-3}',5' > \text{C-3},5 > \text{C-2}',6' > \text{C-2},6$.

El aspecto más destacable en relación a las diferencias que se observan en el espectro de ^{13}C -RMN para los átomos de carbono aromáticos quinolínicos y cuaternarios en ambos subgrupos es la modificación de desplazamiento químico que sufren los carbonos C-6_{quin} , C-8_{quin} , pero sobre todo C-7_{quin} tras la sustitución del cloro por los grupos metoxilo o perhidroazepina. Concretamente, dicho carbono se desplaza hasta 12 ppm a frecuencias mayores cuando se sustituye el halógeno.

Como viene observándose en todas las subfamilias anteriores, en la segunda zona del espectro de ^{13}C -RMN, la señal que aparece a campo más bajo, corresponde al metileno unido a la amina terciaria.

Para consultar los desplazamientos de las distintas aminas, tanto cuando el compuesto está sustituido, como cuando no lo está ver **Tabla 4.3.16**.

Tabla 4.3.16. Desplazamientos químicos de ^{13}C -RMN de los compuestos finales derivados de bencilo y 7-cloro-4-(perhidroazepin-1-il)quinolina **C.4.1-C.4.4**.

Comp.	C-2 _{quin}	C-3 _{quin}	C-4 _{quin}	C-5 _{quin}	C-6 _{quin}	C-7 _{quin}	C-8 _{quin}	C-4a	C-8a	azepina	R
C.4.1	144,89	102,81	159,26	130,18	125,22	139,59	117,44	117,57	140,66	26,88 (C-4,5 _{az}) 27,01 (C-3,5 _{az}) 53,92 (C-2,7 _{az})	-
C.4.2	143,44	100,67	158,79	129,24	95,53	152,74	126,63	111,88	142,52	27,03 (C-4,5 _{az}) 27,50 (C-3,5 _{az}) 53,44 (C-2,7 _{az})	42,18 (-OCH ₃)
C.4.3	144,86	102,90	159,26	130,17	125,23	139,64	117,45	117,59	140,70	26,89 (C-4,5 _{az}) 27,02 (C-3,6 _{az}) 53,89 (C-2,7 _{az})	-
C.4.4	143,49	100,52	158,64	129,54 (= 4')	95,53	151,60	111,72	109,02	142,35	27,02 (C-4,5 _{az}) 27,52 (C-2,7 _{az}) 53,43 (C-3,6 _{az})	26,03 (C-2,7 _{az}) 26,34 (C-3,6 _{az}) 49,37 (C-2,7 _{az})

Tabla 4.3.16. Continuación.

Comp.	C-1	C-2,6	C-4	C-3,5	C-1'	C-2',6'	C-4'	C-3',5'	CH ₂ N ⁺	CH ₂ Nam	A.terciaria
C.4.1	134,04	127,23	140,20	127,55	141,70	127,38	130,10	131,28	56,72	60,36	41,59 ((CH ₃) ₂ am)
C.4.2	134,95	127,29	139,70	127,46	142,03	127,33	130,99	133,53	56,82	60,94	8,62 ((CH ₃) ₂ am)
C.4.3	134,95	126,71	139,93	127,55	141,68	127,27	129,82	131,41	57,20	60,17	26,08 (C- 4,5 _{az} am) 26,13 (C- 3,6 _{az} am) 54,34 (C- 2,7 _{az} am)
C.4.4	134,00	127,23	140,31	127,55	141,44	127,31	129,54	131,37	56,77	60,20	26,10 (C- 4,5 _{az} am) 26,14 (C- 3,6 _{az} am) 54,35 (C- 2,7 _{az} am)

4.3.3.3.4.3. Análisis de espectrometría de masas HRMS.

El análisis de HRMS muestra una concordancia perfecta entre los valores calculados para las fórmulas empíricas (M-Br)⁺ de los compuestos de esta familia y los correspondientes valores encontrados. Además, al igual que para los compuestos de la subfamilia **C.1**, gracias a este análisis de espectrometría se confirma la sustitución del cloro en posición 7 de la quinolina por metoxilo en el compuesto **C.4.2** y por azepina en **C.4.4**.

C.4.1: calculado para C₃₁H₃₅N₃Cl⁺: 484,2089; encontrado: 484,2070.

C.4.2: calculado para C₃₂H₃₉N₃OCl²⁺: 247,1605; encontrado: 247,1587.

C.4.3: calculado para C₃₅H₄₁N₃Cl⁺: 538,2989; encontrado: 538,2981.

C.4.4: calculado para C₄₁H₅₄N₄²⁺: 301,2169; encontrado: 301,2162.

4.3.4. Ensayos biológicos

4.3.4.1. Consideraciones generales

Para lograr el principal objetivo de la Química Farmacéutica, es decir, el descubrimiento de nuevos fármacos, es necesario que el diseño y la síntesis de los nuevos prototipos se realice de forma simultánea a su evaluación biológica para descartar las moléculas inactivas y continuar con el estudio de aquellas que dan lugar al efecto deseado.

En este apartado se discuten los resultados de los ensayos biológicos de los compuestos sintetizados en la presente Tesis Doctoral. En primer lugar, se mostrará un análisis de su afinidad frente a *HsChoK α 1* y *HsChoK β* , así como de los ensayos de inhibición enzimática y de actividad antiproliferativa realizados frente a diversas líneas celulares. Finalmente, se presentará la estructura cristalográfica de *HsChoK α 1* en complejo con los compuestos más activos para estudiar su modo de unión. Con todo ello se pretenden obtener conclusiones útiles para el futuro diseño de nuevos inhibidores de *HsChoK α 1*.

4.3.4.2. Ensayos de espectroscopía de fluorescencia sobre *HsChoK*

Los compuestos seleccionados para este primer experimento fueron todos los de las familias **A** y **B** y sólo aquellos de la familia **C** con las cabezas catiónicas de menor y de mayor tamaño, respectivamente. Además, para evaluar el efecto de la carga positiva y del grupo fenilo de los distintos compuestos en la afinidad por la proteína, se hizo espectroscopía de fluorescencia con los grupos funcionales que forman la cabeza catiónica, pero sin carga ni fenilo. Esto es, sobre los grupos 4-dimetilaminopiridina, 4-pirrolidinopiridina, 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina y 7-cloro-4-(perhidroazepin-1-il)quinolina (**Figura 4.3.17**).

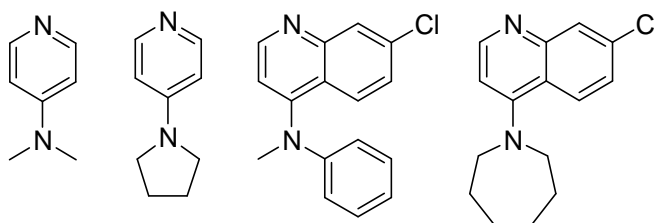


Figura 4.3.17. Grupos funcionales sin carga de la cabeza catiónica.

De todos los compuestos seleccionados, los únicos que mostraron muy poca afinidad (35-82 μM) por la ChoK fueron los derivados sin carga positiva ni fenilo (**Tabla 4.3.17**), demostrándose así la importancia que tienen ambos en el farmacóforo para conseguir la unión eficiente de los ligandos. No obstante, aunque su efecto sea poco notable, alguna afinidad muestran por la enzima lo cual es gracias a los anillos aromáticos. Además, se observa mejora de la afinidad en los derivados de quinolina, por lo que el benceno adicional del anillo quinolínico y del grupo *N*-metilanilino, algún tipo de interacción deben de establecer con la proteína. En general, los compuestos menos afines fueron los de la familia **A** (K_d comprendida entre 0,4 y 24 μM , **Tabla 4.3.17**) y los más afines, los de la familia **C** (0,069-0,654 μM , **Tabla 4.3.17**) seguidos de la familia **B** (0,185-1,7 μM , **Tabla 4.3.17**), que fueron reconocidos por la proteína con una afinidad muy parecida. En consecuencia, puede afirmarse que los compuestos finales se unen a la *HsChoK α 1* con una afinidad creciente a medida que se va aumentando la complejidad de su estructura química, lo cual podría estar en relación con el tipo y el número de interacciones que son capaces de establecer con los residuos del sitio activo.

Tabla 4.3.17. Compuestos seleccionados para los ensayos de fluorescencia y valores de K_d frente a *HsChoK α 1* y *HsChoK β* . Entre paréntesis aparece el número de veces que son más selectivos de *HsChoK α 1*.

	DMAP	PPIR	QUIN-Phe	QUIN-Az
$K_d(\mu\text{M})$ <i>HsChoKα1</i>	35 \pm 18	49 \pm 3	82 \pm 12	45 \pm 3
Familia A	A.1	A.2	A.3	A.4
$K_d(\mu\text{M})$ <i>HsChoKα1</i>	14 \pm 0,7	24 \pm 3,5	0,878 \pm 0,047	0,400 \pm 0,040
$K_d(\mu\text{M})$ <i>HsChoKβ</i>			36 \pm 5 (41v)	33 \pm 5 (83v)
Familia B	B.1	B.2	B.3	B.4
$K_d(\mu\text{M})$ <i>HsChoKα1</i>	1,7 \pm 0,045	0,678 \pm 0,002	0,185 \pm 0,024	0,368 \pm 0,80
$K_d(\mu\text{M})$ <i>HsChoKβ</i>			20 \pm 5 (108v)	63 \pm 3 (171v)
Familia C	C.1.1	C.2.1	C.3.1	C.4.2
$K_d(\mu\text{M})$ <i>HsChoKα1</i>	0,400 \pm 0,014	0,400 \pm 0,100	0,069 \pm 0,015	0,100 \pm 0,028
$K_d(\mu\text{M})$ <i>HsChoKβ</i>		4 \pm 0,3 (10v)	9 \pm 1,3 (130v)	
Familia C	C.1.7	C.2.5	C.3.9	C.4.3
$K_d(\mu\text{M})$ <i>HsChoKα1</i>	0,303 \pm 0,075	0,654 \pm 0,136	0,414 \pm 0,148	0,556 \pm 0,045
$K_d(\mu\text{M})$ <i>HsChoKβ</i>	29 \pm 7 (96v)	44 \pm 8 (67v)	17 \pm 3 (41v)	17 \pm 6 (31v)

A continuación, se detallan las particularidades de cada familia:

- **Familia A**

La cuaternización del nitrógeno endocíclico de los restos de 4-dimetilaminopiridina, 4-pirrolidinopiridina, 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina y 7-cloro-4-(perhidroazepin-1-il)quinolina mediante un grupo bencilo, es la causa de que los compuestos finales de esta familia se unan a la proteína, es decir, podrían ser grupos imprescindibles en el farmacóforo. No obstante, para el caso de los derivados de piridina (compuestos **A.1** y **A.2**), la unión es más débil que la de los derivados de la quinolina (**A.3** y **A.4**). Este dato pone de manifiesto el efecto beneficioso que tiene sobre el farmacóforo la fusión de benceno al anillo piridínico para dar lugar al sistema quinolínico, lo cual podría deberse a un mayor número de interacciones hidrofóbicas con los aminoácidos del bolsillo de la colina. No obstante, la mayor afinidad que muestra el compuesto **A.4** con respecto al **A.3** evidencia que el anillo de fenilo del grupo *N*-metilanilino de la hipótesis farmacofórica no es imprescindible para conseguir una unión eficiente a la proteína.

- **Familia B**

La afinidad por la *HsChoK* α 1 de los compuestos finales de esta familia es mayor que la de los compuestos de la familia anterior. No obstante, es más notable la mejora que experimentan en la K_d los derivados de piridina (**B.1** y **B.2**) en relación a sus análogos de la familia **A**, que los derivados de quinolina (**B.3** y **B.4**). Nuevamente, se observa que los derivados de quinolina se unen mejor a la proteína que los piridínicos y en concreto, el compuesto con 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina (**B.3**) muestra una afinidad mayor que el **B.4**. No obstante, esta vez las diferencias de K_d entre ambos grupos de compuestos (**B.1**, **B.2** y **B.3**, **B.4**) no es tan acentuada como en el caso de la familia **A**.

En consecuencia, puede inferirse que la afinidad de los compuestos de la familia **A** por la *HsChoK* puede mejorarse introduciendo un grupo fenilo adicional en el espaciador, tal y como se observa para los compuestos finales de la familia **B**. Además, la similitud de afinidades entre los derivados piridínicos y quinolínicos demuestra una vez más que el grupo fenilo del *N*-metilanilino del farmacóforo no es imprescindible para conseguir unión a la proteína. No obstante, en caso de estar presente, la mejora, al igual que el fenilo adicional del grupo quinolinio.

- *Familia C*

Para los compuestos de la familia **C**, se observa que en general los valores de K_d son mejores que los de la familia **B** y que además, son muy parecidos entre sí, tanto para los derivados piridínicos como para los quinolínicos. No obstante, en general, los derivados quinolínicos son un poco más afines a la proteína que los derivados piridínicos. Esto evidencia una vez más que el benceno adicional presente en la quinolina, aunque no es imprescindible para la estabilización de los ligandos, en caso de estar presente proporciona un punto más de interacción con *HsChoK*. Por otra parte, aunque los valores de afinidad están muy conservados entre los compuestos de la misma subfamilia, el volumen de la amina parecen influir en la calidad de la unión a la proteína. Así, a excepción de los derivados de dimetilaminopiridina (subfamilia **C.1**; afinidades muy parecidas), la afinidad por la *HsChoK α 1* es mejor cuando la amina es de pequeño volumen (dimetilamina), esté o no protonada. De este modo, los compuestos de K_d más baja son los derivados quinolínicos **C.3.1** y **C.4.2**. Por último, nuevamente uno de los compuestos más afines por la ChoK presenta como cabeza catiónica el grupo 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina (**C.3.1**), no obstante, la similitud de K_d existente con otros compuestos de esta familia (como el **C.4.2** y el **C.1.1**), evidencia que el fenilo del grupo *N*-metilanilino no es esencial para conseguir unión a la proteína.

En conclusión, las aminas terciarias de reducido volumen (con independencia de su estado de protonación) conducen a una mejora de la afinidad de los compuestos por la *HsChoK α 1* en comparación con los derivados de la familia **B**. Esto en el caso de las aminas terciarias, podría deberse a la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua presentes en el medio por su posible exposición al disolvente, tal y como sugiere el cristal de *HsChoK α 1/HC-3* (PDB ID: **3G15**). Sin embargo, en el caso de las aminas cuaternarias, podrían ser las interacciones de tipo π -catión con los residuos aromáticos del sitio activo, las responsables de esta mayor afinidad. Por su parte, posiblemente las aminas más voluminosas (como la perhidroazepina) dan lugar a un empeoramiento de la afinidad en los compuestos de las subfamilias **C.2-C.4** en relación a la afinidad de sus análogos de la familia **B** por hacer que el compuesto muestre un modo de unión donde se interrumpen por conflicto estérico interacciones significativas presentes en el patrón de interacción de sus análogos de la familia **B**.

En definitiva, la afinidad de los compuestos por la proteína aumenta a medida que se introcen nuevos grupos funcionales en los fragmentos iniciales, no obstante, dicho

aumento es más notable tras la inserción del fenilo adicional en el espaciador y de la amina terciaria, cuando ésta es poco voluminosa, con independencia de su estado de protonación. Además, en general, se observa una mejora de la afinidad cuando se fusiona un benceno adicional al anillo de piridina (conformando el anillo de quinolina). Consecuentemente, todos estos datos pueden traducirse a que probablemente de todos los restos químicos presentes en el farmacóforo (tres anillos aromáticos: bencilo, piridina y *N*-metilanilino, carga positiva y nitrógeno exocíclico), los más importantes para conseguir una unión eficiente a la ChoK sean la carga positiva deslocalizada en el anillo aromático de piridina, el grupo bencilo unido al átomo con carga y el nitrógeno exocíclico. El grupo funcional restante, es decir, el benceno del grupo *N*-metilanilino parece no ser imprescindible, pero en caso de estar presente, en algunos casos (como en las familias **B** y **C**) puede contribuir levemente a mejorar la afinidad de los compuestos. Por otro lado, la optimización del farmacóforo puede conseguirse mediante espaciadores bifenílicos, aminas terciarias o cuaternarias de reducido volumen y anillos quinolínicos. No obstante, la mejora de afinidad a la que dan lugar estos últimos, no es tan pronunciada como la que se observa por acción de los dos primeros (bifenilo y aminas).

La explicación desde el punto de vista de reconocimiento molecular para todas estas observaciones se proporcionará en el apartado correspondiente de cristalografía.

Por otro lado, como recientemente se ha evidenciado que un efecto potente como anticancerígeno únicamente puede conseguirse cuando se disminuye específicamente la expresión de *HsChoK α 1* sin afectar a los niveles de *HsChoK β* ,¹³⁹ se evaluó la unión selectiva de algunos derivados de síntesis a la isoforma *HsChoK α 1*. Para ello, al igual que en el caso de los compuestos procedentes del cribado virtual, se realizaron experimentos de fluorescencia frente a la isoforma *HsChoK β* . De acuerdo con los valores de K_d obtenidos, estos compuestos son selectivos para *HsChoK α 1*, siendo los compuestos **C.2.1** y **B.4** los que muestran una menor y mayor selectividad, respectivamente (**Tabla 4.3.17**). El carácter selectivo de los ligandos se atribuye a una mayor flexibilidad del Trp420 en la *HsChoK α 1* en comparación con la de su homólogo (Trp353) en *HsChoK β* , puesto que en la isoforma α 1 existe detrás del triptófano una leucina, en vez de la fenilalanina de la isoforma β . Por ello, la selectividad de los compuestos podría estar ligada a su modo de unión a la ChoK y más concretamente, a la necesidad de retroceso del triptófano para albergar al ligando en el sitio de la colina. De

esta forma, a la vista del dato de selectividad, para albergar al compuesto **B.4**, probablemente sea necesario que el Trp420 retroceda para aumentar el tamaño de la cavidad (dado el volumen del derivado) o para interactuar con algún grupo funcional del ligando. En el caso de la isoforma α dicho desplazamiento sería posible, mientras que en el caso de la isoforma *HsChoK* β , estaría impedido por la fenilalanina. Por el contrario, la menor selectividad del compuesto **C.2.1** se debería a que su unión al bolsillo de la colina no implicaría un retroceso tan pronunciado del triptófano en ambas isoformas.

4.3.4.3. Ensayos de inhibición de HsChoK

La actividad inhibitoria competitiva de un compuesto depende de la capacidad que tenga para impedir la entrada de todos o algunos de los sustratos de catálisis al sitio activo bloqueando el espacio que dichos sustratos ocupan. Para ello, debe de establecer interacciones suficientemente estables con los residuos del sitio activo como para hacer que la enzima tenga más afinidad por él que por sus sustratos. Teniendo en cuenta el segundo mecanismo catalítico propuesto para HsChoK,²⁷ esto implica que los potenciales inhibidores que hayan sido diseñados para actuar a nivel del sitio de la colina, deben de evitar el ataque nucleofílico del Asp306 al fosfato γ del ATP o en caso de que éste se produzca, para ser eficaces no podrían ser desplazados del sitio activo tras la fosforilación de dicho residuo. En caso de que un ligando no pudiera evitar lo anteriormente expuesto, se facilitaría su expulsión del bolsillo hidrofóbico e inmediatamente después entraría la colina, por lo que se podría catalizar la reacción. Estudiando la naturaleza del sitio de la colina, la disposición adecuada se consigue con interacciones numerosas y de gran intensidad con los residuos aromáticos del bolsillo hidrofóbico, para lo cual se deben de reunir en un mismo ligando, grupos funcionales que las faciliten. Estos grupos funcionales podrían ser los que conforman el modelo de farmacóforo propuesto en la presente Tesis Doctoral, es decir, una carga positiva, tres anillos aromáticos y un nitrógeno exocíclico donde se localice uno de esos anillos. Además, como evidencian los estudios de fluorescencia, dicho farmacóforo se optimiza sobre todo con espaciadores bifenílicos y aminas terciarias o cuaternarias y con cabezas catiónicas quinolónicas.

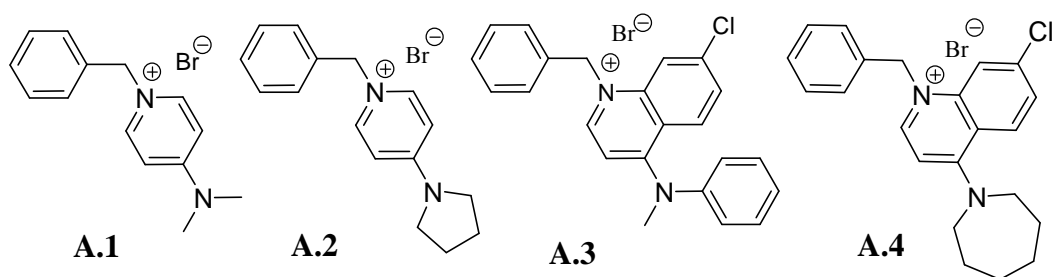
De acuerdo con todo lo anteriormente expuesto, están los resultados de actividad inhibitoria, puesto que en general se observa que la inhibición es mejor cuanto más voluminoso es el ligando, es decir, conforme se va pasando de la familia **A**, a la **B** y posteriormente, a la **C** (**Tablas 4.3.18- 4.3.23**). En concreto, los mayores porcentajes de inhibición (> 90 % a 50 μ M) se alcanzan en las subfamilias **C.3** y **C.4**, correspondientes a derivados quinolónicos con bifenilo sustituido por amina. Los resultados de inhibición concuerdan con las medidas de fluorescencia, de modo que se confirma que si la afinidad del ligando por la proteína es mejor (lo cual viene determinado por las interacciones que establezca con los residuos del sitio activo), también aumentará la actividad inhibitoria. Así, los porcentajes de inhibición indican que dentro de la familia **C**, las mayores actividades corresponden a los derivados con aminas menos

voluminosas en todos los casos, a excepción de los compuestos finales de la subfamilia **C.1**, donde los resultados de inhibición son muy parecidos con independencia del tamaño de la amina (al igual que los valores de K_d).

- **Familia A**

Al igual que sugerían los datos de afinidad, los derivados sin carga ni bencilo, no inhiben a la *HsChoK α 1*. Sin embargo, la cuaternización del nitrógeno aromático mediante el bencilo, lleva consigo algo de inhibición puesto que como previamente se ha indicado, los compuestos de la familia **A** se unen al sitio de la colina con una afinidad de entre 0,4-24 μ M (**Tabla 4.3.18**). En este caso, también vuelve a ponerse de manifiesto el aumento de inhibición en los derivados quinolínicos, de tal manera que mientras que el compuesto **A.1** no inhibe nada, el **A.3** sí que manifiesta algo de inhibición (19 % a 50 μ M). Lo mismo se observa para los compuestos **A.2** y **A.4**, donde tiene lugar un aumento de actividad inhibitoria del 11 % para el compuesto **A.4** (39 %) en relación al **A.2** (28 %).

Tabla 4.3.18. Inhibición enzimática de la familia **A**.

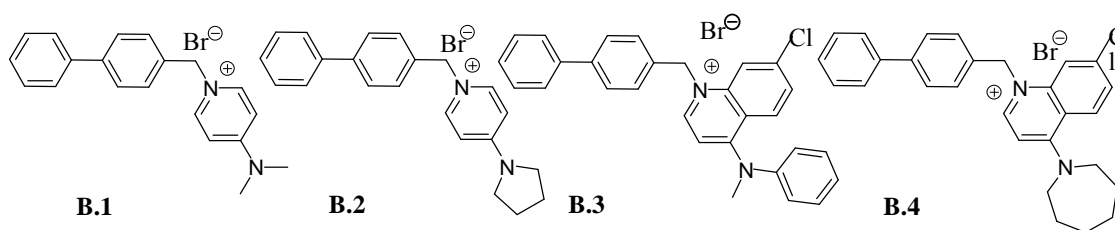


Compuesto	% Inhib. <i>HsChoKα1</i>		CI_{50} <i>HsChoKα1</i>
	10 μ M	50 μ M	
A.1	-	-	n.d
A.2	11,08 \pm 1,62	27,84 \pm 1,72	n.d
A.3	-	18,58 \pm 2,00	n.d
A.4	-	38,77 \pm 10,83	n.d
n.d. dato no determinado			

- **Familia B**

En el caso de los compuestos de la familia **B**, la fluorescencia indicaba que la introducción de un fenilo adicional en el espaciador conducía a un aumento de la afinidad por la enzima con respecto a los derivados de la familia **A**. Según los datos de inhibición (**Tabla 4.3.19**), esta observación se confirma para el caso de los derivados quinolínicos. En concreto el compuesto **B.3**, presenta una CI_{50} de 12,55 μ M, mientras que la CI_{50} del compuesto **B.4**, es de 16 μ M.

Tabla 4.3.19. Inhibición enzimática de la familia **B**.



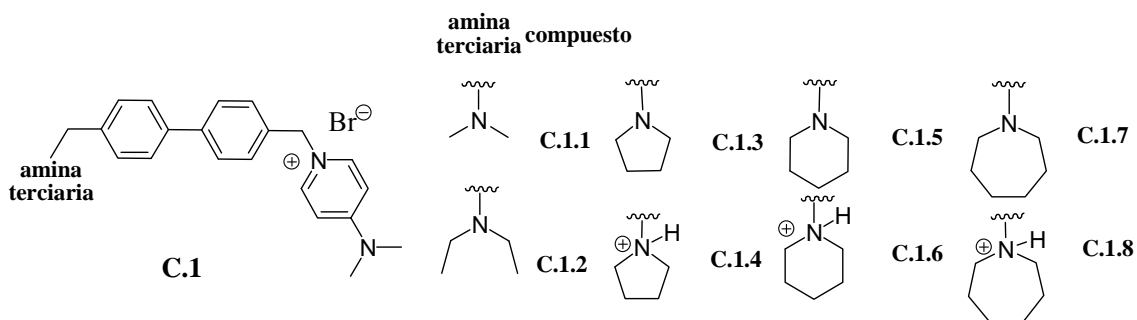
Compuesto	% Inhib. <i>HsChoKα1</i>		CI_{50} <i>HsChoKα1</i>
	10 μ M	50 μ M	
B.1	-	-	
B.2	-	-	
B.3	n.d		12,55 \pm 0,16
B.4	n.d		16,04 \pm 0,35
n.d. dato no determinado			

- **Familia C**

Los valores de K_d sugerían que en general, no hay muchas diferencias de afinidad entre compuestos equivalentes (con la misma amina) de las diferentes subfamilias, pero que es mejor para los derivados con aminas de reducido volumen y en este caso, mejor que la de los compuestos de la familia **B**.

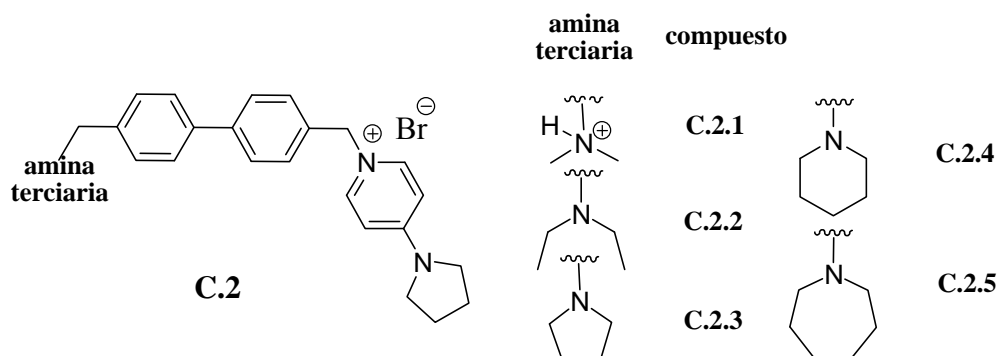
Los datos de los ensayos de inhibición están de acuerdo con estas observaciones, puesto que el porcentaje de inhibición disminuye a medida que aumenta el volumen de la amina (terciaria o cuaternaria) en todas las subfamilias, excepto en la **C.1** (Tablas 4.3.19- 4.3.23), donde la capacidad inhibitoria está muy conservada y se sitúa en valores de CI_{50} del rango 0,82 (**C.1.1**) - 3,34 (**C.1.8**) μM . Cuando la amina es de reducido volumen, la inhibición se mejora conforme el tamaño de la cabeza catiónica aumenta. De este modo, dentro de las subfamilias **C.2**, **C.3** y **C.4** los mejores inhibidores son los derivados con dimetilamina, los cuales presentan mejor actividad que el análogo correspondiente de la familia **B**. En concreto, la CI_{50} de los mejores inhibidores de las subfamilias **C.2-C.4** es de 3,18 μM para el **C.2.1**, 2,18 μM para el compuesto **C.3.1** y 0,41 μM para el compuesto **C.4.2**. Por tanto, parece ser que cuando la cabeza catiónica es distinta a la 4-dimetilaminopiridina, las aminas voluminosas posicionan el ligando en el sitio activo de un modo en el que las interacciones con los aminoácidos están menos favorecidas que en el caso de las aminas de menor tamaño, por lo que al estar menos estabilizado, el ligando podría ser más fácilmente desplazado.

Tabla 4.3.20. Inhibición enzimática de la subfamilia **C.1**.



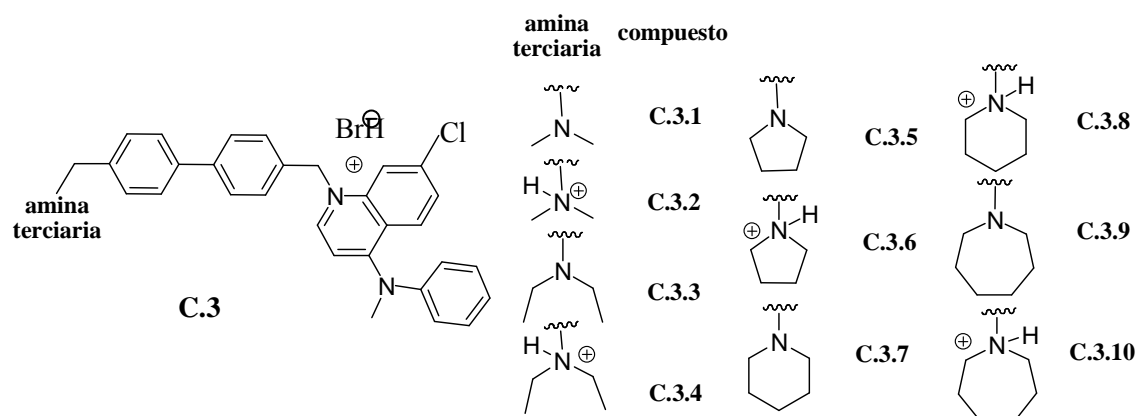
Compuesto	% Inhib. <i>HsChoKα1</i>		CI ₅₀ <i>HsChoKα1</i>
	10 μM	50 μM	
Subfamilia C.1			
C.1.1	59,65±4,53	70,44±2,06	0.82±0.14
C.1.2	71,88±2,92	81,19±1,19	n.d
C.1.3	57,14±2,51	71,68±3,54	n.d
C.1.4	55,91±0,54	70,47±0,51	n.d
C.1.5	n,d	68,77±10,83	n.d
C.1.6	48,21±1,89	65,99±2,47	n.d
C.1.7	56,31±3,01	69,09±3,84	3.34±0.01
C.1.8	53,17±2,53	71,50±3,80	n.d
n.d. dato no determinado			

Tabla 4.3.21. Inhibición enzimática de la subfamilia C.2.



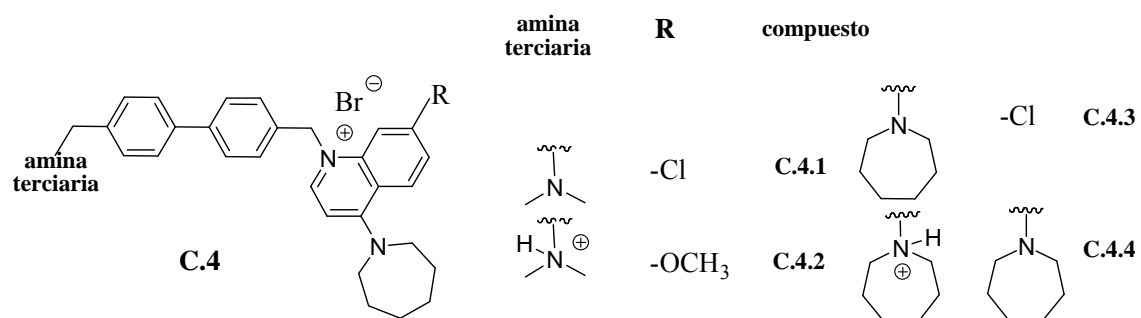
Compuesto	% Inhib. <i>HsChoKα1</i>		CI_{50} <i>HsChoKα1</i>
	10 μ M	50 μ M	
Subfamilia C.2			
C.2.1	49,76 \pm 2,26	72,01 \pm 3,25	3.18 \pm 0.73
C.2.2	14,34 \pm 7,65	44,15 \pm 7,62	n.d
C.2.3	29,54 \pm 2,54	50,85 \pm 2,04	n.d
C.2.4	19,38 \pm 4,98	45,39 \pm 2,33	n.d
C.2.5	4,05 \pm 0,37	34,95 \pm 3,15	n.d
n.d. dato no determinado			

Tabla 4.3.22. Inhibición enzimática de la subfamilia C.3.



Compuesto	% Inhib. <i>HsChoKα1</i>		CI_{50} <i>HsChoKα1</i>
	10 μ M	50 μ M	
Subfamilia C.3			
C.3.1	53,47 \pm 0,20	82,63 \pm 2,81	2,18 \pm 0,07
C.3.2	-	27,71 \pm 0,70	n,d
C.3.3	78,12 \pm 1,37	88,99 \pm 1,70	n,d
C.3.4	82,85 \pm 1,02	92,37 \pm 0,39	n,d
C.3.5	35,17 \pm 1,32	65,31 \pm 3,16	n,d
C.3.6	24,23 \pm 1,48	59,25 \pm 8,94	n,d
C.3.7	35,06 \pm 8,63	53,17 \pm 5,97	n,d
C.3.8	15,26 \pm 0,59	46,65 \pm 6,49	n,d
C.3.9	3,62 \pm 0,04	26,85 \pm 2,40	6,74 \pm 0,13
C.3.10	-	27,85 \pm 3,76	n,d
n.d. dato no determinado			

Tabla 4.3.23. Inhibición enzimática de la subfamilia C.4.



Compuesto	% Inhib. <i>HsChoKα1</i>		<i>CI</i> ₅₀ <i>HsChoKα1</i>
	10 μM	50 μM	
Subfamilia C.4	10 μM	50 μM	
C.4.2	n.d	n.d	0,41±0,01
C.4.3	16,52±0,63	50,51±0,72	3,61±0,60
C.4.4	52,15±1,84	85,76±1,84	1,17±0,01
n.d. dato no determinado			

4.3.4.4. Ensayos de actividad antiproliferativa

A diferencia de los experimentos de afinidad y de actividad inhibitoria, los requisitos que un buen inhibidor de la proteína debe cumplir para que además sea un buen agente antiproliferativo es que su lipofilia sea suficiente para atravesar la membrana celular y que sea selectivo de la diana terapéutica de interés para evitar toxicidad.

Tabla 4.3.24. Lipofilia (logP) de los compuestos finales calculados con el software Pallas 3.8.

Compuesto	Lipofilia (annlogp2005)	Compuesto	Lipofilia (annlogp2005)	Compuesto	Lipofilia (annlogp2005)
FAMILIA C		FAMILIA B		FAMILIA A	
Subfamilia C.1		B.1	-0.61	A.1	-2.23
C.1.1	-0.41				
C.1.2	0.37				
C.1.3	0.15				
C.1.4	0.42				
C.1.5	0.64				
C.1.6	0.57				
C.1.7	0.82				
C.1.8	0.60				
Subfamilia C.2		B.2	0.18	A.2	-1.76
C.2.1	0.42				
C.2.2	0.97				
C.2.3	0.62				
C.2.4	0.74				
C.2.5	1.03				
Subfamilia C.3		B.3	3.06	A.3	1.46
C.3.1	3.11				
C.3.2	2.66				
C.3.3	3.67				
C.3.4	3.45				
C.3.5	3.78				
C.3.6	3.64				
C.3.7	4.48				
C.3.8	4.21				
C.3.9	5.11				
C.3.10	4.48				
Subfamilia C.4		B.4	3.23	A.4	0.96
C.4.1	3.41				
C.4.2	2.10				
C.4.3	4.41				
C.4.4	4.73				

Los inhibidores de la presente Tesis Doctoral, han sido diseñados para que actuando sobre *HsChoK α 1*, puedan impedir la proliferación celular de líneas tumorales. En concreto, las distintas líneas celulares sobre las que se ha ensayado el efecto

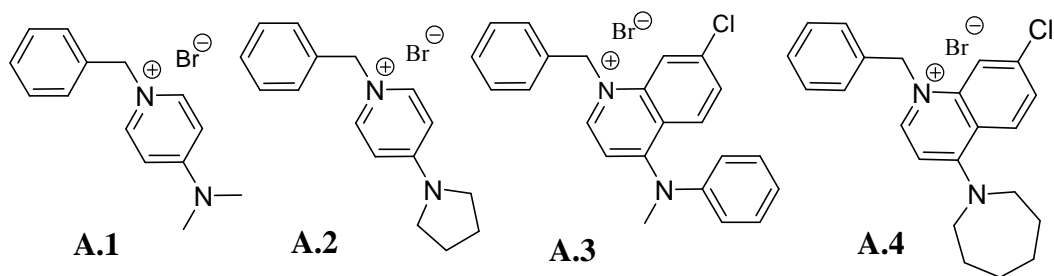
antiproliferativo de los compuestos finales de las familias **A**, **B** y **C** han sido HepG2, A549, HT29, HCT116, MCF7, Mia Paca y Jurkat. Los motivos por los que se han elegido varias líneas celulares y en concreto, las anteriores, son: a) presencia del oncogén *ras* activo; b) diversidad de rutas de señalización que se encuentran activas en cada una de ellas, y en consecuencia, diversidad de dianas (entre ellas las quinasas) que puedan estar sobreexpresadas o hiperactivadas; c) diferente composición de membranas celulares en función del tipo celular, y por tanto, distinta penetración de los compuestos en función de su lipofilia.

- **Resultados en HepG2**

Los ensayos se iniciaron con HepG2 por motivos de accesibilidad (experimentos llevados a cabo en Granada bajo la dirección de Dña. Carmen Marco) y también debido a que es una de las líneas celulares más resistentes frente a fármacos que existe.^{140,141}

- **Familia A**

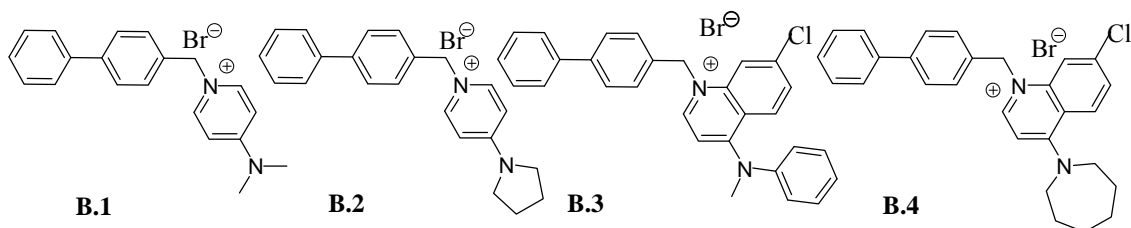
Los grupos constituyentes de la cabeza catiónica aisladamente, parecen no tener la suficiente lipofilia como para atravesar la membrana de las células HepG2, puesto que no se manifiesta ningún efecto antiproliferativo (**Tabla 4.3.25**). Sin embargo, la introducción del grupo bencilo se traduce en un aporte de lipofilia que permite a los compuestos de la familia **A** alcanzar el citoplasma. Como era de esperar, la actividad antiproliferativa es mayor para los derivados quinolínicos. De este modo, se pasa de un 7 % de actividad antiproliferativa a 50 μ M del compuesto **A.1** a un 46 % en **A.3**, y de un 23 % en **A.2** a un 46 % en **A.4**, lo cual se debe a dos motivos. En primer lugar, la mayor lipofilia que presentan con respecto a los derivados piridínicos les permite alcanzar concentraciones mayores en el citoplasma y en segundo lugar, porque al unirse con más afinidad al sitio activo y ser mejores inhibidores que sus análogos, bloquean de manera más efectiva el funcionamiento de ChoK. No obstante, el efecto que se observa a 50 μ M no es lo suficientemente satisfactorio como para conseguir una EC_{50} de reducido valor.

Tabla 4.3.25. Actividad antiproliferativa de la familia A.

Compuesto	Inhibición proliferación HepG2 (%)		EC ₅₀ (μM)						
	10 μM	50 μM	HepG2	A549	HT29	MCF7	HCT116	Mia Paca	Jurkat
A.1	-	7,05±0,43	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
A.2	-	23,21±3,80	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
A.3	-	46,42±2,61	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
A.4	37,04 ±2,78	46,17±2,80	n.d	> 25	5,27±3,22	> 25	23,97±0,55	> 25	23,60±1,24

- Familia B

A pesar de que los compuestos **B.1** y **B.2** no muestran buenos valores de inhibición de la *HsChoKα1*, se ha observado para ellos un cierto efecto antiproliferativo (**Tabla 4.3.26**). En consecuencia, dicha actividad sería atribuible a la inhibición inespecífica de otras enzimas implicadas en las rutas de muerte celular. Para los dos restantes inhibidores (**B.3** y **B.4**), se observa que la viabilidad celular disminuye con respecto a sus análogos de la familia **A** debido a la mayor lipofilia que aporta el fenilo adicional del espaciador, a la mejor afinidad por *HsChoKα1* y a su mayor efecto inhibitorio de la enzima. No obstante, al igual que para el caso de la familia **A**, los compuestos finales de la familia **B** no son buenos agentes antiproliferativos frente a HepG2 puesto que son tóxicos.

Tabla 4.3.26. Actividad antiproliferativa de la familia B.

Compuesto	Inhibición proliferación HepG2 (%)		EC ₅₀ (μM)						
	10 μM	50 μM	HepG2	A549	HT29	MCF7	HCT116	Mia Paca	Jurkat
	B.1	n.d		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
B.2	n.d		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
B.3	-	54,35 ± 1,23	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
B.4	-	50,34 ± 1,98	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

- Familia C

Como era de esperar por los resultados de afinidad e inhibición de ChoK, así como por su mayor lipofilia, los compuestos de esta familia son agentes antiproliferativos más potentes que los de las familias anteriores (**Tablas 4.3.27- 4.3.30**). Por otra parte, se observa una actividad antiproliferativa creciente conforme aumenta el tamaño de la cabeza catiónica, lo cual se asocia con afinidades, efectos inhibitorios y lipofilia en aumento. En concreto, los compuestos más potentes son los derivados quinolínicos (subfamilias **C.3** y **C.4**).

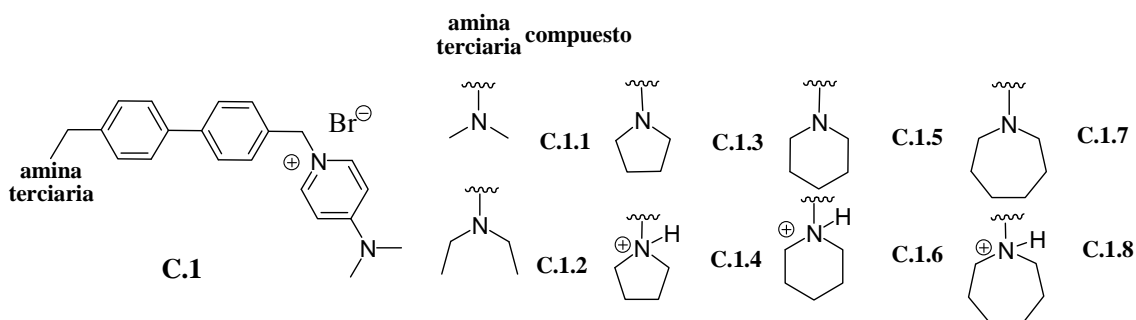
En esta ocasión, la menor afinidad y capacidad inhibitoria por aminas voluminosas se contrarresta con la mayor lipofilia, de modo que no puede asociarse una mayor actividad antiproliferativa con los compuestos más lipófilos, ni tampoco con los más afines a la proteína, ya que ambos parámetros se complementan. Así, los compuestos más afines o más potentes como inhibidores (con aminas poco voluminosas, como la dimetilamina) son los menos lipófilos y por tanto, los que presentan más dificultades para atravesar la membrana celular. Esto implica como resultado que no se observen variaciones importantes de actividad antiproliferativa entre los compuestos de una misma subfamilia.

Por otro lado, los resultados muestran que la protonación de la amina terciaria no modifica la capacidad antiproliferativa de los compuestos, aunque *a priori* cabría esperarse una disminución de la misma por la existencia de una carga positiva más (Tablas 4.3.27- 4.3.30).

Por último, aunque las mayores disminuciones de la viabilidad celular se consiguen con los derivados quinolínicos, dicha reducción se manifiesta con toxicidad en todos los compuestos a excepción de C.4.3 y C.4.4. Aunque los mecanismos por los que se observa dicha necrosis no han sido estudiados, posiblemente sea la falta de selectividad frente a *HsChoKα1* la responsable de tal observación. Tal y como puede observarse en las Tablas 4.3.22 y 4.3.23, los derivados quinolínicos son muy potentes como inhibidores ($CI_{50} < 5 \mu M$) de modo que al acumularse en grandes cantidades en el interior celular y no ser selectivos, podrían inhibir con potencia a otras dianas sobreexpresadas o hiperactivadas que sean estructuralmente similares a la *HsChoKα1*, como otras quinasas involucradas en mecanismos de muerte celular. Al potenciarse el efecto inhibitorio por sinergia en varias dianas, podría manifestarse toxicidad.

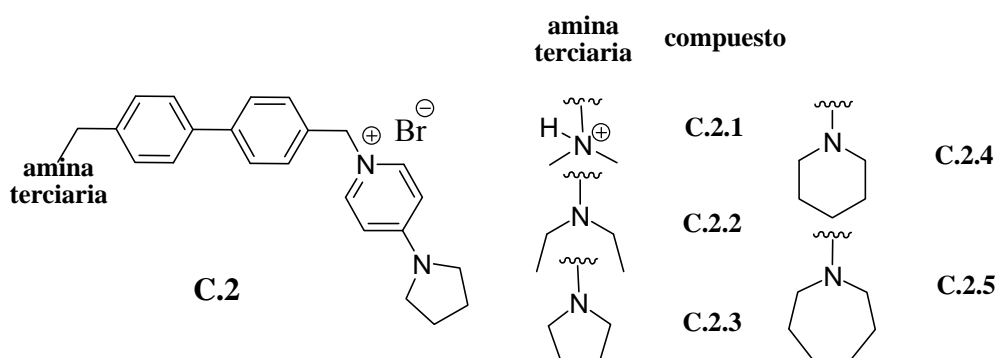
En el caso de los compuestos C.4.3 y C.4.4, se consigue una buena actividad antiproliferativa sin toxicidad frente a HepG2 porque ambos son buenos inhibidores de *HsChoKα1*, presentan lipofilia suficiente como para penetrar en el citoplasma y probablemente ambos sean selectivos de nuestra diana.

Tabla 4.3.27. Actividad antiproliferativa de la subfamilia C.1.



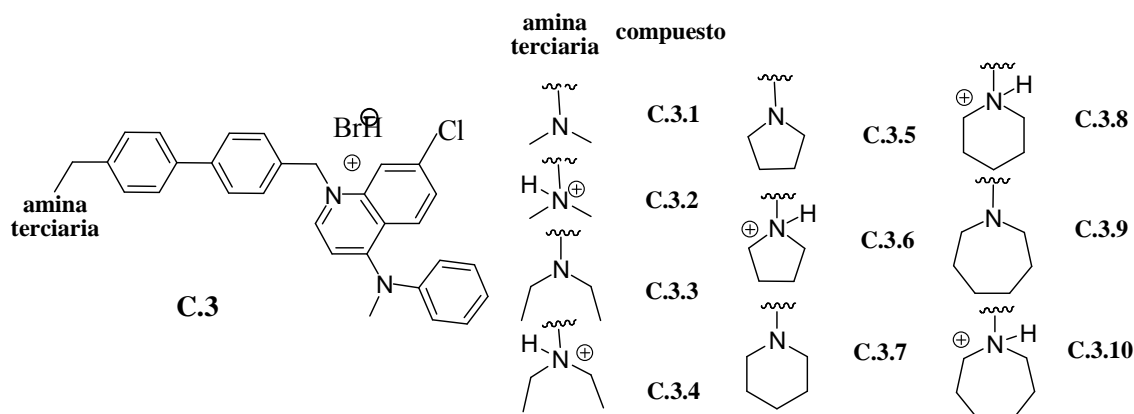
Compuesto	Inhibición proliferación HepG2 (%)		EC ₅₀ (μM)						
	10 μM	50 μM	HepG2	A549	HT29	MCF7	HCT116	Mia Paca	Jurkat
Subfamilia C.1									
C.1.1	7,15 ± 4,99	11,71±2,00	> 100	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.2	10,26±2,26	11,56±3,98	> 100	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.3	-	-	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.4	16,91±4,36	31,00±4,12	> 100	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.5	-	-	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.6	-	24,25±5,20	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.7	-	-	38,92±0,23	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.8	-	21,89±8,15	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Tabla 4.3.28. Actividad antiproliferativa de la subfamilia C.2.



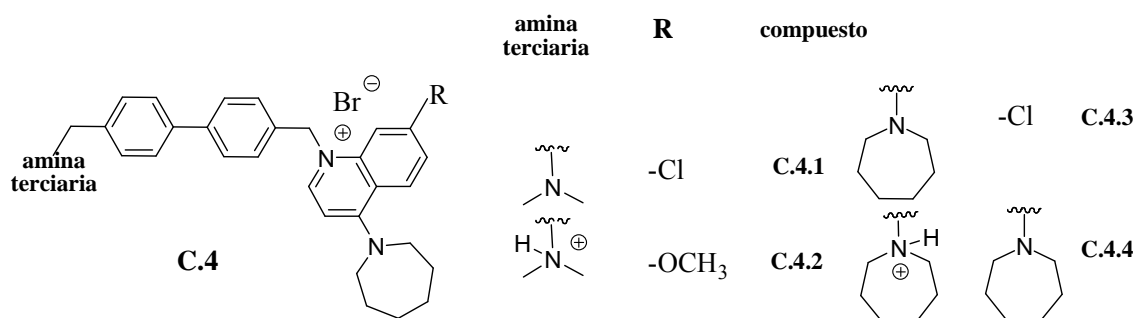
Compuesto	Inhibición proliferación HepG2 (%)		EC ₅₀ (μM)						
	10 μM	50 μM	HepG2	A549	HT29	MCF7	HCT116	Mia Paca	Jurkat
Subfamilia C.2									
C.2.1	22,23±0,86	42,08±5,69	64,68±1,50	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.2.2	44,24±6,01	49,94±2,08	47,78±9,40	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.2.3	28,37±5,03	64,78±2,79	30,46±8,70	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.2.4	13,44±1,50	43,64±2,16	71,02±5,10	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.2.5	-	22,25±8,60	> 100	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Tabla 4.3.29. Actividad antiproliferativa de la subfamilia C.3.



Compuesto	Inhibición proliferación HepG2 (%)		EC ₅₀ (μM)						
	10 μM	50 μM	HepG2	A549	HT29	MCF7	HCT116	Mia Paca	Jurkat
Subfamilia C.3									
C.3.1	Tóxico a 5 μM		n.d	7,2±0,21	2,65±1,55	14,65±3,15	7,18±0,52	8,40±1,90	1,63±0,24
C.3.2	15,58±2,75	43,98±0,69	55,17±6,15	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.3	Tóxico desde 1 μM		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.4	Tóxico desde 1 μM		n.d	12,11±1,72	0,87±0,02	13,93±2,64	10,10±1,74	11,27±3,22	2,45±0,29
C.3.5	5 μM tóxico y no efecto entre 50 nM-1 μM		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.6	Tóxico desde 1 μM		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.7	Tóxico a 5 μM		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.8	Tóxico a 5 μM		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.9	Tóxico a 5 μM		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.10	Tóxico a 5 μM		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Tabla 4.3.30. Actividad antiproliferativa de la subfamilia C.4.



Compuesto	Inhibición proliferación HepG2 (%)		EC ₅₀ (μM)						
	10 μM	50 μM	HepG2	A549	HT29	MCF7	HCT116	Mia Paca	Jurkat
Subfamilia C.4									
C.4.2	Tóxico a 25 μM		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.4.3	32,20±1,39	muertas	38,92±0,23	16,58±1,05	4,20±2,38	16,57±2,99	23,45±2,65	19,40±3,23	4,48 ±0,60
C.4.4	51,69±4,06	muertas	14,60±3,83	6,35± 0,67	1,75±0,60	8,07±1,82	12,26±2,24	7,57±1,75	3,35 ±0,63

- Resultados en A549, HT29, HCT116, MCF7, Mia Paca y Jurkat

Las rutas de señalización que se encuentran activas durante un proceso cancerígeno son distintas no sólo a lo largo del desarrollo tumoral¹⁴², sino también entre individuos y tipos celulares diferentes debido a la existencia de perfiles de mutación genética (y en consecuencia, enzimáticos) diversos⁸⁷. Es precisamente en la diversidad genética entre tipos cancerígenos en la que se fundamentan las técnicas más recientes de diagnóstico^{70, 143}. Por eso, aunque *a priori* un fármaco concreto pueda resultar inactivo o tóxico para un determinado tipo de cáncer, puede ser efectivo para el tratamiento de esta enfermedad cuando afecta a otros órganos.^{18,144}

Según los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antiproliferativa frente a HepG2, los mejores anticancerígenos son los compuestos **C.4.3** y **C.4.4**. Los compuestos de la subfamilia C.3 también son muy buenos inhibidores de *HsChoKα1*, pero presentan toxicidad frente a HepG2. Con el objetivo de testar los efectos en otras líneas cancerígenas de **C.4.4**, **C.4.3**, así como de dos representantes de la subfamilia **C.3** con los mejores valores de inhibición de *HsChoKα1* (**C.3.1** y **C.3.4**), se calcularon sus

CI₅₀ frente las líneas celulares A549 (pulmón), HT29 (colon), HCT116 (colon), MCF7 (mama), Mia Paca (páncreas) y Jurkat (linfocitos).

Por otro lado, aunque los compuestos de las familias **A**, **B**, **C.1** y **C.2** no fueron los mejores en cuanto a actividad antiproliferativa frente a HepG2, se eligieron los compuestos **A.4**, **C.1.1**, **C.1.7**, **C.2.1** y **C.2.5** para llevar a cabo el mismo tipo de experimentos. El motivo por el que se eligió el compuesto **A.4** es que su actividad antiproliferativa en HepG2 es junto con la del compuesto **A.3** la mejor de la familia **A** y parecida a la de los compuestos **B.3** y **B.4**, de modo que así se puede tener idea del comportamiento de los derivados quinolínicos de ambas familias en otras líneas celulares cancerígenas. Por su parte, los productos finales de las subfamilias **C.1** y **C.2**, que no habían resultado suficientemente lipófilos frente a HepG2, se ensayaron para estudiar si dicha falta de lipofilia constituía nuevamente una limitación para demostrar su efecto en el resto de líneas celulares.

Compuesto A.4

Este compuesto, que *a priori* no parecía ser demasiado interesante como agente antiproliferativo frente a HepG2, mostró una actividad de 5 μ M frente a la línea celular HT-29 (**Tabla 4.3.24**). En esta línea celular, la falta de lipofilia demostrada frente a HepG2 no parece limitar su efecto.

Compuestos C.1.1, C.1.7, C.2.1 y C.2.5

No demostraron efecto antiproliferativo en ninguna línea celular (máxima concentración probada: 25 μ M, **Tablas 4.3.27 y 4.3.30**). En consecuencia, su falta de lipofilia también es una limitación para la penetración en el citoplasma de estas células.

Compuestos C.3.1 y C.3.4

Ambos mostraban toxicidad frente a la línea celular HepG2. Sin embargo, son buenos agentes antiproliferativos para algunas de las líneas celulares cancerígenas anteriormente citadas y no muestran toxicidad (**Tabla 4.3.29**). En concreto, el compuesto **C.3.1** es muy activo en cinco de las seis líneas celulares con las que se ha trabajado (A549, HT29, HCT116, Mia Paca y Jurkat), presentando un valor medio de EC₅₀ de 5,4 μ M. Por su parte, el compuesto **C.3.4** resultó muy activo en HT29 y en Jurkat, donde presentó un valor medio de EC₅₀ de 1,5 μ M.

Compuestos C.4.4 y C.4.3

Curiosamente, al igual que el compuesto **C.3.1**, **C.4.4** resultó activo en cinco líneas celulares (A549, HT29, MCF7, Mia Paca y Jurkat) con un valor medio de EC_{50} igual al del compuesto **C.3.1**, es decir, 5,4 μM . El compuesto **C.4.3** por su parte, resultó activo frente a las mismas líneas celulares que **C.3.4**, es decir, HT29 y Jurkat, pero en este caso, su valor medio de EC_{50} resultó ser algo mayor e igual a 4,3 μM (**Tabla 4.3.30**).

En definitiva, para llegar a conseguir un buen efecto antiproliferativo, no sólo se necesita inhibir de forma potente a la *HsChoK α 1*, sino que además, se debe dotar a los compuestos de lipofilia suficiente como para que puedan atravesar la membrana celular, y alcanzar el citoplasma, donde se encuentra su diana. No obstante, a pesar de que el diseño vaya dirigido a conseguir ambos objetivos, la falta de selectividad de los compuestos en determinadas líneas celulares (como HepG2), puede ser causa de toxicidad.

En general, y a la vista de los resultados de fluorescencia, de inhibición enzimática y de actividad antiproliferativa, aunque los grupos funcionales propuestos por el modelo inicial de farmacóforo (carga positiva, tres anillos aromáticos y nitrógeno exocíclico) sean condición necesaria para la unión del compuesto a la proteína (todos excepto el fenilo del *N*-metilanilino), la actividad antiproliferativa se mejora a medida que se incrementa la lipofilia. En consecuencia, la optimización del farmacóforo implica, tal y como se apuntaba en los apartados anteriores, la introducción de un fenilo adicional tanto en el espaciador como en el anillo de piridina para dar lugar al sistema quinolínico y de aminas de reducido volumen (protonadas o no).

En definitiva, la farmacomodulación del farmacóforo puesta de manifiesto en las familias **B** y **C**, ha permitido su optimización y por ese motivo, los resultados finalmente obtenidos tanto a nivel de afinidades por *HsChoK α 1*, como actividad inhibitoria y antiproliferativa para los derivados de la familia **C**, son mejores que para los compuestos procedentes del cribado virtual. La síntesis química nos ha permitido conocer qué grupos funcionales pueden utilizarse para optimizar el farmacóforo y en consecuencia, también los compuestos del cribado virtual, tarea que será abordada en futuras etapas de la investigación.

4.3.5. Estudios de cristalografía

4.3.5.1. Las estructuras cristalinas demuestran que los compuestos se unen al sitio de la colina.

La espectroscopía de fluorescencia sugirió que los compuestos de las familias **A**, **B** y **C** se unen a la *HsChoK α 1* a nivel del sitio de la colina (**Tabla 4.3.17**), al igual que los ensayos de inhibición, puesto que todos los derivados producen una disminución más o menos notable de los niveles de fosfocolina (**Tablas 4.3.18-4.3.23**). No obstante, se llevaron a cabo estudios de cristalografía con al menos un representante de cada familia (productos **A.2**, **B.2**, **C.2.1**, **C.3.1** y **C.3.2**) para tener evidencias experimentales a este respecto y para explicar el aumento gradual de afinidad y de potencia inhibitoria.

Las estructuras cristalinas de *HsChoK α 1* en complejo con cada uno de los compuestos (**Figura 4.3.19**) se obtuvieron con una resolución de entre 1,55-2,30 Å (**Tabla 4.3.30**) y una buena estadística ($R = 0,189-0,201$, $R_{\text{free}} = 0,214-0,257$, **Tabla 4.3.30**) después de un proceso iterativo de construcción y refinado.

Todas las estructuras cristalinas son homodiméricas a excepción de los complejos *HsChoK α 1-C.2.1* y *HsChoK α 1-C.3.1*, que son monoméricos. Al igual que en el complejo con el compuesto **5217714** procedente del cribado virtual, se observa que cada monómero está constituido por un dominio pequeño *N*-terminal y un dominio *C*-terminal más grande. Mientras que el sitio de unión del ATP está localizado en una hendidura formada por los residuos de ambos dominios *N*- y *C*-terminal, el sitio de la colina se encuentra en un bolsillo profundo e hidrofóbico del dominio *C*-terminal. Sorprendentemente, se observó la presencia de dos moléculas del compuesto **B.2** en el sitio de la colina (**Figura 4.3.20**). Como en el resto de las estructuras sólo se observa una molécula de compuesto (**Figura 4.3.20**), a ChoK posiblemente le resulte más favorable desde el punto de vista energético el posicionamiento de sus ligandos en este sitio común, y sólo en ocasiones, obtiene energía suficiente para introducir los ligandos en el segundo sitio.

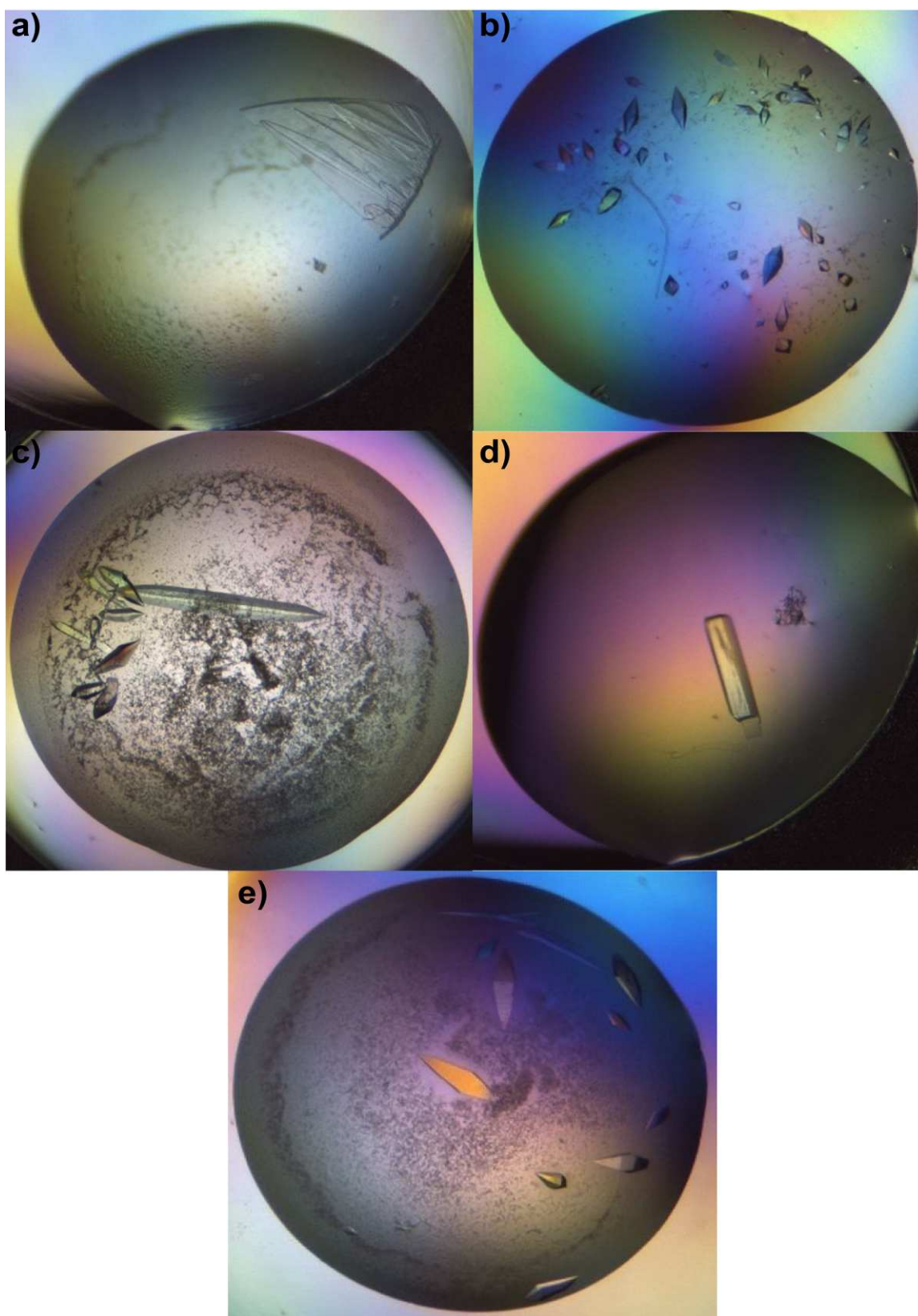


Figura 4.3.19. Cristales de *HsChoKa1* finalmente seleccionados para los compuestos: a) A.2, b) B.2, c) C.2.1, d) C.3.1 y e) C.3.2.

Tabla 4.3.31. Parámetros característicos de las estructuras cristalinas de rayos X y estadísticas del proceso de refinamiento. Los valores entre paréntesis están referidos a la celdilla de mayor resolución. Las estadísticas del Ramachandran plot fueron determinadas con PROCHECK.

	<i>HsCKal-A.2</i>	<i>HsCKal-B.2</i>	<i>HsCKal-C.2.1</i>	<i>HsCKal-C.3.1</i>	<i>HsCKal-C.3.2</i>
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4 ₃ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P4 ₃ 2 ₁ 2
Longitud de onda (Å)	0.97	0.92	0.92	1.05	0.97
Resolución (Å)	20-2.15 (2.27-2.15)	61-1.80 (1.90-1.80)	54.97-1.55 (1.63-1.55)	20-2.30 (2.42-2.30)	20-2.00 (2.11-2.00)
Dimensiones de la celda (Å)	<i>a</i> = 55.67 <i>b</i> = 118.77 <i>c</i> = 131.00	<i>a</i> = 61.37 <i>b</i> = 61.37 <i>c</i> = 221.07	<i>a</i> = 61.24 <i>b</i> = 61.26 <i>c</i> = 219.88	<i>a</i> = 55.71 <i>b</i> = 120.03 <i>c</i> = 131.30	<i>a</i> = 61.93 <i>b</i> = 61.93 <i>c</i> = 221.43
Reflexiones	48047	40416	120961	39920	30254
Completeness	99.9 (100)	99.9 (99.9)	99.9 (99.9)	99.8 (100)	99.9 (100)
<i>R</i> _{sym}	0.092 (0.715)	0.1 (0.653)	0.04 (0.533)	0.07 (0.691)	0.102 (0.717)
<i>I</i> / <i>s</i> (<i>I</i>)	16.7 (3.1)	12.6 (2.8)	20.4 (3.1)	18.1 (3.5)	16.0 (4.0)
Redundancia	8.2 (8.2)	8.5 (8.7)	5.9 (6.0)	9.8 (10.3)	15.5 (15.8)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.190/0.226	0.189/0.230	0.195/0.214	0.195/0.230	0.201/0.257
RMSD geometría ideal, enlaces (Å)	0.009	0.011	0.008	0.012	0.008
RMSD geometría ideal, ángulos (°)	1.306	1.385	1.263	1.441	1.242
< <i>B</i> > proteína (Å ²)	38.91	22.06	25.33	58.85	35.99
< <i>B</i> > ligando (Å ²)	81.29	29.95	38.16	76.72	68.80
< <i>B</i> > disolvente (Å ²)	44.43	37.07	37.15	54.93	41.70
< <i>B</i> > Etilenglicol (Å ²)	62.64	38.31	39.87	65.30	51.00
Ramachandran plot: Más favorecidos (%)	97.01	97.59	97.17	97.79	96.92
Permitidos (%)	2.54	1.81	2.38	1.77	2.77
Prohibidos (%)	0.45	0.60	0.45	0.44	0.31

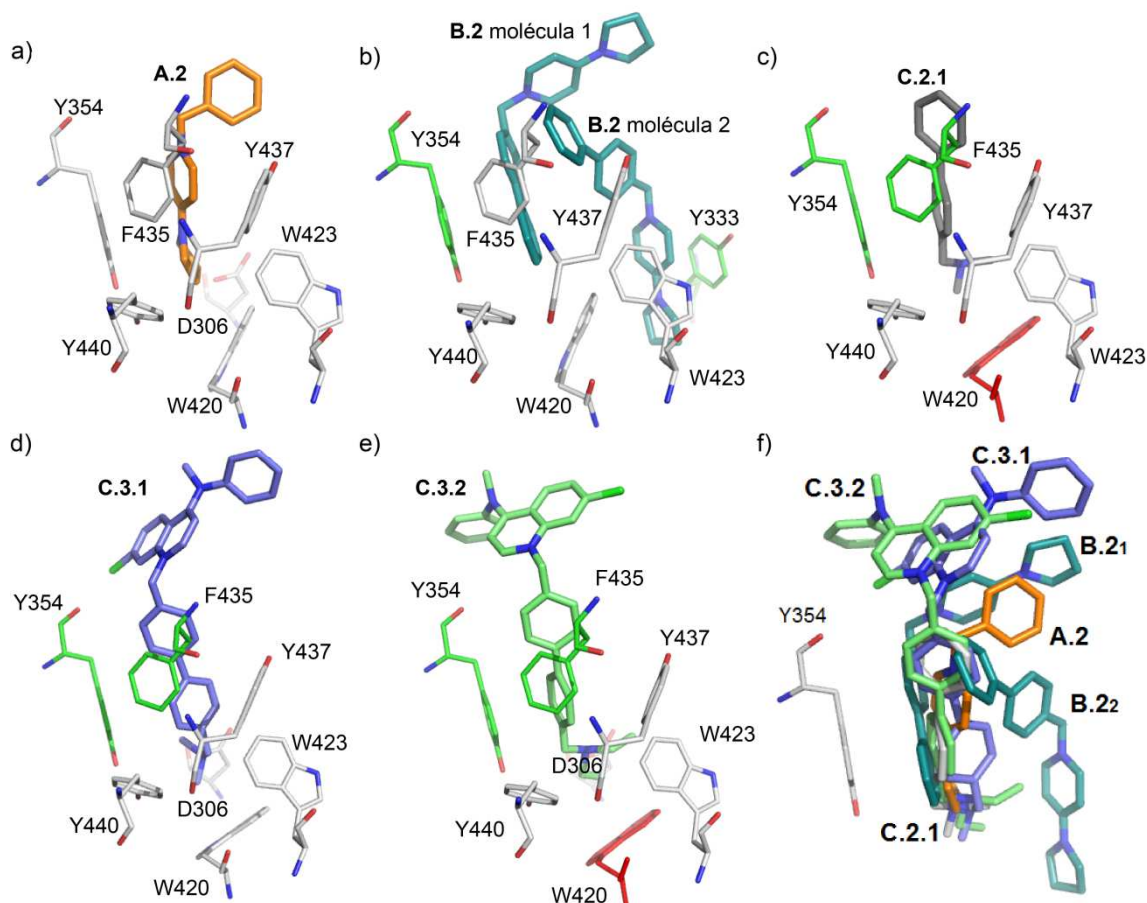


Figura 4.3.20. a) Estructura cristalina del complejo *HsChoKα1/A.2*. b) *HsChoKα1/B.2*. c) *HsChoKα1/C.2.1*. d) *HsChoKα1/C.3.1*. e) *HsChoKα1/C.3.2*. f) Superposición de los cinco ligandos. Los residuos hidrofóbicos con los que se forman interacciones π - π paralelas aparecen en verde, mientras que aquellos con los que existen interacciones π -catión se muestran en rojo. El resto de residuos que conforman el bolsillo hidrofóbico se han señalado en blanco.

- Familia A

De los cuatro compuestos incluidos en esta familia, sólo se ha cristalizado el compuesto **A.2** (que a su vez es muy similar al **A.1**). El compuesto **A.3** era insoluble a la concentración que debe usarse en el experimento. Por su parte, el compuesto **A.4** a diferencia del **A.3**, no era insoluble a las concentraciones deseadas, pero en todos los cristales obtenidos, no se recogió su mapa de densidad.

Los compuestos pertenecientes a la familia **A** eran los que mostraban una afinidad y una actividad inhibitoria más débil en comparación con el resto de familias.

Según las evidencias aportadas por el cristal del complejo *HsChoKα1/A.2*, la falta de afinidad puede deberse a la formación de débiles interacciones con los residuos del

sitio de la colina. De este modo, sólo se observan dos interacciones π - π no paralelas con Tyr354 y Phe345 (**Figura 4.3.20.a**). El resto de aminoácidos que conforman el sitio hidrofóbico donde **A.2** se inserta, no contribuyen a la estabilización del ligando. Dichos aminoácidos son Tyr440, Trp420, Trp423 y Tyr437.

La poca potencia inhibitoria podría estar debida además, a la cercanía del compuesto con el Asp306. Este aminoácido, que ha sido propuesto como base catalítica, ataca nucleofilicamente al fosfato γ del ATP y se fosforila. En consecuencia, se forma un intermedio de reacción que entra en conflicto estérico con el compuesto **A.2**. Dicho ligando, que no establece interacciones fuertes con los residuos del sitio activo, podría ser desplazado con facilidad del bolsillo hidrofóbico. Por tanto, entraría la colina y la reacción se terminaría de catalizar.

Un modo de interacción similar debe de existir para el compuesto **A.1**, puesto que muestra valores de afinidad e inhibición muy parecidos al **A.2**. Sin embargo, el anillo quinolínico de los compuestos **A.3** y **A.4**, así como el fenilo del grupo *N*-metilanilino presente en **A.3** conducirían a un perfil de interacción diverso en el que los sistemas aromáticos participarían en la formación de enlaces adicionales. Como resultado, la afinidad por la ChoK sería mayor. No obstante, de acuerdo a la escasa inhibición a la que también ellos dan lugar, tales interacciones adicionales parecen no ser suficientes para mantenerlos unidos de forma estable al sitio activo, por lo que la fosforilación del Asp306 también podría ser causa de su expulsión del bolsillo de la colina.

- **Familia B**

La estructura cristalina que se obtuvo para los compuestos de la **familia B**, fue la formada por el complejo *Hs*ChoK α 1/**B.2**, puesto que el compuesto **B.1** ya había sido cristalizado en trabajos recientemente publicados⁸⁸ y la insolubilidad de los compuestos **B.3** y **B.4** a grandes concentraciones, impidieron su cristalización. En consecuencia, también se abordaron estudios de docking para explicar el modo de unión del compuesto **B.3**, que a su vez, podría ser parecido al del compuesto **B.4** dada la similitud estructural entre ambos.

Según los valores de K_d que se obtuvieron para ellos, la afinidad mejoraba considerablemente con respecto a los derivados de la **familia A**, siendo esta mejora especialmente acusada para el caso de los derivados piridínicos.

En el cristal del compuesto **B.2** (**Figura 4.3.20.b**) no sólo se observan dos moléculas en el sitio de la colina, sino también interacciones π - π paralelas con los residuos Tyr354 (molécula 1) y Tyr333 (molécula 2). Además, la unión de la molécula 1 se refuerza con interacciones π - π no paralelas con los residuos Phe435 y Tyr440. Los residuos Trp420, Trp423 y Tyr437 también forman parte del bolsillo hidrofóbico donde ambas moléculas quedan insertadas. A la vista de estas interacciones puede afirmarse que la unión de los compuestos de la familia **B** está más reforzada que en el caso de los compuestos de la familia **A**, gracias al fenilo adicional del espaciador. El resultado por tanto, es una mejora de la afinidad frente a *HsChoK α 1* que especialmente notable en el caso de los derivados piridínicos y que debería de conducir a un aumento de la potencia como inhibidores.

Estudios de cristalografía llevados a cabo previamente con el compuesto **B.1** y otros derivados con dimetilaminopiridina como cabeza catiónica (consultar Protein Data Bank, PDB IDs: 4BR3 y 4CGA), han puesto de manifiesto que aunque sólo existe una molécula unida al sitio de la colina, ésta se presenta interacciones paralelas de tipo π - π con los residuos Tyr354, Phe435 y Trp420 (**Figura 4.3.21**). Esto explicaría la mejor afinidad del compuesto **B.1** con respecto a su equivalente **A.1**. Por otro lado, la comparación de la conformación adoptada por los residuos que conforman el bolsillo hidrofóbico donde ambos compuestos se insertan, ponen de manifiesto la notable rotación que experimentan los residuos Trp420 y Tyr333 para albergar la segunda molécula del compuesto **B.2**. Tanto es así que puede postularse que dicho cambio conformacional necesitaría de un aporte energético extra que sería motivo suficiente para pensar que *HsChoK α 1* introduce primero en el sitio de la colina a la molécula 1 (con una disposición ordinaria donde establece interacciones π - π paralelas con la Tyr354), y luego, a la molécula 2 (en la nueva cavidad que Trp420 y Tyr333 abren).

No obstante, los ensayos de inhibición ponen de manifiesto que tanto **B.1** como **B.2** no son capaces de interrumpir la síntesis de fosfocolina, por lo que las interacciones previamente descritas parecen no ser suficientes para impedir que la enzima los expulse del sitio activo.

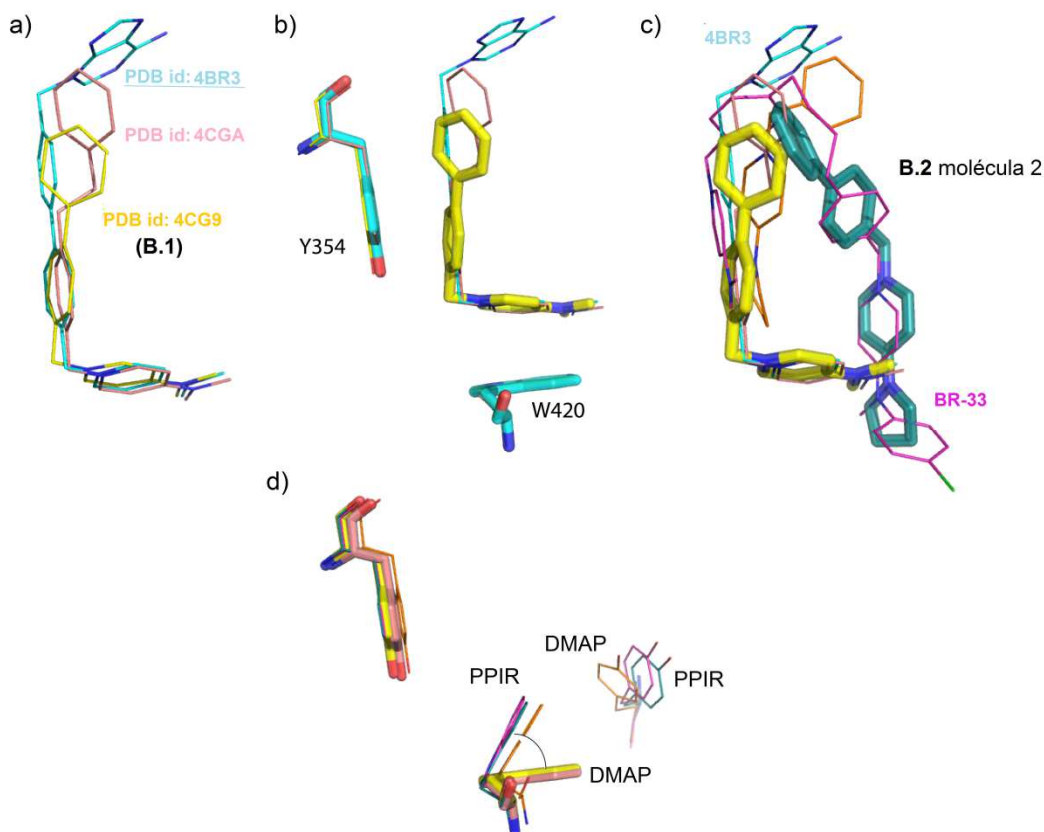


Figura 4.3.21. Interacciones del compuesto **B.1** y análogos con los residuos del sitio de la colina. **a)** Superposición del compuesto **B.1** (PDB ID: **4CG9**) y sus derivados de los cristales de código PDB: **4CGA** y **4BR3**. **b)** Residuos del sitio activo con los que forman interacciones π - π paralelas. **c)** Superposición de **B.1** y derivados con **B.2** y el compuesto **BR-33**. **d)** Cambios conformacionales de los residuos del sitio activo (Trp420 y Tyr 333) frente a los derivados de dimetilaminopiridina (DMAP) y pirrolidinopiridina (PPIR).

En base a estudios de docking realizados con el derivado quinolínico **B.3** (**Figura 4.3.22**), y según los valores de K_d observados, su unión al sitio de la colina podría darse de dos modos distintos. En la primera pose, la cabeza catiónica aparece insertada de modo profundo en el bolsillo de la colina, mientras que en el segundo modo de unión, ésta se expone hacia el disolvente. No obstante, en ambos casos, se observa que su reconocimiento molecular estará reforzado por interacciones extra de tipo π -catión, π - π paralelas y no paralelas a través del fenilo adicional del espaciador, del grupo quinolinio y del *N*-metilanilino. Esto podría explicar su mejor afinidad con respecto a los compuestos **B.1** y **B.2**, así como a sus análogos **A.3** y **A.4**. En concreto, los residuos involucrados en la interacción π -catión son la Tyr440 en la primera pose, y el Trp420, en la segunda. Por otro lado, las interacciones π - π paralelas de la primera pose se establecerían con los residuos Phe435 y Trp420, mientras que en la segunda pose,

intervendría únicamente la Tyr354. Por último, las interacciones π - π no paralelas se formarían con los residuos Phe435, Tyr354 y Trp423 en la primera pose, mientras que en la segunda parecen intervenir los residuos Trp420, Phe435, Tyr440 y Trp428.

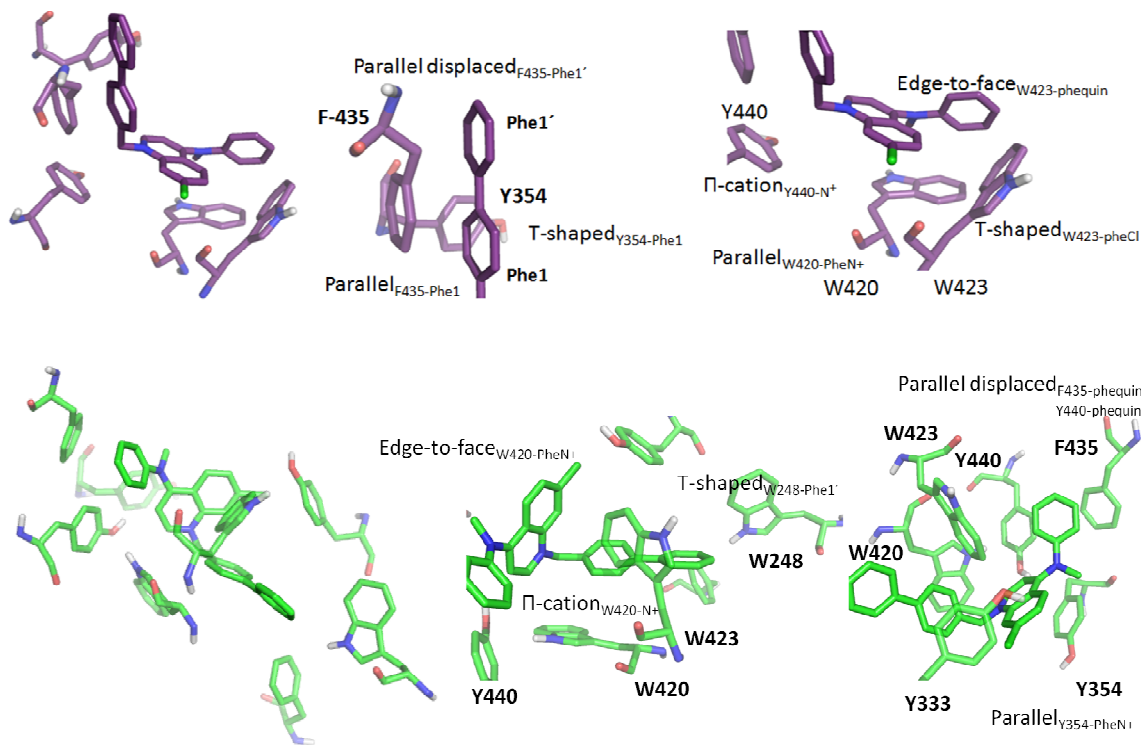


Figura 4.3.22. Primera y segunda pose adoptada por el compuesto **B.3** en los estudios de docking realizados. Todas las interacciones que se establecen aparecen indicadas en las figuras.

- Familia C

Los experimentos de fluorescencia y de actividad inhibitoria indican que los compuestos de la familia **C** con aminas de reducido volumen (protonadas o no) son los más afines a la proteína y los más potentes como inhibidores. Además, sugieren que los derivados quinolínicos con aminas pequeñas son más afines a la proteína que sus equivalentes piridínicos.

Estudiando las estructuras cristalinas de los compuestos **C.2.1**, **C.3.1** y **C.3.2** se observa que en el cristal del compuesto **C.2.1** hay falta de densidad electrónica para el fragmento de pirrolidinopiridina. Esto podría deberse a que dicho fragmento sale del bolsillo hidrófobo, no interactúa con ningún residuo y en consecuencia, presenta una gran movilidad que dificulta la difracción de los rayos X.

A nivel de interacciones, existen grandes similitudes entre los compuestos de ambas subfamilias y también ciertas diferencias con respecto a sus análogos de la familia **B** (**Figuras 4.3.20.c, 4.3.20.d y 4.3.20.e**). En concreto, los compuestos de la familia **C** sustituyen las interacciones π - π no paralelas observadas en la familia **B** por otra interacción paralela de este tipo, y además, los compuestos **C.2.1** y **C.3.2** muestran una interacción π -catión que no aparece en las otras familias debido a la carencia de aminas protonadas. Los residuos involucrados en las interacciones π - π paralelas son la Tyr354 y la Phe435 en el caso del compuesto **C.3.2** y sólo la Tyr354 en el compuesto **C.3.1** (**Figuras 4.3.20.c, 4.3.20.d y 4.3.20.e**), mientras que la interacción π -catión se forma entre la carga positiva de la amina cuaternaria y el Trp420. El resto de aminoácidos que forman el bolsillo donde se introducen los compuestos de la familia **C** son el Trp423, la Tyr437 y la Tyr440.

Por otro lado, se evidencia que ChoK selecciona el grupo funcional de tamaño menor para alojarlo en el bolsillo hidrofóbico, mientras que dirige hacia fuera del sitio activo el grupo más voluminoso. En el caso de los compuestos **C.2.1, C.3.1 y C.3.2**, elige la dimetil o dietilamina y expulsa hacia el disolvente las cabezas catiónicas piridínicas y quinolónicas. De este modo, la enzima evita conflictos estéricos y estabiliza el espaciador bifenílico mediante interacciones de tipo π - π con algunos residuos del sitio activo, como la Tyr354.

Por último, merece la pena destacar que los derivados quinolónicos desordenan el lóbulo del dominio *N*-terminal constituido por los residuos Arg117-Ser121, puesto que no aparece en la estructura cristalina. Este hecho únicamente se ha observado para los compuestos **C.3.1** y **C.3.2**, por lo que parece ser exclusivo de cabezas quinolónicas y puede que sea causa de un factor entrópico (ΔS) mayor que en definitiva, conduzca a una mayor estabilidad (menor ΔG de Gibbs) del complejo proteína/ligando.

En la **Tabla 4.3.32** se muestran resumidamente las interacciones que los miembros de cada familia establecen con los residuos del sitio de la colina.

Tabla 4.3.32. Perfil de interacción de los miembros de cada familia.

		C.2.1, C.3.1, C.3.2	B.1 y derivados	B.2	A.2
π-π	Paralelas	Y354, F435 (no en C.3.1)	W420, F435, Y354	Y354 (molécula 1), Y333 (molécula 2)	-
	No paralelas	-	W423	F435 (molécula 1, Phe'), Y440 (molécula 1, Phe')	Y354, F345
Bolsillo hidrofóbico		W423, Y437, Y440	Y333, Y437, Y440	W420, W423, Y437	W420, W423, Y437, Y440
Aspectos relevantes		Elevado ΔS para el loop R117-S121 / W420 (π -catión)	-	-	-
		Y354 contribuye a estabilizar a todos los ligandos con independencia de la naturaleza química del espaciador y de la cabeza catiónica			

4.3.5.2. Comparativa de los cristales de las familias A, B y C -entre sí y con otros previamente publicados- en función de la naturaleza de la cabeza catiónica de los compuestos.

- Compuestos biscatiónicos con dimetil o dietilamina y quinolina

La superposición de los compuestos **C.2.1** y **C.3.1** revela que el grupo dimetilamino-bifenilo presenta el mismo posicionamiento en ambos casos. Ambas poses están estabilizadas mediante interacciones π - π paralelas con los residuos Phe435 y Tyr354 en el caso del compuesto **C.2.1**, que rota su grupo fenilo directamente unido al dimetilamino protonado (**Figura 4.3.23**). Además, se observa una interacción π -catión con el nitrógeno del grupo dimetilamino de ambos compuestos y el Trp420.

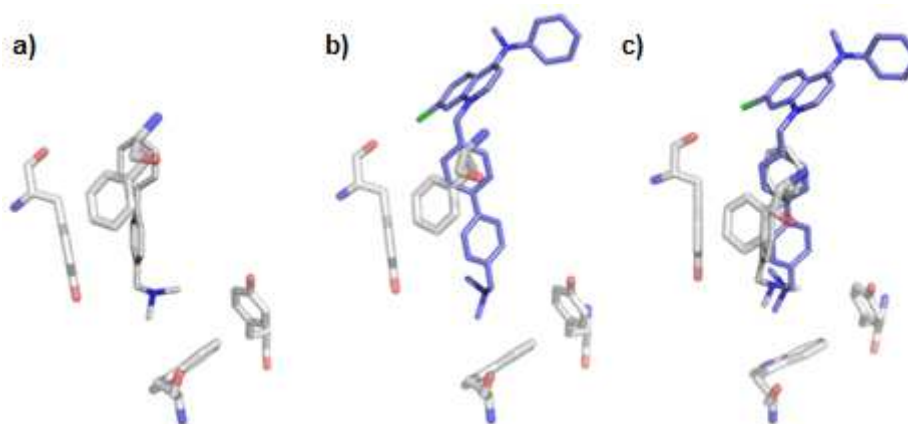


Figura 4.3.23. Estructura cristalina de los compuestos **C.2.1**, **C.3.1** y superposición de ambos. a) Compuesto **C.2.1**. b) Compuesto **C.3.1**. d) Superposición de las estructuras cristalinas de **C.2.1** y **C.3.1**.

Por su parte, el compuesto **C.3.2** es también un derivado quinolínico que presenta una dietilamina en el extremo opuesto a la quinolina. Tal como ocurre con el compuesto **C.3.1**, la quinolina se dirige hacia el exterior del sitio de la colina. Sin embargo, **C.3.2** rota 180° su cabeza catiónica quinolínica con respecto a **C.3.1** y adopta la misma conformación del anillo bifenílico que la del compuesto **C.2.1** (**Figura 4.3.24**).

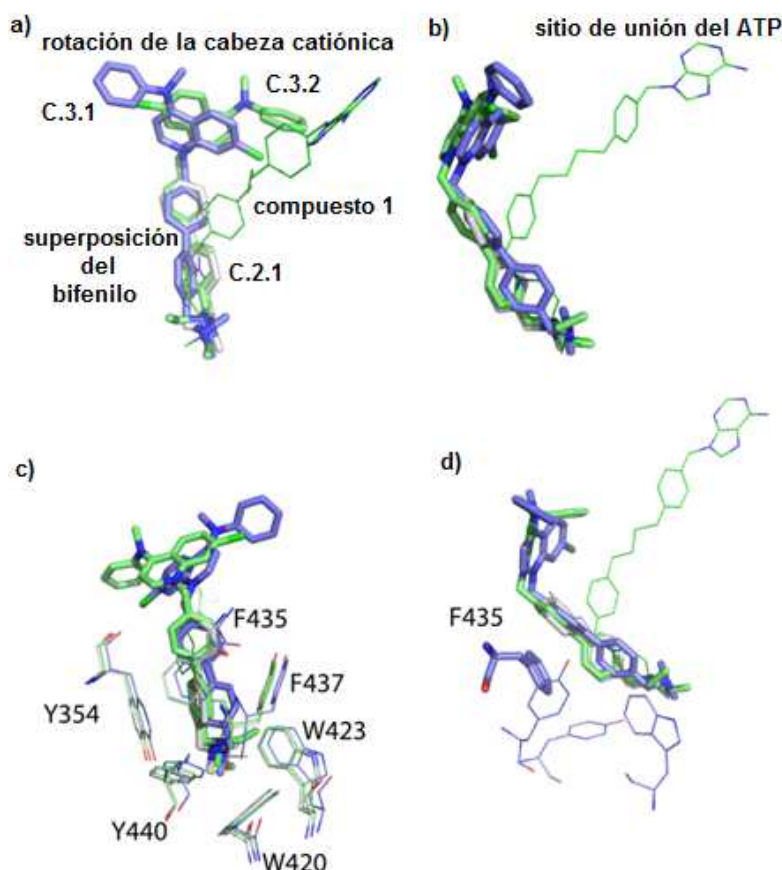


Figura 4.3.24. Superposición de las estructuras cristalinas de los compuestos **C.2.1**, **C.3.1**, **C.3.2** y **compuesto 1**. **a)** Superposición de las poses adoptadas por los compuestos **C.2.1**, **C.3.1**, **C.3.2** y el **compuesto 1** en el complejo cristalino. **b)** Otra perspectiva de la superposición donde se muestra la ocupación del sitio del ATP por el **compuesto 1**. **c)** Residuos del sitio activo involucrados en el reconocimiento de los cuatro ligandos. **d)** Phe435 como residuo común con el que se establecen interacciones π - π paralelas.

Estudios de dinámica molecular (MD) llevados a cabo en el grupo del profesor D. Antonio Macchiarulo por el doctor Roberto Nuti en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Perugia (Italia) han demostrado que tanto la quinolina como el bifenilo del compuesto **C.3.1** son capaces de rotar y adoptar la misma orientación que en el compuesto **C.3.2** (**Figura 4.3.25**). En conclusión, **C.3.1** también es capaz de establecer dos interacciones π - π paralelas con los residuos Tyr354 y Phe435.

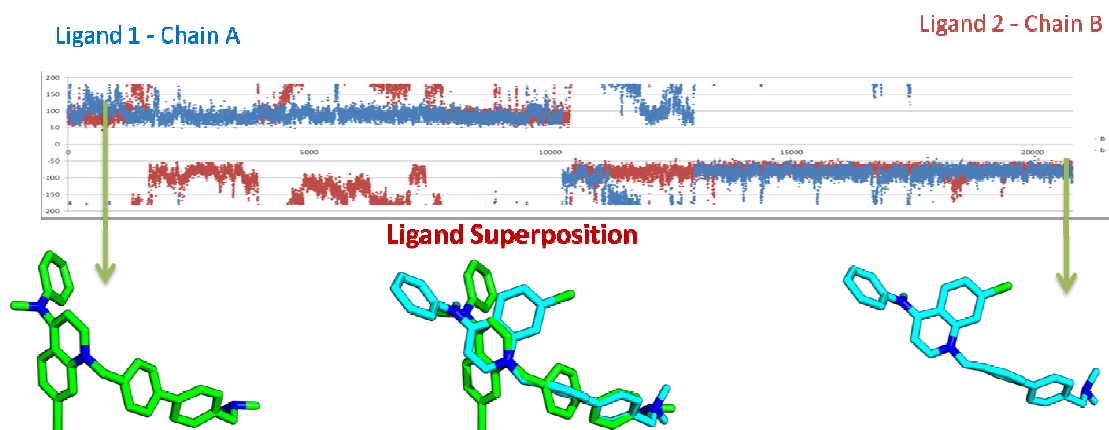


Figura 4.3.25. Cambio de orientación de los grupos quinolinio y bifenilo al final de los 100 ns de MD.

Además, la MD pone de manifiesto que el compuesto **C.3.1** forma un puente de hidrógeno con una molécula de agua presente en el sitio activo (**Figura 4.3.26**), por lo que dicha interacción contribuye todavía más a la estabilización del ligando y a aumentar su afinidad por el sitio activo. Por otro lado, de todos los puentes de hidrógeno previamente señalados, los de mayor ocupancia (los más duraderos en el tiempo, y por tanto, los más estables) según la MD son los establecidos con los residuos Phe435 y Tyr354.

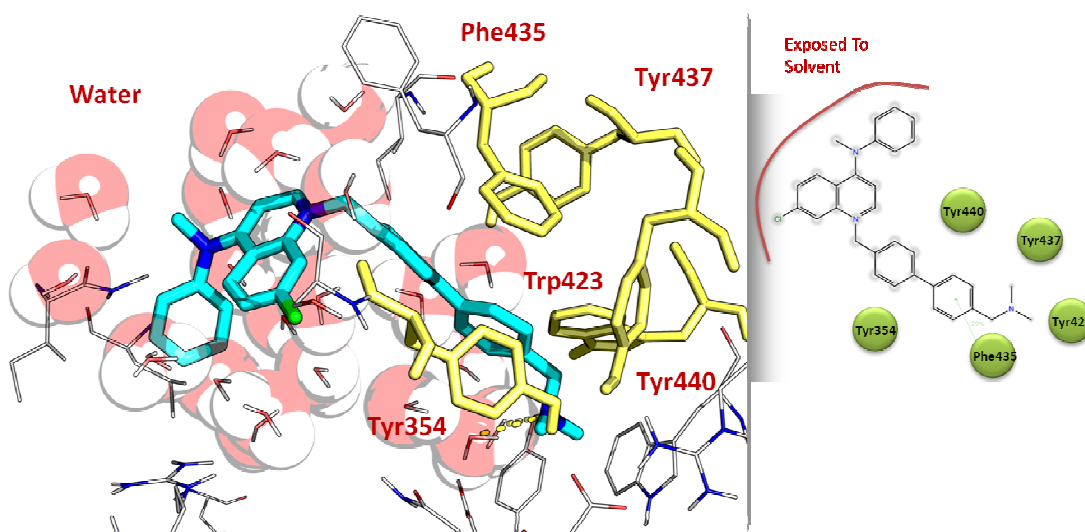


Figura 4.3.26. Imagen del compuesto **C.3.1** en el sitio de la colina rodeado por los residuos y el agua con los que establece interacciones.

Este hecho, junto con la carencia del lóbulo formado por los residuos Arg117-Ser121 en los cristales de **C.3.1** y **C.3.2** (**Figura 4.3.27**), pueden ser los responsables de

la mejor K_d que muestran los derivados de quinolina en comparación con el compuesto **C.2.1** y el resto de compuestos sintetizados en la presente Tesis Doctoral. La carencia del lóbulo sugiere una importante movilidad o desorden que podría ser causa de un factor entrópico mayor en la energía libre de Gibbs y en consecuencia, de una mejor afinidad de los ligandos por la proteína.

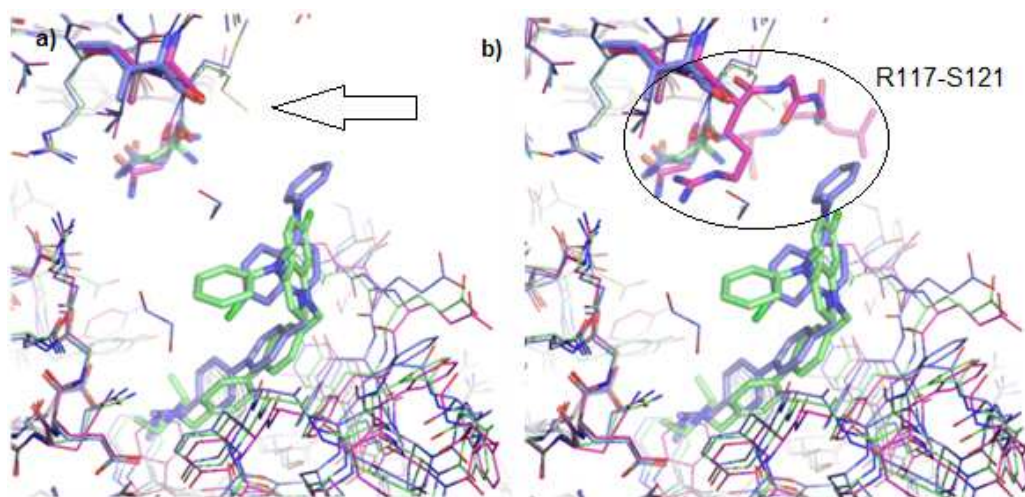


Figura 4.3.27. Residuos **R117-S121** que no se han resuelto en la estructura cristalina de los complejos *HsChoKa1/C.3.1* y *HsChoKa1/C.3.2*. **a)** Cristales de ambos compuestos superpuestos con flecha indicando el sitio donde falta el lóbulo. **b)** Lóbulo que debería de aparecer.

Aunque en el compuesto **1** (PDB ID: **3ZM9**)⁸⁰ nos encontramos una dimetilaminopiridina (DMAP) (**Figura 4.3.24**), el modo en el que este ligando se inserta en el sitio de la colina es el mismo que el del resto de ligandos de las subfamilias **C.2** y **C.3**. La razón de este posicionamiento es la longitud del espaciador, de modo que se necesitarían dos carbonos más para que el compuesto **1** se posicionara igual que el resto de derivados de DMAP. Sin embargo, a pesar del corto espaciador, ChoK orienta el fragmento de piridina hacia la Tyr354 para establecer interacciones π - π (**Figura 4.3.24**).

- Derivados de pirrolidinopiridina

En este grupo de compuestos, se pueden diferenciar dos tipos de ligandos, el **A.2** y el **B.2**, los cuales vistos en conjunto se introducen en el sitio de la colina de igual forma que el compuesto **14** (**BR33**)⁸⁹ (**Figura 4.3.25**).

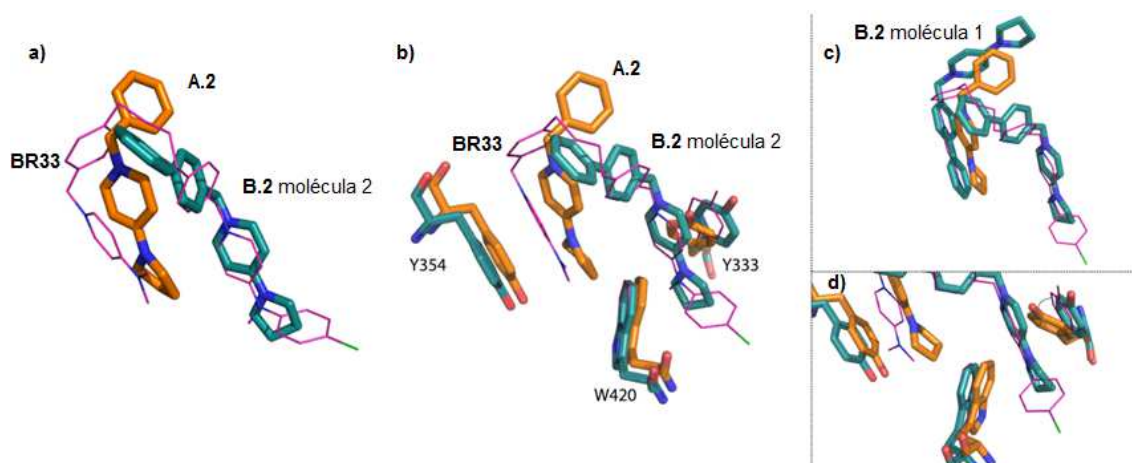


Figura 4.3.25. a) Superposición de las estructuras cristalinas de los compuestos **A.2**, **B.2** y **BR33**. b) Algunos de los residuos con los que se forman interacciones π - π . c) Superposición de los grupos piridinio de las dos moléculas del compuesto **B.2** con el grupo piridina del compuesto **BR33** y proximidad con el piridinio de **A.2**. d) Rotación hacia atrás de la Tyr333 para acomodar a la molécula 2 del compuesto **B.2** y al grupo *N*-metilnilino del **BR33**.

Como puede observarse, los residuos que están involucrados en el reconocimiento de los tres ligandos no son los mismos. En este sentido, es notable la interacción π - π paralela que forma la molécula 2 del compuesto **B.2** con la Tyr333. Este residuo, se desplaza hacia atrás para acomodar de la forma más estable posible a dicha molécula (**Figura 4.3.25.d**). En el caso de **A.2**, no establece interacciones π - π paralelas con ningún aminoácido, tal y como se indicó previamente. Por su parte, el compuesto **14** forma tres interacciones π - π , de las cuales 2 son paralelas con los residuos Tyr354 y Tyr333. El aminoácido Trp420 es el responsable de la tercera interacción (**Figura 4.3.25.b**). Curiosamente, la molécula 1 del compuesto **B.2** superpone su grupo fenilo unido directamente a la cabeza catiónica con el fenilo del compuesto **14**. Esta disposición le permite establecer interacciones π - π paralelas con la Tyr354. La molécula 1 de **B.2** forma interacciones π - π no paralelas con Phe435 y con Tyr440, respectivamente. Si se comparan las poses de las moléculas 1 y 2 del ligando **B.2**, se observa que sus grupos bifénilo se disponen paralelamente en cruz (**Figura 4.3.26**), de forma que se favorece la formación de interacciones π - π no paralelas entre ambas.

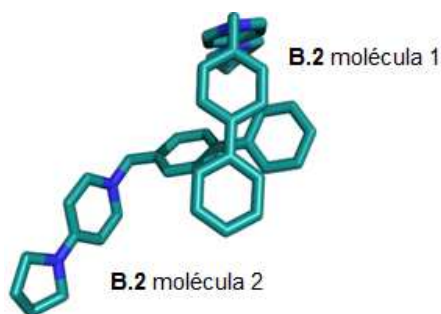


Figura 4.3.26. Disposición en cruz de las dos moléculas del compuesto **B.2**.

En conclusión, cada uno de estos perfiles de interacción es responsable de un valor de K_d mayor que el de los derivados quinolínicos y el del compuesto **C.2.1**. A la vista de lo previamente expuesto, dicha observación puede responder a la formación de menos interacciones π - π paralelas.

- **Derivados de dimetilaminopiridina**

La disposición típica de los derivados de dimetilaminopiridina (DMAP) en el sitio de la colina implica la formación de tres interacciones π - π paralelas con los residuos Trp420, Tyr354 y Phe435 (**Figura 4.3.21**). Todas ellas son la causa de la mayor afinidad que en general, los derivados de DMAP muestran con respecto a los de pirrolidinopiridina (PPIR). También puede apreciarse una interacción π - π no paralelas entre el aminoácido Trp423 y el anillo de piridina del compuesto **B.1**. El fragmento de DMAP está superpuesto en todos los casos, sin embargo, el resto de la molécula se dispone de forma distinta en función del espaciador (**Figura 4.3.21**). Esto confirma una vez más que la parte de la molécula realmente importante para interactuar con la proteína es el fármaco que ha sido propuesto previamente.

Si se compara la orientación de los residuos involucrados en la interacción de los derivados de DMAP y PPIR, es apreciable el giro que experimentan los residuos Trp420 y Try333 para facilitar la unión de los derivados de PPIR (**Figura 4.3.21.d**).

4.4. Parte 4: Estudio computacional comparativo de los sitios activos de *HsChoK* α 1, *PfChoK*, *PkChoK* y *CpChoK*.

Después del diseño de nuevos inhibidores de *HsChoK* α 1, se realizó el estudio computacional de otras proteínas que guardaran un alto grado de conservación con la misma. El objetivo era encontrar proteínas homólogas donde estudiar el efecto de algunos de los inhibidores de *HsChoK* α 1 previamente diseñados. De esta forma, en caso de demostrarse inhibición de las proteínas homólogas, se abriría un nuevo campo de acción para los inhibidores de *HsChoK* α 1 y por tanto, también podrían tener aplicación para el tratamiento de otras enfermedades distintas al cáncer.

Tal y como se especifica en la **sección 5.1.1** de la Parte Experimental, este estudio se llevó a cabo realizando inicialmente un análisis computacional donde se buscaron proteínas homólogas de *HsChoK* α 1. A continuación, se clonaron, expresaron y purificaron dichas proteínas (*PfChoK*: colina quinasa de *Plasmodium falciparum* y *CpChoK*: colina quinasa de *Cryptosporidium parvum*), junto a *HsChoK* α 1 para determinar la afinidad de dos posibles inhibidores mediante espectroscopía de fluorescencia de triptófanos (**Figura 4.4.1**). La síntesis y caracterización de ambos se describe en el **apartado 5.2** de la Parte Experimental (compuestos **B.1** y **C.4.4**). Finalmente, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de las tres proteínas con ambos inhibidores.

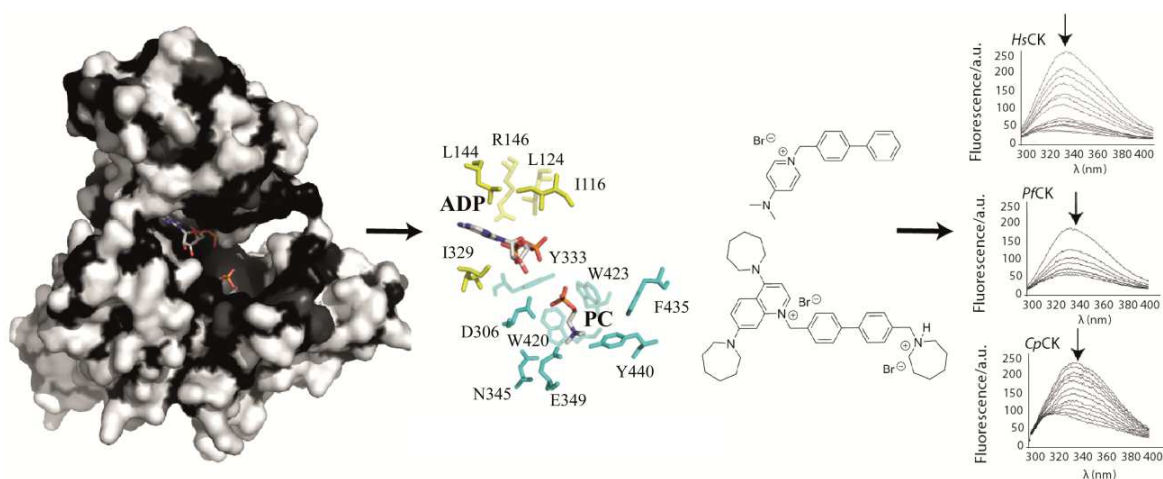


Figura 4.4.1. Esquema del proceso comparativo de las ChoK homólogas.

4.4.1. El sitio activo de *Cryptosporidium parvum* y *Plasmodium* ChoKs está muy conservado con el de *HsChoK α 1*.

Inicialmente, para llevar a cabo el presente estudio se eligieron diez ChoKs de diferentes patógenos eucariotas y procariotas para incluir la máxima variabilidad posible entre estas enzimas a nivel de su secuencia de aminoácidos. Un alineamiento múltiple de la secuencia proteica de estas ChoKs frente a *HsChoK α 1*, mostró que la identidad global es variable, oscilando entre el 23 y el 43 % dependiendo del organismo (**Tabla 4.4.1**). Comparando los sitios activos, en general la identidad de las secuencias de las ChoKs aumenta, sugiriendo una mayor conservación a este nivel que globalmente. Concretamente, la conservación de *PfChoK*, *PkChoK* y *CpChoK* con la ChoK humana a nivel de los sitios de unión del ADP y de la PCho es la más pronunciada, alcanzando una identidad entre el 69 y el 80 % (**Tabla 4.4.1** y **Figura 4.4.1.a**). Esta observación fue posteriormente evidenciada con un análisis de conservación estructural donde se superpusieron las estructuras tridimensionales de las tres homólogas (**Figura 4.4.1.b**). Dicho análisis muestra un gran número de residuos idénticos que interaccionan con el ADP y la PCho (**Figura 4.4.1.c**).

Tabla 4.4.1. Identities entre las **ChoKs** de diferentes patógenos con *HsChoK α 1*. Las secuencias fueron alineadas con el software Jalview y el porcentaje de identidad se determinó a nivel global para la proteína y para el sitio activo. Para seleccionar los residuos constituyentes de los sitios activos, se usó como referencia la estructura de la ChoK α 1 humana en complejo con el ADP y la PCho (PDB ID: **2CKQ**) y se tomó un radio de 5 Å alrededor de los ligandos. Las ChoKs que muestran una secuencia de mayor identidad con la *HsChoK α 1* están señaladas en negrita.

Especie	Identidad global con <i>HsChoKα1</i> (%)	Identidad del sitio activo con <i>HsChoKα1</i> (%)
<i>Clostridium botulinum</i>	43	40
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	31	43
<i>Toxoplasma gondii</i>	30	44
<i>Cryptosporidium parvum</i>	30	80
<i>Plasmodium falciparum</i>	29	69
<i>Plasmodium knowlesi</i>	29	69
<i>Legionella pneumophila</i>	29	29
<i>Theileria orientalis</i>	26	26
<i>Mycoplasma pneumonia</i>	25	22
<i>Trypanosoma cruzi</i>	23	48

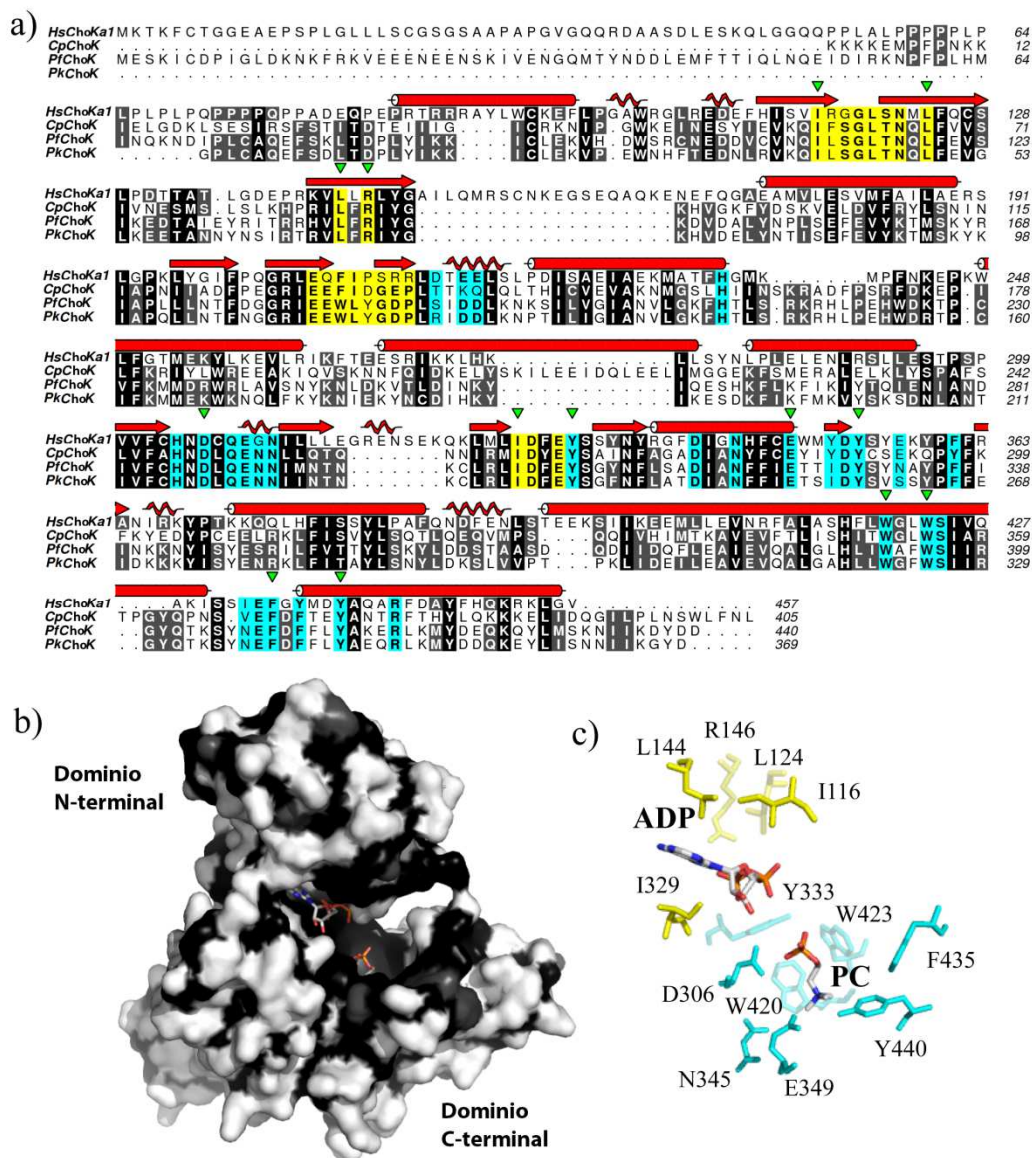


Figura 4.4.1. Comparación estructural entre las **ChoKs** de *Plasmodium* y *Cryptosporidium* con la *HsChoKa1*. **a)** Alineamiento múltiple de las secuencias de *HsChoKa1*, *PfChoK*, *PkChoK* y *CpChoK*. Los residuos localizados en los sitios de unión del ATP y de la colina se muestran subrayados con una línea negra fina y gruesa, respectivamente. Los triángulos hacen referencia a residuos conservados que interactúan a través de puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas con el ADP y la PCho. Los elementos de la estructura secundaria deducidos de la *HsChoKa1* (PDB ID: **3G15**) están representados como líneas onduladas para las hélices 3_{10} , y como cilindros y flechas para las α -hélices y las láminas β , respectivamente. **b)** Representación de la superficie de *HsChoKa1* coloreada según la conservación de su secuencia con *PfChoK*, *PkChoK* y *CpChoK* (negro (100% identidad), gris (<50% identidad)). **c)** Sitio activo de *HsChoKa1* (PDB ID: **3G15**) en complejo con ADP y PCho que muestra los residuos conservados interactuando a través de fuerzas hidrofóbicas y puentes de hidrógeno con el ADP y la PCho. Ambos productos están representados como barras con los átomos de carbono en blanco. Sólo se muestran los residuos idénticos entre las diferentes ChoKs.

4.4.2. La MD muestra que en el reconocimiento de los ligandos intervienen interacciones conservadas/no conservadas entre las especies

El reconocimiento de ligandos es un proceso complejo y dinámico que implica la reorganización conformacional de los grupos funcionales implicados en la unión de acuerdo a su energía.¹⁴⁵ Como consecuencia, los residuos no conservados que se localizan tanto fuera como dentro del sitio de activo de las ChoKs pueden favorecer conformaciones específicas del enzima, determinando diferencias típicas de cada especie durante el reconocimiento de los ligandos. Para investigar el proceso de reconocimiento en las ChoKs, 10 ns de simulaciones de dinámica molecular (MD) se llevaron a cabo en *HsChoKα1*, *PfChoK*, *PkChoK* y *CpChoK* en complejo con ADP y PCho. Las trayectorias resultantes se analizaron para evaluar la diversidad conformacional de las cuatro enzimas. En concreto, se realizó el cálculo del “root mean square deviation” (RMSD)¹⁴⁶ de los átomos del esqueleto carbonado y de los ligandos y la estabilidad de las interacciones ligando/enzima durante los 10 ns de simulaciones de MD.

La media de los valores de RMSD de la PCho están comprendidos entre 0,576 Å (*PkChoK*) y 0,956 Å (*PfChoK*), y entre 0,569 Å (*CpChoK*) y 0,967 Å (*HsChoKα1*) para el ADP (**Figura 4.4.2**), indicando que no se producen cambios conformacionales significativos. Sin embargo, en el caso de los átomos del esqueleto carbonado, se observan fluctuaciones más importantes en todos los casos y en especial para la *HsChoKα1*, que muestra los mayores movimientos ($1,591 \pm 0,289$ Å). Como resultado, puede afirmarse que en el sitio activo de las ChoKs tienen lugar cambios conformacionales atribuibles a los residuos no conservados entre las diferentes enzimas.

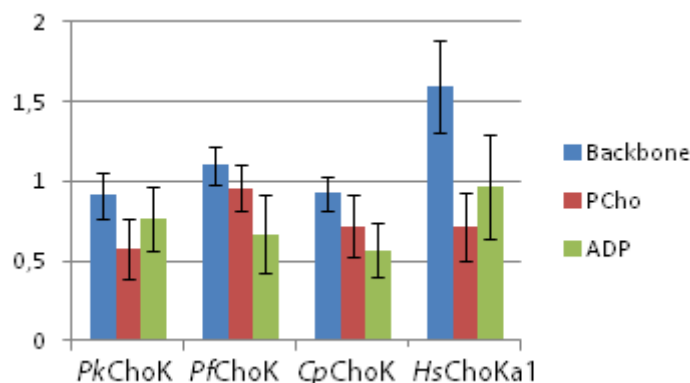


Figura 4.4.2. Histograma de barras de la media de los valores de RMSD y desviaciones estándar para los átomos del esqueleto carbonado y de los ligandos en *PkChoK*, *PfChoK*, *CpChoK* y en *HsChoKα1*.

A continuación, se planteó la pregunta sobre si los diferentes movimientos conformacionales de las ChoKs podrían dar lugar a diversos tipos de interacciones ligando/diana en los sitios de unión del ADP y de la PCho. La respuesta a esta pregunta se encontró mediante un cálculo de ocupancia de los puentes de hidrógeno durante la trayectoria de cada una de las cuatro MD (**Tabla 4.4.2**). La inspección de la **Tabla 4.4.2** revela la presencia de interacciones por puentes de hidrógeno conservados y no conservados entre los residuos del sitio activo y los ligandos (**Figura 4.4.3**).

Dentro de las interacciones conservadas entre especies se incluyen los puentes de hidrógeno estables entre la Arg146 (numeración de *HsChoK α 1*) y el grupo fosfato del ADP, y entre la Gln207 (numeración de *HsChoK α 1*) y el resto de adenina del sustrato, si bien esta última interacción muestra una menor ocupancia en la enzima humana (36.67%). Esto es debido a que la Gln207 reemplaza a un residuo de ácido glutámico presente en las otras ChoKs de los patógenos, resultando en una menor ocupancia del puente de hidrógeno en la *HsChoK α 1* debido a la pérdida de la contribución electrostática proporcionada por la carga negativa de la cadena lateral carboxílica. Otra interacción conservada entre las especies que también muestra una notable ocupancia es la que se forma entre el Asp306 y el protón ácido del grupo fosfato de la PCho, la cual es la única interacción por puente de hidrógeno conservada en la que participa este ligando. Además de las interacciones previamente mencionadas, existe una zona altamente conservada de potencial electrostático compuesta por las cadenas laterales de los residuos Glu349, Tyr440, Phe435, Trp420 y Trp423 (numeración de *HsChoK α 1*) que proporciona fuertes interacciones electrostáticas con la amina cuaternaria cargada positivamente de la PCho (**Figura 4.4.3**).

A pesar de que sólo unas cuantas interacciones no conservadas contribuyen a una distinta estabilización de la PCho en las ChoKs, son varias las interacciones de este tipo que participan en la estabilización del ADP de un modo específico en cada especie. En particular, *HsChoK α 1*, *PfChoK* y *PkChoK* aprovechan la cadena lateral del residuo conservado Gln308 (numeración *HsChoK α 1*) estableciendo un puente de hidrógeno específico con el grupo fosfato de la PCho aunque esta interacción es prácticamente inexistente en *CpChoK* (ocupancia < 1 %). Sin embargo, *CpChoK* compensa la ausencia de dicha interacción estableciendo un puente de hidrógeno muy estable con el grupo fosfato de la PCho (ocupancia 90.83 %) a través de la Tyr333 (numeración de *HsChoK α 1*). Otra interacción similiar específica de ciertas especies puede atribuirse a

la Asn311 (numeración de *HsChoK* α 1) que, a pesar de estar conservada en las cuatro enzimas, únicamente forma puentes de hidrógeno de baja ocupancia con el grupo fosfato de la PCho en *PfChoK* (ocupancia 29.12 %), *PkChoK* (ocupancia 24.75 %) y *HsChoK* α 1 (ocupancia 11.56 %) (**Tabla 4.4.2** y **Figura 4.4.3**).

Respecto a las interacciones especie-específicas del ADP, los residuos Thr83 y Asn84 (numeración *CpChoK*) están selectivamente implicados en la unión mediante puentes de hidrógeno con el fosfato β del ligando en *CpChoK* (ocupancia 90.47 % y 98.62 %), *PfChoK* (ocupancia 79.03,% y 28.76,%) y *PkChoK* (ocupancia 25.16 % y 94.25 %). Mientras que el Glu183 y la Asp305 (numeración *PfChoK*) específicamente forman puentes de hidrógeno estables con el ADP en *PfChoK* y *PkChoK*, Asn292 (numeración *PfChoK*) establece puentes de hidrógeno con el ligando exclusivamente en *PfChoK* y en *CpChoK*. Finalmente, merece la pena destacar que el residuo no conservado Arg117 de *HsChoK* α 1 interacciona con el fosfato β del ADP mediante un puente de hidrógeno muy estable (ocupancia 100 %), proporcionando la interacción específica más fuerte (**Tabla 4.4.2** y **Figura 4.4.3**).

Tabla 4.4.2. Porcentaje de ocupancia de las interacciones mediante puentes de hidrógeno. Las interacciones comunes están señaladas en negrita.

<i>HsChoKα1</i>		R117	G118	S121	N122	R146	S211	E206	Q207	R213	D306	Q308	G310	N311	D330	E332	Y333
<i>CpChoK</i>		F79	S80	T83	N84	R108	G154	E149	E150	P156	D268	Q270	N272	N273	D285	E287	Y288
<i>PfChoK</i>		L112	S113	T116	N117	R142	G187	E183	E184	P190	D288	Q290	N292	N293	D305	E307	Y308
<i>PkChoK</i>		L42	S43	T46	N47	R72	G118	E113	E114	P120	D218	Q220	N222	N223	D235	E237	Y238
<i>HsChoKα1</i>	ADP	100.00	-	-	0.12	95.81	0.42	2.88	36.67	1.74	-	-	5.21	-	-	-	-
	PC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62.19	41.70	-	11.56	-	-	-
<i>CpChoK</i>	ADP	-	1.14	90.47	98.62	99.34	-	0.12	44.22	-	-	-	59.62	-	-	-	-
	PC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99.52	0.90	-	-	0.30	0.06	90.83
<i>PfChoK</i>	ADP		9.17	79.03	28.76	97.42	-	24.75	82.69	-	-	-	22.95	-	91.19	-	-
	PC	-	-	-	-	-		-	-		92.45	75.31	-	29.12	-		3.54
<i>PkChoK</i>	ADP	-	5.57	25.16	94.25	99.10	-	21.51	54.34		-	-	3.24	-	80.83	-	73.16
	PC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98.38	84.57	-	24.75	-	-	1.20

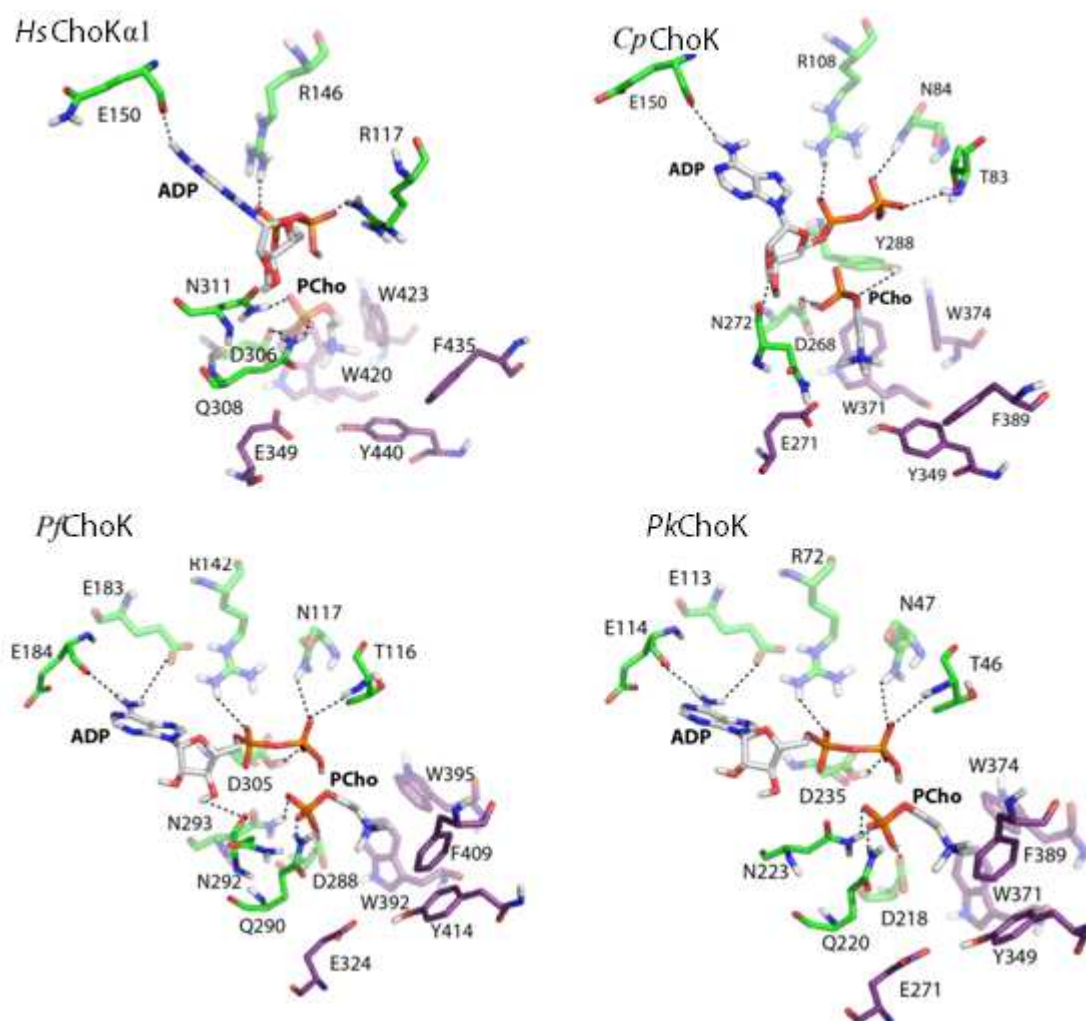


Figura 4.4.3. Sitio activo de *HsChoKα1*, *CpChoK*, *PfChoK* y *PkChoK* en complejo con ADP y PCho. Sólo se muestran los residuos implicados en la estabilización del ADP y de la PCho mediante puentes de hidrógeno o contactos hidrofóbicos conservados y no conservados para facilitar la ilustración. Los puentes de hidrógeno están representados con líneas negras discontinuas. Todas estas imágenes han sido confeccionadas con Pymol tras la simulación de MD en los modelos de los complejos ADP-PCho/ChoKs (código PDB: 3G15 para *HsChoKα1*, 3MES para *CpChoK*, 3F18 para *PfChoK* y 3C5I para *PkChoK*).

4.4.3. Los derivados del HC-3 pueden comportarse como inhibidores de *HsChoKα1*, *PfChoK* y *CpChoK* simultáneamente.

Los estudios computacionales no sólo evidencian que el sitio activo de *HsChoKα1* es muy parecido al de las ChoKs de *Plasmodium* y *Cryptosporidium*, sino que también sugieren la presencia de enlaces de hidrógeno conservados y no conservados entre las diferentes especies, que afectan al proceso de reconocimiento de los ligandos.

Las interacciones conservadas, en particular, incluyen dos enlaces de hidrógeno que anclan al ADP, otro en el que participa el grupo fosfato de la PCho, y fuerzas

electrostáticas donde está implicada la amina cuaternaria del ligando. Es destacable el hecho de que el grupo fosfato de la PCho actúa como donador en vez de como grupo aceptor en el enlace de hidrógeno que establece con la cadena lateral del Asp306. Por su parte, las interacciones no conservadas con la PCho se atribuyen a enlaces de hidrógeno en el que el resto de fosfato actúa como grupo aceptor.

Por todo lo anterior, se hipotetiza que los derivados de **HC-3** capaces de unirse a la *HsChoK α 1* principalmente a través de residuos aceptores de enlaces de hidrógeno podrían también interactuar con las enzimas de *Plasmodium* o *Cryptosporidium*, explorando interacciones electrostáticas conservadas o bien formando enlaces de hidrógeno donde actúen como donadores frente al Asp306.

Para validar dicha hipótesis, se implementaron ensayos de fluorescencia de triptófanos en los que se determinaron los valores de afinidad o K_d frente a *HsChoK α 1*, *PfChoK* y *CpChoK* de dos compuestos derivados del **HC-3** que no incluían potenciales aceptores de enlaces de hidrógeno (**Figura 4.4.4**). A este respecto conviene destacar que los nitrógenos anilínicos de los compuestos **B.1** y **C.4.4** no pueden ser considerados aceptores porque su par electrónico libre está conjugado con el anillo aromático.

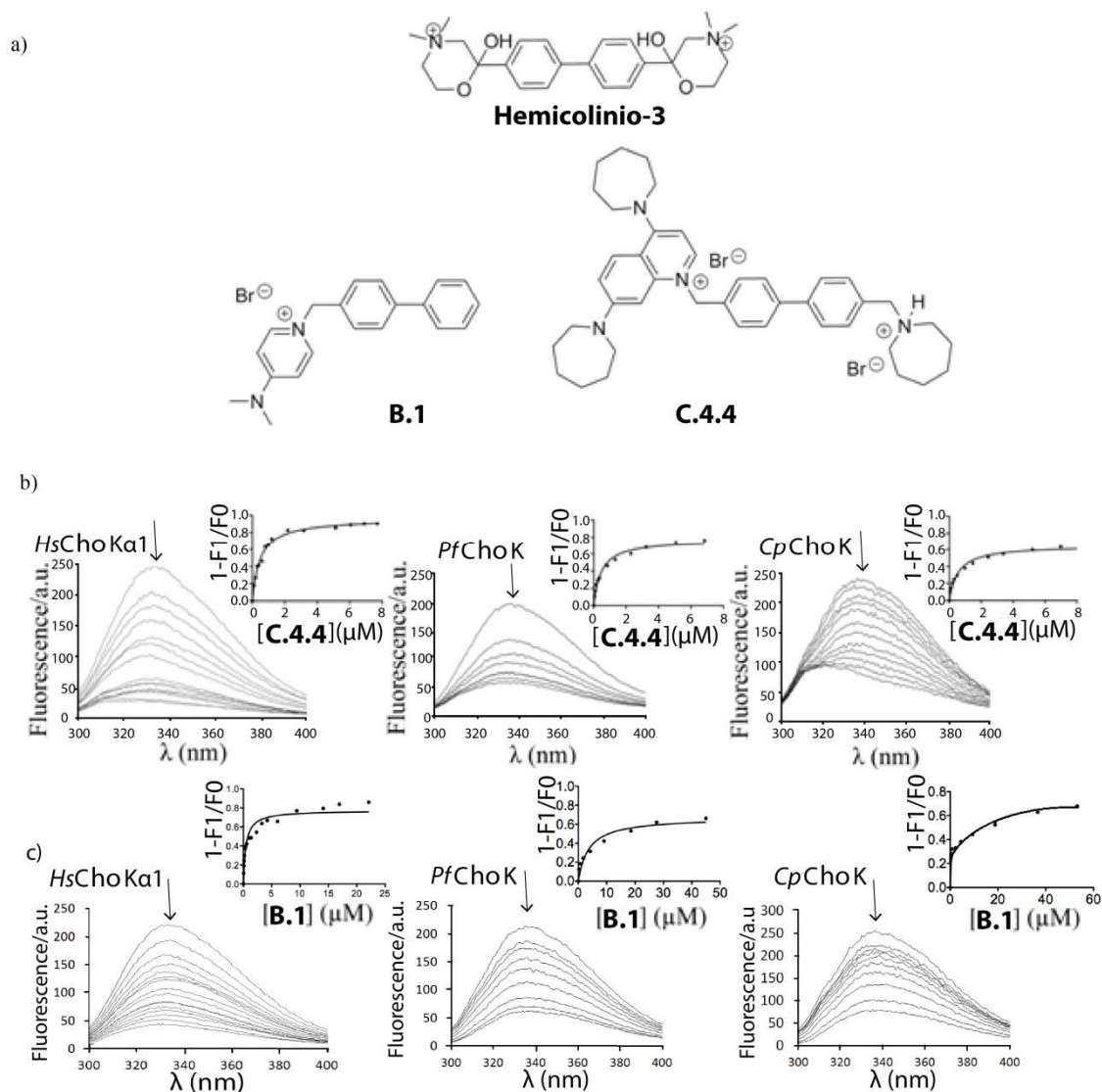


Figura 4.4.4. a) Estructura química del **HC-3** y de los compuestos **B.1** y **C.4.4**. b), c) Extinción de la fluorescencia intrínseca de los triptófanos en *HsChoKa1*, *PfChoK* y *CpChoK* medida a concentraciones crecientes de los compuestos **B.1** y **C.4.4**. Todos los puntos representan las medias \pm S.D para tres medidas. La K_d para los compuestos **B.1** y **C.4.4** se determinó ajustando los datos de intensidad de la señal fluorescente frente las concentraciones de ambos compuestos.

La síntesis y el modo de unión del compuesto **B.1** ya fueron publicados en un reciente estudio, demostrando que este compuesto, al igual que la mayoría de los derivados del HC-3, es un inhibidor competitivo de *HsChoKa1*.¹⁴⁷ El compuesto **C.4.4** por su parte, fue diseñado y sintetizado con el propósito de incrementar el tamaño y la complejidad de la molécula manteniendo al mismo tiempo la carencia de grupos aceptores de enlaces de hidrógeno. Los resultados de los estudios de fluorescencia indicaron que los valores de K_d de estos compuestos eran del orden de μM bajo y que

eran muy similares para las tres enzimas, verificando la hipótesis de trabajo (**Tabla 4.4.3** y **Figura 4.4.4**).

Mientras que el compuesto **B.1** muestra un valor de K_d peor de 1400, 1960 y 2927 nM frente a *HsChoK α 1, *PfChoK* y *CpChoK* respectivamente, el compuesto **C.4.4** se une mejor a estas enzimas proporcionando un valor de K_d de 265, 430 y 425 nM (**Tabla 4.4.3**). Estos resultados indican que el compuesto **C.4.4** es más potente que el compuesto **B.1**. Además, se confirmó que el compuesto **C.4.4** es inhibidor de *HsChoK α 1, *PfChoK* y *CpChoK* midiendo sus valores de IC_{50} (**Tabla 4.4.3**). Aunque los valores de CI_{50} resultantes para las tres enzimas son diferentes, el de las constantes de inhibición⁴⁴ calculadas a partir de la ecuación de Cheng-Prusoff para inhibidores competitivos (**Ecuación 4.4.1**) son del mismo orden para *HsChoK α 1 y *PfChoK* (K_i de 152 y 387 nM para *HsChoK α 1 y *PfChoK*, respectivamente) y muy cercanas a los valores de K_{ds} (K_d de 265 y 430 nM para *HsChoK α 1 y *PfChoK*, respectivamente; **Tabla 4.4.3**).*****

Ecuación 4.4.1

$$K_i = CI_{50} / \left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)$$

En definitiva, estos resultados confirman nuestros estudios computacionales y sugieren que los compuestos derivados del **HC-3** que carezcan de grupos aceptores de enlaces de hidrógeno pueden comportarse como inhibidores frente a estos patógenos y posiblemente, otros. Esto mismo ha sido validado para otros derivados del **HC-3** como el **MN58b** y el **RSM-932A** para el caso de *PfChoK* (**Figura 4.4.5**).¹⁴⁸

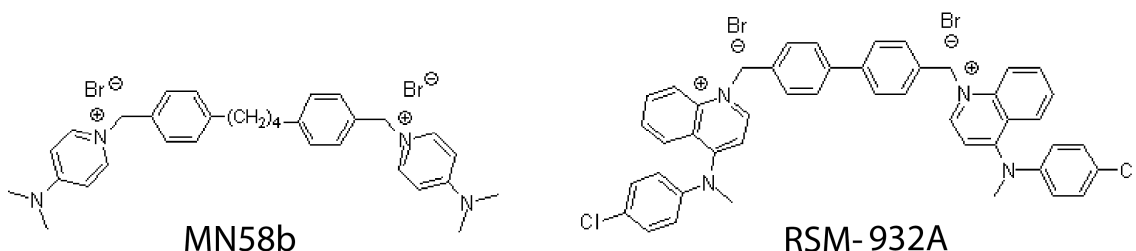


Figura 4.4.5. Estructuras químicas de los compuestos **MN58b** y **RSM-932A**. Como puede observarse, **MN58b** recuerda al compuesto **B.1**, mientras que la mayoría de los grupos funcionales del compuesto **RSM-932A** se incluyen en el compuesto **C.4.4**.

Finalmente, también se evaluó la selectividad de **B.1** y **C.4.4**, y como era de esperar los compuestos mostraron de 9-22 veces más selectividad por *HsChoK α 1*, *PfChoK* y *CpChoK* que por la *HsChoK β* (**Tabla 4.4.3**). Dicha selectividad es una importante característica que deben de mostrar los inhibidores de *ChoK α 1*, puesto que la inhibición simultánea de *HsChoK β* a dosis similares usadas para inhibir a *HsChoK α 1*, *PfChoK* y *CpChoK* puede ser causa de importantes efectos no deseados.^{88,139} En trabajos anteriores se ha sugerido que la selectividad de los compuestos por *HsChoK α 1* frente a *HsChoK β* es debida a una mayor flexibilidad del Trp420 en *HsChoK α 1* en comparación con la reducida flexibilidad de su equivalente (Trp353) en *HsChoK β* .⁸⁸ La flexibilidad del Trp420 en *HsChoK α 1* parece estar debida a un mayor grado de libertad de dicho residuo por tener localizada a su espalda una leucina (Leu419). En contraste, un residuo más voluminoso, la Phe352, está localizada a la espalda del Trp353 en la *HsChoK β* conduciendo a una menor flexibilidad de este triptófano.¹⁴⁷ En el caso de *PfChoK*, *PkChoK* o *CpChoK* la presencia de un residuo similar a la Leu419 (no voluminoso) (ver **Figura 4.4.1a**) sugiere que el correspondiente triptófano también es flexible.

Tabla 4.4.3. Valores de K_d , IC_{50} y K_i de los compuestos **B.1** y **C.4.4** frente a *HsChoK α 1*, *PfChoK* y *CpChoK*.

	K_d <i>HsChoKα1</i>	IC_{50} <i>HsChoKα1</i>	K_i <i>HsChoKα1</i>	K_d <i>PfChoK</i>	IC_{50} <i>PfChoK</i>	K_i <i>PfChoK</i>	K_d <i>CpChoK</i>	IC_{50} <i>CpChoK</i>	K_d <i>HsChoKβ</i>
B.1	1700±45	nd		1960±134	nd		2927±225	nd	18764±321
C.4.4	265±62	1170±10	195±0,001	430 ± 28	18020±80	387±0.001	425±123	19170±1230	4000±124

nd = no determinado.

4.4.4. Efecto antiproliferativo y antimalárico del compuesto C.4.4.

Una vez que se tuvo certeza de que el compuesto **C.4.4** era un inhibidor de las tres proteínas homólogas (*HsChoK α 1*, *PfChoK* y *CpChoK*), se procedió a realizar estudios sobre su capacidad como agente antiproliferativo y antimalárico. Para ello, se usaron los métodos del cristal violeta para la determinación de su efecto antiproliferativo en HepG2, y el del MTT en las líneas celulares A549, HT29, HCT116, MCF7, Mia Paca y Jurkat (**sección 5.6.2**, Parte Experimental). Por otro lado, su actividad antimalárica se midió en eritrocitos infectados por el método de Smilkstein y col. empleando SYBR Green I tal y como se detalla en el **apartado 5.6.3** de la Parte Experimental.¹⁴⁹

Los resultados obtenidos (**Tabla 4.4.4**) indican que el compuesto **C.4.4** muestra un efecto antimalárico más potente que el antiproliferativo en todas las líneas celulares ensayadas, a excepción de las líneas HT29 y Jurkat (ver **apartado 4.5**, “Actividad antimalárica de los compuestos de síntesis” para más detalles). No obstante, en el resto de líneas tumorales también puede considerarse activo debido a que los valores de IC_{50} están en el rango de μM bajo.

Tabla 4.4.4. Valores de EC_{50} e IC_{50} del compuesto **C.4.4** en distintas líneas tumorales y en eritrocitos parasitados por *PfChoK*.

Compuesto C.4.4	Eritrocitos parasitados	HepG2	A549	HT29	HCT116	MCF7	Mia Paca	Jurkat
EC_{50} (μM)	-	14,60 \pm 3,83	6,35 \pm 0,67	1,75 \pm 0,6	12,26 \pm 2,24	8,07 \pm 1,82	7,57 \pm 1,75	3,35 \pm 0,63
IC_{50} (μM)	3,6 \pm 1,1							

En el caso de *C. parvum* hay carencia de información relativa a la efectividad de los derivados de **HC-3** para el tratamiento de la criptosporidiosis porque todavía no se ha realizado ningún estudio al respecto. Por este motivo y también después de los resultados de este trabajo, se plantea ensayar en un futuro los compuestos de la presente Tesis Doctoral en *Cryptosporidium*.

4.4.5. Conclusiones

En esta sección de la Tesis Doctoral se han usado simulaciones de dinámica molecular para investigar las similitudes del proceso de reconocimiento de los ligandos en las ChoKs de *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium knowlesi*, y *Cryptosporidium parvum* en comparación con la ChoK α 1 humana (*HsChoK α 1*). Se ha observado que los sitios de unión del ATP y de la colina en las ChoKs de los patógenos están muy conservados (69-80 %) y que comparten patrones parecidos de reconocimiento mediados por puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas conservadas y no conservadas. Teniendo en cuenta qué aminoácidos del sitio activo y qué grupos funcionales de los ligandos participan en la formación de los enlaces de hidrógeno conservados, se hipotetizó que los inhibidores de la ChoK humana también podrían mostrar efecto inhibitorio en las ChoKs de los patógenos. Tal hipótesis ha sido validada mostrando que dos compuestos (**B.1** y **C.4.4**) se unen a *HsChoK α 1*, *PfChoK* y *CpChoK* con valores de K_d del orden de μM bajo. En concreto, el compuesto **C.4.4** actúa como

inhibidor de las tres enzimas, mostrando un valor de constante de inhibición (K_i) del mismo orden que su constante de disociación (K_d). Los resultados de los ensayos realizados en distintas líneas cancerígenas y sobre eritrocitos infectados por *P.falciparum* han indicado que presenta efectos antiproliferativos y antimaláricos potentes, siendo más destacable el efecto antipalúdico. En conjunto, estos resultados revelan similitudes entre los sitios activos de la colina quinasa de diferentes patógenos y de los humanos, dejando al descubierto la posibilidad de diseñar nuevos inhibidores que actuando a nivel del sitio de unión de la colina puedan usarse como herramientas químicas versátiles para bloquear el funcionamiento de la ChoK en diferentes especies donde es target para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer y la malaria. De igual modo, se revela que el diseño de inhibidores selectivos para cada homóloga es muy difícil debido al elevado porcentaje de identidad existente entre ellas (del 69 al 80 %).

4.5. Parte 5: Actividad antimalárica de los derivados de síntesis

Dada la similitud estructural de *HsChoK α 1* con sus homólogas (*PfChoK* y *CpChoK*) que se puso de manifiesto tras la realización de los estudios computacionales previamente detallados (Sección 4.4), se procedió a la realización de ensayos de fluorescencia de todos los compuestos sintetizados frente a *PfChoK* y de actividad antimalárica en eritrocitos infectados, de únicamente algunos representantes de las tres familias (ver **Tabla 4.5.1**). A la vista de los resultados de los experimentos, se corroboró que todos los compuestos (a excepción de los grupos funcionales sin carga de las cabezas catiónicas) mostraban afinidad por la proteína (como sucedía para *HsChoK α 1*) y también actividad antimalárica. Curiosamente, su potencia como antipalúdicos es superior a la que muestran como agentes antiproliferativos, lo cual pone de manifiesto la posible sinergia que podría existir con otras dianas estructuralmente parecidas a la *ChoK*.

Tabla 4.5.1. Valores de K_d y de CI_{50} frente *PfChoK* y eritrocitos infectados, respectivamente, de los compuestos de las familias **A**, **B** y **C**.

	DMAP	PPIR	QUIN-Phe	QUIN-Az
K_d <i>PfChoK</i> (μ M)	> 50	> 50	> 50	> 50
CI_{50} (μ M) <i>Plasmodium falciparum</i>	nd	nd	nd	nd
Familia A	A.1	A.2	A.3	A.4
K_d <i>PfChoK</i> (μ M)	4,005 \pm 1,805	5,478 \pm 0,144	4,225 \pm 0,275	4,96 \pm 0,035
CI_{50} (μ M) <i>Plasmodium falciparum</i>	nd	5,9 \pm 0,6	nd	0,7 \pm 0,1
Familia B	B.1	B.2	B.3	B.4
K_d <i>PfChoK</i> (μ M)	1,960 \pm 1,820	2,317 \pm 1,343	1,149 \pm 0,513	3,079 \pm 0,070
CI_{50} (μ M) <i>Plasmodium falciparum</i>	nd	1,2 \pm 0,2	nd	1,5 \pm 0,5
Familia C	C.1.1	C.2.1	C.3.1	C.4.4
K_d <i>PfChoK</i> (μ M)	1.106 \pm 0,194	0,341 \pm 0,049	0,358 \pm 0,049	0,430 \pm 0,028
CI_{50} (μ M) <i>Plasmodium falciparum</i>	1,173 \pm 0,03	1,875 \pm 0,02	0,049 \pm 0,001	3,6 \pm 0,1
Familia C	C.1.7	C.2.5	C.3.9	C.4.3
K_d <i>PfChoK</i> (μ M)	1,826 \pm 0,049	1,227 \pm 0,132	0,496 \pm 0,038	0,638 \pm 0,128
CI_{50} (μ M) <i>Plasmodium falciparum</i>	0,312 \pm 0,004	0,494 \pm 0,011	0,383 \pm 0,07	3 \pm 0,1
Cloroquina; CI_{50} (μ M) <i>Plasmodium falciparum</i>	0,023			

- *Familia A*

De acuerdo a los estudios de fluorescencia de triptófanos y a los valores de K_d obtenidos, los compuestos de la familia **A** presentan unión a *Pf*ChoK (K_d : 4,0 -5,5 μ M), a diferencia de sus equivalentes no protonados ($K_d > 50 \mu$ M). Esto nuevamente manifiesta que para conseguir una unión de buena afinidad a la proteína, es necesaria la presencia de una carga positiva en la molécula, al igual que en el caso de la *Hs*ChoK α 1.

Los estudios de actividad antimalárica llevados a cabo con **A.2** y con **A.4** sobre la forma intraeritrocítica de *P.falciparum*, indican que ambos compuestos son potentes como agentes antimaláricos, puesto que los valores de CI_{50} obtenidos son 5,9 μ M para **A.2** y 0,7 μ M para **A.4** (**Tabla 4.5.1**). Tal y como puede apreciarse, el benceno adicional del grupo quinolínico y los tres carbonos más del anillo de perhidroazepina del compuesto **A.4**, proporcionan un extra de lipofilia (**Tabla 4.3.24**) que conduce a una mayor inhibición del crecimiento parasitario. Esta observación es concordante con estudios previos en agentes antimaláricos con estructura de sales de amonio cuaternarias para las que se demostró que el incremento de lipofilia alrededor del N^+ provoca un descenso acusado del valor de la CI_{50} .¹⁵⁰

La comparación de la actividad antimalárica de los compuestos de la familia **A** con la antiproliferativa frente a las líneas celulares HepG2, A549, HT29, HCT116, MCF7, Mia Paca y Jurkat (**Tablas 4.3.19- 4.3.22 y 4.3.24**) pone de manifiesto que la potencia como agentes antimaláricos es superior a su potencia como agentes antiproliferativos. Concretamente, para el compuesto **A.4**, que es uno de los antimaláricos más potentes de todos los compuestos sintetizados, se observa una CI_{50} frente al eritrocito infectado que es de 8 a 33 veces inferior a la mostrada frente a las líneas celulares previamente mencionadas.

- *Familia B*

Los datos de fluorescencia evidencian que los compuestos de la familia **B** también se unen a *Pf*ChoK y además, con una afinidad muy parecida entre ellos y mayor que la de los compuestos de la familia **A**. Los compuestos más afines son **B.1** y **B.3**, al igual que sus equivalentes de la familia **A**. En el caso de *Pf*ChoK, la introducción de un fenilo adicional en el espaciador no supone una mejora tan notable de la afinidad como para el caso de *Hs*ChoK α 1.

Se han ensayado como antimaláricos los compuestos **B.2** y **B.4**, observándose que su potencia es muy similar entre ellos (CI_{50} : 1,2 y 1,5 μ M, respectivamente), por lo que

en este caso, la mayor lipofilia del compuesto **B.4** en relación al **B.2** (**Tabla 4.3.24**) no mejora significativamente su efecto inhibitorio frente al parásito. Si se comparan con los compuestos de la familia **A**, el fenilo adicional mejora 5 veces la potencia como antimalárico del derivado de pirrolidinopiridina, mientras que la empeora 2 veces en el caso del derivado quinolínico con perhidroazepino.

- **Familia C**

Los valores de K_d mostrados en la **Tabla 4.5.1** indican al igual que para el caso de *HsChoK α 1*, que los derivados de la familia **C** son los más afines frente a *PfChoK* de todos los compuestos sintetizados. Como ya se puntualizó en el **apartado 4.3.1** (**Figura 4.3.2**) la causa de esta mayor afinidad podría ser la mayor estabilidad del complejo ligando-proteína al formarse puentes de hidrógeno entre las aminas de los compuestos y el agua del medio donde está presente la proteína. Aunque la diferencia de K_d entre los derivados piridínicos y quinolínicos no es demasiado acusada, son los derivados quinolínicos los que en general, se unen mejor a la proteína, por lo que el anillo de benceno condensado del grupo quinolínico debe de aportar un punto adicional de interacción con *ChoK*. Por otro lado, al igual que en el caso de *HsChoK α 1*, las mejores K_d se consiguen para los derivados con amina terciaria de menor tamaño (esté o no protonada), de este modo, los compuestos más afines frente a *PfChoK* son **C.2.1** y **C.3.1**. Esto sugiere que la pose que adoptan los compuestos con amina terciaria más voluminosa en el sitio activo de la enzima, podría ser ligeramente distinta a la de los derivados de dimetilamina, por lo que tal vez se interrumpen algunas interacciones que pudieran ser importantes en el reconocimiento enzima-ligando.

En el caso de la actividad antimalárica, se observa que los compuestos de la familia **C** son más potentes que los del resto de familias y en general, su potencia aumenta para los derivados de aminas voluminosas por el incremento de lipofilia (**Tabla 4.3.24**), a pesar de que su afinidad por *PfChoK* disminuya levemente con respecto a los derivados de dimetilamina. Por otro lado, la potencia como antimaláricos sólo mejora con respecto a la familia **B** en el caso de los derivados de pirrolidinopiridinio (no hay datos para las subfamilias **C.1** y **C.3**), siendo atribuible una vez más a la lipofilia extra que le aportan tanto el fenilo adicional del espaciador como la amina. De hecho, la presencia de una segunda carga en la molécula, como en el caso del compuesto **C.2.1** resulta en un aumento del valor de CI_{50} . Sin embargo, nuevamente se observa que un aumento de la complejidad de la estructura química de los derivados de 7-cloro-4-(perhidroazepin-1-

il)quinolinio se traduce en una disminución de su efecto inhibitorio frente al parásito. Los compuestos más potentes como agentes antimaláricos son **C.3.1** (CI₅₀: 0,049 μM), **C.1.7** (CI₅₀: 0,312 μM) y **C.3.9** (CI₅₀: 0,383 μM), que coinciden con un derivado quinolínico con dimetilamina y con dos compuestos con perhidroazepina derivados de dimetilaminopiridina y de 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina, respectivamente. En concreto, el compuesto **C.3.1** es el segundo más afín por la proteína y también, el segundo más lipófilo, de ahí que sea el compuesto con más potencia como antimalárico.

Como en el caso de los compuestos finales de la familia **A**, cuando se compara la actividad antimalárica con la antiproliferativa de los compuestos de la familia **C**, en general se observa que son mejores como agentes antipalúdicos. En concreto, el compuesto **C.3.1**, que es el segundo más afín por *Pf*ChoK y uno de los más potentes como agente antiproliferativo (CI₅₀ de entre 1,63 (Jurkat)- 14,65 (MCF7) μM), es de 33 a 312 veces más potente como antimalárico (CI₅₀: 0,049 μM).

Esta última observación, sugiere que los compuestos podrían penetrar mejor en *P. falciparum* que en células humanas o bien que podrían ejercer un efecto sinérgico sobre otras dianas del parásito involucradas en la muerte celular, tal y como señalaban Lacal y col. en una reciente publicación¹³⁴.

De hecho, se ha demostrado que el merozoíto produce una excisión de proteínas en la membrana del eritrocito durante su proceso de penetración¹⁵¹, lo cual se traduce en la formación de poros. Por otra parte, en la membrana del eritrocito también existen transportadores de tipo NPP (*New Permeation Pathway*; nuevas vías de permeabilidad) que facilitan la penetración de sustancias cargadas, como la colina, hacia su interior. Por todo lo anterior tanto los poros como los transportadores de tipo NPP podrían ser aprovechados por los compuestos para penetrar en el citoplasma del eritrocito. Por otra parte, la acumulación del compuesto en el citoplasma de *P.falciparum* podría estar mediada por transportadores localizados en la membrana del parásito por los que los compuestos pudieran tener afinidad¹⁵². Por último, no puede descartarse la posibilidad de que la actividad antimalárica de los compuestos de la presente Tesis Doctoral pudiera estar debida en parte a un bloqueo de los transportadores denominados PPM (*Parasite Plasma Membrane Carrier*; transportadores de membrana plasmática del parásito). Éstos, se localizan en la membrana de *P.falciparum* y participan en el aporte de colina al parásito, de modo que si el compuesto los inhibe, el parásito no contaría con uno de los metabolitos esenciales para la biosíntesis de fosfolípidos. En concreto, éste es uno de

los mecanismos por los que compuestos como el **T16**¹⁰⁸ (**Figura 4.5.1**) y el **HC-3** muestran su efecto como agentes antimaláricos.¹⁰⁵

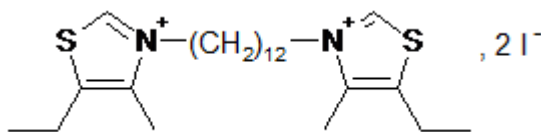


Figura 4.5.1. Estructura química del compuesto **T16**.

Como previamente ha sido demostrado, los derivados del **HC-3** tales como **MN58b** y **RSM-932A**, pueden ser usados para el tratamiento de la malaria, a pesar de haber sido previamente diseñados para inducir apoptosis en células cancerígenas^{134, 153} por varios motivos. En primer lugar, se ha demostrado que los derivados de **HC-3** en células humanas sanas (como NIH3T3) inducen una parada reversible del ciclo celular que desaparece cuando el inhibidor es eliminado,¹⁵⁴ así que no se encontraron efectos adversos por inhibición de *HsChoKα1*. Además, recientemente se ha demostrado que cuando se bloquea la traducción del RNAm de *HsChoKα1* se induce apoptosis en varias líneas tumorales de vejiga, mama, pulmón y cervix, mientras que la viabilidad de las células primarias no se ve afectada.⁶⁴

Estas evidencias junto con el hecho de que la dosis para conseguir un efecto potente como antimalárico sea de nanomolar bajo, y no micromolar, como en el caso del efecto antiproliferativo, nos permite concluir que los derivados de **HC-3** pueden considerarse excelentes antimaláricos ya que aunque se inhiba la *ChoKα1* humana en células sanas, únicamente ocurre un bloqueo reversible del ciclo celular. Un ejemplo lo constituye el compuesto **C.3.1**, que no sólo es el mejor agente antipalúdico de todos los sintetizados en la presente Tesis Doctoral con una actividad parecida a la de la cloroquina (CI₅₀: 23,11 nM), sino que además, según estudios de toxicidad realizados en la línea celular L6 (mioblasto de ratón) se ha evidenciado que es 218 veces más selectivo de eritrocitos infectados que de células sanas (**Tabla 4.5.2**). Según lo anterior, **C.3.1** puede considerarse un prototipo potente y seguro en el tratamiento de la malaria.

Tabla 4.5.2. Valores de CT_{50} (concentración tóxica para el 50% de la población estudiada) y CI_{50} del compuesto **C.3.1** frente a la línea celular L6 y eritrocitos infectados con *P.falciparum*, respectivamente.

Compuesto	CT_{50} L6 ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} <i>P.f</i> ($\mu\text{g/mL}$)	SI
C.3.1	6,1	0,028	217,9
$SI = CT_{50} \text{ L6} / CI_{50} \text{ P.falciparum}$			

En definitiva, puede afirmarse que en general, el aumento de actividad antimalárica de las familias **A**, **B** y **C** se produce a la par que el aumento de lipofilia y el de afinidad por *PfChoK*, siendo los compuestos de la familia **C** los que más inhiben la proliferación del parásito. Sin embargo, los derivados de 7-cloro-4-(perhidroazepin-1-il)quinolinio, presentan un empeoramiento gradual de la actividad antipalúdica a medida que se aumenta la complejidad de su estructura química a pesar de que se aumenta la afinidad por la proteína.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5. Parte Experimental

5.1. Química Computacional

Los estudios de química computacional que a continuación se presentan fueron llevados a cabo durante una estancia predoctoral en el “Dipartimento di Scienze Farmaceutiche” en la “Università degli Studi di Perugia” bajo la dirección del profesor D. Antonio Macchiarulo.¹⁵⁵

5.1.1. Diseño del farmacóforo

5.1.1.1. Primera aproximación: Estudio de docking inicial.

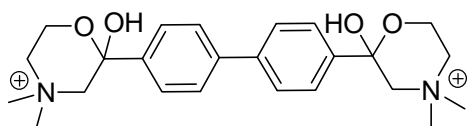
En una primera fase, se llevó a cabo un estudio de docking de 83 inhibidores derivados del **HC-3** en la estructura cristalina de la *HsChoK α 1* (**Figura 5.1**). Dicho estudio fue realizado tras la preparación de la proteína y de los ligandos con Maestro 9.3.¹⁵⁶ La estructura cristalina de la *HsChoK α 1* en complejo con el **HC-3** se descargó del Protein Data Bank (PDB ID: **3G15**). Tras eliminación de las aguas y los iones metálicos, la cadena monomérica A fue procesada con Protein Preparation Wizard^{27, 157} para añadirle hidrógenos, asignarle órdenes de enlace correctos, convertir las selenometioninas en metioninas y resolver conflictos estéricos. Los hidrógenos se minimizaron a pH fisiológico, mientras que los átomos pesados se minimizaron con Impact Refinement usando el campo de fuerzas OPLS-2005 hasta que las desviaciones de root-mean-square (RMSD) alcanzaron como máximo los 0.30 Å. Los estados de protonación del ADP y del **HC-3** a pH fisiológico también fueron generados con

Protein Preparation Wizard, seleccionándose una carga formal de -2 para el ADP y de +2 para el **HC-3**.

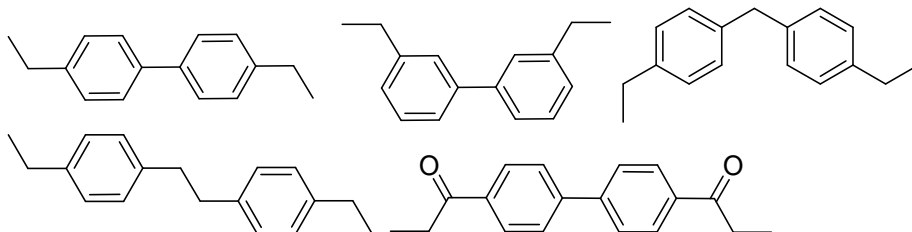
La librería de 83 derivados del **HC-3** se descargó del Binding Database⁶⁸ en formato SD y se pre-procesaron con LigPrep 2.5 para añadirles los hidrógenos, eliminar los contraiones, generar los estados de ionización correspondientes a pH fisiológico con Epik, generar las conformaciones de los anillos de menor energía y optimizar sus geometrías usando OPLS-2005. En este conjunto de compuestos había tanto moléculas activas como inactivas en términos de actividad inhibitoria de *HsChoK α 1*, ya que su valor de CI_{50} estaba comprendido entre 0.4 μ M y más de 100 μ M.

A continuación, se realizó con Glide 5.8¹⁵⁸ un docking flexible de calidad estándar (SP) usando un grid de 10 Å centrado en el **HC-3**.

Hemicolinio-3



Espaciadores



Cabezas catiónicas

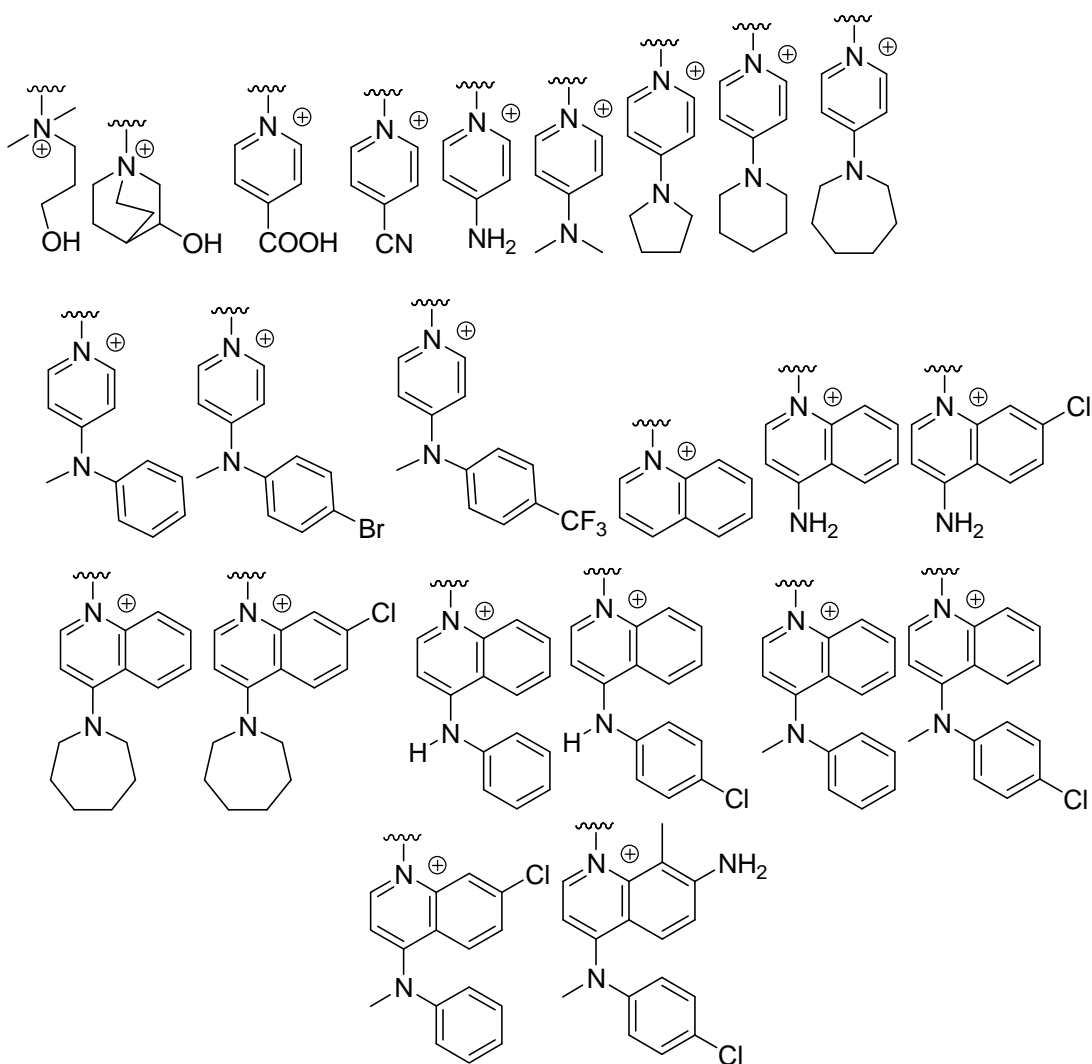


Figura 5.1. Espaciadores y cabezas catiónicas de los 83 derivados del **HC-3** recogidos en el *Binding Database*.⁶⁸

5.1.1.2. Segunda aproximación: Hipótesis farmacofórica basada en el HC-3.

Después de este primer estudio, se llevó a cabo con Glide 5.8 un refinamiento de calidad extra (XP) de la pose del **HC-3** en 3G15 para generar con E-pharmacophore¹⁵⁹ una primera hipótesis farmacofórica basada en el **HC-3** (hipótesis-1). Esta hipótesis incluía 6 grupos funcionales que se usaron por Phase 3.4¹⁶⁰ junto a volúmenes de exclusión (zona del sitio activo que no puede ser ocupada por los grupos funcionales de un compuesto para evitar conflictos estéricos) definidos a partir de una esfera de radio 5 Å con centro en el **HC-3** (**Figura 5.2**) para encontrar en la librería de los 83 compuestos previamente pre-procesados, moléculas que presentaran similitudes estructurales con la hipótesis. Tales moléculas debían de presentar al menos 3 de los 6 grupos funcionales constituyentes de la hipótesis farmacofórica y éstos debían de localizarse a una distancia máxima de 2.00 Å a partir de dicha hipótesis. Tanto el mínimo número de grupos funcionales que deben de tener como mínimo las moléculas seleccionadas como las distancias máximas a las que éstas pueden localizarse, constituyen la tolerancia (*Feature-matching tolerance*, en inglés). Cuanto más grupos funcionales se compartan entre el farmacóforo y el compuesto seleccionado y mayor sea la superposición entre ellos (menor la distancia), más parecidos serán estructuralmente.

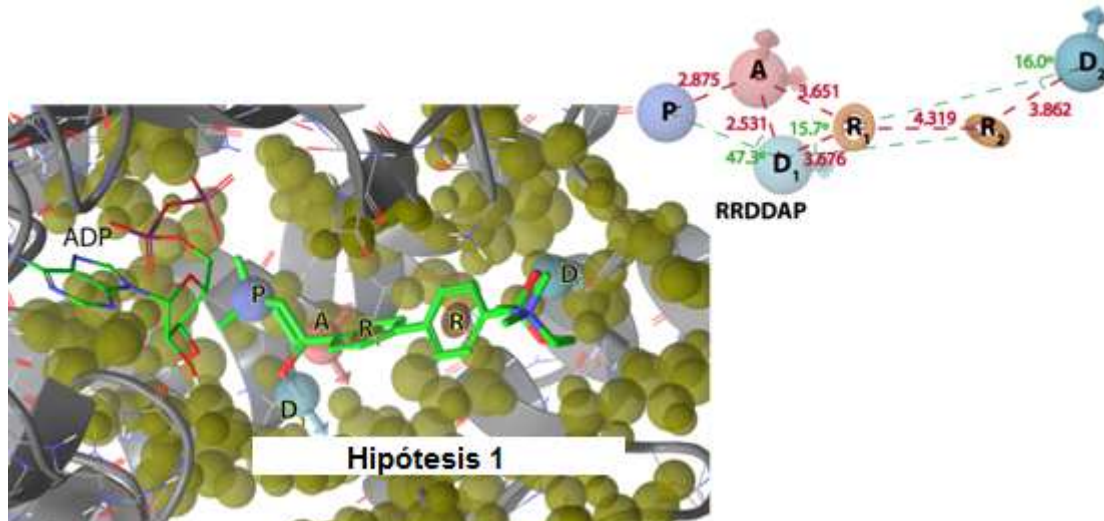


Figura 5.2. Hipótesis farmacofórica basada en el HC-3 (hipótesis1), constituida por seis features o partes (RRDDAP). R, significa ring; D, donador de enlaces de hidrógeno; A, aceptor de enlaces de hidrógeno y P, carga positiva. Los volúmenes de exclusión se representan con esferas verdes y representa el espacio dentro del sitio activo de la colina que no puede ser ocupado por ningún grupo funcional de los ligandos de la librería que sean seleccionados.

Además de los 6 grupos funcionales y los volúmenes de exclusión, en esta etapa también se generaron con ConfGen¹⁶¹ 100 conformeros por cada enlace con capacidad de rotación hasta un máximo 1000 conformeros por estructura para incluir la mayor diversidad química posible entre los compuestos de la librería.

Como resultado, 14 compuestos del total de 83 fueron seleccionados por la hipótesis y se clasificaron de acuerdo a su valor de Fitness score.¹⁶⁰ Concretamente, el Fitness score es un parámetro que mide el grado de concordancia entre la molécula seleccionada y el farmacóforo, de modo que cuanto más positivo sea su valor, más parecidos serán ambos.

5.1.1.3. Tercera aproximación: Búsqueda del farmacóforo en el fragmento de 1-bencil-4-(*N*-metilanilino)piridinio.

La nueva búsqueda del farmacóforo se focalizó en el fragmento de 1-bencil-4-(*N*-metilanilino)piridinio. Éste se minimizó energéticamente con LigPrep 2.5¹⁵⁷ antes de hacer un docking rígido SP en 3G15 usando un grid de 10 Å centrado en el **HC-3**. La pose en la que uno de sus anillos bencílicos estaba superpuesta con uno de los fenilos del **HC-3** (**Figura 5.3**), fue sometida a un refinamiento XP antes de la búsqueda con E-pharmacophore de los grupos funcionales que definirían la siguiente hipótesis farmacofórica.

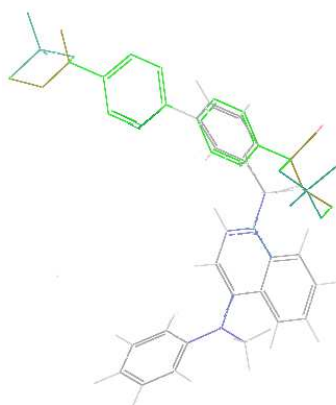


Figura 5.3. Superposición de uno de los anillos de la mitad de la molécula de mejor Fitness Score de la hipótesis 1 (**CHEMBL-364022**) con otro anillo del **HC-3**.

Los grupos funcionales aromáticos definidos por E-pharmacophore (dos anillos de benceno), junto con la carga positiva, el nitrógeno de la amina terciaria y el resto hidrofóbico unido a este nitrógeno que se definieron manualmente, permitieron generar

nuevas hipótesis que se usaron como entrada del siguiente cálculo con Phase 3.4 junto con volúmenes de exclusión que se extendían 5 Å más allá del fragmento de 1-bencil-4-(*N*-metilanilino)piridinio. En total, se definieron un total de doce hipótesis farmacofóricas cuya tolerancia era de 3 grupos funcionales como mínimo sobre 5 y la distancia entre ellos en la selección y en el farmacóforo, de 2.0 Å.

En esta nueva aproximación, la validez de la hipótesis se testó frente a una nueva librería que incluía 11 compuestos activos ($CI_{50} < 1.5 \mu\text{M}$) y 11 compuestos inactivos ($CI_{50} > 100 \mu\text{M}$) de los 83 iniciales (**Tabla 5.1**). La generación de los conformeros de cada uno de estos compuestos fue realizada como se describirá posteriormente en la **sección 5.1.2**. El tamaño de la librería se redujo para ahorrar tiempo de cálculo y para conseguir una clara y equilibrada diferenciación entre los compuestos activos e inactivos de acuerdo a su actividad biológica y a la igualdad del número de ligandos en cada grupo.

Nuevamente, el mínimo número de grupos funcionales que debía de tener en común cualquier molécula de la nueva librería con la hipótesis farmacofórica para ser elegida como activa, era 3 de 5.

Tabla 5.1. Librería de los 22 compuestos usados para comprobar la validez de las doce hipótesis. El ChEMBL-BDB es el código con el que se identifica cada compuesto en el Binding Database (BDB).

ChEMBL-BDB	CI_{50} (μM)		ChEMBL-BDB	CI_{50} (μM)	
125148	0.300	ACTIVOS ($\leq 1.5 \mu\text{M}$)	349401	>1000.000	INACTIVOS ($\geq 100 \mu\text{M}$)
364145	0.400		364174	>1000.000	
191595	0.400		349948	1000.000	
372667	0.500		165437	1000.000	
363853	0.600		364075	>200.000	
370289	1.000		371151	>200.000	
189324	1.200		184576	>100.000	
370057	1.200		189334	>100.000	
191873	1.300		165570	136.700	
332621	1.400		426637	147.000	
364361	1.500		193262	133.000	

5.1.2. Cribado virtual (Virtual screening, VS)

El farmacóforo definido en la etapa previa del presente estudio, sirvió como criterio de selección de nuevos prototipos en una fase de cribado virtual donde una vez más se definieron volúmenes de exclusión (esfera de 5 Å con centro en el **HC-3** co-cristalizado con *HsChoK α 1* (PDB ID: **3G15**)).

En este caso, la búsqueda de nuevas cabezas de serie de estructura química diversa a las moléculas que hasta ahora habían sido diseñadas como inhibidoras de *HsChoK α 1*, se realizó en las librerías comerciales Enamine,¹⁶² Chembridge¹⁰⁴ y Life Chemicals.⁹⁴

Los compuestos incluidos en estas librerías fueron pre-procesados con LigPrep 2.5 y ConfGen con el objetivo de añadirles hidrógenos, eliminar contraiones, generar configuraciones de mínima energía de los anillos, optimizar sus geometrías y generar conformeros (100 como máximo). Phase 3.4 fue nuevamente usado como plataforma de búsqueda y el número mínimo de grupos funcionales comunes entre el farmacóforo y cualquier molécula para que ésta fuera seleccionada como posible prototipo, fue fijado en 3 de 5. Los cálculos del cribado se llevaron a cabo en cada librería por separado y en cada uno de ellos se limitó a 5000 el número máximo de prototipos que podían seleccionarse.

Como resultado del cribado en las tres librerías, fueron seleccionadas un total de 8621 moléculas. El criterio que se utilizó para seleccionar los compuestos que pudieran presentar una mejor afinidad por la *HsChoK α 1* y en consecuencia, para eliminar falsos positivos, fue un valor de Fitness score superior al asignado por la hipótesis-2 al compuesto más activo de los seleccionados (Fitness score > 0.366) (**Tabla 4.1.1**).

Después de este primer cribado, resultaron 72 compuestos con los que se hizo docking con Glide SP en el sitio de la colina de *HsChoK α 1* usando un grid de 10 Å centrado en el **HC-3**. A continuación, se realizaron cálculos de Prime MM_GBSA⁹³ (con los parámetros establecidos por defecto) para estimar las energías de unión de los 72 potenciales cabezas de serie.

Finalmente, de los 20 compuestos con mejor valor de Prime MM-GBSA (inferior a -36.790 Kcal/mol), únicamente 11 fueron seleccionados de acuerdo con su disponibilidad comercial y su precio.

5.1.3. Estudio comparativo de los sitios activos de *HsChoK α 1*, *PfChoK*, *PkChoK* y *CpChoK*.

5.1.3.1. Preparación de las estructuras

Las estructuras cristalinas en complejo con sus sustratos, productos de reacción o inhibidores fueron descargadas del Protein Data Bank atendiendo a los PDB IDs: **3G15**, **3FI8**, **3C5I** y **3MES**, correspondientes a *HsChoK α 1*, *PfChoK*, *PkChoK* y *CpChoK*, respectivamente (**Tabla 5.2**).

Tabla 5.2. PDB IDs de las estructuras cristalinas en complejo con diferentes ligandos.

Proteína	PDB ID	Ligando
<i>HsChoKα1</i>	3G15	ADP, HC-3
<i>PfChoK</i>	3FI8	ADP, P-Cho
<i>PkChoK</i>	3C5I	colina
<i>CpChoK</i>	3MES	ADP, ácido tartámico

Después de llevar a cabo un alineamiento por pares de sus secuencias cristalinas con aquellas obtenidas de la base de datos Uniprot (códigos P35790, Q5CUP2, Q8IM71 y D0VWT1, que corresponden a *HsChoK α 1*, *CpChoK*, *PfChoK* y *PkChoK*, respectivamente)¹⁶³ usando el software ALINE¹⁶⁴, se comprobó que algunos residuos no aparecían en los ficheros PDB (**Figura 5.4**) y que por lo tanto, no se habían resuelto en las estructuras cristalinas. Algunos de dichos residuos formaban parte del sitio activo o se encontraban en zonas adyacentes a él, por lo que la siguiente fase del estudio fue completar las secuencias cristalinas con los aminoácidos ausentes.

```

      81      90      100      110      120      130      140
3G15|A EQPEPRTRPRRAYLWCKEFLPGAWRGLREDEFHISVIRGGLSNMLFQCSPDATTATLGDPEPRKVL
      |
      |
      |
P35790 EQPEPRTRPRRAYLWCKEFLPGAWRGLREDEFHISVIRGGLSNMLFQCSPDATTATLGDPEPRKVL
      |
      |
      |
      150      160      170      180      190      200      210
3G15|A RLYGA-----AEAMVLESVMFAILAERSLGPPLYGIFPQGRLEQFIP
      |
      |
      |
P35790 RLYGAILQMRSCNKEGSEQAQKENEFGGAEAMVLESVMFAILAERSLGPPLYGIFPQGRLEQFIP
      |
      |
      |
      220      230      240      250      260      270
3G15|A SPRLDTEELSLPDISAEIAEKMATFHGMKMPFNKEPKWLFGTMEKYLKEVLRIFKFTESRIKKLH
      |
      |
      |
P35790 SPRLDTEELSLPDISAEIAEKMATFHGMKMPFNKEPKWLFGTMEKYLKEVLRIFKFTESRIKKLH
      |
      |
      |
      280      290      300      310      320      330      340
3G15|A KLLSYNLPLELENLRSLLSTPSPVVFCHNDCQEGNILLLEGRENSEKQKMLLIDFEYSSYNYRG
      |
      |
      |
P35790 KLLSYNLPLELENLRSLLSTPSPVVFCHNDCQEGNILLLEGRENSEKQKMLLIDFEYSSYNYRG
      |
      |
      |
      350      360      370      380      390      400
3G15|A FDIGNHFCEWMYDYSYEKYPFFRANIRKYPTKKQQLHFISYLPAFQNDFENLSTEEKSIKEEM
      |
      |
      |
P35790 FDIGNHFCEWMYDYSYEKYPFFRANIRKYPTKKQQLHFISYLPAFQNDFENLSTEEKSIKEEM
      |
      |
      |
      410      420      430      440      450
3G15|A LLEVNRFALASHFLWGLWSIVQAKISSIEFGYMDYAQARFDAYFHQKRKLG
      |
      |
      |
P35790 LLEVNRFALASHFLWGLWSIVQAKISSIEFGYMDYAQARFDAYFHQKRKLG

```

```

      31      40      50      60      70      80      90
3MES|B DTEIIIGICRKNIPGWKEINESYIEVKQIFSGLTNQLFVVSIVNE-----LKHPRILFRIYGK
      |
      |
      |
Q5CUP2 DTEIIIGICRKNIPGWKEINESYIEVKQIFSGLTNQLFVVSIVNESMSLSLKHPRILFRIYGK
      |
      |
      |
      100      110      120      130      140      150      160
3MES|B --FYDSKVELDVFRYLSNINIAPNIIADFPEGRIEEFIDGELPTTKQLQLTHICVEVAKNMGSLH
      |
      |
      |
Q5CUP2 GKFFYDSKVELDVFRYLSNINIAPNIIADFPEGRIEEFIDGELPTTKQLQLTHICVEVAKNMGSLH
      |
      |
      |
      170      180      190      200      210      220
3MES|B IINSKRADFPSRFDKEPILFKRIYLVWREEAKIQVSKNNFQIDKELYSKILEEIDQLEELIMGGEK
      |
      |
      |
Q5CUP2 IINSKRADFPSRFDKEPILFKRIYLVWREEAKIQVSKNNFQIDKELYSKILEEIDQLEELIMGGEK
      |
      |
      |
      230      240      250      260      270      280      290
3MES|B FSMERALELKLSPAFSLVFAHNDLQENLLQTQNNIRMIDYEYSAINFAGADIANYFCEYIYDY
      |
      |
      |
Q5CUP2 FSMERALELKLSPAFSLVFAHNDLQENLLQTQNNIRMIDYEYSAINFAGADIANYFCEYIYDY
      |
      |
      |
      300      310      320      330      340      350
3MES|B CSEKQPYFKFYEDYPCEELRKLFI SVYLSQTLQEQVMPSSQIVHIMTKAVEVFTLISHITWGLW
      |
      |
      |
Q5CUP2 CSEKQPYFKFYEDYPCEELRKLFI SVYLSQTLQEQVMPSSQIVHIMTKAVEVFTLISHITWGLW
      |
      |
      |
      360      370      380      390      400
3MES|B SIA-----SVEFDFTYANTRFTHYLQKKKELIDQGILPLNSWLFN
      |
      |
      |
Q5CUP2 SIARTPGYQPNVSVEFDFTYANTRFTHYLQKKKELIDQGILPLNSWLFN

```

```

      80      90      100      110      120      130      140
3FI8|A SKLTDPLYIKKICLEKVHDSRCNEDDVCVNQILSGLTNQLFEVSIKEDTAIEYRITRRHVLFR
      |
      |
Q8IM71 SKLTDPLYIKKICLEKVHDSRCNEDDVCVNQILSGLTNQLFEVSIKEDTAIEYRITRRHVLFR
      |
      |
      150      160      170      180      190      200
3FI8|A Y-----PLSEFEVYKTMISKYRIAPLLLNTFDGGRIEEWLYGDPLSIDDLNKNSILVGIANV
      |
      |
Q8IM71 YGKDVDALYNPLSEFEVYKTMISKYRIAPLLLNTFDGGRIEEWLYGDPLSIDDLNKNSILVGIANV
      |
      |
      210      220      230      240      250      260      270
3FI8|A LGKFHTLSRKRPHLPEHWDKTPCVFKMMDRWRRLAVSNYKNLDKVTLDINKYIQESHKFLKFIKIYT
      |
      |
Q8IM71 LGKFHTLSRKRPHLPEHWDKTPCVFKMMDRWRRLAVSNYKNLDKVTLDINKYIQESHKFLKFIKIYT
      |
      |
      280      290      300      310      320      330
3FI8|A QIENIANDIVFCHNDLQENNIMNTNKCLRLIDFEYSGYNFLSADIANFFIETTIDYSYNAYPFFI
      |
      |
Q8IM71 QIENIANDIVFCHNDLQENNIMNTNKCLRLIDFEYSGYNFLSADIANFFIETTIDYSYNAYPFFI
      |
      |
      340      350      360      370      380      390      400
3FI8|A INKKNYISYESRILFVTTYLSKYLDDSTAA--DQDIIDQFLEAIEVQALGLHLIWAFFWSIIRGYQT
      |
      |
Q8IM71 INKKNYISYESRILFVTTYLSKYLDDSTAA--DQDIIDQFLEAIEVQALGLHLIWAFFWSIIRGYQT
      |
      |
      410      420      430      440
3FI8|A -----FDFFLYAKERLKMYYDEQKQYLSK-----
      |
      |
Q8IM71 KSYNEFDFFLYAKERLKMYYDEQKQYLSKNIIDYDD

```

```

      90      100      110      120      130      140
3C5I|D LTDPLYIKKICLEKVPEWVNHFTEDNLRVKQII--LTNQLFEVGLKEETANNYNSIRTRVLFR
      |
      |
DOVWT1 LTDPLYIKKICLEKVPEWVNHFTEDNLRVKQII--SGLTNQLFEVGLKEETANNYNSIRTRVLFR
      |
      |
      150      160      170      180      190      200      210
3C5I|D KHVDELYNTISEFEVYKTMISKYKIAPQLLNTFNGGRIEEWLYGDPLRIDDLKNPTILIGIANVLG
      |
      |
DOVWT1 KHVDELYNTISEFEVYKTMISKYKIAPQLLNTFNGGRIEEWLYGDPLRIDDLKNPTILIGIANVLG
      |
      |
      220      230      240      250      260      270
3C5I|D KFHTLSRKRPHLPEHWDRTPCIFKMMKWKQNLFKYKNIEKYNCDIHKYIKESDKFIKFMKVYSKS
      |
      |
DOVWT1 KFHTLSRKRPHLPEHWDRTPCIFKMMKWKQNLFKYKNIEKYNCDIHKYIKESDKFIKFMKVYSKS
      |
      |
      280      290      300      310      320      330      340
3C5I|D DNLANTIVFCHNDLQENNIINTNKCLRLIDFEYSGFNFLATDIANFFIETSIDYSVSSYPFFEID
      |
      |
DOVWT1 DNLANTIVFCHNDLQENNIINTNKCLRLIDFEYSGFNFLATDIANFFIETSIDYSVSSYPFFEID
      |
      |
      350      360      370      380      390      400
3C5I|D KKKYISYENRKLFITAYLSNYLDF--VVPVTPKLIDEILEAVEVQALGAHLLWGFWSIIRGYQTKS
      |
      |
DOVWT1 KKKYISYENRKLFITAYLSNYLDF--SLVVPVTPKLIDEILEAVEVQALGAHLLWGFWSIIRGYQTKS
      |
      |
      410      420      430      440
3C5I|D YNEFDFFLYAEQRLKMYDDQKEYLISNNIIKGYD
      |
      |
DOVWT1 YNEFDFFLYAEQRLKMYDDQKEYLISNNIIKGYD

```

Figura 5.4. Alineamiento por pares de las secuencias de **ChoK**. La secuencia de cada estructura cristalina (PDB ID 3G15, 3MES, 3FI8 y 3C5I) se alineó con la correspondiente secuencia de UniprotKB

(códigos P35790, Q5CUP2, Q8IM71 y D0VWT1, que corresponden a *HsChoK α 1*, *CpChoK*, *PfChoK* y *PkChoK* respectivamente). Los huecos en el alineamiento son los aminoácidos que no se resolvieron en los PDBs y se señalan en rojo.

En los casos de 3G15, 3C5I y 3MES, en una primera etapa se eliminaron de la estructura cristalina los detergentes procedentes de la cristalización y las cadenas monoméricas con un menor número de residuos. A continuación, las coordenadas de los residuos que faltaban se completaron con el método de predicción de extrema precisión de Prime 3.0 (método “ultra extended”), el cual también se usó para minimizar los lóbulos añadidos.

Una vez que se completaron las secuencias de todas las proteínas, la siguiente fase consistió en la inserción de los productos de catálisis (ADP, PCho y Mg^{2+}) en sus sitios activos, puesto que se pretendía hacer un estudio comparativo de las interacciones mediante las que dichas moléculas, que son los productos comunes del mecanismo catalítico, son estabilizados en cada proteína. Para ello, primero se introdujo la PCho y a continuación, el ADP y el Mg^{2+} .

Para insertar la PCho, se usó como soporte Maestro 9.2 donde cada homóloga se superpuso con la proteína de PDB ID: **2CKQ**, la cual corresponde a la *HsChoK α 2* co-cristalizada con PCho. Inicialmente, se eliminaron todos los ligandos con los que cada ChoK estaba co-cristalizada (**Tabla 5.2**). Los átomos de Mg^{2+} se mantuvieron en su localización inicial en cada estructura, al igual que el ADP. No obstante, en el caso de 3C5I, el ADP está ausente y por tanto, se importó desde 3FI8. Para ello fue necesaria una superposición previa de ambas estructuras cristalinas.

Finalmente, todas las estructuras cristalinas con su secuencia completa y con la PCho, el ADP y el Mg^{2+} en el sitio activo se sometieron a un proceso de refinamiento siguiendo protocolo establecido por el módulo de preparación de proteínas con el que cuenta Maestro 9.2 (Protein Preparation Wizard).¹⁵⁷ El objetivo es añadir hidrógenos, asignar órdenes de enlace correctos, convertir las posibles selenometioninas en metioninas y resolver los conflictos estéricos. Los hidrógenos se añadieron considerando que las proteínas se hallaban a pH fisiológico y la minimización de los átomos pesados se llevó a cabo con Impact Refinement usando OPLS-2005¹⁵⁷ como algoritmo del campo de fuerzas y se terminó cuando las desviaciones de RMSD (Root-Mean-Square Deviations) alcanzaron un valor máximo de 0.30 Å.

Con el objetivo de insertar los lóbulos que faltaban en 3FI8, se usó como referencia la estructura cristalina de *PkChoK* (PDB ID: **3C5I**) debido a que ambas muestran un elevado porcentaje de identidad tanto global (70 %), como en el sitio activo (97 %). En este caso, fue Maestro 9.2 el programa usado para la construcción del modelo completo. Primero se eliminó el glicerol y únicamente el ADP y el Mg^{2+} se conservaron como ligandos de 3FI8. La PCho que aparecía co-cristalizada en 3FI8, se eliminó debido a que mostraba una orientación invertida con respecto a la que adquiere en la ChoK humana. Posteriormente, ambas estructuras se prepararon con el módulo de preparación de proteínas siguiendo el mismo protocolo el expuesto anteriormente. Luego, se alinearon las secuencias de 3FI8 y 3C5I para posteriormente insertar los aminoácidos ausentes en 3FI8 directamente desde la secuencia de 3C5I haciendo una copia de los mismos. En el caso de los aminoácidos que variaban entre ambas especies, se mutaron tras la inserción del área correspondiente en 3FI8. Posteriormente, mediante el uso de Macromodel 9.9¹⁶⁵ se ajustaron no sólo las distancias y los ángulos de enlace en las inserciones, sino que también se hizo una primera minimización energética de las mismas. Con este último objetivo, se definieron tres celdas en cada zona insertada. A los residuos de la primera celda se les permitía moverse libremente, mientras que en la segunda celda únicamente los dos residuos siguientes a la inserción podían moverse hasta alcanzar una constante de fuerza de $200 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$. En el caso de la tercera celda, todos los residuos debían de permanecer inmóviles. OPLS-2005 fue seleccionado como campo de fuerzas.

Tras la minimización de las cuatro zonas que se insertaron en la secuencia de 3FI8, la PCho se importó desde 2CKQ y de nuevo, se realizó una minimización energética de la proteína completa usando con Prime 3.0 un método de menor precisión el empleado tras la inserción de los lóbulos (método “extended”) para ahorrar tiempo de cálculo.

En todas las estructuras finales, los estados de protonación del ADP y la PCho a pH fisiológico fueron también generados con Protein Preparation Wizard, de este modo se seleccionaron una carga formal de -2 para el ADP y de 0 para la PCho. El estado de protonación -2 para el ADP a pH fisiológico es posible sin alterara la capacidad que tienen los fosfatos de coordinar a los metales porque dicha coordinación es debida al par electrónico libre del oxígeno. La única diferencia entre un estado de protonación de -2 y 0 para el ADP es que los grupos hidroxilo de los fosfatos α y β están desprotonados

cuando la carga es -2, de manera que un par electrónico más está libre para quelar al Mg^{2+} .

5.1.3.2. Simulaciones de Dinámica Molecular

Las simulaciones de Dinámica Molecular (MD) fueron llevadas a cabo usando el paquete DESMOND 3.0¹⁶⁶ en varias etapas:

a.-) *Construcción del sistema*

Los cuatro complejos se solvataron con agua de tipo TIP3P en una caja triclínica definida por 10 Å de distancia en el eje X (a), 10 Å en el eje Y (b), 10 Å en el eje Z (c) y 90° para los ángulos α , β and γ . Estas condiciones permiten optimizar el tiempo de cálculo posterior en la simulación, y por tanto, minimizan el coste computacional.¹⁶⁷ El sistema proteína-agua fue sometido a una minimización de volumen en la que se tomaron condiciones de borde periódico (periodic boundary conditions). Los sistemas se neutralizaron añadiendo Na^+ (sodio) o Cl^- (cloruro) y finalmente se minimizaron con el campo de fuerzas OPLS-2005.

b.-) *Desarrollo de la simulación de MD*

Diez nanosegundos de simulación de MD fueron desarrollados para cada complejo proteína-agua utilizando condiciones constantes de presión a 1.0 atm y temperatura a 300 K (NPT), aplicando el algoritmo de Berendsen y col.¹⁶⁸ Cada sistema fue relajado antes de los cálculos y las interacciones electrostáticas se calcularon con el método particle-mesh Ewald.¹⁶⁹

c.-) *Análisis de la MD*

El RMSD y los enlaces de hidrógeno fueron analizados en los últimos 8 ns de simulación usando VMD18.¹⁷⁰

c.1.-) Determinaciones de RMSD

Las desviaciones de root-mean-square (RMSD) no sólo se calcularon para las proteínas, sino también para los ligandos con el objetivo de identificar cambios conformacionales relevantes. En todos los casos, este parámetro se estableció tomando como referencia el RMSD medio para todas las etapas de la dinámica y se determinó sólo para el esqueleto carbonado en el caso de las proteínas y para todos los átomos, excepto para los hidrógenos, en los casos del ADP y de la PCho.

c.2.-) Porcentaje de formación de enlaces de hidrógeno a lo largo del tiempo

Inicialmente se hizo una determinación cualitativa de los enlaces de hidrógeno que pudieran aparecer entre los ligandos y aquellos residuos del sitio activo que estuvieran dispuestos como máximo a unos 3.0 Å de los primeros y formando un ángulo de como máximo 30°. A continuación, para cuantificar el porcentaje de formación de cada uno de los enlaces de hidrógeno previamente identificados, se calculó la información detallada por pares de residuos.

5.2. Síntesis Orgánica

El proceso de síntesis de nuevas moléculas se realizó tras el diseño del farmacóforo y de forma paralela al cribado virtual. El objetivo que se perseguía era el de optimizar el farmacóforo con nuevos grupos químicos para poder así encontrar nuevos inhibidores que mostraran una máxima actividad inhibitoria frente a *HsChoK α 1* con el menor número posible de grupos funcionales.

5.2.1. Condiciones generales

Todos los reactivos disponibles comercialmente se han adquirido en Sigma-Aldrich y han sido usados sin posteriores purificaciones.

Los procesos de reacción se controlaron de forma rutinaria mediante cromatografía en capa fina (c.c.f) en cromatofolios Merck AL de Silicagel 60 F₂₅₄ y se revelaron bajo lámpara de rayos ultravioleta o en una atmósfera saturada de yodo (I₂).

La purificación mediante cromatografía en columna flash se ha realizado utilizando Silicagel Merck 60 con un tamaño de partícula 0,040-0,063 (230-400 mesh ASMT).

La síntesis química asistida por microondas se realizó en un aparato Initiator 2.0 que produce una radiación controlada a 2.450 GHz (Biotage AB, Upsala). El tiempo de reacción se refiere al tiempo en el que la reacción se mantiene a la temperatura deseada y no al tiempo total de irradiación.

Los puntos de fusión han sido medidos en aparatos Stuart Scientific SMP3 o Electrothermal Melting Point Apparatus y están sin corregir.

Los espectros de RMN y HRMS han sido realizados por el Centro de Instrumentación Científica (C.I.C) de la Universidad de Granada.

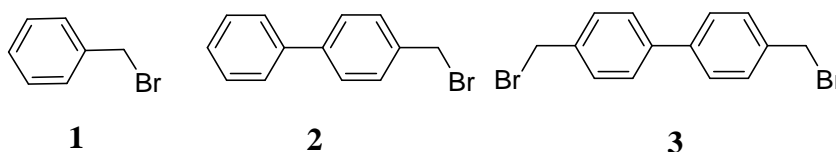
Los espectros de ¹H-RMN se han realizado en un aparato Varian Inova Unity (300 MHz) y Varian Direct Drive (400, 500 y 600 MHz) a temperatura ambiente. Los disolventes deuterados empleados han sido CD₃OD y CDCl₃. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en Hz (ciclos por segundo). El aspecto y la multiplicidad de las señales se indican mediante las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; dd, doble doblete; t, triplete; c, cuadruplete; q, quintuplete; m, multiplete. Los espectros de ¹³C-RMN se han realizado en un aparato Varian Inova Unity (75 MHz) y Varian Direct Drive (125 y 150 MHz).

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se realizaron en dos tipos de espectrómetros: Bruker Autoflex, mediante la técnica de ionización por láser asistida

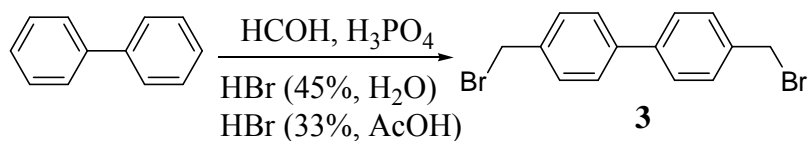
por nano-matriz (NALDI-TOF), y Waters LCT Premier XE, mediante ionización por electronebulización (ESI-TOF).

5.2.2. Síntesis de las materias primas.

En este trabajo se han empleado 3 tipos de espaciadores diferentes, el bromuro de bencilo (**1**), el 4-(bromometil)bifenilo (**2**) y el 4,4'-bis(bromometil)bifenilo. Los dos primeros son asequibles comercialmente, mientras que el último se prepara siguiendo la metodología sintética que se describe a continuación.



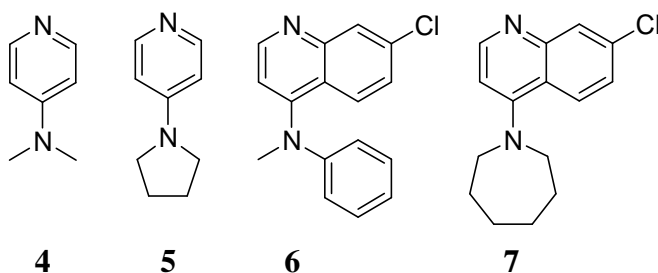
5.2.2.1.- Síntesis de 4,4'-bis(bromometil)bifenilo.



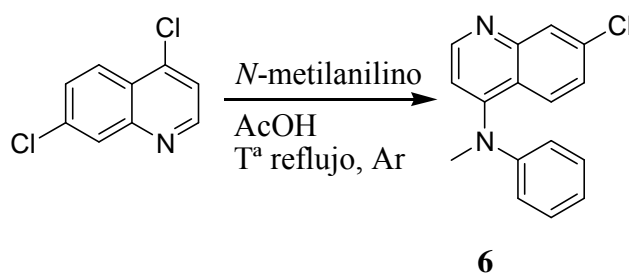
Se prepara una suspensión constituida por 15.0 gr de bifenilo, 12.0 gr de paraformaldehído, 31 ml de ácido bromhídrico al 45 % y 23 ml de ácido fosfórico en 40 ml de una solución de ácido bromhídrico gas en ácido acético glacial al 33 %. La mezcla se calienta a 120°C durante 27 horas. Pasado este tiempo, el sólido formado se filtra y se recrystaliza en acetona obteniéndose un sólido blanco. Rendimiento 38.13 %.

P.f. 171.0- 172.0°. ^{171, 172}

Los grupos funcionales que en el presente trabajo se comportan como cabezas catiónicas son la 4-dimetilaminopiridina (**4**), la 4-pirrolidinopiridina (**5**), la 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina (**6**) y la 7-cloro-4-(perhidroazepin-1-il)quinolina (**7**). De estas cuatro, las dos primeras se adquieren comercialmente, la número **6** se sintetiza de acuerdo al procedimiento sintético ya descrito ¹⁷³ y la última, en base al indicado a continuación.



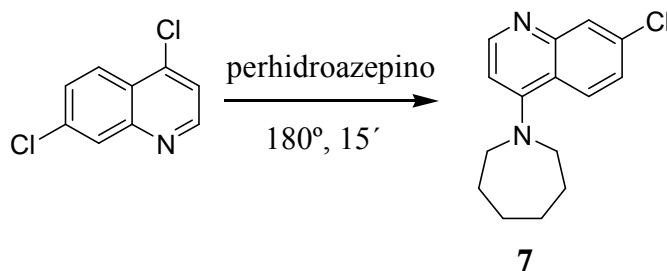
5.2.2.2.- Síntesis de 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolina (6).



Una mezcla de 4,7-dicloroquinolina (disponible comercialmente) con un exceso de *N*-metilanilina, se disuelve en ácido acético glacial y se mantiene a reflujo (135°) bajo argón. Se emplea ácido acético glacial como disolvente para favorecer la protonación del nitrógeno endocíclico y así, exaltar la reactividad de la posición 4 de la quinolina. Finalmente, se obtiene un sirupo anaranjado que se identifica como el producto. Rendimiento: 75 %.

$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.63 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-2_{quin}), 7.92 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-8_{quin}), 7.54 (dd, $J = 7.9$ y 6.0 Hz, 2H, H-3,5_{anil}), 7.48 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H, H-4_{anil}), 7.39 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-2,6_{anil}), 7.32 (d, $J = 9.4$, 1H, H-5_{quin}), 7.28 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, H-3_{quin}), 7.24 (dd, $J = 9.4$ y 2.1 Hz, 1H, H-6_{quin}), 3.78 (s, 3H, CH_3).

5.2.2.3.- Síntesis de 4-azepan-1-il-7-cloroquinolina (7).

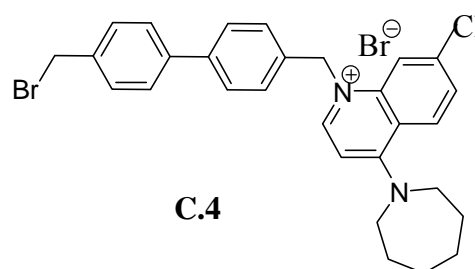
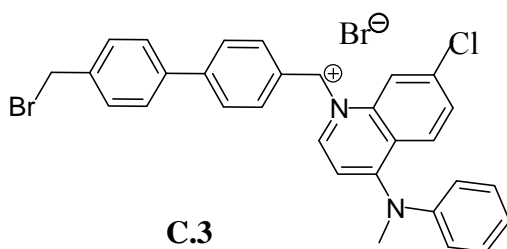
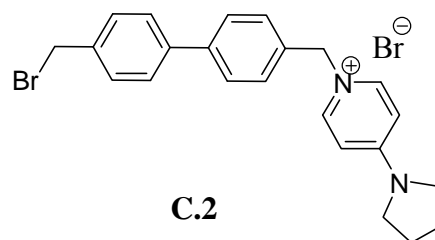
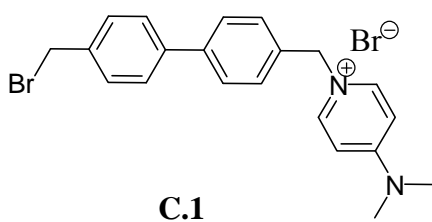


Una mezcla de 4,7-dicloroquinolina (0.445 g, 4.5 mmol) y perhidroazepina (0.68 ml, 12 mmol; actúa como reactivo y como disolvente) se irradia en microondas a 180° durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, el crudo de reacción se enfría, se neutraliza con NaOH 1 N y se extrae la fase oleosa con CH₂Cl₂. A continuación, la fase orgánica se seca con sulfato de magnesio y se concentra a vacío para eliminar el disolvente. Por último, se purifica por cromatografía en columna flash empleando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH→9:1, obteniéndose un sólido marrón claro. Rendimiento 89.63 %. **P.f.** 184-185 °.

¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8.44 (d, *J* = 5.6, 1H, H-2_{quin}), 8.12 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-5_{quin}), 7.86 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-8_{quin}), 7.42 (dd, *J* = 9.2, 2.3 Hz, 1H, H-6_{quin}), 6.88 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H-3_{quin}), 3.64 (t, *J* = 5.6 Hz, 4H, H-2,7_{az}), 2.00-1.93 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.79-1.75 (m, 4H, H-4,5_{az}).

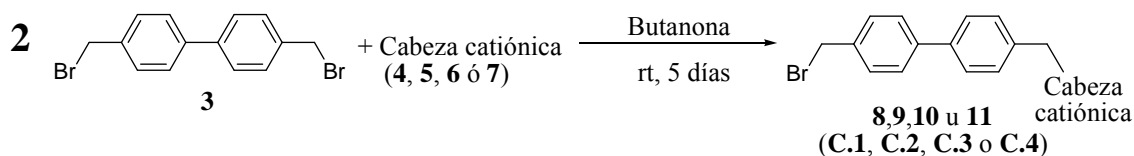
5.2.3. Síntesis de los productos intermedios.

Dada la disponibilidad comercial de los intermedios de las **familias A** (bromuro de bencilo (**1**)) y **B** (4-(bromometil)bifenilo(**2**)), únicamente se realizó la síntesis de los productos intermedios de la familia C (**C.1** u 8, **C.2** ó 9, **C.3** ó 10 y **C.4** u 11).



5.2.3.1. Método general de síntesis de los productos intermedios empleados en la obtención de los compuestos finales de la Familia C.

Una disolución del espaciador dibromado y el derivado de piridinio (**4**, **5**) o quinolinio (**6**, **7**) correspondiente en cada caso (relación molar 2:1) en butanona (40 ml de butanona por cada 500 mg de mezcla de productos de partida), se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 5 días. Los productos intermedios precipitan en el medio de reacción, purificándose por filtración y lavado con butanona, acetato de etilo y éter etílico sucesivamente. Para recuperar el sólido que se pierde en el filtrado, se evaporan los disolventes y se purifica por cromatografía en columna flash empleando como eluyente CH_2Cl_2 : $\text{MeOH} \rightarrow 7:3$.



5.2.3.1.1. Bromuro de 1-[[4'-(bromometil)bifenil-1-il]metil]-4-(dimetilamino)piridinio (C.1, 8).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.3.1 y partiendo del espaciador comercial 4,4'-bis(bromometil)bifenilo⁷⁰, se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 64 %. P.f: 230-232°C.

¹H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 8.27 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.72 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3,5), 7.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2',6'), 7.52 – 7.41 (m, 4H, H-2,6, H-3',5'), 7.04 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.44 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 4.63 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{Br}$), 3.27 (s, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

¹³C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 156.82 (1C, C-4_{pyr}), 141.96 (2C, C-2,6_{pyr}), 141.53 (1C, C-4), 140.23 (1C, C-1'), 138.46 (1C, C-4'), 134.28 (1C, C-1), 129.67 (2C, C-3',5'), 128.62 (2C, C-2,6), 127.75 (2C, C-2',6'), 127.08 (2C, C-3,5), 107.85 (2C, C-3,5_{pyr}), 60.15 (1C, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 39.15 (2C, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 32.45 (1C, $-\text{CH}_2\text{Br}$).

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{Br}^+$: 381.0966; encontrado: 381.0954.

5.2.3.1.2. Bromuro de 1-[[4'-(bromometil)bifenil-1-il]metil]-4-(pirrolidin-1-il)piridinio (C.2, 9).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el **apartado 5.2.3.1** y partiendo del espaciador comercial 4,4'-bis(bromometil)bifenilo (**3**), se obtiene un sólido marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 49 %. P.f: 214-216°C.

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8.21 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3,5), 7.56 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-2',6'), 7.46 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3',5'), 7.41 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-2,6), 6.83 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.39 (s, 2H, -CH₂N⁺), 4.63 (s, 2H, -CH₂-Br), 3.52 (t, *J* = 6.6 Hz, 4H, H-2,5_{pirr}), 2.08 (q, *J* = 6.6 Hz, 4H, H-3,4_{pirr}).

¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 154.08 (1C, C-4_{pyr}), 141.88 (2C, C-2,6_{pyr}), 141.67 (1C, C-4), 139.56 (1C, C-1'), 138.06 (1C, C-4'), 134.09 (1C, C-1), 128.83 (2C, C-3',5'), 128.33 (2C, C-2,6), 127.66 (2C, C-2',6'), 126.82 (2C, C-3,5), 108.67 (2C, C-3,5_{pyr}), 60.25 (1C, -CH₂N⁺), 48.61 (1C, -CH₂Br), 48.49 (2C, C-2,5_{pirr}), 24.97 (2C, C-3,4_{pirr}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para C₂₃H₂₄N₂Br⁺: 407.1123; encontrado: 407.1124.

5.2.3.1.3. Bromuro de 1-[[4'-(bromometil)bifenil-1-il]metil]-7-cloro-4-(N-metilanilino)quinolinio (C.3, 10).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el **apartado 5.2.3.1** y partiendo del espaciador comercial 4,4'-bis(bromometil)bifenilo (**3**), se obtiene un sólido marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 86 %. P.f: 272-274°C.

¹H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 8.61 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-2,5_{quin}), 8.15 (d, *J* = 1.9 Hz, H-8_{quin}), 7.80 (dd, *J* = 1.9, 9.1 Hz, H-6_{quin}), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3,5), 7.58 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2',6'), 7.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3',5'), 7.43 - 7.35 (m, 7H, H-2,6, H-2-6_{anil}), 6.90 (d, *J* = 7.5 Hz, H-3_{quin}), 5.87 (s, 2H, -CH₂-N⁺), 4.59 (s, -CH₂-am), 2.44 (s, 3H, -CH₃).

¹³C RMN (125 MHz, CD₃OD): δ 156.00 (1C, C-4_{quin}), 147.67 (1C, C-2_{quin}), 140.91 (1C, C-7_{quin}), 140.79 (1C, C-4), 139.87 (1C, C-1'), 139.40 (1C, C-8a_{quin}), 138.59 (1C, C-1_{anil}), 137.86 (1C, C-4_{anil}), 133.85 (1C, C-1), 133.40 (1C, C-4'), 130.47 (2C, C-3',5'),

129.35 (2C, C-2,6_{anil}), 128.03 (1C, C-6_{quin}), 127.48 (2C, C-2,6), 127.06 (2C, C-2',6'), 126.85 (2C, C-3,5), 125.66 (1C, C-5_{quin}), 125.19 (2C, C-3,5_{anil}), 118.27 (1C, C-8_{quin}), 117.09 (1C, C-4_{aquin}), 100.52 (1C, C-3_{quin}), 57.33 (1C, -CH₂-N⁺), 32.21 (1C, -CH₂-Br), 19.74 (1C, -CH₃).

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para C₃₀H₂₅N₂ClBr⁺: 527.0890; encontrado: 527.0897.

5.2.3.1.4. Bromuro de 4-(azepan-1-il)-1-[[4'-(bromometil)bifenil-1-il]metil]-7-cloroquinolinio (C.4, 11).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.3.1 y partiendo del espaciador comercial 4,4'-bis(bromometil)bifenilo⁷⁰, se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 31 %. P.f: 254-256°C.

¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8.54 (d, *J* = 7.1 Hz, H-2_{quin}), 8.36 (d, *J* = 9.2 Hz, H-5_{quin}), 8.03 (m, H-8_{quin}), 7.67- 7.56 (m, 5H, H-6_{quin}, H-3,5, H-2',6'), 7.48- 7.34 (m, 4H, H-3',5', H-2,6), 7.11 (d, *J* = 7.8 Hz, H-3_{quin}), 5.80 (s, 2H, -CH₂N⁺), 4.59 (s, 2H, -CH₂Br), 4.06 (t, *J* = 5.6 Hz, 4H, H-2,7_{az}), 2.11- 2.01 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.76- 1.65 (m, 4H, H-4,5_{az}).

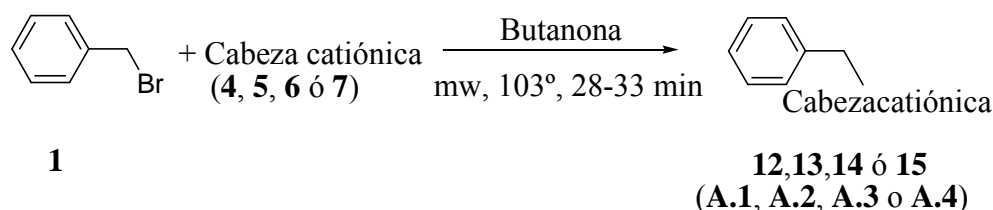
¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 159.60 (1C, C-4_{quin}), 145.02 (1C, C-2_{quin}), 141.39 (1C, C-7_{quin}), 140.98 (1C, C-4), 139.94 (1C, C-1'), 138.12 (1C, C-8_{aquin}), 133.83 (1C, C-1), 133.51 (1C, C-4'), 130.37 (2C, C-3',5'), 129.64 (2C, C-2,6), 129.19 (1C, C-6_{quin}), 127.68 (2C, C-2',6'), 127.40 (2C, C-3,5), 125.51 (1C, C-5_{quin}), 117.85 (1C, C-4_{aquin}), 117.73 (1C, C-8_{quin}), 103.08 (1C, C-3_{quin}), 57.06 (1C, -CH₂N⁺), 54.25 (2C, C-2,7_{az}), 32.51 (1C, -CH₂Br), 27.27 (2C, C-3,6_{az}), 27.14 (2C, C-4,5_{az}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para C₂₉H₂₉N₂ClBr⁺: 519.1203; encontrado: 519.1220.

5.2.4. Síntesis de los productos finales.

5.2.4.1. Método general de síntesis para los productos finales derivados del bencilo. Familia A.

Una disolución del espaciador bromado (**1**) con el derivado de piridinio (**4**, **5**) o quinolinio (**6**, **7**) correspondiente (relación molar 1:1) en butanona (5 ml de por cada 1g de mezcla de productos de partida) se irradia en el microondas a 110° durante 33 minutos (en el caso de las piridinas) ó 28 minutos (para el caso de las quinolinas). El crudo resultante se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente para los derivados de piridina CH₂Cl₂:MeOH→4:1 y para los derivados de quinolina CH₂Cl₂:MeOH→9:1.



5.2.4.1.1. Bromuro de 1-bencil-4-(dimetilamino)piridinio (**A.1**, **12**).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.1 y partiendo del espaciador comercial bromuro de bencilo (**1**), se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 88 %. P.f: 210-212°C.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.23 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.44- 7.38 (m, 5H, H-2,6, H-3,5, H-4), 7.01 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.38 (s, 2H, -CH₂N⁺), 3.26 (s, 6H, (-CH₃)₂).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 156.75 (1C, C-4_{pyr}), 141.73 (2C, C-2,6_{pyr}), 134.79 (1C, C-1), 129.06 (2C, C-3,5), 128.88 (1C, C-4), 127.93 (2C, C-2,6), 107.74 (2C, C-3,5_{pyr}) 60.38 (1C, -CH₂N⁺), 38.98 (2C, (-CH₃)₂).

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para C₁₄H₁₇N₂⁺: 213.1392; encontrado: 213.1387.

5.2.4.1.2. Bromuro de 1-bencil-4-(pirrolidin-1-il)piridinio (A.2, 13).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.1 y partiendo del espaciador comercial bromuro de bencilo (**1**), se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 82 %. P.f: 226-228°C.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.21 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.38-7.45 (m, 5H, H-2,6, H-3,5, H-4), 6.87 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.37 (s, 2H, -CH₂N⁺), 3.56 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, H-2,5_{pirr}), 2.12 (m, 4H, H-3,4_{pirr}).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 153.84 (1C, C-4_{pyr}), 141.51 (2C, C-2,6_{pyr}), 134.96 (1C, C-1), 129.00 (2C, C-3,5), 128.81 (1C, C-4), 127.84 (2C, C-2,6), 108.28 (2C, C-3,5_{pyr}) 60.38 (1C, -CH₂N⁺), 48.30 (2C, C-2,5_{pirr}), 24.76 (2C, C-3,4_{pirr}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para C₁₆H₁₉N₂⁺: 239.1548; encontrado: 239.1542.

5.2.4.1.3. Bromuro de 1-bencil-7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolinio (A.3, 14).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.1 y partiendo del espaciador comercial bromuro de bencilo (**1**), se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 87 %. P.f: 259-261°C.

¹H NMR (600 MHz, CD₃OD) δ 8.62 (d, *J* = 9.0 Hz, H-5_{quin}), 8.55 (d, *J* = 7.5 Hz, H-2_{quin}), 8.08 (d, *J* = 1.9 Hz, H-8_{quin}), 7.80 (dd, *J* = 1.9, 9.0 Hz, H-6_{quin}), 7.44- 7.37 (m, 8H, H-3,5, H-4, H-2-6_{anil}), 7.30-7.28 (m, 2H, H-2,6), 6.89 (d, *J* = 7.4 Hz, H-3_{quin}), 5.82 (s, -CH₂N⁺), 2.46 (s, 3H, -CH₃).

¹³C NMR (125 MHz, CD₃OD) δ 155.98 (1C, C-4_{quin}), 147.65 (1C, C-2_{quin}), 140.67 (1C, C-7_{quin}), 139.38 (1C, C-8_{aquin}), 138.52 (1C, C-1_{anil}), 134.20 (1C, C-1), 130.47 (2C, C-2,6_{anil}), 129.86 (C-4_{anil}), 129.03 (2C, C-3,5 ó C-3,5_{anil}), 128.48 (1C, C-4), 127.71 (1C, C-6_{quin}), 126.38 (2C, C-2,6), 125.63 (1C, C-5_{quin}), 125.17 (2C, C-3,5_{anil} ó C-3,5), 118.36 (1C, C-8_{quin}), 117.12 (1C, C-4_{aquin}), 100.48 (1C, C-3_{quin}), 57.64 (1C, -CH₂N⁺), 19.82 (1C, -CH₃).

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para C₂₃H₂₀N₂Cl⁺: 359.1315; encontrado: 359.1306.

5.2.4.1.4. Bromuro de 4-azepan-1-il-1-bencil-7-cloroquinolinio (A.4, 15).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.1 y partiendo del espaciador comercial bromuro de bencilo (**1**), se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 53 %. P.f: 225-227°C.

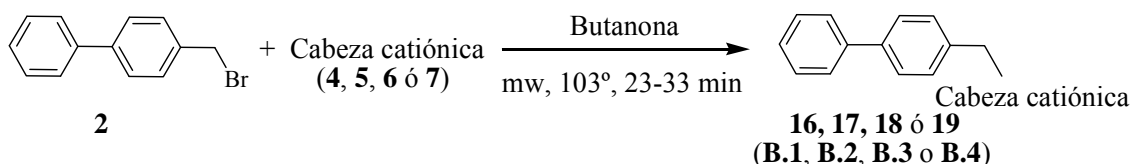
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 8.51 (d, *J* = 7.8 Hz, H-2_{quin}), 8.37 (d, *J* = 9.2 Hz, H-5_{quin}), 7.98 (d, *J* = 2.04 Hz, H-8_{quin}), 7.64 (dd, *J* = 1.6, 9.2 Hz, H-6_{quin}), 7.43- 7.35 (m, 3H, H-3,5, H-4), 7.28-7.30 (m, H-2,6), 7.10 (d, *J* = 3.8 Hz, H-3_{quin}), 5.80 (s, -CH₂N⁺), 4.09 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H, H-2,7_{az}), 2.08- 2.01 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.76- 1.72 (m, 4H, H-4,5_{az}).

¹³C NMR (150 MHz, CD₃OD) δ 160.68 (1C, C-4_{quin}), 146.16 (1C, C-2_{quin}), 142.06 (1C, C-8_{quin}), 140.94 (1C, C-7_{quin}), 135.68 (1C, C-1), 131.52 (1C, C-5_{quin}), 130.38 (2C, C-3,5), 129.76 (1C, C-4), 127.86 (2C, C-2,6), 126.53 (1C, C-6_{quin}), 118.94 (1C, C-4_{aquin}), 118.85 (1C, C-8_{quin}), 104.25 (1C, C-3_{quin}), 58.44 (1C, -CH₂N⁺), 55.23 (2C, C-2,7_{az}), 28.29 (2C, C-3,6_{az}), 27.63 (2C, C-4,5_{az}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para C₂₂H₂₄N₂Cl⁺: 351.1628; encontrado: 351.1631.

5.2.4.2. Método general de síntesis para los productos finales derivados del bifenilo. Familia B.

La preparación de los productos finales de esta familia se lleva a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito para la obtención de los productos finales de la familia **A** (ver sección 5.2.4.1). No obstante, el espaciador usado es el 4-(bromometil)bifenilo (**2**). Además, dada la mayor lipofilia de los productos finales de la familia **B** y su consecuente precipitación en butanona, su purificación se realizó mediante filtración y lavado con dicho disolvente, acetato de etilo y éter etílico.



5.2.4.2.1. Bromuro de 1-(bifenil-4-il-metil)-4-(dimetilamino)piridinio (B.1, 16)

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.2 y partiendo del espaciador comercial 4-(bromometil)bifenilo (2), se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 88 %. P.f: 222-224°C.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 8.26 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-2, $_{6\text{pyr}}$), 7.69 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2,6), 7.61 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-2',6'), 7.51- 7.40 (m, 4H, H-3,5, H-3',5'), 7.36 (t, $J = 7.4$ Hz, H-4'), 7.02 (d, $J = 7.8$ Hz, H-3, $_{5\text{pyr}}$), 5.42 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 3.26 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ 158.04 (1C, C- $_{4\text{pyr}}$), 143.48 (1C, C-1'), 143.11 (2C, C-2, $_{6\text{pyr}}$), 141.36 (1C, C-1), 135.07 (1C, C-4), 130.00 (2C, C-3',5'), 129.90 (2C, C-3,5), 128.92 (2C, C-2,6), 128.86 (1C, C-4'), 127.99 (2C, C-2',6'), 109.14 (2C, C-3, $_{5\text{pyr}}$), 61.47 (1C, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 40.36 (2C, $(-\text{CH}_3)_2$).

HRMS- m/z [M- Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_2^+$: 289.1705; encontrado: 289.1698.

5.2.4.2.2. Bromuro de 1-(bifenil-4-il-metil)-4-(pirrolidin-1-il)piridinio (B.2, 17).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.2 y partiendo del espaciador comercial 4,4'-bis(bromometil)bifenilo ⁷⁰, se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 81 %. P.f: 196-198°C.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ 8.24 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-2, $_{6\text{pyr}}$), 7.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2,6), 7.61 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2',6'), 7.48- 7.43 (m, 4H, H-3,5, H-3',5'), 7.36 (t, $J = 7.4$ Hz, H-4'), 6.87 (d, $J = 7.8$ Hz, H-3, $_{5\text{pyr}}$), 5.41 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 3.56 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H, H-2, $_{5\text{pirr}}$), 2.12 (q, $J = 6.8$ Hz, 4H, H-3, $_{4\text{pirr}}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ 153.77 (1C, C-4_{pyr}), 141.98 (1C, C-1'), 141.62 (2C, C-2,6_{pyr}), 139.94 (1C, C-1), 133.78 (1C, C-4), 128.58 (2C, C-3',5'), 128.48 (2C, C-3,5), 127.47 (2C, C-2,6), 127.43 (1C, C-4'), 126.57 (2C, C-2',6'), 108.28 (2C, C-3,5_{pyr}), 60.08 (1C, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 48.70 (2C, C-2,5_{pirr}), 24.71 (2C, C-3,4_{pirr}).

HRMS- m/z [M- Br]⁺ calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2^+$: 315.1861; encontrado: 315.1863.

5.2.4.2.3. Bromuro de 1-(bifenil-4-il-metil)-7-cloro-4-(N-metilanilino)quinolinio (B.3, 18).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.2 y partiendo del espaciador comercial 4,4'-bis(bromometil)bifenilo (3), se obtiene un sólido amarillo claro que se identifica como el producto. Rendimiento: 81 %. P.f: 283-285°C.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 8.63 (d, $J = 8.5$ Hz, H-2,5_{quin}), 8.17 (d, $J = 1.8$ Hz, H-8_{quin}), 7.84 (dd, $J = 1.9, 9.1$ Hz, H-6_{quin}), 7.67 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2,6), 7.60 (d, $J = 7.2$ Hz, H-2',6'), 7.48- 7.37 (m, 10H, H-3,5, H-3',5', H-4', H-2-6_{anil}), 6.94 (d, $J = 7.5$ Hz, H-3_{quin}), 5.87 (s, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 2.47 (s, $-\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ 156.00 (1C, C-4_{quin}), 147.65 (1C, C-2_{quin}), 141.69 (C-1 ó C-1'), 140.78 (1C, C-7_{quin}), 139.93 (1C, C-1 ó C-1'), 139.41 (1C, C-8_{aquin}), 138.58 (1C, C-1_{anil}), 133.91 (1C, C-4_{anil}), 133.11 (1C, C-4), 130.48 (2C, C-2,6_{anil}), 128.54 (2C, C-3',5'), 127.79 (1C, C-6_{quin}), 127.51 (2C, C-2,6), 127.37 (1C, C-4'), 127.00 (2C, C-3,5), 126.55 (2C, C-2',6'), 125.63 (1C, C-5_{quin}), 125.18 (2C, C-3,5_{anil}), 118.31 (1C, C-8_{quin}), 117.21 (1C, C-4_{aquin}), 100.59 (1C, C-3_{quin}), 57.36 (1C, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 19.75 (1C, $-\text{CH}_3$).

HRMS- m/z [M- Br]⁺ calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{Cl}^+$: 435.1628; encontrado: 435.1626.

5.2.4.2.4. Bromuro de 4-azepan-1-il-1-(bifenil-4-ilmetil)-7-cloroquinolinio (B.4, 19).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.2 y partiendo del espaciador comercial 4,4'-bis(bromometil)bifenilo ⁷⁰, se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 83 %. P.f: 223-225°C.

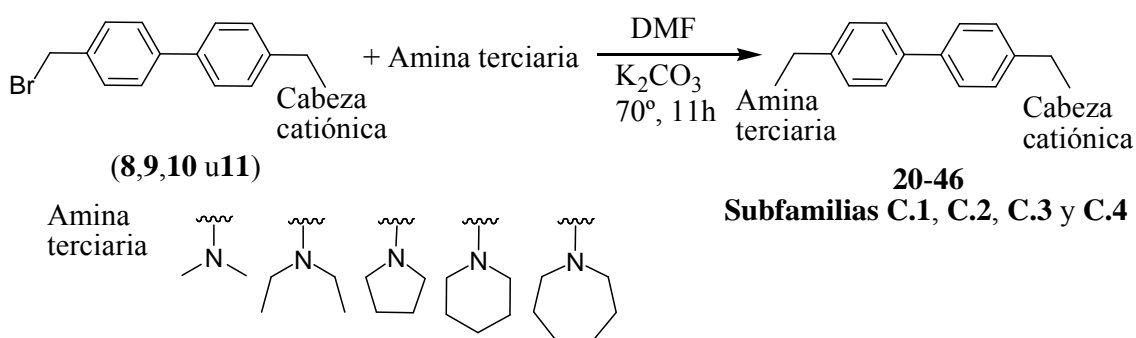
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz; CD_3OD): δ 8.55 (d, $J = 7.8$, H-2_{quin}), 8.37 (d, $J = 9.2$, H-5_{quin}), 8.06 (d, $J = 2.0$ Hz, H-8_{quin}), 7.66 - 7.58 (m, 5H, H-2,6, H-2',6', H-6_{quin}), 7.44 - 7.31 (m, 5H, H-3,5, H-3',5', H-4'), 7.12 (d, $J = 7.8$, H-3_{quin}), 5.81 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 4.07 (t, $J = 5.6$, 4H, H-2,7_{az}), 2.10- 2.06 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.77- 1.63 (m, 4H, H-4,5_{az}).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz; CD_3OD): δ 159.30 (1C, C-4_{quin}), 144.72 (1C, C-2_{quin}), 141.57 (1C, C-1 ó C-1'), 140.69 (1C, C-8_{quin}), 139.93 (1C, C-1 ó C-1'), 139.64 (1C, C-7_{quin}), 133.18 (1C, C-4), 130.08 (1C, C-5_{quin}), 128.51 (2C, C-3',5'), 127.44 (2C, C-2,6), 127.32 (1C, C-4'), 127.09 (2C, C-3,5), 126.52 (2C, C-2',6'), 125.21 (1C, C-6_{quin}), 117.56 (1C, C-4_{quin}), 117.45 (1C, C-8_{quin}), 102.37 (1C, C-3_{quin}), 56.79 (1C, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 53.84 (2C, C-2,7_{az}), 26.99 (2C, C-3,6_{az}), 26.86 (2C, C-4,5_{az}).

HRMS- m/z [M- Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{Cl}^+$: 427.1941; encontrado: 427.1933.

5.2.4.3. Método general de síntesis para los productos finales derivados del bifenilo con amina terciaria. Familia C.

A una disolución del intermedio monobromado correspondiente (productos **8**, **9**, **10** u **11**) en dimetilformamida (DMF) y tubo cerrado, se le añade la amina terciaria (relación molar 1:1) en un baño de hielo/sal a -5°C junto a carbonato potásico (relación molar 1:0.5). A continuación, se aumenta la temperatura hasta 70°C durante 11 horas. Transcurrido este tiempo, se evapora la DMF en rotavapor y el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH_2Cl_2 : MeOH de proporciones distintas en función del producto final del que se trate.



5.2.4.3.1. Subfamilia C.1. Derivados de bifenilo y dimetilaminopiridina.**5.2.4.3.1.1. Bromuro de 4-(dimetilamino)-1-({4'-[(dimetilamino)metil]bifenil-1-il}metil)piridinio (C.1.1, 20).**

Seguendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **8**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 93 %. P.f: 164-166°C.

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.31 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3,5), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2',6'), 7.50-7.53 (m, 4H, H-2,6, H-3',5'), 7.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.45 (s, 2H, -CH₂N⁺), 3.76 (s, 2H, -CH₂N_{am}), 3.24 (s, 6H, (-CH₃)₂), 2.44 (s, 6H, (-CH₃)_{2am}).

¹³C NMR (75 MHz; CD₃OD): δ 156.86 (1C, C-4_{pyr}), 142.03 (2C, C-2,6_{pyr}), 141.48 (1C, C-1'), 140.10 (1C, C-4), 135.16 (1C, C-4'), 134.30 (1C, C-1), 130.61 (2C, C-3',5'), 128.90 (2C, C-2,6), 127.71 (2C, C-2',6'), 127.05 (2C, C-3,5), 108.08 (2C, C-3,5_{pyr}), 62.65 (1C, -CH₂-N_{am}), 60.26 (1C, -CH₂-N⁺), 43.54 (2C, (-CH₃)_{2am}), 39.36 (2C, (-CH₃)₂).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₂₃H₂₈N₃⁺: 346.2286; encontrado: 346.2282.

5.2.4.3.1.2. Bromuro de 4-(dimetilamino)-1-({4'-[(dietilamino)metil]bifenil-1-il}metil)piridinio (C.1.2, 21).

Seguendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **8**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→4:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 57 %. P.f: 160-162°C.

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.27 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.70 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-3,5), 7.65 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, H-2',6'), 7.47-7.51 (m, 4H, H-2,6, H-3',5'), 7.01 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.43 (s, 2H, -CH₂N⁺), 3.90 (s, 2H, -CH₂N_{am}), 3.24 (s, 6H, (-CH₃)₂), 2.80 (c, *J* = 7.2 Hz, 4H, -CH₂CH₃), 1.18 (t, 6H, *J* = 7.2 Hz, -CH₂CH₃).

^{13}C NMR (75 MHz; CD_3OD): δ 156.36 (1C, C-4_{pyr}), 141.58 (2C, C-2,6_{pyr}), 140.78 (1C, C-1'), 140.54 (1C, C-4), 133.14 (1C, C-4'), 130.96 (1C, C-1), 130.49 (2C, C-3',5'), 128.55 (2C, C-2,6), 127.31 (2C, C-2',6'), 127.03 (2C, C-3,5), 107.62 (2C, C-3,5_{pyr}), 59.73 (1C, -CH₂-N_{am}), 55.44 (1C, -CH₂-N⁺), 46.69 (2C, -N(CH₂-CH₃)), 38.90 (2C, -(CH₃)₂), 8.05 (2C, -N(CH₂-CH₃)).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₂₅H₃₂N₃⁺: 374.2596; encontrado: 374.2600.

5.2.4.3.1.3 Bromuro de 4-(dimetilamino)-1-[[4'-(pirrolidin-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]piridinio (C.1.3, 22).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **8**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo poco intenso que se identifica como el producto. Rendimiento: 7 %. P.f: 171-173°C.

^1H NMR (300 MHz; CD_3OD): δ 8.25 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.69 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H-3,5), 7.61 (d, J = 8.3 Hz, 2H, H-2',6'), 7.45-7.47 (m, 4H, H-2,6, H-3',5'), 7.01 (d, J = 7.9 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.41 (s, 2H, -CH₂N⁺), 3.81 (s, 2H, -CH₂N_{am}), 3.25 (s, 6H, -(CH₃)₂), 2.67-2.77 (m, 4H, H-2,5_{pirr}), 1.84-1.90 (m, 4H, H-3,4_{pirr}).

^{13}C NMR (75 MHz; CD_3OD): δ 156.63 (1C, C-4_{pyr}), 141.73 (2C, C-2,6_{pyr}), 141.25 (1C, C-1'), 141.19 (1C, C-4), 134.52 (1C, C-4'), 132.04 (1C, C-1), 130.83 (2C, C-3',5'), 128.88 (2C, C-2,6), 127.80 (2C, C-2',6'), 127.51 (2C, C-3,5), 108.04 (2C, C-3,5_{pyr}), 60.25 (1C, -CH₂-N_{am}), 58.06 (1C, -CH₂-N⁺), 53.67 (2C, C-2,5_{pirr}), 39.25 (2C, -(CH₃)₂), 22.76 (2C, C-3,4_{pirr}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₂₅H₃₀N₃⁺: 372.2440; encontrado: 372.2444.

5.2.4.3.1.4. Bromuro de 4-(dimetilamino)-1-[[4'-(pirrolidinio-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]piridinio (C.1.4, 23).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **8**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→5:1.

Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 55 %. P.f: 177-179°C(funde como espuma).

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.28 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.71-7.73 (m, 4H, H-3,5, H-2',6'), 7.61 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-3',5'), 7.50 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-2,6), 7.03 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.44 (s, 2H, -CH₂N⁺), 4.29 (s, 2H, -CH₂N_{am}), 3.30-3.32 (m, 4H, H-2,5_{pirr}), 3.27 (s, 6H, (-CH₃)₂), 2.00-2.11 (m, 4H, H-3,4_{pirr}).

¹³C NMR (75 MHz; CD₃OD): δ 156.66 (1C, C-4_{pyr}), 141.79 (2C, C-2,6_{pyr}), 141.56 (1C, C-1'), 141.13 (1C, C-4 ó C-4'), 141.06 (1C, C-4 ó C-4'), 134.09 (1C, C-1), 129.89 (2C, C-3',5'), 128.60 (2C, C-2,6), 127.53 (2C, C-2',6'), 126.76 (2C, C-3,5), 107.83 (2C, C-3,5_{pyr}), 60.15 (1C, -CH₂-N⁺), 59.35 (1C, -CH₂-N_{am}), 53.63 (2C, C-2,5_{pirr}), 39.03 (2C, (-CH₃)₂), 22.76 (2C, C-3,4_{pirr}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺/2: calculado para C₂₅H₃₁N₃²⁺: 186.6254; encontrado: 186.6284.

5.2.4.3.1.5. Bromuro de 4-(dimetilamino)-1-[[4'-(piperidin-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]piridinio (C.1.5, 24).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **8**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→4:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 75 %. P.f: 183-185°C.

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.28 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3,5) 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2',6'), 7.45-7.50 (m, 4H, H-2,6, H-3',5'), 7.01 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.43 (s, 2H, -CH₂N⁺), 3.72 (s, 2H, -CH₂N_{am}), 3.25 (s, 6H, (-CH₃)₂), 2.62 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, H-2,6_{pip}), 1.66 (q, *J* = 5.5 Hz, 4H, H-3,5_{pip}), 1.47-1.56 (m, 2H, H-4_{pip}).

¹³C NMR (75 MHz; CD₃OD): δ 156.91 (1C, C-4_{pyr}), 141.95 (2C, C-2,6_{pyr}), 141.64 (1C, C-1'), 139.83 (1C, C-4), 134.99 (1C, C-4'), 134.03 (1C, C-1), 130.70 (2C, C-3',5'), 128.89 (2C, C-2,6), 127.71 (2C, C-2',6'), 126.88 (2C, C-3,5), 108.05 (2C, C-3,5_{pyr}),

62.44 (1C, $-\text{CH}_2\text{-N}_{\text{am}}$), 60.38 (1C, $-\text{CH}_2\text{-N}^+$), 53.89 (2C, C-2,6_{pip}), 39.28 (2C, $-(\text{CH}_3)_2$), 24.81 (2C, C-3,5_{pip}), 23.52 (1C, C-4_{pip}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₂₆H₃₂N₃⁺: 386.2591; encontrado: 386.2595.

5.2.4.3.1.6. Bromuro de 4-(dimetilamino)-1-[[4'-(piperidinio-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]piridinio (C.1.6, 25).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **8**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→4:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo poco intenso que se identifica como el producto. Rendimiento: 22 %. P.f: 193-195°C.

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.30 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.70-7.72 (m, 4H, H-3,5, H-2',6'), 7.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3',5'), 7.51 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2,6), 7.02 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.45 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 4.24 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}_{\text{am}}$), 3.24 (s, 6H, $-(\text{CH}_3)_2$), 3.13 (t, *J* = 4.9 Hz, 4H, H-2,6_{pip}), 1.83 (q, *J* = 5.5 Hz, 4H, H-3,5_{pip}), 1.58-1.70 (m, 2H, H-4_{pip}).

¹³C NMR (75 MHz; CD₃OD): δ 156.91 (1C, C-4_{pyr}), 142.08 (2C, C-2,6_{pyr}), 141.51 (1C, C-1'), 141.12 (1C, C-4 ó C-4'), 141.05 (1C, C-4 ó C-4'), 134.66 (1C, C-1), 131.86 (2C, C-3',5'), 129.02 (2C, C-2,6), 127.86 (2C, C-2',6'), 127.49 (2C, C-3,5), 108.12 (2C, C-3,5_{pyr}), 60.63 (1C, $-\text{CH}_2\text{-N}^+$), 60.27 (1C, $-\text{CH}_2\text{-N}_{\text{am}}$), 53.09 (2C, C-2,6_{pip}), 39.37 (2C, $-(\text{CH}_3)_2$), 23.39 (2C, C-3,5_{pip}), 22.01 (1C, C-4_{pip}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺²: calculado para C₂₆H₃₃N₃²⁺: 193.6332; encontrado: 193.6336.

5.2.4.3.1.7. Bromuro de 1-[[4'-(azepan-1-ilmetil)bifenil-4-il]metil]-4-(dimetilamino)piridinio (C.1.7, 26).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **8**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo poco intenso que se identifica como el producto. Rendimiento: 35 %. P.f: 163-165°C.

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.29 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.70 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3,5), 7.64 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2',6'), 7.49- 7.55 (m, 4H, H-2,6, H-3',5'), 7.02 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.44 (s, 2H, -CH₂N⁺), 3.98 (s, 2H, -CH₂N_{am}), 3.25 (s, 6H, (-CH₃)₂), 2.96 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H, H-2,7_{az}), 1.73-1.80 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.64-1.72 (m, 4H, H-4,5_{az}).

¹³C NMR (75 MHz; CD₃OD): δ 156.65 (1C, C-4_{pyr}), 141.66 (2C, C-2,6_{pyr}), 141.17 (1C, C-1'), 139.91 (1C, C-4), 134.55 (1C, C-4'), 134.25 (1C, C-1), 130.35 (2C, C-3',5'), 128.59 (2C, C-2,6), 127.44 (2C, C-2',6'), 126.02 (2C, C-3,5), 107.70 (2C, C-3,5_{pyr}), 60.15 (1C, -CH₂-N_{am}), 59.77 (1C, -CH₂-N⁺), 54.29 (2C, C-2,7_{az}), 38.74 (2C, -(CH₃)₂), 26.00 (2C, C-3,6_{az}), 23.28 (2C, C-4,5_{az}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₂₇H₃₄N₃⁺: 400.2747; encontrado: 400.2749.

5.2.4.3.1.8. Bromuro de 1-[(4'-[4-(dimetilamino)piridinio-1-il]metil]bifenil-4-il)metil]azepanio (C.1.8, 27).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **8**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂: MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo poco intenso que se identifica como el producto. Rendimiento: 58 %. P.f: 180-182°C.

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.30 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.72-7.73 (m, 4H, H-3,5, H-2',6'), 7.68 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3',5'), 7.52 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-2,6), 7.02 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.46 (s, 2H, -CH₂N⁺), 4.36 (s, 2H, -CH₂N_{am}), 3.26 (s, 6H, (-CH₃)₂), 3.29-3.31 (m, 4H, H-2,7_{az}), 1.89-1.93 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.73-1.77 (m, 4H, H-4,5_{az}).

¹³C NMR (75 MHz; CD₃OD): δ 156.65 (1C, C-4_{pyr}), 141.80 (2C, C-2,6_{pyr}), 141.31 (1C, C-1'), 140.80 (1C, C-4 ó C-4'), 140.73 (1C, C-4 ó C-4'), 134.39 (1C, C-1), 131.47 (2C, C-3',5'), 128.73 (2C, C-2,6), 127.59 (2C, C-2',6'), 127.31 (2C, C-3,5), 107.85 (2C, C-3,5_{pyr}), 60.29 (1C, -CH₂-N⁺), 60.01 (1C, -CH₂-N_{am}), 54.25 (2C, C-2,7_{az}), 39.08 (2C, -(CH₃)₂), 26.15 (2C, C-3,6_{az}), 23.59 (2C, C-4,5_{az}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺/2: calculado para C₂₇H₃₅N₃²⁺: 200.6410; encontrado: 200.6414.

5.2.4.3.2. Subfamilia C.2. Derivados de bifenilo y pirrolidinopiridina.

5.2.4.3.2.1. Bromuro de 1-([4'-[(dimetilamonio)metil]bifenil-1-il]metil)-4-pirrolidin-1-ilpiridinio (C.2.1, 28).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **9**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂: MeOH→4:1. Finalmente se obtiene un sólido marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 34 %. P.f: 160-162°C.

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.24 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.68-7.75 (m, 4H, H-3,5, H-2',6'), 7.66 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3',5'), 7.52 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2,6), 6.90 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.42 (s, 2H, -CH₂N⁺), 4.41 (s, 2H, -CH₂N_{am}), 3.54 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, H-2,5_{pirr}), 2.80 (s, 6H, (-CH₃)_{2am}), 2.10 (m, 4H, H-3,4_{pirr}).

¹³C NMR (75 MHz; CD₃OD): δ 153.73 (1C, C-4_{pyr}), 141.67 (2C, C-2,6_{pyr}), 140.85 (1C, C-1'), 140.62 (1C, C-4), 134.60 (1C, C-1), 131.35 (2C, C-3',5'), 129.02 (1C, C-4'), 128.62 (2C, C-2,6), 127.49 (2C, C-2',6'), 127.59 (2C, C-3,5), 108.37 (2C, C-3,5_{pyr}), 60.37 (1C, -CH₂-N_{am}), 59.98 (1C, -CH₂-N⁺), 48.35 (2C, C-2,5_{pirr}), 41.65 (2C, (-CH₃)₂), 24.72 (2C, C-3,4_{pirr}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺/2: calculado para C₂₅H₃₁N₃²⁺: 186.1220; encontrado: 186.1223.

5.2.4.3.2.2. Bromuro de 1-([4'-[(dietilamino)metil]bifenil-1-il]metil)-4-pirrolidin-1-ilpiridinio (C.2.2, 29).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **9**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂: MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 57 %. P.f: 170-172°C.

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.28 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.65 – 7.71 (m, 4H, H-3,5, H-2',6'), 7.38 – 7.48 (m, 4H, H-2,6, H-3',5'), 6.88 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.40 (s, 2H, -CH₂N⁺), 4.63 (s, 2H, -CH₂N_{am}), 3.53 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, H-2,5_{pirr}), 3.23 (q, *J* = 7.4 Hz, 4H, -CH₂CH₃), 2.09 – 2.13 (m, 4H, H-3,4_{pirr}), 1.37 (t, *J* = 6.0 Hz, 6H, -CH₂CH₃).

¹³C NMR (75 MHz; CD₃OD): δ 153.90 (1C, C-4_{pyr}), 142.01 (2C, C-2,6_{pyr}), 140.81 (1C, C-1'), 139.60 (1C, C-4), 134.03 (1C, C-1), 131.61 (2C, C-3',5'), 129.27 (1C, C-4'), 128.72 (2C, C-2,6), 127.51 (2C, C-2',6'), 126.31 (2C, C-3,5), 108.40 (2C, C-3,5_{pyr}), 60.26 (1C, -CH₂-N_{am}), 55.65 (1C, -CH₂-N⁺), 48.69 (2C, C-2,5_{pirr}), 46.08 (2C, -CH₂CH₃), 24.88 (2C, C-3,4_{pirr}), 8.00 (2C, -CH₂CH₃).

HRMS-*m/z*[M- Br]⁺: calculado para C₂₇H₃₄N₃⁺: 400.2753; encontrado: 400.2748.

5.2.4.3.2.3. Bromuro de 4-pirrolidin-1-il-1-[[4'-(pirrolidin-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]piridinio (C.2.3, 30).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **9**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂: MeOH → 5:1. Finalmente se obtiene un sólido marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 63 %. P.f: 153-155°C.

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.23 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.60 – 7.72 (m, 4H, H-3,5, H-2',6'), 7.42 – 7.52 (m, 4H, H-2,6, H-3',5'), 6.86 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.40 (s, 2H, -CH₂N⁺), 4.64 (s, 2H, -CH₂N_{am}), 3.55 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, H-2,5_{pirr}), 2.56 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H, H-2,5_{pirr}am), 2.08 – 2.12 (m, 4H, H-3,4_{pirr}), 1.82 – 1.87 (m, 4H, H-3,4_{pirr}am).

¹³C NMR (75 MHz; CD₃OD): δ 153.90 (1C, C-4_{pyr}), 141.93 (2C, C-2,6_{pyr}), 140.81 (1C, C-1'), 139.60 (1C, C-4), 134.03 (1C, C-1), 128.31 (2C, C-3',5'), 128.02 (1C, C-4'), 127.73 (2C, C-2,6), 127.47 (2C, C-2',6'), 126.72 (2C, C-3,5), 108.58 (2C, C-3,5_{pyr}), 60.26 (1C, -CH₂-N_{am}), 53.67 (1C, -CH₂-N⁺), 48.27 (2C, C-2,5_{pirr}), 25.31 (2C, C-2,5_{pirr}am), 22.89 (2C, C-3,4_{pirr}), 21.13 (2C, C-3,4_{pirr}am).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₂₇H₃₂N₃⁺: 398.2596; encontrado: 398.2590.

5.2.4.3.2.4. Bromuro de 1-[[4'-(piperidin-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]-4-pirrolidin-1-ilpiridinio (C.2.4, 31).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **9**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂: MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 41 %. P.f: 185-187°C.

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.24 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.65 – 7.78 (m, 6H, H-3,5, H-2',6', H-3',5'), 7.49 - 7.55 (m, 2H, H-2,6), 6.86 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.42 (s, 2H, -CH₂N⁺), 4.28 (s, 2H, -CH₂N_{am}), 3.55 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, H-2,5_{pirr}), 3.17 – 3.28 (m, 4H, H-2,6_{pipeam}), 2.10 – 2.14 (m, 4H, H-3,4_{pirr}), 1.82 – 1.90 (m, 4H, H-3,5_{pipeam}), 1.61 – 1.72 (m, 2H, H-4_{pipeam}).

¹³C NMR (75 MHz; CD₃OD): δ 153.69 (1C, C-4_{pyr}), 141.77 (2C, C-2,6_{pyr}), 140.66 (1C, C-1'), 139.41 (1C, C-4), 134.39 (1C, C-1), 131.61 (2C, C-3',5'), 130.90 (1C, C-4'), 128.55 (2C, C-2,6), 127.45 (2C, C-2',6'), 127.19 (2C, C-3,5), 108.22 (2C, C-3,5_{pyr}), 59.96 (1C, -CH₂-N_{am}), 54.68 (1C, -CH₂-N⁺), 52.40 (2C, C-2,5_{pirr}), 24.64 (2C, C-2,6_{pipeam}), 22.80 (2C, C-3,4_{pirr}), 21.13 (2C, C-3,5_{pipeam}), 20.68 (1C, C-4_{pipeam}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₂₈H₃₄N₃⁺: 412.2753; encontrado: 412.2740.

5.2.4.3.2.5. Bromuro de 1-[[4'-(azepan-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]-4-pirrolidin-1-ilpiridinio (C.2.5, 32).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **9**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂: MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 22 %. P.f: 172-174°C.

^1H NMR (300 MHz; CD_3OD): δ 8.26 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-2,6_{pyr}), 7.66 - 7.74 (m, 6H, H-3,5, H-2',6', H-3',5'), 7.44 - 7.51 (m, 2H, H-2,6), 6.87 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-3,5_{pyr}), 5.43 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 4.40 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{N}_{\text{am}}$), 3.55 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H, H-2,5_{pirr}), 3.31 (t, $J = 3.3$ Hz, 4H, H-2,7_{az}), 2.10 (m, 4H, H-3,4_{pirr}), 1.89 - 1.96 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.72 - 1.76 (m, 4H, H-4,5_{az}).

^{13}C NMR (75 MHz; CD_3OD): δ 153.66 (1C, C-4_{pyr}), 141.75 (2C, C-2,6_{pyr}), 140.69 (1C, C-1'), 139.45 (1C, C-4), 136.98 (1C, C-1), 131.93 (2C, C-3',5'), 130.85 (1C, C-4'), 128.84 (2C, C-2,6), 127.67 (2C, C-2',6'), 127.43 (2C, C-3,5), 108.45 (2C, C-3,5_{pyr}), 61.61 (1C, $-\text{CH}_2\text{-N}_{\text{am}}$), 61.49 (1C, $-\text{CH}_2\text{-N}^+$), 55.72 (2C, C-2,7_{az}), 49.79 (2C, C-2,5_{pirr}), 27.49 (2C, C-4,5_{az}), 26.13 (2C, C-3,4_{pirr}), 24.48 (2C, C-3,6_{az}).

HRMS- m/z [M- Br]⁺: calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_3^+$: 426.2913; encontrado: 426.2909.

5.2.4.3.3. Subfamilia C.3. Derivados de bifenilo y 7-cloro-4-(*N*-metilanilinio)quinolina.

5.2.4.3.3.1. Bromuro de 7-cloro-1-({4'-[(dimetilamino)metil]bifenil-1-il}metil)-4-(*N*-metilanilino)quinolinio (C.3.1, 33).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **10**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}\rightarrow 4:1$. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 29 %. P.f: 249-251°C.

^1H NMR (600 MHz; CD_3OD): δ 8.68-8.70 (m, 2H, H-2,5_{quin}), 8.09 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H-8_{quin}), 7.65 (dd, $J = 8.3, 9.0$ Hz, 1H, H-6_{quin}), 7.60 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3,5), 7.58 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2',6'), 7.50 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-3',5'), 7.40 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2,6), 7.34-7.39 (m, 5H, H-2-6_{anil}), 6.85 (d, $J = 7.4$ Hz, H-3_{quin}), 5.89 (s, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 4.02 (s, $-\text{CH}_2\text{N}_{\text{am}}$), 2.61 (s, 6H, $(-\text{CH}_3)_2\text{am}$), 2.35 (s, 3H, $-\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (125 MHz; CD_3OD): δ 155.45 (1C, C-4_{quin}), 148.68 (1C, C-2_{quin}), 141.52 (1C, C-7_{quin}), 141.39 (1C, C-4), 141.35 (1C, C-1'), 140.21 (1C, C-8_{aquin}), 139.12 (1C,

C-1_{anil}), 135.05 (1C, C-4_{anil}), 134.67 (1C, C-1), 133.14 (1C, C-4'), 131.76 (2C, C-3',5'), 131.34 (2C, C-2,6_{anil}), 128.60 (1C, C-6_{quin}), 128.40 (2C, C-2,6), 128.29 (2C, C-2',6'), 127.92 (2C, C-3,5), 127.13 (1C, C-5_{quin}), 125.84 (2C, C-3,5_{anil}), 119.13 (1C, C-8_{quin}), 118.07 (1C, C-4a_{quin}), 101.59 (1C, C-3_{quin}), 62.19 (1C, -CH₂N_{am}), 58.28 (1C, CH₂N⁺), 43.51 (2C, -(CH₃)_{2am}), 20.85 (1C, CH₃).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₃₂H₃₁N₃Cl⁺: 492.2207; encontrado: 492.2196.

5.2.4.3.3.2. Bromuro de 7-cloro-1-((4'-[[dimetilamonio]metil]bifenil-1-il)metil)-4-(N-metilanolino)quinolinio (C.3.2, 34).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **10**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→4:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 20 %. P.f: 258-260°C.

¹H NMR (500 MHz; CD₃OD): δ 8.61-8.64 (m, 2H, H-2,5_{quin}), 8.12 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H-8_{quin}), 7.78-7.79 (m, 3H, H-6_{quin}, H-3,5), 7.69-7.71 (m, 4H, H-2',6', H-3',5'), 7.38-7.42 (m, 7H, H-2,6, H-2-6_{anil}), 6.89 (d, *J* = 7.4 Hz, H-3_{quin}), 5.89 (s, -CH₂N⁺), 4.71 (s, -CH₂N_{am}), 3.30 (s, 6H, -(CH₃)_{2am}), 2.43 (s, 3H, -CH₃).

¹³C NMR (125 MHz; CD₃OD): δ 155.45 (1C, C-4_{quin}), 147.05 (1C, C-2_{quin}), 141.85 (1C, C-1'), 140.11 (1C, C-7_{quin}), 139.53 (1C, C-4), 138.83 (1C, C-8a_{quin}), 137.87 (1C, C-1_{anil}), 135.58 (1C, C-4_{anil}), 134.38 (1C, C-1), 132.97 (2C, C-3',5'), 129.88 (2C, C-2,6_{anil}), 127.11 (1C, C-6_{quin}), 127.08 (2C, C-2',6'), 126.82 (2C, C-3,5), 126.60 (2C, C-2,6), 126.40 (1C, C-4'), 126.10 (1C, C-5_{quin}), 124.54 (2C, C-3,5_{anil}), 117.63 (1C, C-8_{quin}), 116.77 (1C, C-4a_{quin}), 100.06 (1C, C-3_{quin}), 67.38 (1C, -CH₂N_{am}), 56.67 (1C, CH₂N⁺), 46.78 (2C, -(CH₃)_{2am}), 19.22 (1C, CH₃).

HRMS-m/z[M- Br]^{+/2}: calculado para C₃₂H₃₂N₃Cl²⁺: 246.6104; encontrado: 246.6083.

5.2.4.3.3.3. Bromuro de 7-cloro-1-({4'-[(dietilamino)metil]bifenil-1-il}metil)-4-(*N*-metilanilino)quinolinio (C.3.3, 35).

Seguendo el procedimiento general descrito en el **apartado 5.2.4.3** y partiendo del intermedio monobromado **10**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→4:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 13 %. P.f: 233-235°C.

¹H NMR (500 MHz; CD₃OD): δ 8.58-8.60 (m, 2H, H-2,5_{quin}), 8.07 (d, *J* = 1.7 Hz, H-8_{quin}), 7.72 (dd, *J* = 8.3, 9.0 Hz, 1H, H-6_{quin}), 7.63-7.64 (m, 4H, H-3,5, H-2',6'), 7.51 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3',5'), 7.32-7.37 (m, 7H, H-2,6, H-2-6_{anil}), 6.84 (d, *J* = 7.4 Hz, H-3_{quin}), 5.83 (s, -CH₂N⁺), 4.11 (s, -CH₂N_{am}), 2.98 (c, *J* = 7.2 Hz, 4H, -CH₂CH₃), 2.38 (s, 3H, -CH₃), 1.25 (t, *J* = 7.4 Hz, 6H, -CH₂CH₃).

¹³C NMR (125 MHz; CD₃OD): δ 155.97 (1C, C-4_{quin}), 147.57 (1C, C-2_{quin}), 140.72 (1C, C-7_{quin}), 140.64 (1C, C-4), 140.57 (1C, C-1'), 139.40 (1C, C-8_{aquin}), 138.34 (1C, C-1_{anil}), 134.31 (1C, C-4_{anil}), 133.75 (1C, C-1), 130.84 (1C, C-4'), 130.42 (2C, C-3',5'), 129.88 (2C, C-2,6_{anil}), 127.65 (1C, C-6_{quin}), 127.51 (2C, C-2,6), 127.13 (2C, C-2',6'), 127.11 (2C, C-3, 5), 125.88 (1C, C-5_{quin}), 125.10 (2C, C-3,5_{anil}), 118.17 (1C, C-8_{quin}), 117.39 (1C, C-4_{aquin}), 100.60 (1C, C-3_{quin}), 57.25 (1C, -CH₂N_{am}), 55.70 (1C, CH₂N⁺), 46.37 (2C, -CH₂CH₃), 19.88 (1C, CH₃), 8.08 (2C, -CH₂CH₃).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₃₄H₃₅N₃Cl⁺: 520.2520; encontrado: 520.2513.

5.2.4.3.3.4. Bromuro de 7-cloro-1-({4'-[(dietilamonio)metil]bifenil-1-il}metil)-4-(*N*-metilanilino)quinolinio (C.3.4, 36).

Seguendo el procedimiento general descrito en el **apartado 5.2.4.3** y partiendo del intermedio monobromado **10**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→4:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 35 %. P.f: 237-239°C.

^1H NMR (400 MHz; CD_3OD): δ 8.70-8.73 (m, 2H, H-2,5_{quin}), 8.11 (d, $J = 1.7$ Hz, H-8_{quin}), 7.69 (dd, $J = 8.3, 9.0$ Hz, 1H, H-6_{quin}), 7.62-7.66 (m, 6H, H-3,5, H-2',6', H-3',5'), 7.40 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2,6), 7.33-7.38 (m, 5H, H-2-6_{anil}), 6.87 (d, $J = 7.4$ Hz, H-3_{quin}), 5.90 (s, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 4.37 (s, $-\text{CH}_2\text{N}_{\text{am}}$), 3.20 (c, $J = 7.2$ Hz, 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.36 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.33 (t, $J = 7.4$ Hz, 6H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (125 MHz; CD_3OD): δ 155.97 (1C, C-4_{quin}), 148.15 (1C, C-2_{quin}), 141.62 (1C, C-1'), 140.93 (1C, C-7_{quin}), 140.38 (1C, C-4), 139.55 (1C, C-8_{aquin}), 138.62 (1C, C-1_{anil}), 134.23 (1C, C-1), 134.07 (1C, C-4_{anil}), 131.59 (2C, C-3',5'), 130.67 (2C, C-2,6_{anil}), 129.24 (1C, C-6_{quin}), 128.00 (1C, C-4'), 127.80 (2C, C-2',6'), 127.61 (4C, C-2, 6, C-3,5), 126.38 (1C, C-5_{quin}), 125.45 (2C, C-3,5_{anil}), 118.51 (1C, C-8_{quin}), 117.46 (1C, C-4_{aquin}), 100.91 (1C, C-3_{quin}), 57.62 (1C, $-\text{CH}_2\text{N}_{\text{am}}$), 55.72 (1C, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 46.95 (2C, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 20.13 (1C, CH_3), 8.13 (2C, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$).

HRMS- m/z [M- Br]⁺/2: calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{Cl}^{2+}$: 260.6260; encontrado: 260.6253.

5.2.4.3.3.5. Bromuro de 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)-1-[[4'-(pirrolidin-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]quinolinio (C.3.5, 37).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **10**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH_2Cl_2 :MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 39%. P.f: 228-230°C.

^1H NMR (300 MHz; CD_3OD): δ 8.67 (d, $J = 9.1$ Hz, H-2_{quin}), 8.60 (d, $J = 7.5$ Hz, H-5_{quin}), 8.06 (d, $J = 1.7$ Hz, H-8_{quin}), 7.62 (dd, $J = 8.3, 9.0$ Hz, 1H, H-6_{quin}), 7.50-7.62 (m, 6H, H-3,5, H-3',5', H-2',6'), 7.38 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2,6), 7.32-7.34 (m, 5H, H-2-6_{anil}), 6.80 (d, $J = 7.4$ Hz, H-3_{quin}), 5.84 (s, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 4.08 (s, $-\text{CH}_2\text{N}_{\text{am}}$), 3.00 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H, H-2,5_{pirr}), 2.36 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.94 (q, $J = 3.3$ Hz, 4H, H-3,4_{pirr}).

^{13}C NMR (75 MHz; CD_3OD): δ 155.93 (1C, C-4_{quin}), 147.60 (1C, C-2_{quin}), 140.73 (1C, C-7_{quin}), 140.64 (1C, C-4), 140.47 (1C, C-1'), 139.60 (1C, C-8_{aquin}), 138.12 (1C, C-1_{anil}), 135.26 (1C, C-4_{anil}), 134.03 (1C, C-1), 133.57 (1C, C-4'), 130.63 (5C, C-3',5', C-2,6_{anil}, C-6_{quin}), 127.69 (2C, C-2,6), 127.54 (2C, C-2',6'), 127.19 (2C, C-3,5), 126.43

(1C, C-5_{quin}), 125.15 (2C, C-3,5_{anil}), 118.32 (1C, C-8_{quin}), 117.86 (1C, C-4_{aquin}), 100.90 (1C, C-3_{quin}), 58.55 (1C, -CH₂N_{am}), 57.43 (1C, -CH₂N⁺), 53.90 (2C, C-2,5_{pirr}), 22.89 (2C, C-3,4_{pirr}), 20.14 (1C, CH₃).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₃₄H₃₃N₃Cl⁺: 518.2363; encontrado: 518.2349.

5.2.4.3.3.6. Bromuro de 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)-1-[[4'-(pirrolidinio-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]quinolinio (C.3.6, 38).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **10**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 9 %. P.f: 240-242°C.

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.66 (d, *J* = 9.1 Hz, H-2_{quin}), 8.63 (d, *J* = 7.5 Hz, H-5_{quin}), 8.10 (d, *J* = 1.7 Hz, H-8_{quin}), 7.74 (dd, *J* = 8.3, 9.0 Hz, 1H, H-6_{quin}), 7.59-7.68 (m, 6H, H-3,5, H-3',5', H-2',6'), 7.36-7.39 (m, 7H, H-2,6, H-2-6_{anil}), 6.88 (d, *J* = 7.4 Hz, H-3_{quin}), 5.88 (s, -CH₂N⁺), 4.38 (s, -CH₂N_{am}), 3.32 (t, *J* = 6.9 Hz, 4H, H-2,5_{pirr}), 2.39 (s, 3H, -CH₃), 2.06 (q, *J* = 3.3 Hz, 4H, H-3,4_{pirr}).

¹³C NMR (75 MHz; CD₃OD): δ δ 155.93 (1C, C-4_{quin}), 147.84 (1C, C-2_{quin}), 141.35 (1C, C-1'), 140.75 (1C, C-7_{quin}), 140.37 (1C, C-4), 139.40 (1C, C-8_{aquin}), 138.50 (1C, C-1_{anil}), 133.94 (2C, C-1, C-4_{anil}), 130.82 (2C, C-3',5'), 130.49 (2C, C-2,6_{anil}), 127.80 (1C, C-6_{quin}), 127.60 (2C, C-2',6'), 127.37 (2C, C-3,5), 127.31 (2C, C-2,6), 125.93 (1C, C-4'), 125.24 (2C, C-3,5_{anil}), 122.85 (1C, C-5_{quin}), 118.31 (1C, C-8_{quin}), 117.28 (1C, C-4_{aquin}), 100.91 (1C, C-3_{quin}), 57.52 (1C, -CH₂N_{am}), 57.37 (1C, -CH₂N⁺), 53.99 (2C, C-2,5_{pirr}), 22.52 (2C, C-3,4_{pirr}), 19.85 (1C, CH₃).

HRMS-m/z[M- Br]⁺²: calculado para C₃₄H₃₄N₃Cl²⁺: 259.6182; encontrado: 259.6207.

5.2.4.3.3.7. Bromuro de 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)-1-[[4'-(piperidin-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]quinolinio (C.3.7, 39).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **10**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 30 %. P.f: 186-188°C.

¹H NMR (500 MHz; CD₃OD): δ 8.55-8.58 (m, 2H, H-2,5_{quin}), 8.09 (d, *J* = 1.7 Hz, H-8_{quin}), 7.75 (dd, *J* = 8.3, 9.0 Hz, 1H, H-6_{quin}), 7.61-7.65 (m, 4H, H-3,5, H-2',6'), 7.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3',5'), 7.37 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-2,6), 7.32-7.34 (m, 5H, H-2-6_{anil}), 6.84 (d, *J* = 7.4 Hz, H-3_{quin}), 5.82 (s, -CH₂N⁺), 3.95 (s, -CH₂N_{am}), 2.79-2.95 (m, 4H, H-2,6_{pip}), 2.39 (s, 3H, -CH₃), 1.70 (q, *J* = 6.1 Hz, 4H, H-3,5_{pirr}), 1.50-1.59 (m, 2H, H-4_{pip}).

¹³C NMR (125 MHz; CD₃OD): δ 155.98 (1C, C-4_{quin}), 145.40 (1C, C-2_{quin}), 140.98 (1C, C-7_{quin}), 139.78 (1C, C-4), 139.60 (1C, C-1'), 139.47 (1C, C-8_{aquin}), 139.28 (1C, C-1_{anil}), 136.25 (1C, C-4_{anil}), 136.18 (1C, C-1), 133.99 (1C, C-4'), 130.30 (2C, C-3',5'), 130.28 (2C, C-2,6_{anil}), 127.45 (1C, C-6_{quin}), 127.09 (2C, C-2,6), 126.54 (2C, C-2',6'), 126.42 (2C, C-3',5'), 126.33 (1C, C-5_{quin}), 123.93 (2C, C-3,5_{anil}), 119.57 (1C, C-8_{quin}), 117.42 (1C, C-4_{aquin}), 100.85 (1C, C-3_{quin}), 62.85 (1C, -CH₂N_{am}), 56.55 (1C, -CH₂N⁺), 53.99 (2C, C-2,6_{pip}), 25.11 (2C, C-3,5_{pip}), 23.76 (1C, C-4_{pip}), 19.89 (1C, CH₃).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₃₅H₃₅N₃Cl⁺: 532.2520; encontrado: 532.2508.

5.2.4.3.3.7. Bromuro de 7-cloro-4-(*N*-metilanilino)-1-[[4'-(piperidinio-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]quinolinio (C.3.8, 40).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **10**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 20 %. P.f: 230-232°C.

¹H NMR (500 MHz; CD₃OD): δ 8.62-8.64 (m, 2H, H-2,5_{quin}), 8.12 (d, *J* = 1.7 Hz, H-8_{quin}), 7.78 (dd, *J* = 8.3, 9.0 Hz, 1H, H-6_{quin}), 7.67-7.70 (m, 4H, H-3,5, H-2',6'), 7.58 (d,

^1H NMR (500 MHz; CD_3OD): δ 8.58-8.62 (m, 2H, H-2,5_{quin}), 8.11 (d, $J = 1.7$ Hz, H-8_{quin}), 7.77 (dd, $J = 8.3, 9.0$ Hz, 1H, H-6_{quin}), 7.67-7.68 (m, 4H, H-3,5, H-2',6'), 7.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3',5'), 7.35-7.41 (m, 7H, H-2,6, H-2-6_{anil}), 6.87 (d, $J = 7.4$ Hz, H-3_{quin}), 5.86 (s, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 4.18 (s, $-\text{CH}_2\text{N}_{\text{am}}$), 3.11-3.16 (m, 4H, H-2,7_{az}), 2.43 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.82-1.86 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.69-1.73 (m, 2H, H-4,5_{az}).

^{13}C NMR (125 MHz; CD_3OD): δ 155.98 (1C, C-4_{quin}), 147.73 (1C, C-2_{quin}), 141.34 (1C, C-1'), 140.74 (1C, C-7_{quin}), 140.50 (1C, C-4), 139.38 (1C, C-8_{aquin}), 138.52 (1C, C-1_{anil}), 133.99 (1C, C-4_{anil}), 133.85 (1C, C-1), 131.49 (2C, C-3',5'), 130.46 (2C, C-2,6_{anil}), 129.35 (1C, C-6_{quin}), 127.76 (1C, C-4'), 127.57 (2C, C-2',6'), 127.21 (2C, C-3,5), 127.16 (2C, C-2,6), 125.78 (1C, C-5_{quin}), 125.19 (2C, C-3,5_{anil}), 118.25 (1C, C-8_{quin}), 117.30 (1C, C-4_{aquin}), 100.61 (1C, C-3_{quin}), 60.18 (1C, $-\text{CH}_2\text{N}_{\text{am}}$), 57.31 (1C, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 52.74 (2C, C-2,6_{pip}), 22.97 (2C, C-3,5_{pip}), 21.58 (1C, C-4_{pip}), 19.76 (1C, CH_3).

HRMS- m/z [M- Br]⁺/2: calculado para $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{Cl}^{2+}$: 266.6260; encontrado: 266.6287.

5.2.4.3.3.8. Bromuro de 1-[[4'-(azepan-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]-7-cloro-4-(*N*-metilanilino)quinolinio (C.3.9, 41).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **10**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH_2Cl_2 :MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido verde que se identifica como el producto. Rendimiento: 40 %. P.f: 198-200°C (funde como espuma).

^1H NMR (500 MHz; CD_3OD): δ 8.58-8.62 (m, 2H, H-2,5_{quin}), 8.11 (d, $J = 1.7$ Hz, H-8_{quin}), 7.77 (dd, $J = 8.3, 9.0$ Hz, 1H, H-6_{quin}), 7.67-7.68 (m, 4H, H-3,5, H-2',6'), 7.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3',5'), 7.35-7.41 (m, 7H, H-2,6, H-2-6_{anil}), 6.87 (d, $J = 7.4$ Hz, H-3_{quin}), 5.86 (s, $-\text{CH}_2\text{N}^+$), 4.18 (s, $-\text{CH}_2\text{N}_{\text{am}}$), 3.11-3.16 (m, 4H, H-2,7_{az}), 2.43 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.82-1.86 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.69-1.73 (m, 2H, H-4,5_{az}).

^{13}C NMR (125 MHz; CD_3OD): δ 155.98 (1C, C-4_{quin}), 147.55 (1C, C-2_{quin}), 140.84 (1C, C-7_{quin}), 140.74 (1C, C-4), 140.69 (1C, C-1'), 140.57 (1C, C-8_{aquin}), 139.41 (1C, C-1_{anil}), 138.43 (1C, C-4_{anil}), 134.22 (1C, C-1), 133.73 (1C, C-4'), 130.95 (2C, C-3',5'), 130.44 (2C, C-2,6_{anil}), 127.68 (1C, C-6_{quin}), 127.52 (2C, C-2,6), 127.10 (4C, C-2',6', C-3,5), 125.72 (1C, C-5_{quin}), 125.09 (2C, C-3,5_{anil}), 118.19 (1C, C-8_{quin}), 117.39 (1C, C-

4a_{quin}), 100.67 (1C, C-3_{quin}), 60.54 (1C, -CH₂N_{am}), 57.31 (1C, -CH₂N⁺), 54.54 (2C, C-2,7_{az}), 26.17 (2C, C-3,5_{az}), 24.04 (2C, C-4,5_{az}), 19.74 (1C, CH₃).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₃₆H₃₇N₃Cl⁺: 546.2676; encontrado: 546.2626.

5.2.4.3.3.8. Bromuro de 1-([4'-(azepanio-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil)-7-cloro-4-(N-metilnilino)quinolinio (C.3.10, 42).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **10**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→5:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 8 %. P.f: 217-219°C.

¹H NMR (300 MHz; CD₃OD): δ 8.65-8.68 (m, 2H, H-2,5_{quin}), 8.11 (d, *J* = 1.7 Hz, H-8_{quin}), 7.79 (dd, *J* = 8.3, 9.0 Hz, 1H, H-6_{quin}), 7.68-7.74 (m, 4H, H-3,5, H-2',6'), 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3',5'), 7.36-7.43 (m, 7H, H-2,6, H-2-6_{anil}), 6.88 (d, *J* = 7.4 Hz, H-3_{quin}), 5.89 (s, -CH₂N⁺), 4.36 (s, -CH₂N_{am}), 3.28-3.34 (m, 4H, H-2,7_{az}), 2.39 (s, 3H, -CH₃), 1.86-1.91 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.69-1.73 (m, 2H, H-4,5_{az}).

¹³C NMR (125 MHz; CD₃OD): δ 156.02 (1C, C-4_{quin}), 147.73 (1C, C-2_{quin}), 140.81 (1C, C-1'), 140.78 (1C, C-7_{quin}), 140.67 (1C, C-4), 140.41 (1C, C-8a_{quin}), 139.45 (1C, C-1_{anil}), 138.62 (1C, C-4_{anil}), 133.99 (1C, C-1), 131.46 (2C, C-3',5'), 130.53 (2C, C-2,6_{anil}), 129.52 (1C, C-6_{quin}), 127.83 (1C, C-4'), 127.64 (2C, C-2',6'), 127.41 (2C, C-3,5), 127.20 (2C, C-2,6), 125.78 (1C, C-5_{quin}), 125.25 (2C, C-3,5_{anil}), 118.32 (1C, C-8_{quin}), 117.28 (1C, C-4a_{quin}), 100.57 (1C, C-3_{quin}), 60.22 (1C, -CH₂N_{am}), 57.20 (1C, -CH₂N⁺), 54.47 (2C, C-2,7_{az}), 26.21 (2C, C-3,5_{az}), 23.03 (2C, C-4,5_{az}), 19.74 (1C, CH₃).

HRMS-m/z[M- Br]^{+/2}: calculado para C₃₆H₃₈N₃Cl²⁺: 273.6388; encontrado: 273.6373.

5.2.4.3.4. Subfamilia C.4. Derivados de bifenilo y 7-cloro-4-(azepan-1-il)quinolina.

5.2.4.3.4.1. Bromuro de 4-azepan-1-il-7-cloro-1-({4'-[(dimetilamino)metil]bifenil-1-il)metil)quinolinio (C.4.1, 43).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **11**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→9:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 13 %. P.f: 267-269°C.

¹H NMR (500 MHz; CD₃OD): δ 8.58 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-2_{quin}), 8.38 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-5_{quin}), 8.00 (d, *J* = 2.0 Hz, H-8_{quin}), 7.68-7.73 (m, 4H, H-2',6', H-3,5), 7.60-7.63 (m, 3H, H-3',5', H-6_{quin}), 7.38-7.40 (m, 2H, H-2,6), 7.13 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-3_{quin}), 5.83 (s, -CH₂N⁺), 4.36 (s, -CH₂N_{am}), 4.06 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H, H-2,7_{az}), 2.85 (s, 6H, -(CH₃)₂am), 2.01-2.09 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.66-1.73 (m, 4H, H-4,5_{az}).

¹³C NMR (125 MHz; CD₃OD): δ 159.26 (1C, C-4_{quin}), 144.89 (2C, C-2_{quin}), 141.70 (1C, C-1'), 140.66 (1C, C-8_{aquin}), 140.20 (1C, C-4), 139.59 (1C, C-7_{quin}), 134.04 (1C, C-1), 131.28 (2C, C-3',5'), 130.18 (2C, C-5_{quin}), 130.10 (1C, C-4'), 127.55 (2C, C-3,5), 127.38 (2C, C-2',6'), 127.23 (2C, C-2,6), 125.22 (1C, C-6_{quin}), 117.57 (1C, C-4_{aquin}), 117.44 (1C, C-8_{quin}), 102.81 (1C, C-3_{quin}), 60.36 (1C, -CH₂N_{am}), 56.72 (1C, -CH₂N⁺), 53.92 (2C, C-2,7_{az}), 41.59 (2C, -(CH₃)₂am), 27.01 (2C, C-3,5_{az}), 26.88 (2C, C-4,5_{az}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₃₁H₃₅N₃Cl⁺: 484.2089; encontrado: 484.2070.

5.2.4.3.4.2. Bromuro de 4-azepan-1-il-1-({4'-[(dimetilamino)metil]bifenil-1-il)metil)-7-metoxiquinolinio (C.4.2, 44).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **11**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→9:1. Finalmente se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 16 %. P.f: 257-259°C.

¹H NMR (500 MHz; CD₃OD): δ 8.34 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-2_{quin}), 8.12 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-5_{quin}), 7.75 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H, H-2',6'), 7.64-7.69 (m, 4H, H-3,5, H-3',5'), 7.39 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2,6), 7.06 (dd, *J* = 2.5, 9.7 Hz, 1H, H-6_{quin}), 6.82 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-3_{quin}), 6.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-8_{quin}), 5.69 (s, -CH₂N⁺), 4.70 (s, -CH₂N_{am}), 3.96 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H, H-2,7_{az}), 3.02 (s, 6H, -(CH₃)₂am), 2.99 (s, 3H, -OCH₃), 1.96-2.08 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.65-1.73 (m, 4H, H-4,5_{az}).

¹³C NMR (125 MHz; CD₃OD): δ 158.79 (1C, C-4_{quin}), 152.74 (1C, C-7_{quin}), 143.44 (1C, C-2_{quin}), 142.52 (1C, C-8_{aquin}), 142.03 (1C, C-1'), 139.70 (1C, C-4), 134.95 (1C, C-1), 133.53 (2C, C-3',5'), 130.99 (1C, C-4'), 129.24 (1C, C-5_{quin}), 127.46 (2C, C-3,5), 127.33 (2C, C-2',6'), 127.29 (2C, C-2,6), 126.63 (1C, C-8_{quin}), 111.88 (1C, C-4_{aquin}), 100.67 (1C, C-3_{quin}), 95.53 (1C, C-6_{quin}), 60.94 (1C, -CH₂N_{am}), 56.82 (1C, -CH₂N⁺), 53.44 (4C, C-2,7_{az}), 42.18 (1C, -OCH₃), 38.62 (2C, -(CH₃)₂am), 27.50 (2C, C-3,5_{az}), 27.03 (2C, C-4,5_{az}).

HRMS-*m/z*[M- Br]⁺/2: calculado para C₃₂H₃₉N₃OCl²⁺: 247.1605; encontrado: 247.1587.

5.2.4.3.4.3. Bromuro de 4-azepan-1-il-7-cloro-1-({4'-[(azepan-1-il)metil]bifenil-1-il}metil)quinolinio (C.4.3, 45).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **11**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→9.5:0.5. Finalmente se obtiene un sólido amarillo intenso que se identifica como el producto. Rendimiento: 25 %. P.f: 232-234°C.

¹H NMR (500 MHz; CD₃OD): δ 8.56 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-2_{quin}), 8.37 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-5_{quin}), 8.02 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-8_{quin}), 7.69-7.73 (m, 4H, H-2',6', H-3,5), 7.61-7.63 (m, 3H, H-3',5', H-6_{quin}), 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, H-2,6), 7.12 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-3_{quin}), 5.83 (s, -CH₂N⁺), 4.34 (s, -CH₂N_{am}), 4.07 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H, H-2,7_{az}), 3.21 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H, H-2,7_{az}am), 2.04-2.07 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.87- 1.90 (m, 4H, H-3,6_{az}am), 1.65-1.73 (m, 8H, H-4,5_{az}, H-4,5_{az}am).

^{13}C NMR (125 MHz; CD_3OD): δ 159.26 (1C, C-4_{quin}), 144.86 (2C, C-2_{quin}), 141.68 (1C, C-1'), 140.70 (1C, C-8a_{quin}), 139.93 (1C, C-4), 139.64 (1C, C-7_{quin}), 134.95 (1C, C-1), 131.41 (2C, C-3',5'), 130.17 (1C, C-5_{quin}), 129.82 (1C, C-4'), 127.55 (2C, C-3,5), 127.27 (2C, C-2',6'), 127.71 (2C, C-2,6), 125.23 (1C, C-6_{quin}), 117.59 (1C, C-4a_{quin}), 117.45 (1C, C-8_{quin}), 102.90 (1C, C-3_{quin}), 60.17 (1C, -CH₂N_{am}), 57.20 (1C, -CH₂N⁺), 54.34 (2C, C-2,7_{azam}), 53.89 (2C, C-2,7_{az}), 27.02 (2C, C-3,6_{az}), 26.89 (2C, C-4,5_{az}), 26.13 (2C, C-3,6_{azam}), 26.08 (2C, C-4,5_{azam}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺: calculado para C₃₅H₄₁N₃Cl⁺: 538.2989 ; encontrado: 538.2981.

5.2.4.3.4.4. Bromuro de 1-[[4'-(azepanio-1-ilmetil)bifenil-1-il]metil]-4,7-diazepan-1-ilquinolinio (C.4.4, 46).

Siguiendo el procedimiento general descrito en el apartado 5.2.4.3 y partiendo del intermedio monobromado **11**, se purifica el crudo resultante mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH→9.5:0.5. Finalmente se obtiene un sólido amarillo intenso que se identifica como el producto. Rendimiento: 20%. P.f: 224-226°C.

^1H NMR (300 MHz; CD_3OD): δ 8.34 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-2_{quin}), 8.16 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-5_{quin}), 7.68-7.72 (m, 4H, H-2',6', H-3,5), 7.58-7.62 (m, 2H, H-3',5'), 7.36 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2,6), 7.12 (dd, $J = 2.5, 9.7$ Hz, 1H, H-6_{quin}), 6.86 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-3_{quin}), 6.54 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-8_{quin}), 5.71 (s, -CH₂N⁺), 4.27 (s, -CH₂N_{am}), 4.02 (t, $J = 5.6$ Hz, 4H, H-2,7_{az}), 3.57 ($J = 5.9$ Hz, 4H, H-2,7_{az'}), 3.25-3.29 (m, 4H, H-2,7_{azam}), 2.05-2.09 (m, 4H, H-3,6_{az}), 1.89-2.00 (m, 4H, H-3,6_{azam}), 1.74-1.78 (m, 8H, H-4,5_{az}, H-4,5_{azam}), 1.59-1.64 (m, 4H, H-3,6_{az'}), 1.38-1.44 (m, 4H, H-4,5_{az'}).

^{13}C NMR (125 MHz; CD_3OD): δ 158.64 (1C, C-4_{quin}), 151.60 (1C, C-7_{quin}), 143.49 (1C, C-2_{quin}), 142.35 (1C, C-8a_{quin}), 141.44 (1C, C-1'), 140.31 (1C, C-4), 134.00 (1C, C-1), 131.37 (2C, C-3',5'), 129.54 (2C, C-4', C-5_{quin}), 127.55 (2C, C-3,5), 127.31 (2C, C-2',6'), 125.23 (2C, C-2,6), 111.72 (1C, C-8_{quin}), 109.02 (1C, C-4a_{quin}), 100.52 (1C, C-3_{quin}), 95.53 (1C, C-6_{quin}), 60.20 (1C, -CH₂N_{am}), 56.77 (1C, -CH₂N⁺), 54.35 (2C, C-2,7_{azam}), 53.43 (2C, C-3,6_{az}), 49.37 (2C, C-2,7_{az'}), 27.52 (2C, C-2,7_{az}), 27.02 (2C, C-4,5_{az}), 26.34 (2C, C-3,6_{az'}), 26.14 (2C, C-3,6_{azam}), 26.10 (2C, C-4,5_{azam}), 26.03 (2C, C-2,7_{az'}).

HRMS- m/z [M- Br]⁺/2: calculado para C₄₁H₅₄N₄²⁺: 301.2169; encontrado: 301.2162.

5.3. Clonaje, expresión y purificación de proteínas

El clonaje, la expresión y la purificación de las proteínas *HsChoK α 1*, *PfChoK* y *CpChoK* se llevaron a cabo en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos de la Universidad de Zaragoza bajo la supervisión del investigador ARAID D. Ramón Hurtado Guerrero¹⁷⁴.

5.3.1.1. Clonaje, expresión y purificación de *HsChoK α 1* y *HsChoK β*

5.3.1.2. Clonaje de *HsChoK α 1* y *HsChoK β*

Los protocolos de clonaje, expresión y purificación de ambas proteínas ya habían sido previamente puestos a punto por el doctor Hurtado en su centro de investigación y publicados en un *Angewanted* del año 2013⁸⁰, de tal manera que se expresaron ambas proteínas siguiendo los protocolos descritos que a continuación se detallan.

5.3.1.3. Expresión de *HsChoK α 1* y *HsChoK β*

El protocolo de expresión y purificación de ambas isoformas comienza con la transformación por choque térmico de los clones *pMALC2x-choK α 1* y *pMALC2x-choK β* en BL21 (DE3) star, una cepa comercial de *E. coli* que permite la inducción de proteínas con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Posteriormente, las células transformadas se crecen en un precultivo de 35 ml de medio 2XTY (16 g/L triptona, 10 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl pH 7.0) estéril con ampicilina (100 μ g/ml) a 37°C durante toda la noche en agitación a 250 rpm.

Al día siguiente el precultivo se inocula en 2 litros de medio de cultivo con ampicilina (100 μ g/ml) y se incuba a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 medida a 600 nm. A continuación, se induce la expresión de la proteína recombinante utilizando 1 mM de IPTG durante aproximadamente 20 horas a 18°C agitándose a 180 rpm. Transcurrido este tiempo, las células se recogen centrifugando a 4500 rpm en ciclos de 20 minutos y en caso de no ser usado inmediatamente, el sedimento de células se congela a -20°C.

5.3.1.4. Purificación de *HsChoK α 1* y *HsChoK β*

Se resuspendió el sedimento celular en el tampón A (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA a pH 7.5) en la proporción de 1 ml de tampón por cada gramo de pellet. Se añadió 1 μ l/10ml de benzonasa (Novagen), 1 mg/ml lisozima (Fluka analytical) e inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y se incubó la mezcla a 37°C durante 30 minutos.

A continuación, las células se rompieron en un baño de hielo mediante 10 series de sonicación de 30 segundos (amplitud al 80 %) y 30 segundos de descanso. Luego, se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación a 19500 rpm durante 45 minutos y se filtró el sobrenadante con filtros de 0,45 μ m antes de ser inyectado en las columnas.

Posteriormente, se inyectó el sobrenadante en una columna de maltosa MBT Trap HP de 5 ml (GE Healthcare), se lavó con el tampón A y se eluyó con el tampón B (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM maltosa a pH 7,5) utilizando durante todo el proceso un flujo máximo de 5 ml/min en un aparato ÄKTA purifier™ (GE Healthcare) o en bomba peristáltica (**Figura 5.5**).

A continuación, se dializó la fracción eluída de la siguiente columna cromatográfica con el tampón A (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl pH 7.5) para que la proteasa de precisión (PP, “PreScission protease”, GE Healthcare) se encontrara en un ambiente óptimo de corte. La diálisis se llevó a cabo en agitación a 4°C realizando 3 cambios de buffer cada 2 horas. Durante todo el proceso se utilizaron geles de acrilamida SDS-PAGE al 12% tanto para confirmar la presencia de la proteína en las distintas fracciones aisladas como para realizar un control del proceso de purificación.

La separación de ChoK de la proteína de fusión (MBP) se realizó con la PP la cual se añadió a una concentración de 1 mg por cada 10 mg de proteína, y se incubó a 4°C durante 24 horas. Se comprobó que la proteasa había cortado correctamente con un gel SDS-PAGE al 12 % (**Figura 5.5**). Después, se utilizó una columna de GST (GE Healthcare) con el tampón B (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10 mM glutatión reducido a pH 7,5) para retener a la proteasa y liberar a la ChoK (**Figura 5.5**).

La fracción recuperada se purificó utilizando una columna HiTrap Blue (GE Healthcare) usando como tampón A, 25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl a pH 7,5 y como tampón B, 25 mM Tris/HCl, 2.5 M NaCl a pH 7,5. La elución de ChoK se llevó a cabo con un gradiente de NaCl (**Figura 5.5**). Luego, al eluído se le eliminó el exceso de sal

mediante una columna de intercambio de tampones en 25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl a pH 7,0-7,5.

Finalmente, la proteína disuelta en el tampón anterior se concentró hasta los 2 ml, se filtró con filtros de 0,45 μm y se inyectó en una columna de exclusión molecular (Superdex 75 XK26/60, GE Healthcare, **Figura 5.5**).

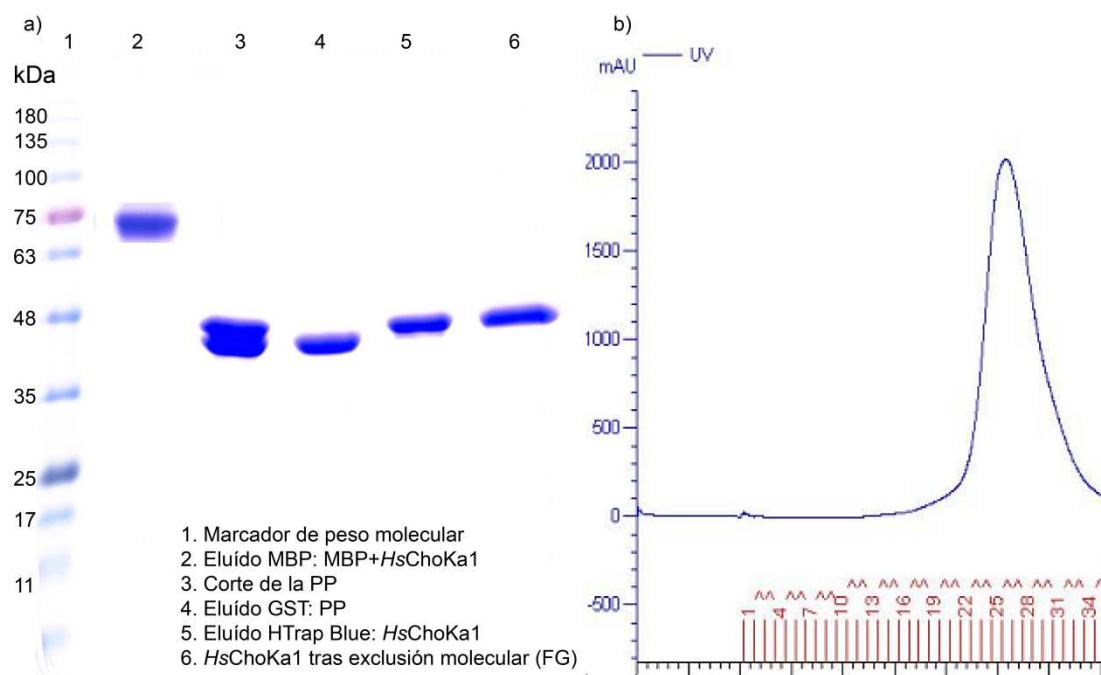


Figura 5.5. a) Seguimiento del proceso de purificación de *HsChoKa1*; b) Cromatografía de exclusión molecular *HsChoKa1*.

Por último, se analizó espectrofotométricamente la cantidad de proteína obtenida utilizando coeficientes de extinción molar a 280 nm de $1.30 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ y $1.64 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ para las isoformas *HsChoKa1* y *HsChoK β* , respectivamente. Ambas enzimas se concentraron hasta 20 mg/ml y se almacenaron a -80°C hasta ser usadas en los experimentos biofísicos posteriores.

5.3.2. Clonaje, expresión y purificación de *PfChoK*

5.3.2.1. Clonaje de *PfChoK*

La secuencia de DNA que codifica los aminoácidos 79-440 de *PfChoK* fue sintetizada por la empresa GenScript para poder ser transformada en *E. coli*. La construcción de *PfChoK* contenía un sitio de corte para la proteasa de precisión y fue digerida con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SalI* e inicialmente se clonó en el vector pMALC2x. Debido a problemas para eliminar la proteína de unión a maltosa utilizando la proteasa de precisión, se decidió diseñar otra construcción que contuviera una secuencia corta compuesta por 8 aminoácidos (Trp-Ser-Hys-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) (Strep-tag) y un sitio de corte para la proteasa TEV. Utilizando pMALC2x-*PfChoK* como molde, se amplificó la construcción en dos rondas de PCR con el objetivo de incluir los dos elementos previamente citados en la construcción final. La primera PCR se amplificó usando el primer directo,

5'-

GAAAACCTGTACTTCCAGGGTAGCGGTAGCGGTTCAAGTAAACTGACCGA
TC-3' (que contenía el sitio de corte para TEV mostrado en negrita)

y el primer reverso,

5'-CGGAATTCGTCGACTCAATCGTCATAGTCTTTAATAATG-3' (el cual contenía una secuencia de reconocimiento para *SalI* (en cursiva) y un codón de parada (subrayado)).

La segunda PCR se amplificó desde la primera PCR con el mismo primer reverso mencionado previamente y el siguiente primer directo,

5'-

CGGAATTCATATGGGCGGCGGCAGCGGTGGAGCCATCCGCAGTTTGAAA
AAGGCGGCAGCGAAAACCTGTACTTCCAGGGT-3', el cual contenía un sitio *NdeI* (de nuevo en cursiva) y una secuencia de codificación para la Strep-tag (subrayada) seguida de un sitio TEV mostrado en negrita.

A continuación, el producto de la PCR se digirió con *NdeI* y *SalI* (**Figura 5.6**) y se clonó en el vector pET15b, el cual había sido previamente modificado para que codificase además de una cola de histidinas, un sitio de corte para la proteasa de precisión, resultando en el plásmido de expresión final pET15bPP-*PfChoK* (**Figura 5.6**). La secuencia de dicho plásmido fue verificada mediante secuenciación en el Servicio de secuenciación de Sistemas genómicos de Paterna (Valencia).

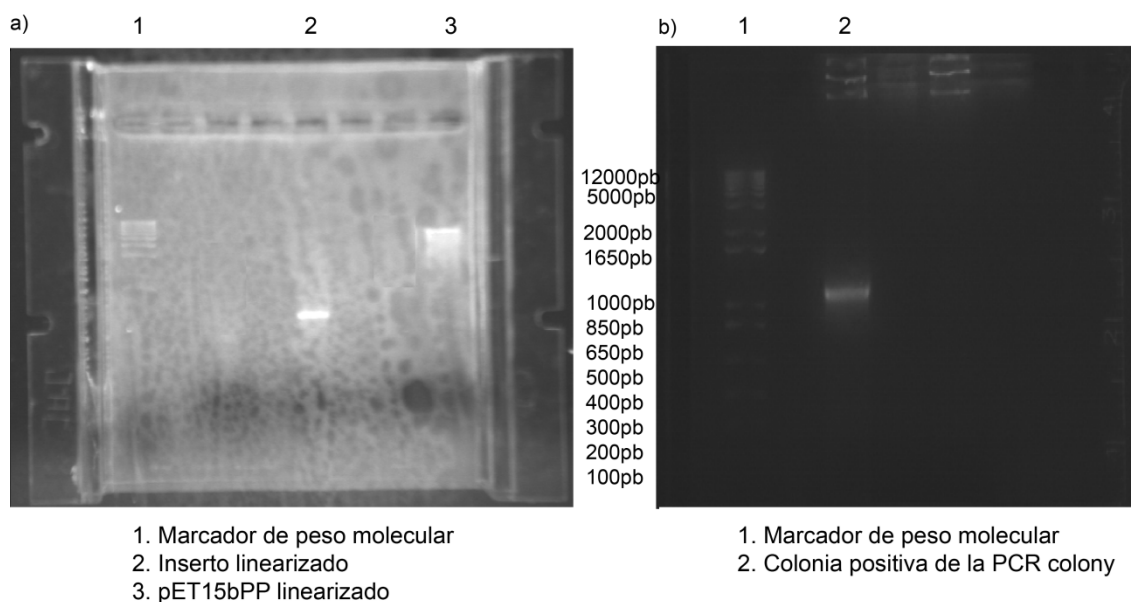


Figura 5.6. Geles de agarosa del clonaje pET15bPP-*PfChoK*. **a)** Purificación de la digestión de pET15bPP y el inserto de *PfChoK*. **b)** Colonia positiva tras ligación (contiene plásmido final pET15bPP-*PfChoK*).

5.3.2.2. Expresión de *PfChoK*

El plásmido pET15bPP-*PfChoK* se transformó en la cepa Arctic Express (DE3) RP, las cuales se crecieron durante una noche en medio Super Broth (32 g/L triptona, 20 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl ph 7,5) con 100 µg/ml de ampicilina. A continuación, las células se inocularon en el cultivo y se dejaron crecer a 30°C hasta alcanzar una absorbancia de 1,2 a 600 nm, después de lo cual se indujo la expresión de la proteína con 1 mM de IPTG a 12,5°C durante 2 horas sin agitación. Posteriormente, los cultivos fueron incubados a 12,5°C durante 72 horas a 180 rpm. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron mediante centrifugación a 3480 g durante 30 min y el sedimento celular en caso de no ser utilizado inmediatamente, se congela a -20°C.

5.3.2.3. Purificación de *PfChoK*

El sedimento celular recogido en la etapa anterior, se resuspendió en tampón A (20 mM fosfato, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,4), conteniendo lisozima (1 mg/ml), DNAsa (0,1 mg/ml) e inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Las células se

rompieron mediante sonicación y se centrifugaron a 19500 rpm a 4°C durante 30 minutos.

El sobrenadante se aplicó en una columna de 1 x 5 ml de cobalto HP (GE Healthcare) previamente equilibrada con el tampón A. La columna se lavó con dicho tampón y la proteína de fusión se eluyó con tampón B (20 mM fosfato, 500 mM NaCl, 500 mM de imidazol, pH 7,4).

A continuación, la proteína eluída se dializó con el tampón de corte de la TEV (50 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM DTT pH 8,0) y posteriormente, se mantuvo en contacto una noche con la proteasa (TEV, GE Healthcare) a 4°C en una proporción de 0,5 mg TEV/10 mg proteína (**Figura 5.7**).

Luego, la TEV se eliminó mediante una columna de cobalto y la proteína que no se unió, se dializó en tampón C (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl pH 7,5). Finalmente, se purificó por cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 75 XK26/60 (GE Healthcare) previamente equilibrada con dos volúmenes de tampón C (**Figura 5.7**).

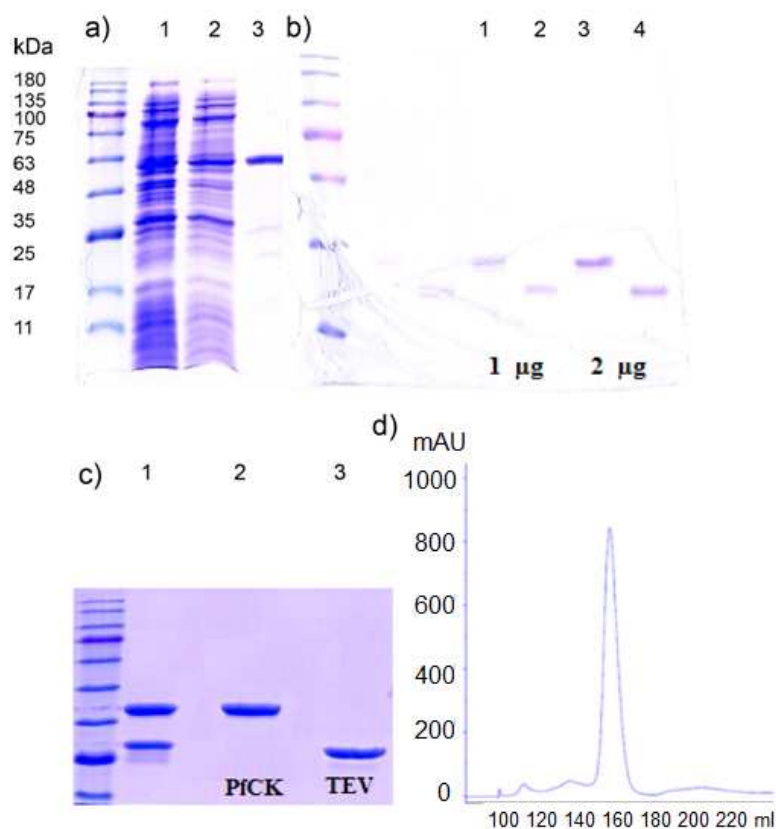


Figura 5.7. Seguimiento del proceso de purificación de *PfChoK*. **a)** Columna de cobalto; 1, Fracción no retenida; 2, Lavado; 3, Eluído (PfChoK+ His); **b)** Corte con TEV; 1 y 3, antes del corte; 2 y

4, después del corte; c) Segunda columna de cobalto; 1, antes de inyectar; 2, Fracción no retenida y lavado; 3, eluído; d) Columna de exclusión molecular.

La concentración de la enzima se determinó espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción molar a 280 nm de $1,622 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ y se almacenó a 20 mg/ml a -80°C hasta ser usada en los experimentos biofísicos posteriores.

5.3.3. Clonaje, expresión y purificación de CpChoK

5.3.3.1. Clonaje de CpChoK

La secuencia de DNA que codifica para los aminoácidos 50-424 de CpChoK fue también sintetizada y optimizada por GenScript para ser expresada en *E.coli*. Esta construcción se digirió con *EcoRI* y *SalI* y se clonó en pMALC2x conteniendo en el extremo N-terminal de CpChoK una cola de histidina, otra Strep-tag y un sitio de corte para la proteasa de precisión, resultando en el plásmido de expresión final pMALC2xPP-CpChoK.

Observar a continuación el extremo N-terminal de CpChoK con la cola de histidinas en cursiva, la Strep-tag subrayada y el sitio de corte para la proteasa de precisión en negrita.

“-GSSHHHHHHHHHHSSGGSAWSH**PQFEK**GG**S**LEVLFQ**G**PGS-“

Al igual que en los casos anteriores, el plásmido fue verificado mediante secuenciación (**Figura 5.8**).

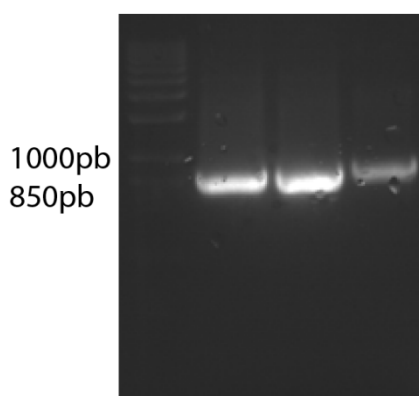


Figura 5.8. Colonias positivas del clonaje pMALC2xPP-CpChoK procedentes de la PCR en colonia.

5.3.3.2. Expresión de CpChoK

El plásmido pMALC2xPP-CpChoK se transformó en la cepa BL21 (DE3) Star. Las células se crecieron durante una noche en medio 2XYT con 100 µg/ml de ampicilina y posteriormente se inocularon en el medio de cultivo a 37°C hasta alcanzar una absorbancia de 0,8 a 600 nm, después de lo cual la expresión de la proteína se indujo con 1 mM IPTG a 18°C durante 24 horas a 180 rpm. Finalmente, las células se recogieron mediante centrifugación a 3480 g durante 30 minutos y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.3.3.3. Purificación de CpChoK

El sedimento celular se resuspendió en tampón A (25mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5), conteniendo lisozima (1 mg/ml), DNAsa (0,1 mg/ml) e inhibidores de proteasas. Las células se rompieron mediante sonicación y se centrifugaron a 19500 rpm a 4°C durante 30 minutos.

Los sobrenadantes se aplicaron en una columna de cobalto HP (GE Healthcare) de 5 ml previamente equilibrada con el tampón A. La columna se lavó con este mismo tampón, el cual suplementado con 500 mM de imidazol, también sirvió para eluir las proteínas de fusión (**Figura 5.9**).

A continuación, al eluido se le eliminó el exceso de imidazol con una columna para intercambio de tampones donde nuevamente se usó el tampón A. Posteriormente, se mantuvo en contacto durante una noche a 4°C con la proteasa de precisión en una proporción de 1 mg PP/5 mg proteína.

CpChoK fue finalmente obtenida en el eluido de una columna HiTrap blue usando el tampón A con 2.5 M de NaCl (**Figura 5.9**). Para eliminar el exceso de sal, se usó nuevamente una columna para intercambio de tampones.

Por último, se utilizó una columna de exclusión molecular Superdex 75 XK26/60 para seleccionar exclusivamente las formas monoméricas de la enzima (**Figura 5.9**) y se cuantificó espectrofotométricamente la cantidad de proteína usando un coeficiente de extinción molar a 280 nm de 1,205 mg⁻¹ ml cm⁻¹. CpChoK se concentró hasta 20 mg/ml y se almacenó a -80°C hasta ser usada en los experimentos biofísicos posteriores.

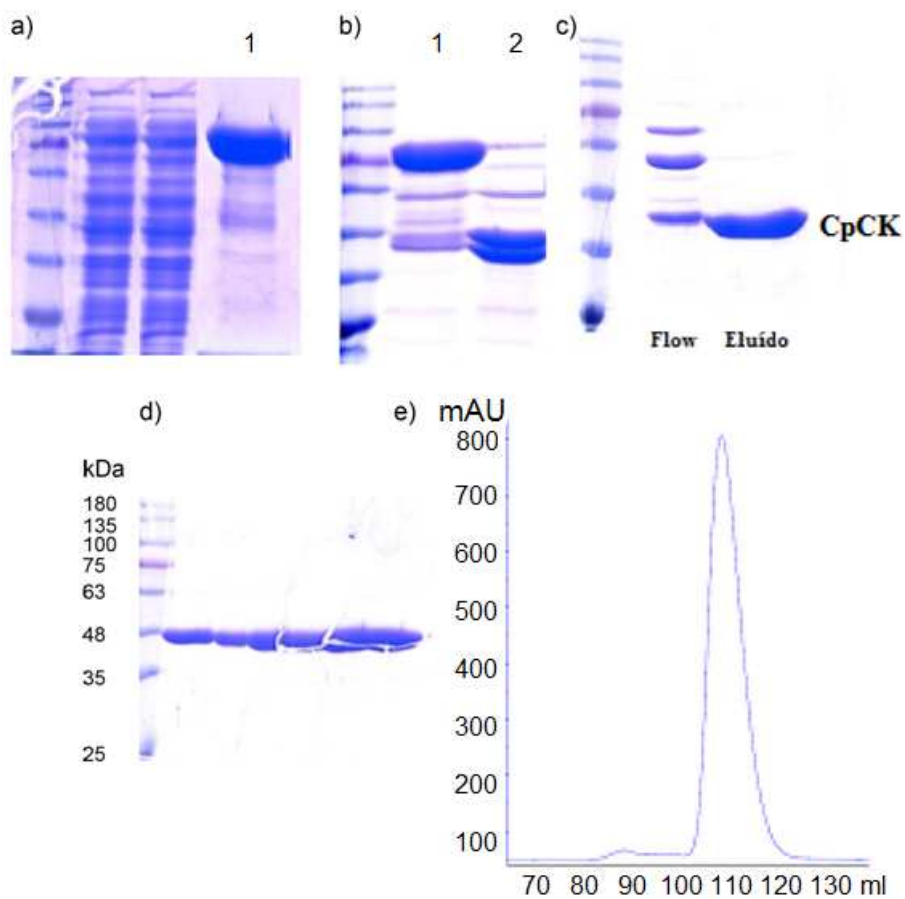


Figura 5.9. Seguimiento del proceso de purificación de *CpChoK*. **a)** Columna de cobalto; 1, *CpChoK* + MBP **b)** Corte; 1, antes; 2, después; **c)** HiTrap Blue; **d)** Filtración en gel (gel SDS); **e)** Cromatograma Filtración en gel.

5.4. Ensayos de afinidad proteína-inhibidor: espectroscopía de fluorescencia de triptófanos

Los experimentos de fluorescencia, al igual que el clonaje, la expresión y la purificación de las cuatro proteínas se realizaron en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos de la Universidad de Zaragoza, bajo la supervisión del investigador D. Ramón Hurtado Guerrero. Frente a *HsChoK α 1* y *PfChoK* se ensayaron todos los compuestos del cribado virtual, de las familias **A**, **B** y los representantes de las subfamilias **C** con la amina terciaria de menor y mayor número de carbonos. En el caso de *HsChoK β* se ensayaron los compuestos más afines por la proteína *HsChoK α 1*. Por su parte, frente a *CpChoK* sólo se ensayó el compuesto de cada subfamilia C que había demostrado tener una mayor afinidad por *HsChoK α 1* y *PfChoK*. A continuación, una vez demostrada la unión a sus dianas, se realizaron los estudios de actividad inhibitoria y antiproliferativa.

Para llevar a cabo los ensayos de fluorescencia, primero se prepararon disoluciones stock de todos los compuestos a máxima concentración en el disolvente donde eran solubles, es decir, DMSO al 100 % (SIGMA-ALDRICH®). A partir de esta disolución, se obtuvo otra menos concentrada del compuesto en el mismo tampón donde se hallaba la proteína (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl pH 7,5). La concentración que se eligió en esta última disolución dependía de la afinidad que mostraba el compuesto por la proteína, de tal manera que cuanto mayor era, menor debería ser la concentración. De este modo, para todos los compuestos a excepción de los del cribado virtual, la concentración elegida fue de 100 μ M. A partir de esta disolución, se cogieron alícuotas de volumen creciente que se fueron añadiendo a la cubeta de cuarzo donde estaba contenida la proteína a lo largo de todo el experimento. Por su parte, la concentración inicial de las proteínas en el experimento fue de 1 μ M.

Las K_{ds} frente a *HsChoK α 1*, *HsChoK β* , *PfChoK* y *CpChoK* se midieron mediante la monitorización de la extinción (quenching) de la señal de fluorescencia emitida por los triptófanos de las proteínas. Todos los experimentos fueron realizados en un espectrofluorímetro Cary Eclipse⁸⁷ a 25°C con las enzimas a 1 μ M, y concentraciones de los compuestos variando de 0,025 a 300 μ M para *HsChoK α 1*, de 0,025 a 500 μ M para *HsChoK β* , de 0,025 a 300 μ M para *PfChoK* y de 0,050 a 60 μ M para *CpChoK*, en 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5. Los espectros de emisión de fluorescencia se grabaron en el rango de los 300-400 nm con una longitud de onda de excitación de 280

nm y una anchura de celda de 5 nm. De forma paralela se realizaron controles en los que se incubaron las enzimas con las cantidades equivalentes de DMSO que se habían usado en cada experimento. El análisis de los datos se llevó a cabo Prism (GraphPad software) considerando un modelo de un solo sitio de unión (**Ecuación 1**), donde F_0 es la fluorescencia intrínseca de la enzima en ausencia del compuesto (Q), F_1 es la fluorescencia observada a una concentración dada de compuesto, f_a es el grado fraccional de la fluorescencia, y K_d es la constante de disociación.

Ecuación 1.

$$1 - \frac{F_1}{F_0} = f_a \times \frac{[Q]}{K_d + [Q]}$$

5.5. Análisis estructural mediante cristalografía de Rayos X

La cristalización de los compuestos que mostraron una mayor afinidad por la ChoK en las tres homólogas donde fueron ensayados (*HsChoK α 1*, *PfChoK*, *CpChoK*) también se llevó a cabo en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos. A pesar de los numerosos intentos para obtener cristales en las tres especies, únicamente se obtuvieron resultados favorables en el caso de la *HsChoK α 1*. Entre las estrategias infructuosas a las que se recurrió para intentar conseguir cristales en *PfChoK*, destacan el empleo de un mayor número de disoluciones comerciales, su purificación en el menor tiempo posible para tratar de evitar su envejecimiento y la cristalización de otra ChoK perteneciente a una especie del mismo género, concretamente *Plasmodium knowlesi* (*PkChoK*).

5.5.1. Condiciones de cristalización

Para llevar a cabo el proceso de cristalización es necesario partir de una disolución de la proteína objetivo en el tampón donde sea más estable y de otra disolución del compuesto en el disolvente donde esté totalmente disuelto a la máxima concentración posible. A continuación, se elige el método de cristalización que haya demostrado una mayor eficacia para esa proteína u otras de la misma familia (gota sentada, gota colgante, diálisis, difusión en gel,...) se incuba durante un cierto tiempo la proteína con el compuesto a la máxima concentración posible sin que se observe la formación de precipitados (supersaturación), y se usan disoluciones comerciales de disoluciones (disolución madre) para identificar condiciones en las que se formen los primeros estados cristalinos. Estas disoluciones madre incluyen agentes precipitantes (sales, como sulfato de amonio o citratos; disolventes orgánicos, como el 2-metil-2,4-pentanediol (MPD); y polímeros, como los polietilenglicoles de distinto peso molecular: PEG3350, el PEG5000...), búferes (acetato de sodio, TRIS, MES, HEPES) y sustancias auxiliares (mercaptoetanol, glutatión, espermina,...). Hay que puntualizar que aunque normalmente la concentración de compuesto que se pone en contacto con la proteína es saturante, dicha concentración dependerá de la afinidad que el compuesto tenga por su diana. De esta forma, se necesitarán mayores concentraciones cuanto menor sea la afinidad. Posteriormente, se procede a mejorar el empaquetamiento y el tamaño de los primeros cristales mediante la modificación de todas las variables iniciales (concentración de proteína, de agente precipitante, de sales y variaciones de

pH), y por último, si es necesario, se recurre al uso de aditivos para conseguir cristales bien formados, individuales y de tamaño adecuado para poder ser procesados en el difractor de rayos X.

En nuestro caso, todos los experimentos de cristalización *de HsChoK α 1* junto con los compuestos más solubles y afines, tanto del cribado virtual como de los sintetizados, se realizaron por co-cristalización o soaking usando el método de la gota sentada, en placas de 96 pocillos (Jena Bioscience). Todos los compuestos, a excepción del AMPPNP, la colina y el Mg²⁺ (solubles en agua) se disolvieron en DMSO para preparar soluciones stock a concentración máxima (ver **Tabla 5.3**). La concentración de la disolución stock de la proteína en su tampón (25 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) fue de 20 mg/ml en todos los casos a excepción de cuando se cristalizó con el compuesto 5217714, que se usó a 11,6 mg/ml.

Tabla 5.3. Stock de las disoluciones de compuesto de partida.

compuesto	disolvente	[compuesto]
A.2	DMSO	500
B.2		500
C.2.1		400
C.3.1		400
C.3.2		400
5217714		400

En una primera etapa, la disolución de la proteína y del compuesto a supersaturación se incubó durante 45 minutos en hielo y a continuación, se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos para eliminar los restos de precipitado. La concentración final de DMSO en la mezcla (cuando éste era el disolvente del compuesto) fue de un 5% como máximo. Posteriormente, se utilizaron cuatro kits de disoluciones de cristalización comerciales como condiciones de partida para todos los experimentos: PEG/Salt, JCSG, Classic I y Basic (Jena Bioscience) y en cada pocillo de la placa se combinaron volúmenes equivalentes (0.5 μ l) de solución de proteína-compuesto y de solución madre. Luego, las placas se almacenaron en un aparato **Rock Imager** (Formulatrix), donde se realizó un seguimiento del crecimiento de los cristales a 18°C.

Una vez seleccionada la mejor condición de cristalización para cada compuesto, en algunos casos fue necesario mejorar las condiciones del screening inicial e incluso, realizar un cribado de aditivos en la última fase del proceso. En la mejora, se variaron

las concentraciones de los precipitantes y el pH, mientras que cuando se hizo el cribado de aditivos, se eligió la condición óptima de la mejora y se usó una cantidad adicional de 0,25 µl de cada aditivo en el pocillo correspondiente. El kit de aditivos que se utilizó fue el Additive Screen (Hampton Research). En la **Tabla 5.4** se muestran las condiciones de cristalización para *HsChoKa1* y todos los compuestos para los que finalmente pudo obtenerse su estructura.

Tabla 5.4. Condiciones finales que resultaron óptimas para el crecimiento de los cristales.

compuesto	[compuesto]	[proteína]	disolución de cristalización	soaking
C.3.1	7,5 mM	20 mg/ml	21% PEG10000 0,1M BIS-TRIS pH 5,5 0,1 M acetato amonio	1 día con compuesto a 30 mM disuelto en DMSO
5217714	7,5 mM	11,6 mg/ml	18 % PEG5000mme 0,2M acetato Ca ²⁺ 0,1 M HEPES pH 8,5 1M hidrocloreuro de guanidina	-
C.2.1	25 mM	20 mg/ml	22%PEG3350 0,4 M NaSCN	-
C.3.2	7,5 mM	20 mg/ml	12%PEG3350 0,2 M acet, Amonio 0,1 M BIS-TRIS pH 5,5 0,1 M hidrocloreuro de betaina	-
B.2	30 mM	20 mg/ml	20% PEG3350 0,2 M nitrato Mg ²⁺	-
A.1	25 mM	20 mg/ml	18% PEG3350 0,1M KCl	-

Una vez que los cristales se mejoraron al máximo, siendo únicos y de tamaño adecuado, se crioprotégieron en la disolución donde crecieron suplementada con un 20 % de etilenglicol y se congelaron con nitrógeno gas a 100 K. Posteriormente, se almacenaron en un dewar en un ambiente saturado de nitrógeno líquido hasta la recogida de los datos de difracción en las instalaciones de los sincrotrones Diamond (Oxford)¹⁷⁵ o Alba (Barcelona) .¹⁷⁶

5.5.2. Determinación de las estructuras cristalográficas por difracción de rayos-X

La estructura de los complejos binarios se resolvió por reemplazamiento molecular usando como patrón el cristal de PDB ID: **3G15**. Las fases iniciales se mejoraron en ciclos sucesivos de construcción manual y refinado en Coot¹⁷⁷ y en REFMAC5,¹⁷⁸ respectivamente. Las moléculas de agua fueron incluidas en cada modelo usando CCP4¹⁷⁹ y la topología de los ligandos se obtuvo mediante el programa PRODRG.¹⁸⁰ Finalmente, se realizó la validación de cada estructura resuelta con PROCHECK.^{181,182}

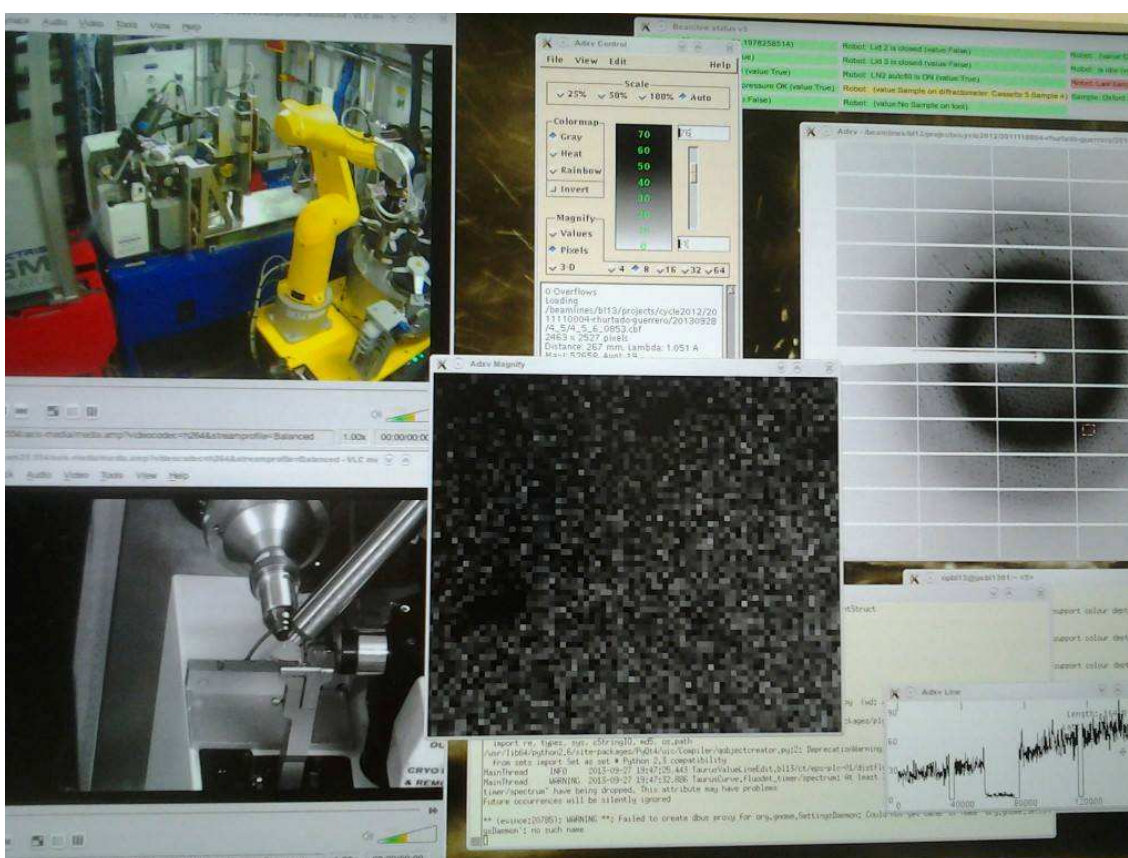


Figura 5.10. Sincrotrón Diamond. A la derecha, el difractor. A la izquierda, patrón de difracción de uno de los cristales.

5.6. Ensayos biológicos

5.6.1. Ensayos de inhibición de la actividad de ChoK

En el caso de la *HsChoK*, los ensayos de inhibición de su actividad, se llevaron a cabo mediante dos métodos. En el primero, se determinó para todos los compuestos el porcentaje de inhibición de la enzima presente en un homogeneizado de células HepG2 (sección 5.6.1.1) frente a dos concentraciones de 10 y 50 μM de inhibidor (sección 5.6.1.2). En el segundo, se utilizó únicamente la isoforma *HsChoK α 1* aislada (apartado 5.3.1) y se determinó la CI_{50} únicamente para los representantes más activos de las familias A, B y C (sección 5.6.1.3).

5.6.1.1 Cultivo celular de HepG2

La línea celular de hepatoma humano HepG2, designada con la referencia HB-8065 en la ATCC (American Type Of Culture Collection), fue adquirida a través de la European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, UK). Las células se cultivaron en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM; proveedor: Sigma-Aldrich (Madrid, España)) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal inactivado mediante calor (FBS; proveedor: The Cell Culture Company (Pasching, Austria)), 2 mM L-glutamina, 1 % aminoácidos no esenciales, 100 U/ml penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ estreptomycin. Las células se crecieron en una atmósfera humedecida con un contenido de un 5 % de CO_2 a 37°C, y se sembraron en ratio 1:10 ratio una vez a la semana.

5.6.1.2 Obtención de *HsChoK* a partir de células HepG2

La enzima ChoK se obtuvo a partir de la línea celular HepG2 mediante el método descrito por Jiménez-López y col.¹⁸³ con pequeñas modificaciones. Para ello, las células se sembraron en placas de 6 pocillos (proveedor: NuncTM (Langensfeld, Germany)) y se mantuvieron en MEM suplementado con 10 % FBS hasta confluencia. Después, las células se despegaron de la placa de cultivo en frío con una solución 275 mM Tris-HCl (pH 8,5). La suspensión obtenida se sonicó a 50 W durante 3 segundos en un baño de hielo y el homogeneizado celular se centrifugó a 12.000 g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido, se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso.

5.6.1.3 Ensayo de la actividad enzimática de *HsChoK* en el homogeneizado de HepG2

La actividad enzimática de ChoK se determinó en la fracción citosólica obtenida previamente mediante la determinación del nivel de incorporación de ^{14}C desde la [metil- ^{14}C]colina (proveedor: Perkin Elmer (Massachusetts, USA)) hasta la PCho en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de inhibidor.

La mezcla final de reacción contenía 50 μg de proteína citosólica, 10 mM MgCl_2 , 10 mM de ATP y 100 mM Tris-HCl (pH 8,5). Tras preincubar las muestras a 37°C durante 5 minutos, la reacción enzimática se inició con la adición de 1 mM [metil- ^{14}C]colina (4500 dpm/nmol), siendo el volumen final de reacción de 55 μl . Se incubó durante 20 minutos a la misma temperatura, y la reacción se detuvo por inmersión de los tubos en un baño de agua a 100°C durante 3 minutos. El precipitado proteico se eliminó mediante centrifugación a 12.000 g durante 3 minutos. Alícuotas de 25 μl del sobrenadante se aplicaron en el origen de placas de Silica Gel (proveedor: Analtech (Newark, DE, USA)) en presencia de fosfocolina (0,1 mg) y colina (0,1 mg) como portadores. La cromatografía se desarrolló en 0,6 % metanol /NaCl/28 % NH_4OH en agua (50:50:5, v/v/v). La PCho fue identificada mediante el uso de un patrón que se desarrolló simultáneamente con las muestras. Las bandas correspondientes a PCho se rasparon y se transfirieron a viales de centelleo, donde se les añadió 3 ml de líquido de centelleo (Cocktail Biogreen 3, Sharlab). Los viales se agitaron vigorosamente y se dispusieron en un contador de centelleo líquido (Beckman 6000-TA, Madrid, España), determinándose el contenido de ^{14}C en cada una de las muestras.

Los valores de CI_{50} para los inhibidores más activos (en términos de porcentaje de inhibición) se determinaron a partir del porcentaje de actividad de la enzima a diferentes concentraciones de los compuestos usando una curva sigmoideal dosis-respuesta (ED50plus v1.0 software).

5.6.1.4 Ensayo de actividad enzimática de *HsChoK* recombinante

El efecto de los compuestos seleccionados se ensayó en la enzima *HsChoK* $\alpha 1$ purificada para determinar los valores de CI_{50} . En cada experimento se llevaron a cabo paralelamente ensayos con DMSO como control. El DMSO nunca excedió una concentración de 0,1 % para evitar la inhibición inespecífica de ChoK.

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo indicado previamente en el apartado 5.6.1.2, aunque con pequeñas

modificaciones. Concretamente, la mezcla de reacción era la misma a excepción de que se añadieron cantidades distintas de enzima pura en función de su actividad basal (20 ng de *HsChoKα1*, 2,4 μg de *PfChoK* y 1,2 μg de *CpChoK*). Además, la reacción transcurrió sólo durante 10 minutos.

Además, en este caso se determinaron las K_{is} para ciertos compuestos frente a las enzimas *HsChoKα1* y *PfChoK*. Para ello, se utilizó la ecuación de Cheng-Prusoff para inhibidores competitivos (**Ecuación 2**).

Ecuación 2.

$$K_i = \frac{CI50}{1 + [S]/K_m}$$

[S]: 1 mM colina

K_m (*HsChoKα1* para colina): 200 μM³¹

K_m (*PfChoK* para colina): 22 μM¹³⁴

5.6.2 Ensayos de inhibición de la proliferación celular en las líneas tumorales HepG2, A549, HT29, HCT116, MCF7 y Jurkat

En los ensayos de inhibición de la proliferación celular se usaron las líneas celulares HepG2, A549 (adenocarcinoma de pulmón), HT29 y HCT116 (adenocarcinoma colorrectal), MCF7 (adenocarcinoma de mama) y Jurkat (leucemia aguda de células T). Sobre HepG2 se realizó un primer cribado de la actividad antiproliferativa de todos los compuestos sintetizados en la presente Tesis Doctoral, mientras que las restantes líneas celulares fueron empleadas para estudiar el efecto de únicamente los inhibidores que demostraron una mayor potencia antiproliferativa o toxicidad sobre HepG2.

Los ensayos en HepG2 han sido llevados a cabo por el grupo de la Doctora Dña. Carmen Marco de la Calle en el Departamento de Bioquímica y Biología Celular de la Universidad de Granada.¹⁸⁴

Por su parte, los ensayos realizados con las líneas celulares A549, HT29, HCT116, MCF7 y Jurkat se han realizado por el Doctor D. Julián Pardo Jimeno en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA).¹⁸⁵

Las células HepG2, A549, HT29, HCT116 y MCF7 fueron cultivadas como se indica en el **apartado 5.6.1.1**. Por su parte, las células de la línea tumoral Jurkat se cultivaron en las mismas condiciones de CO₂ y temperatura que las anteriores, pero en medio RPMI1640 suplementado con 5 % (v/v) de FBS, 1 % de Glutamax y un 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina).

Para medir el efecto antiproliferativo de los distintos compuestos sobre la línea tumoral HepG2, las células fueron sembradas por triplicado en placas de 96 pocillos (10000 células/pocillo) y mantenidas en MEM suplementado con 10 % FBS durante 24 h en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de los distintos inhibidores disueltos en DMSO. En cada experimento se realizaron controles en paralelo con DMSO. El DMSO nunca superó la concentración de 0,3 % para evitar la lisis celular. Posteriormente, el efecto se midió con la tinción de cristal violeta usando una curva estándar. Para hacer este ensayo, se eliminó el medio y las células se fijaron con 100 µl de una solución de glutaraldehído al 1,1 %. Posteriormente, fueron lavadas ocho veces con agua ultrapura, se dejaron secar y se tiñeron con 200 µl de una solución 0,1 % de cristal violeta disuelto en agua. Tras eliminar el colorante, las células fueron lavadas de nuevo con abundante agua desionizada. Las muestras se secaron y después el colorante se solubilizó en 100 µl de ácido acético al 10 %. La absorbancia del cristal violeta en cada pocillo se midió a una longitud de onda de 590 nm usando un lector de placas. Los resultados de absorbancia obtenidos se transformaron en número de células, utilizando para ello los datos de una placa patrón donde se sembraron diferentes cantidades de células. Finalmente, los valores de CE₅₀ fue determinada con curvas dosis-respuesta de acuerdo al ratio de inhibición para cada concentración usando el software ED50plus v1.0.

Por otro lado, para llevar a cabo los experimentos con las líneas celulares A549, HT29, HCT116, MCF7 y Jurkat, únicamente las células con una viabilidad superior al 90 % se incubaron en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de inhibidores de ChoK. Un total de 10000 células/pocillo se incubaron durante 24 ó 48 horas con diferentes concentraciones (25, 8,33, 2,78 y 0,93 µM) de los compuestos que mostraron mayor actividad antiproliferativa sobre HepG2 hasta un volumen final de 100 µl. Posteriormente, la viabilidad celular se evaluó usando el ensayo de MTT de acuerdo al método descrito por Pardo y col. en 2001.¹⁸⁶ Cada experimento se llevó a cabo simultáneamente en tres pocillos y se repitió al menos tres veces. Las concentraciones finales de DMSO se mantuvieron por debajo del 0.1 % en todos los casos. Los valores

de CE_{50} se obtuvo mediante un análisis de regresión lineal en una curva dosis-respuesta usando el software ED50plus v1.0.

5.6.3 Actividad antimalárica

5.6.3.1. Eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum*

Los parásitos de *Plasmodium falciparum* 3D7 se cultivaron en eritrocitos humanos suspendidos a un 5 % de hematocrito en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 2 % de suero humano, 0,2 % de NaHCO₃, 0,5 % Albumax II, 150 μM de hipoxantina y 12,5 μg/mL de gentamicina. Los frascos de cultivo fueron incubados a 37 °C, con un 5 % de CO₂ y un 95% de aire. Los eritrocitos empleados son eritrocitos humanos O⁺, obtenidos del Centro Regional de Transfusión Sanguínea-SAS.

El cultivo anterior se sincronizó con un 5 % de sorbitol y tras 96 horas, los parásitos se encontraban en su mayoría en la fase de anillo tardío y trofozoítos inmaduros. El cultivo fue diluido con medio completo y eritrocitos no parasitados hasta un 5% de hematocrito y una parasitemia del 0,5 %.

Se prepararon soluciones stock de los compuestos a una concentración de 100 mg/mL en DMSO al 99 %. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas en medio completo y se dispusieron en placas de 96 pocillos con un rango de concentración entre 0,0002 a 30 μM. El volumen final del pocillo fue de 100 μL para los ensayos de fluorescencia y una concentración final de DMSO ≤ 0.001%.

Los compuestos en DMSO fueron evaluados por triplicado. Cada placa contenía 3 pocillos como control negativo (sin compuesto) y 3 pocillos como control positivo con 80 nM cloroquina (CI₅₀ = 0,010 μM).

El ensayo de inhibición del crecimiento parasitario y la CI₅₀ fueron determinadas según el método descrito por Smilkstein y col.¹⁴⁹ empleando SYBR Green I.

Después de 72 horas de crecimiento, las placas se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis. Para los ensayos de fluorescencia, 100 μl de SYBYR Green I en tampón de lisis se adicionó a cada pocillo y el contenido se agitó hasta que no quedó ningún sedimento visible de eritrocitos. Tras una hora de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, la fluorescencia se midió con lector de placas de fluorescencia (SpectraMax Gemini EM) a una longitud de onda de excitación de 485 y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

Para el cálculo de los valores de CI₅₀ se representaron los datos de fluorescencia frente al logaritmo de la concentración de cada compuesto y se empleó un ajuste no lineal de la curva de regresión (software Sigma Plot).

5.6.3.2. Estudios de citotoxicidad

Células L6 (línea celular primaria derivada de mioblastos de ratón) se sembraron en placas de 96 pocillos (50000 células/pocillo) usando 100 μ l de medio RPMI 1640 suplementado con 1 % L-glutamina (200 mM) y 10 % FBS durante 3 h. Posteriormente, fueron incubadas durante 72 h con diluciones seriadas del inhibidor (10-0.01 μ g/ml). Al mismo tiempo, se pusieron controles con DMSO. A continuación, las placas se incubaron durante 2 h a 37°C con 10 μ l de solución Alamar Blue. Finalmente, la señal de fluorescencia se midió en un fluorímetro Spectramax Gemini EM a una longitud de onda de excitación y emisión de 536 nm y 588 nm, respectivamente. La determinación de los valores de CT_{50} se llevó a cabo representando la señal de fluorescencia frente la concentración de inhibidor.

6. SUMMARY

6. SUMMARY

1.- Introduction

Cancer and malaria are two prevalent diseases that are responsible for millions of deaths worldwide. The lack of effective and safe therapies for treating cancer and the growing resistances to antimalarial, make the finding of new drugs a primary urgency.

The discovery of new targets with an essential role in both diseases is a valid approach for getting this goal, and in this regard, Choline Kinase (ChoK) represents an example. ChoK is a cytosolic enzyme of eukaryotic and some prokaryotic cells, which is involved in the Kennedy pathway, whose goal is the *de novo* biosynthesis of phosphatidilcholine (PC) from choline (Cho). PC is the most abundant phospholipid in cell membranes and also behaves as a second messenger, so it is involved in cell proliferation.

ChoK catalyzes the first step in the Kennedy pathway, which is the transformation of Cho to phosphocholine (PCho) in the presence ATP and Mg^{2+} . Therefore, an overstimulation or hyperactivation of ChoK leads to an increase of PCho levels that has been associated with uncontrolled cell proliferation in human cancers.

In mammals, ChoK exists in three isoforms (ChoK α 1, α 2 y β) that are active in the dimeric (homo- or hetero-dimers) or tetrameric forms. Nevertheless, only the α -isoforms have been associated with several types of human tumours where *ras* or *rhoa* oncogenes have been mutated (bladder, prostate, lung, breast and ovarian).

On the other hand, ChoK is also an essential enzyme in the Kennedy pathway of some parasites, such us malaria where it has been demonstrated that PC together with

phosphatidylethanolamine (PE), are the most abundant phospholipids in cell membranes. Nevertheless, in contradistinction to mammals, ChoK is monomeric in *Plasmodium sp.*

Recently, ChoK inhibition has been proposed as an efficient antitumour and antimalarial strategy since a decrease in PC levels is responsible for apoptosis in transformed mammal cells and for death in *Plasmodium sp.* due to a stop in its growth. Contrary to what it could be thought in a trivial approach, ChoK inhibition in healthy cells does not result in undesired side effects because only a reversible stop in the cellular cycle has been observed. This is the reason why until the moment, ChoK has been used as a safe target for treating both diseases.

In recent years, many ChoK inhibitors have been synthesized for treating human cancer. The first inhibitor was Hemicholinium-3 (HC-3), which is not in clinical use due to its toxicity in the cholinergic nerve system. Nevertheless, it served as a lead compound for the development of more potent and selective ChoK inhibitors. Our group has acquired a deep experience in the synthesis of HC-3 derivatives, and the most representative compound of our research is named TCD-717. It is currently conducting Phase I clinical trials, which demonstrates the validity of ChoK inhibition strategy in the fight against cancer.

Finally, ChoK inhibition has also yielded interesting results in malaria treatment. Vial et col. designed several mono and bis-quaternary ammonium salts that demonstrated potent efficacy in both *in vitro* and *in vivo* assays against *P.falciparum*.

2.- Aims

The relevant role of ChoK in the medical clinic of cancer and malaria is the reason why the present thesis has been conducted with the next objectives:

1. Elucidate a pharmacophore model that can be used to:
2. Search new hits by Virtual Screening (VS) that are able to bind to ChoK.
3. Optimize the pharmacophore model through synthesis of new HC-3 derivatives.
4. Evaluate the biological activity of all new VS hits and synthesized compounds through tryptophan fluorescence, enzymatic inhibitory assays and antiproliferative activity determinations in several cell lines such as HepG2, A549, HCT116, Jurkat, Mia Paca and MCF7.

5. Perform crystallization studies of the compounds with the greatest affinity and inhibitory potency in order to give an explanation of their biological activity based on the interaction profile with *HsChoKα1*.
6. Compare four ChoK homologues (*HsChoKα1*, *PfChoK*, *PkChoK* and *CpChoK*) in order to find structural similarities among them.
7. Determine the antimalarial activity of some of the new synthesized compounds through *in vitro* (tryptophan fluorescence assays against *PfChoK*) and *in vivo* (infected erythrocytes) assays.

3.- Results and Discussion

3.1. Pharmacophore design

In medicinal chemistry, pharmacophore model searching constitutes a valid tool not only for the discovery of new hits with a chemical structure totally different from the compounds previously used to target an enzyme, but also for the rational design of new molecules with better *in vitro* and *in vivo* activities than the pharmacophore itself.

In this work, a set of 83 symmetric biscationic compounds previously synthesized by our research group together with the tridimensional structure of *HsChoKα1*, were used for the design of the pharmacophore model.

After several unsuccessful approaches, the attention was finally focused on the docking pose of the most active molecule of the previous set. This molecule (CHEBI 421218)⁶⁸ showed an IC₅₀ value of 0.4 μM and according to its docking pose a half of its total structure was exposed to the solvent without making interactions with the residues of the active site. Consequently, it was hypothesized that only this half (the 1-bencyl-4-(*N*-methylaniline)quinolinium fragment was important for *HsChoKα1* recognition.

After comparison of this fragment with other similar ones of the initial set, it was found that compound with CHEBI 414163⁶⁸ had the same inhibitory activity than compound 421218 in spite of including a pyridinium moiety instead of a quinolinium group in the cationic head. Therefore, the additional phenyl ring of compound 421818 did not seem to be important for the inhibition of *HsChoKα1* and for this reason it was not taken into account in the next steps.

Then, twelve pharmacophoric hypothesis were defined taking as reference the 1-bencyl-4-(*N*-methylaniline)pyridinium fragment and finally, the one constituted by 3

aromatic rings, a positive charge and an exocyclic nitrogen (RRRPN) was selected as the pharmacophore model. This hypothesis was not only able to select firstly the active molecules into the set, but also to assign the best values of fitness score to the compounds with the lowest IC₅₀ value (**Figure 6.1**).

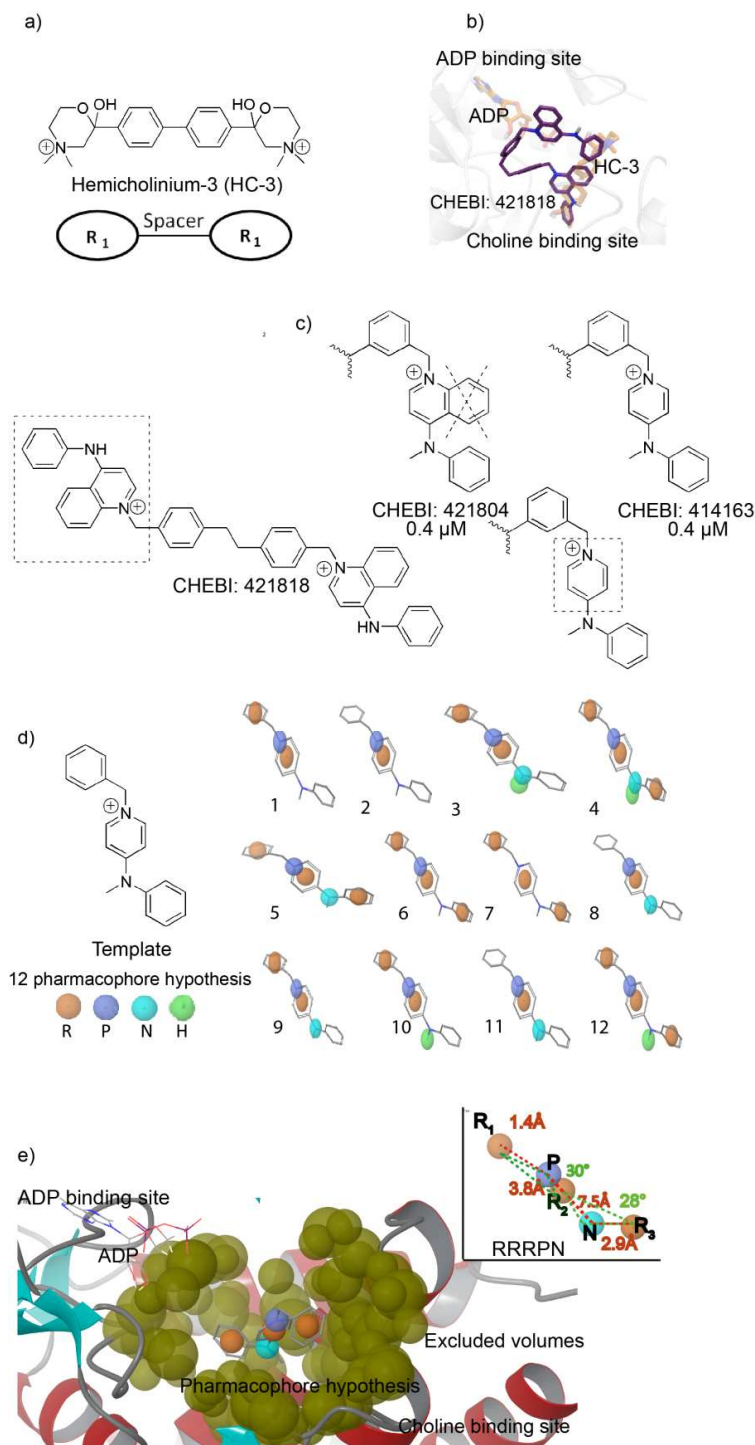


Figure 6.1. Pharmacophore hypothesis development. a) General chemical structure of the 83 Hemicholinium-3 (HC-3) derivatives that serve as starting point of the study. b) Docking pose of the compound 421818. c) Phenyl ring condensed to the pyridine not seems to be essential for the enzyme

inhibition. d) Feature combinations (R: ring, P: positive charge, N: nitrogen atom and H: hydrophobic) for finding the best hypothesis (12). e) Pharmacophore model with the signature RRRPN.

3.2. Virtual Screening and hit biological evaluation

The pharmacophore model that was designed in the first step of the research was simultaneously used to discover smaller and simpler compounds that could show binding affinity on *HsChoK α 1* and also application in the synthesis of new inhibitors.

For getting the first goal, a virtual screening protocol was carried out using three filtering steps (**Figure 6.2**). Firstly, the pharmacophore model enriched with excluded volumes derived from the binding mode of 1-bencyl-4-(*N*-methylaniline)pyridinium fragment to *HsChoK α 1* was employed to funnel the Enamine,¹⁶² Chembridge¹⁰⁴ and Life Chemicals⁹⁴ virtual compound libraries. As result, 8621 compounds were selected, but specifically compounds showing a fitness score¹⁶⁰ higher than 0.366 (it was the value that showed the most active compound that had been selected by the pharmacophoric hypothesis in its development stage) and compliant to excluded volumes were firstly selected, yielding 72 molecules. In order to further reduce the number of compounds, this set of molecules was next docked into the binding site of *HsCK α 1*. So the criterion for compound selection in the second filtering step was the Prime docking score,⁹³ so that only compounds having a score lower than -36.790 Kcal/mol were selected for further evaluations. From the resulting list of 20 compounds, only 11 of them were selected (**Figure 6.2**) in the third filtering step and purchased on the basis of their availability and pricing quotes.

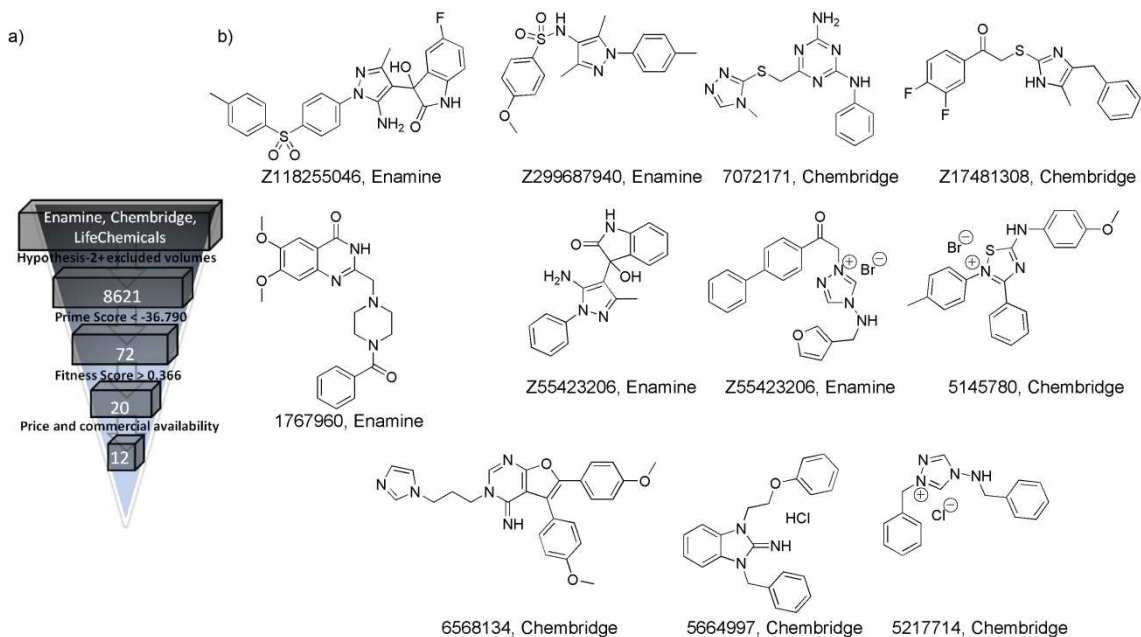


Figure 6.2. a) Hits filtering steps. b) Chemical structures of the selected compounds, and companies from which they are purchased.

The final 11 compounds were evaluated on *HsCKα1* using tryptophan fluorescence spectroscopy.¹³⁸ Of these molecules, only 6 compounds showed binding activity to the enzyme with K_{d} s from 0.44 to 7.9 μM (**Figure 6.3** and **Table 6.1**). Compound **566997** shows the best binding to the *HsChoKα1*.

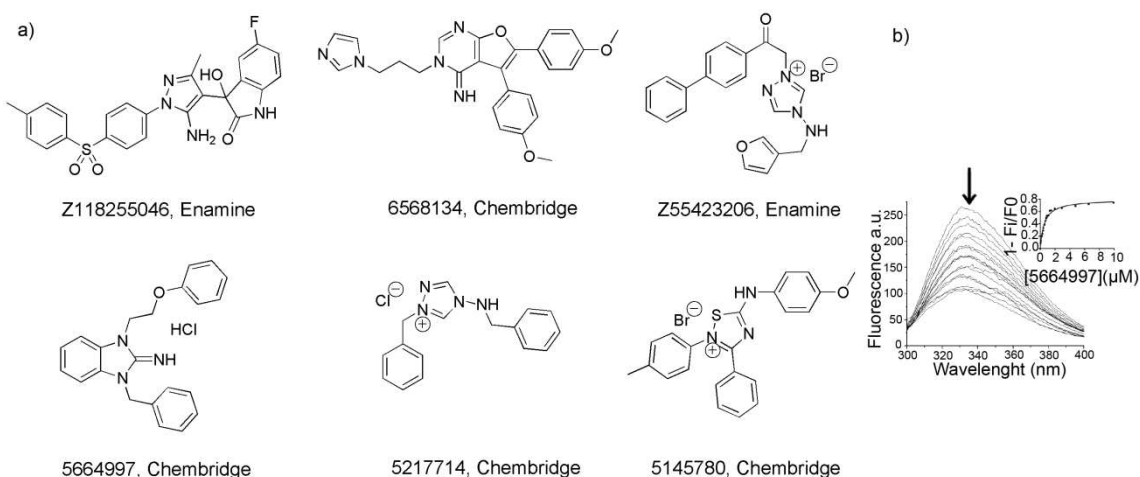


Figure 6.3. a) Compounds that showed binding to *HsCKα1* in the low μM range. b) Quenching of intrinsic *HsChoKα1* tryptophan fluorescence measured at increasing concentrations of compound **5664997**. A black arrow indicates the decrease of the maximal fluorescence signal with increasing concentrations of the compound.

Tryptophan fluorescence assays on *HsChoKβ* indicated that all the hits are 3-160 fold selective on the *HsChoKα1* over *HsChoKβ* (**Table 6.1**), which is important for avoiding negative side effects in skeletal muscle.³⁴ According to the K_d values, compounds **6568134** and **5664997** the poorest and the most selective of all, respectively (**Table 6.1**)

Another important aspect of these compounds comes from the analysis of their ligand efficiency (L.E.)¹⁸⁷ values compared to the ones previously described for the HC-3 (**Table 6.1**). According to this feature, the majority of the molecules in this study present better L.E. than HC-3 (**Table 6.1**). In particular compound **5664997** with the best K_d is the second more efficient molecule with a L.E. of -0.34 kcal/mol*atom whereas compound **5217714** despite having a moderate K_d , has a L.E. of -0.38 kcal/mol*atom, and therefore it is the more efficient molecule. A plausible explanation for the lower L.E. values found in HC-3 is that one half of the compound does not interact with the enzyme and consequently it is exposed to the solvent.

Table 6.1. K_d values of the six hits for *HsCKα1* and *HsCKβ*. All the hits are 3-160 fold selective on the *HsChoKα1* over *HsChoKβ*. Compound **566997** shows the best binding to the *HsChoKα1*, the greatest selectivity for this isoform and is also one of the compounds with the best ligand efficiency. If the hits are compared with Hemicholinium-3 (HC-3), most of them show a better value of ligand efficiency.

	<i>HsChoKα1</i>	<i>HsChoKβ</i>	<i>HsChoKα1</i>	<i>HsChoKα1</i>
Compuesto (Proveedor)	K_d (μM)	K_d (μM)	Selectivity (K_d ChoKβ) / (K_d ChoKα1)	L.E. (Kcal/mol*atom)
5664997 (Chembridge)	0.438 ± 0.1	70 ± 9	160	- 0.34
Z744582706 (Enamine)	0.526 ± 0.1	36.5 ± 3.2	69	- 0.32
5217714 (Chembridge)	2.60 ± 0.7	59.5 ± 3.7	23	- 0.38
5145780 (Chembridge)	4.14 ± 1.3	41.3 ± 7.8	10	- 0.27
6568134 (Chembridge)	7.4 ± 1.6	23 ± 0.8	3	- 0.21
Z118255046 (Enamine)	7.9 ± 0.5	68.3 ± 2.3	9	- 0.20
HC-3	0.180 ± 0.05			-0.26

HsChoK α 1 inhibition assays of the six hits showed a weak percentage of inhibition when a compound concentration of 50 μ M was used (**Table 6.2**).

Table 6.2. *HsChoK α 1* inhibition and antiproliferative activity in **HepG2** cell line of the 6 hits. Both assays were developed with a concentration of 50 μ M of each compound.

Compound (Supplier)	<i>HsChoKα1</i> inhibition (%)	HepG2 antiproliferative activity (%)	EC ₅₀ (μ M)
5664997 (Chembridge)	23.25 \pm 5.27	Tóxico	
Z744582706 (Enamine)	18.85 \pm 3.15	47.43 \pm 0.70	74.27 \pm 4.71
5217714 (Chembridge)	15.24 \pm 4.75	nd	nd
5145780 (Chembridge)	40.58 \pm 0.21	48.05 \pm 4.63	72.88 \pm 8.41
6568134 (Chembridge)	11.71 \pm 3.92	37.80 \pm 2.00	88.78 \pm 11.27
Z118255046 (Enamine)	nd	nd	nd
nd: non detectable; the compound did not show any effect.			

Though the docking studies clearly suggested that the compounds bound to the choline-binding site (**Figure 6.4**), it was a disagreement between the K_d values (**Table 6.1**) and the inhibition prolife on *HsChoK α 1* (**Table 6.2**). In order to have more convincing data, we further carried out crystallization experiments with all the positive hits to check the binding of the compounds to the active site.

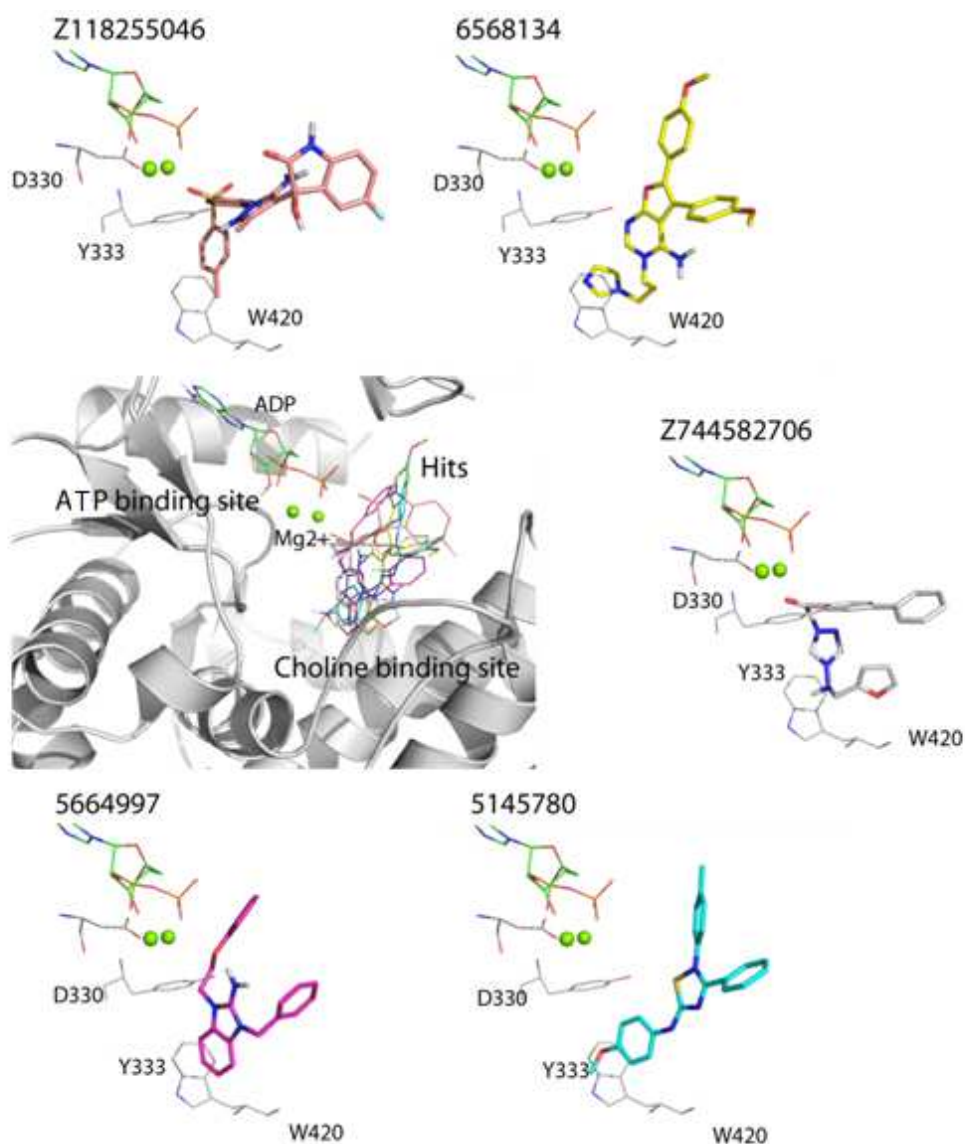


Figure 6.4. Docking pose of the hits that showed a K_d in the low μM range. According to the result, all of them seem to bind to the choline binding pocket.

Despite of a large number of trials we only managed to get the crystal structure of *HsChoKα1* in complex with compound **5217714** (Figure 6.5) at 2.25 Å. After successive refinement cycles we produced a final model with good refinement statistics ($R = 0.224$, $R_{\text{free}} = 0.268$) where strikingly two molecules of the compound were bound to the active site.

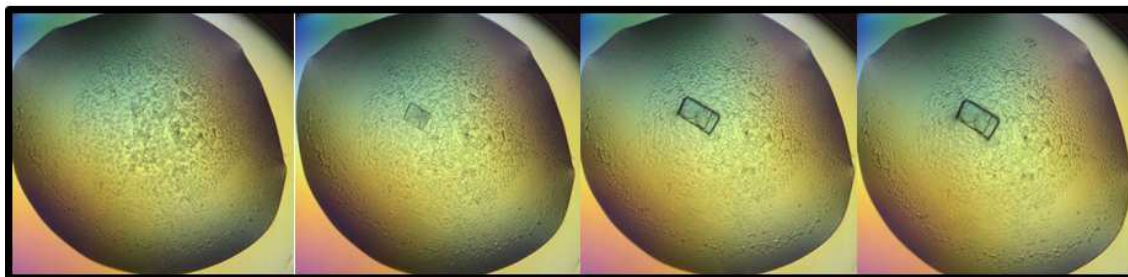


Figure 6.5. Progressive growth of *HsChoKa1/5217714* crystal structure.

Molecule **1** mimics the choline/phosphocholine²⁶ so that it occupies a deeper location in the choline-binding site. It establishes π - π interactions with Trp423 and Phe435, a cation- π interaction with Trp420 and a hydrogen bond with Glu349 (**Figure 6.6**). Nevertheless, molecule **2** sets an electrostatic interaction with Asp330 and a hydrogen bond with Asn311 (Figure 4a), so it shows a binding mode that allows to compete with magnesium atoms (this metal is coordinated by Asp330 and Asn311 and the phosphate groups) and the ADP phosphate groups.²⁶

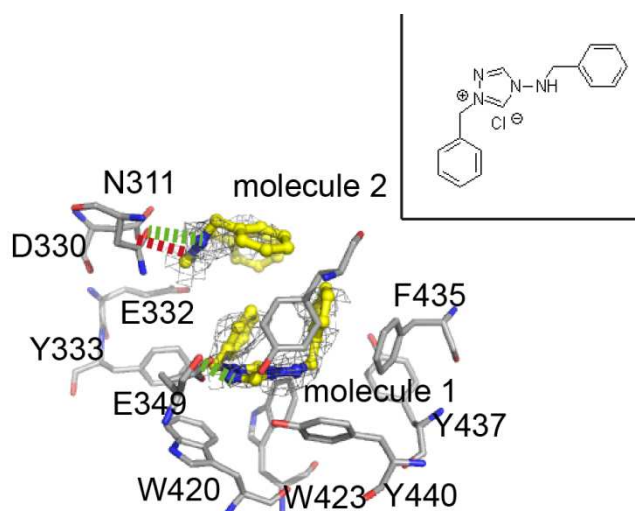


Figure 6.6. Crystal structure of *HsCKα1/5217714* complex. Hydrogen bonds and electrostatic interaction are represented in green and pink dashes, respectively.

Consequently, crystallography studies demonstrated that at least compound **5217714** (and probably the others) binds to the active site of the enzyme, so that the most plausible explanation for the weak inhibition could be based on the second mechanism of action that has been proposed for *HsChoKa1*.²⁷ Accordingly to this, the

phosphorilated Asp306 (it is formed after nucleophilic attack to γ phosphate of ATP) could displace the hits from the active site for solving steric conflicts.

In spite of the weak inhibitory profile of the 6 hits, the biological evaluation was completed with antiproliferative assays in HepG2, A549, HT29, HCT116, MCF7 and Jurkat cell lines. Final results indicated that only compound **5664997** showed an EC_{50} value in the low μM range ($9.59 \pm 2.64 \mu\text{M}$ and $7.44 \pm 0.72 \mu\text{M}$) against A549 and HT29 cell lines (**Table 6.3**). Nevertheless, due to its weak inhibition (23 % for a concentration of 50 μM), the decrease of the cellular viability could be due to an off-target effect.

Table 6.3. Antiproliferative activity of compound **5664997** in several cell lines. EC_{50} represent the average value of three independent experiments \pm S.D.

Compound	EC_{50} (μM)				
	A549	HT29	HCT116	MCF7	Jurkat
5664997	9.59 ± 2.64	7.44 ± 0.72	19.96 ± 1.66	17.89 ± 1.95	17.37 ± 0.46

3.3. Pharmacophore enrichment: chemistry, biological evaluation and crystallization studies

Simultaneously to VS, several compounds derived from the pharmacophore were designed and synthesized. In this new set of molecules, we have developed a pharmacomodulation process of the 1-benzyl-4-(*N*-methylaniline)pyridinium fragment where we have preserved or removed some of the five features of the pharmacophoric hypothesis (RRRPN) and we have inserted other new ones with two objectives. On one hand, to study their influence in the biological activity and in the other hand to improve the binding affinity, inhibitory activity and antiproliferative ability of the VS hits.

3.3.1. Chemistry

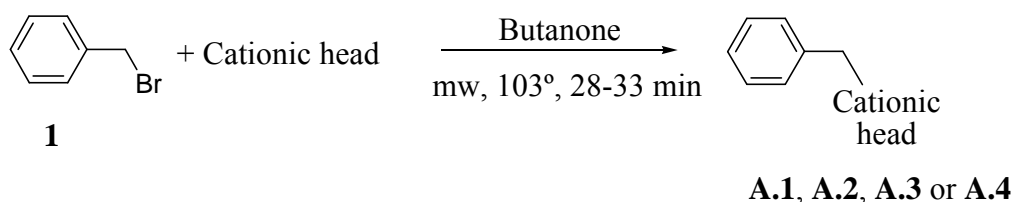
A total of 35 final products were designed to get *Hs*ChoK α 1 inhibition after binding to the choline binding pocket, as the pharmacophore model. According to the chemical nature of their spacer, these salts can be classified into several families. Family A includes benzyl derivatives, whereas families B and C are biphenyl derivatives.

Nevertheless, family C differs from family B in the presence of a tertiary amine bound through a methyl group to the biphenyl moiety. In all families a cationic head can be identified, so it is possible to find salts derived from pyridine (4-(*N,N*-dimethylamine)pyridine or 4-(pirrolidin)pyridine) or quinoline (7-chloro-4-(*N*-methylaniline)quinoline or 7-chloro-4-(azepan-1-yl)quinoline).

Family A

The 4 final products of family A (**Figure 6.7**) were obtained in a microwave assisted synthesis after reaction of the commercial bromide derivative (spacer) with the correspondent cationic head according to scheme 1.

These are the simplest of all the synthesized compounds.



Scheme 1. General synthesis of family A final products.

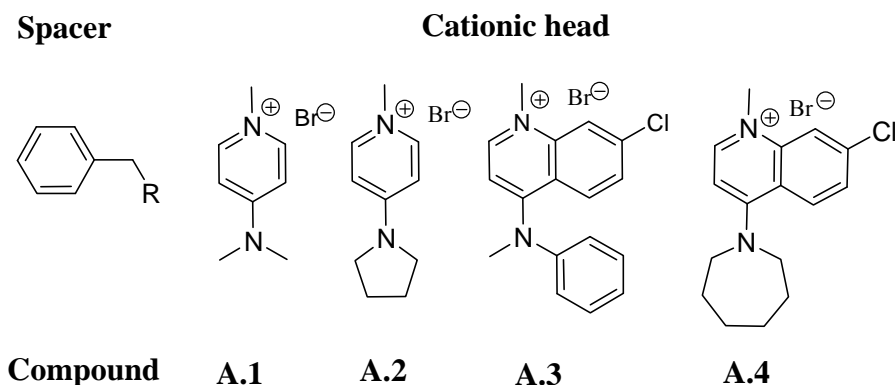
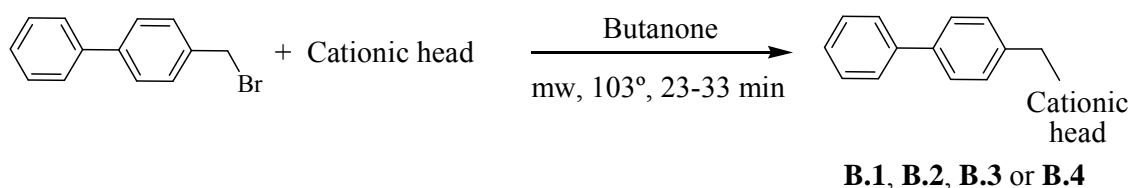


Figure 6.7. Chemical structure of family A final products.

Family B

The 4 final products of family B (**Figure 6.8**) were synthesized according to the procedure indicated for compounds of family A (**Scheme 2**).

The only difference between final products of families A and B is the additional phenyl group that has been inserted into the spacer in order to get biphenyl derivatives.



Scheme 2. General synthesis of family **B** final products.

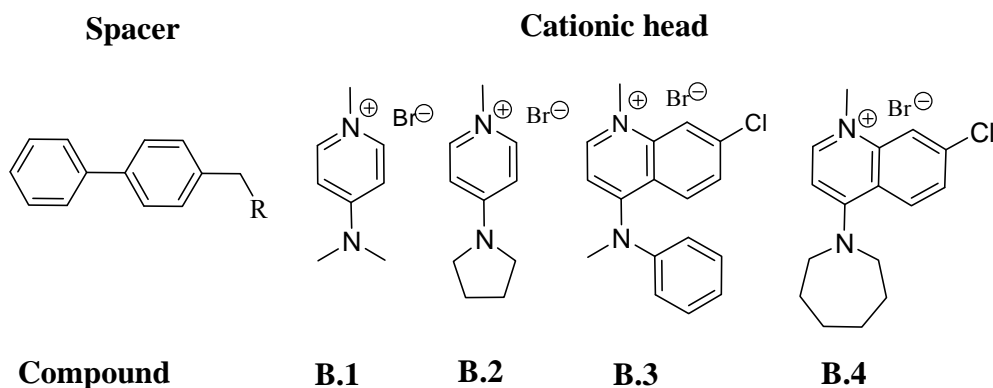
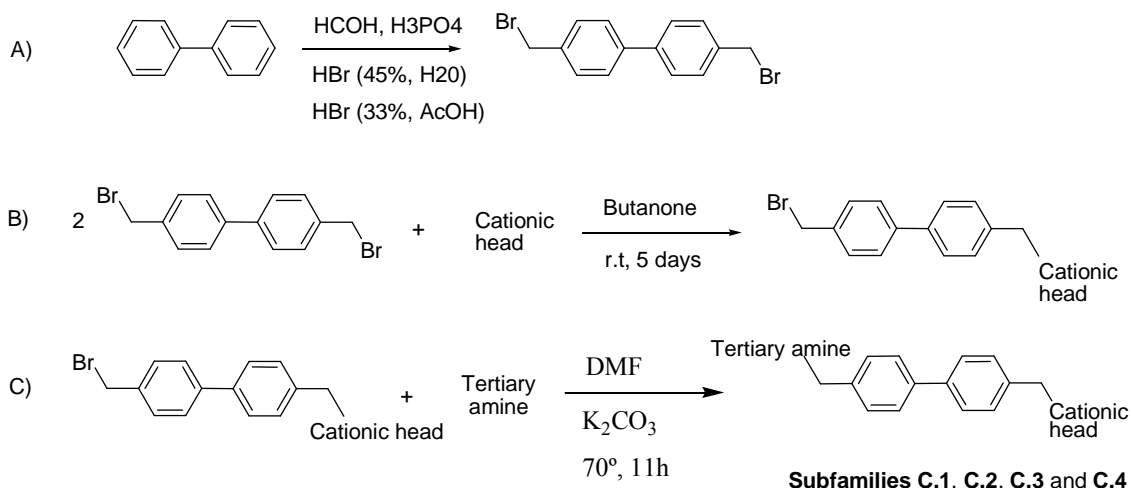


Figure 6.8. Chemical structure of family **B** final products.

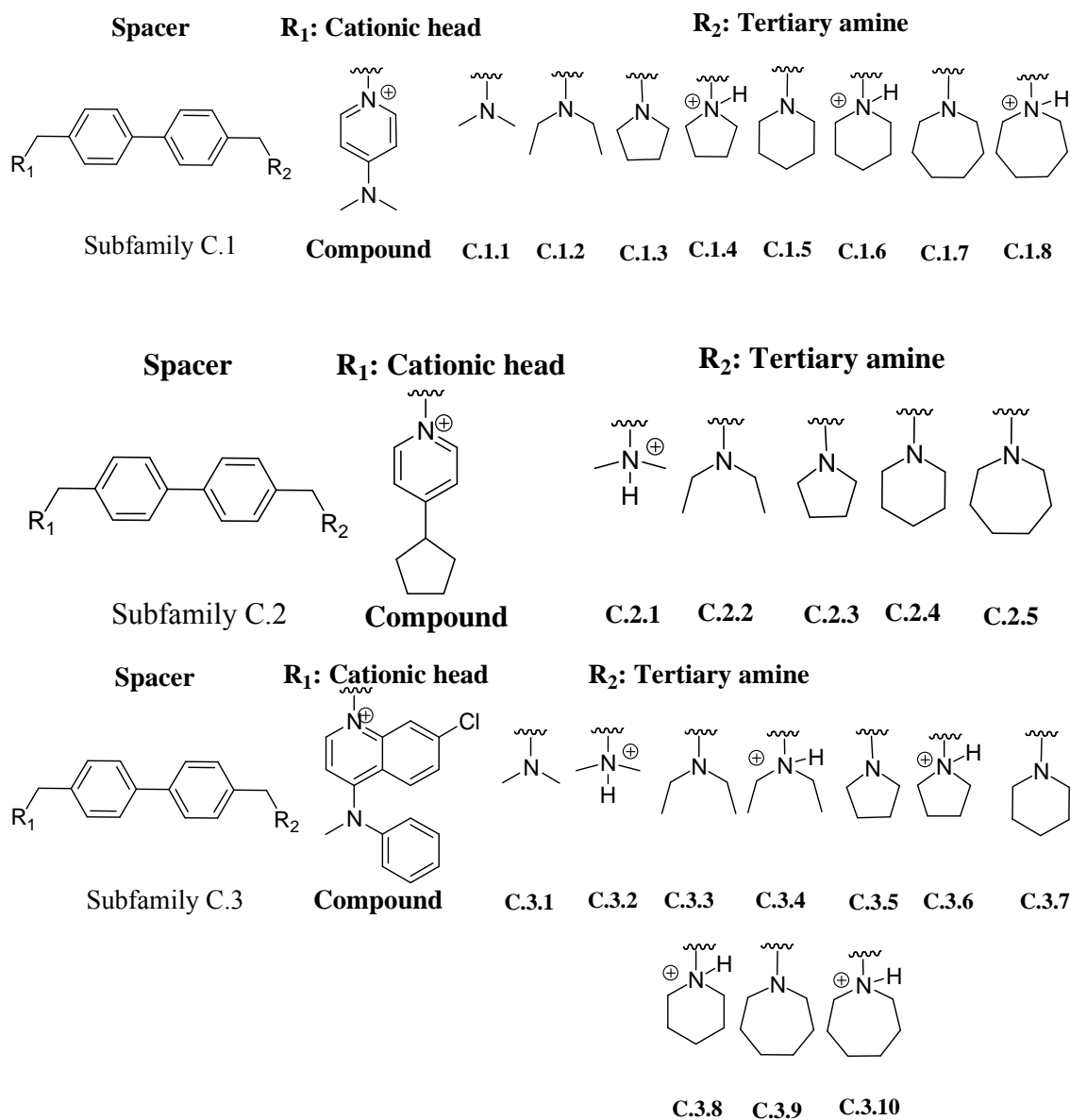
Family C

The 27 final products of family C possess the most complex structure. All of them are family B analogs, but in this case, they also include a tertiary amine in *para* position with respect to the cationic head (**Figure 6.9**). The tertiary amines that have been used show a gradual growth in their volumen, so the dimethylamine and the azepine are the smallest and the biggest ones, respectively. According to the chemical nature of the cationic head, four subfamilies can be identified. In that way, subfamily C.1 corresponds to 4-(dimethylamine)pyridine, subfamily C.2 includes 4-pyrrolidinopyridine derivatives, subfamily C.3 makes reference to 7-chloro-4-(*N*-methylaniline)quinoline and finally, subfamily C.4 comprises 7-chloro-4-(azepin-1-yl)quinoline.

In this case, the dibromide derivative is synthesized first in the synthetic pathway. Then, the cationic head is inserted in a ratio of 2 (dibromide derivative): 1 (cationic head) and finally, the tertiary amine is incorporated into the structure in *para* position (**Scheme 3**).



Scheme 3. General synthesis of family C final products.



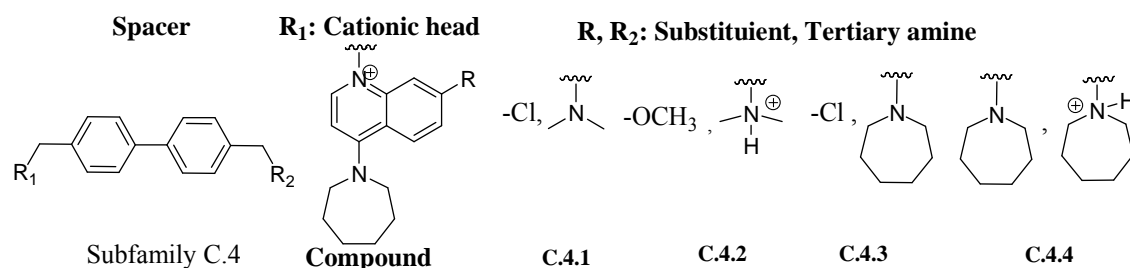


Figure 6.9. Chemical structure of family C final products.

3.3.2. Biological evaluation

Tryptophan fluorescence

Tryptophan fluorescence assays were developed before inhibition and antiproliferative studies for the purpose of determining the binding affinity of the compounds on the protein. For that reason, only a set of compounds was selected (final compounds of families A and B, and only those molecules of family C with the bulkiest and smallest tertiary amines).

In general, final products of family A showed the worst binding affinity on *HsChoKα1* (K_d values between 0.4 and 24 μM , **Table 6.4**), whereas compounds of family C (0.069-0.654 μM , **Tables 6.6-6.9**) together with those of family B (0.368-1.7 μM , **Table 6.5**) were recognized by the enzyme with a very similar affinity.

The most noticeable improvement in the binding affinity occurs when both a biphenyl spacer and also a not bulky tertiary amine (protonated or not) take part of the chemical structure. Nevertheless, in spite of not being essential for getting binding, the affinity also increases when a quinoline ring is used as part of the cationic head. In this way, compounds **C.3.1** and **C.4.2** showed the best binding affinity on the enzyme.

Consequently, it can be concluded that final compounds bind to *HsChoKα1* with an affinity that increases at the same time that their chemical structure is enriched, so the optimization of the binding affinity of the pharmacophore model can be achieved by the insertion of an additional phenyl ring not only into the spacer but also into the cationic head, together with the usage of a small tertiary amine.

To conclude the binding affinity assays, the selectivity of the compounds on *HsChoKα1* versus the β isoform was evaluated. According to the values of K_d , all the compounds were 10-171 fold selective on *HsChoKα1*, which is important to avoid

negative side effects on the skeletal muscle. Specifically, compounds **C.2.1** and **B.4** are the less and the most selective, respectively.

Inhibition of HsChoK α 1

After demonstrating that the selected compounds of families A, B and C bound to the enzyme, inhibitory activity assays on *HsChoK α 1* were conducted with all the final compounds of the three families.

In general, the inhibition results agree with the tryptophan fluorescence determinations, so that the percentage of inhibition improves when the chemical structure of the compound becomes more complex, so it is the best for compounds of family C (biphenyl derivatives with tertiary amine).

For families A and B, the quinoline derivatives show the best inhibitory activity. In the case of family C, the percentage of inhibition decreases when the size of the tertiary amine increases. Nevertheless, subfamily C.1 (4-(dimethylamine)pyridine derivatives) constitutes an exception to this observation since the inhibitory activity is very similar and independent to the size of the tertiary amine (**Tables 6.4-6.9**). Most exactly, quinoline derivatives with not bulky tertiary amines **C.3.1-C.3.4**, **C.4.2** and **C.4.4**, are the best inhibitors (> 82% inhibition at 50 μ M), which are also one of the most affined compounds on *HsChoK α 1*.

Antiproliferative activity

The antiproliferative activity of the final compounds was first determined in HepG2 cell line. Then, the most active compounds were tested in A549, HT29, MCF7, HCT116, Mia Paca and Jurkat cell lines in order to study their effects on other tumour cell systems.

The best antiproliferative agents are those compounds that show not only a good affinity and inhibitory activity on *HsChoK α 1*, but also an appropriate lipophilicity.

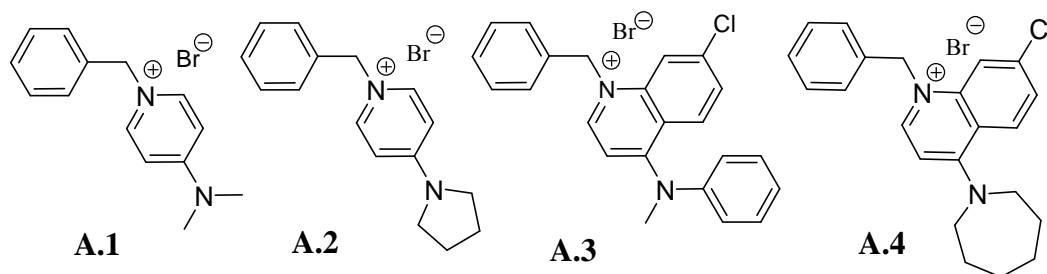
According to the results in HepG2 tumour cell line, final compounds of families A, B and subfamilies C.1 and C.2 were not good antiproliferative agents. In the first two cases, this could be due not only to their weak inhibitory potency on *HsChoK α 1* but also to their insufficient lipophilicity. Nevertheless, compounds of subfamilies C.1 and C.2 do not seem to be lipophilic enough, so they are not able to reach the cytoplasm in spite of being good inhibitors of *HsChoK α 1*. On the other hand, most of quinoline

derivatives of subfamilies C.3 and C.4 (Tables 6.4-6.9) are toxic. Due to their noticeable lypophilicity, great amounts of these compounds could be stored into the cytoplasm and in case of not been selective on *HsChoK α 1*, a synergy effect versus other related proteins, such us kinases, could be the responsible for their toxicity. This lack of selectivity does not seem to affect compound C.4.3 and C.4.4 because they show antiproliferative activity without toxicity (39 and 15 μ M, respectively).

Biological evaluation of compounds C.4.3 and C.4.4 together with C.3.1 and C.3.4 as well as compound A.4 in A549, HT29, MCF7, HCT116, Mia Paca and Jurkat cell lines demonstrated that all of them were good inhibitors (EC_{50} in the low micromolar range) at least in one cell line. Specifically, compound A.4 inhibited HT29 cells proliferation with an EC_{50} value of 5 μ M in spite of not being a good inhibitor of *HsChoK α 1*, reason why we could think in an *off-target* effect. Compounds C.3.1 and C.4.4 were active (EC_{50} 5.4 μ M) against five cell lines (A549, HT29, HCT116, Mia Paca and Jurkat), whereas C.3.4 and C.4.3 inhibited the proliferation of HT29 and Jurkat cell line with EC_{50} values of 1.5 and 4.3 μ M, respectively.

In conclusion, the three types of biological assays that have been conducted (binding affinity, inhibitory potency and antiproliferative activity) with the synthesized compounds let us to infer that the five features included in the pharmacophore model (RRRPN) are not enough for getting potent binding and inhibition of *HsChoK α 1*, as well as a good antiproliferative activity, which is in agreement with the biological results obtained for the VS compounds. Consequently, pharmacophore optimization can be achieved on one hand by the insertion of an additional phenyl not only into the spacer (biphenyl spacer) but also into the cationic head (quinoline moiety), and in the other hand, by the usage of tertiary amines. In that way, in addition to significantly increase the binding affinity and the inhibitory potency of the final products, the antiproliferative activity raises due to a more noticeable lypophilicity, and consequently, a greater accumulation of the compounds into the cytoplasm.

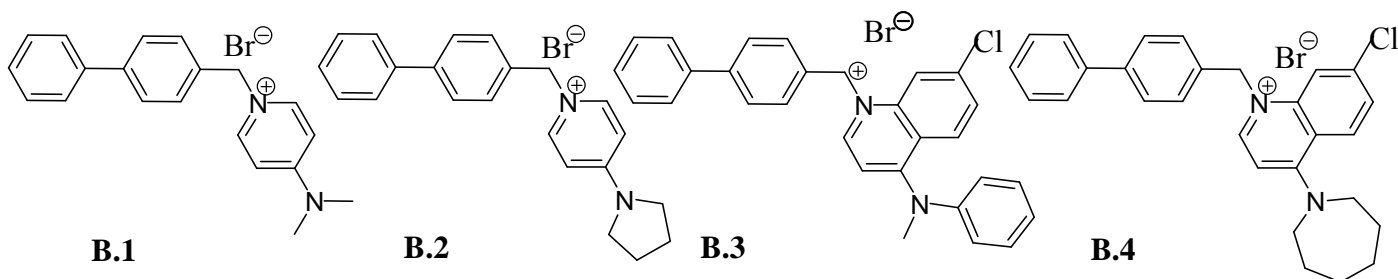
Table 6.4. Tryptophan fluorescence assays, *HsChoKα1* inhibition and antiproliferative activity in **HepG2**, **A549**, **HT29**, **MCF7**, **HCT116**, **Mia Paca** and **Jurkat** for compounds **A.1-A.4**.



Compound	K_d (μM)		Select. ChoK α 1/ β	% Inhib. <i>HsChoKα1</i>		IC ₅₀ purified <i>HsChoKα1</i>	% Antiprolif. Act. HepG2		EC ₅₀ (μM)						
	<i>HsChoKα1</i>	<i>HsChoKβ</i>		10 μM	50 μM		10 μM	50 μM	HepG2	A549	HT29	MCF7	HCT116	Mia Paca	Jurkat
A.1	14 ± 0.7	n.d	n.d	-	-	n.d	-	7.05±0.43	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
A.2	24 ± 3.5	n.d	n.d	11.08±1.62	27.84 ±1.72	n.d	-	23.21±3.80	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
A.3	0.878±0.05	36 ± 5	41	-	18.58 ±2.00	n.d	-	46.42±2.61	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
A.4	0.400±0.04	33 ± 5	83	-	38.77±10.83	n.d	37.04 ±2.78	46.17±2.80	n.d	> 25	5.27±3.22	> 25	23.97±0.55	> 25	23.60±1.24

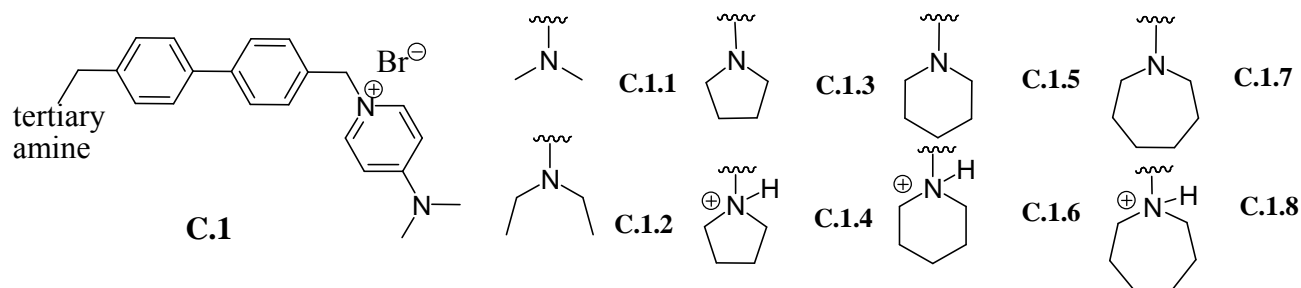
n.d: non determined

Table 6.5. Tryptophan fluorescence assays, *HsChoKa1* inhibition and antiproliferative activity in **HepG2**, **A549**, **HT29**, **MCF7**, **HCT116**, **Mia Paca** and **Jurkat** for compounds **B.1-B.4**.



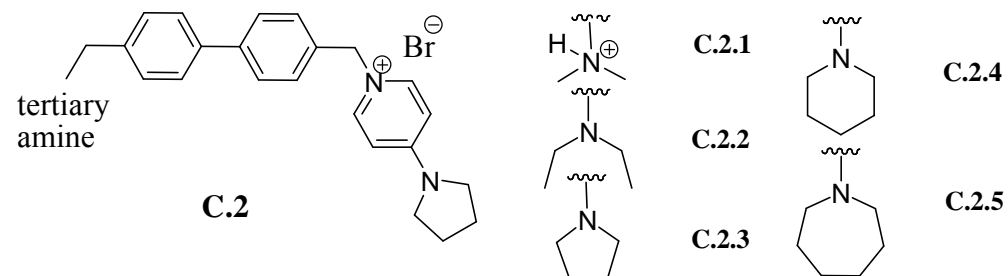
Compound	K_d (μM)		Selectivity <i>HsChoKa1</i> / β	% Inhib. <i>HsChoKa1</i>		IC_{50} purified <i>HsChoKa1</i>	% Antiprolif. Act. HepG2		EC_{50} (μM)						
	<i>HsChoKa1</i>	<i>HsChoKβ</i>		10 μM	50 μM		10 μM	50 μM	HepG2	A549	HT29	MCF7	HCT116	Mia Paca	Jurkat
B.1	1.7 ± 0.04	n.d	n.d	-	-		-	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
B.2	0.678 ± 0.002	n.d	n.d	-	-		-	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
B.3	0.185 ± 0.024	20 ± 5	108	n.d		12.55 ± 0.16	-	54.35 ± 1.23	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
B.4	0.368 ± 0.080	63 ± 3	171	n.d		16.04 ± 0.35	-	50.34 ± 1.98	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

n.d: non determined

Table 6.6. Biological activity for compounds C.1.1-C.1.8.

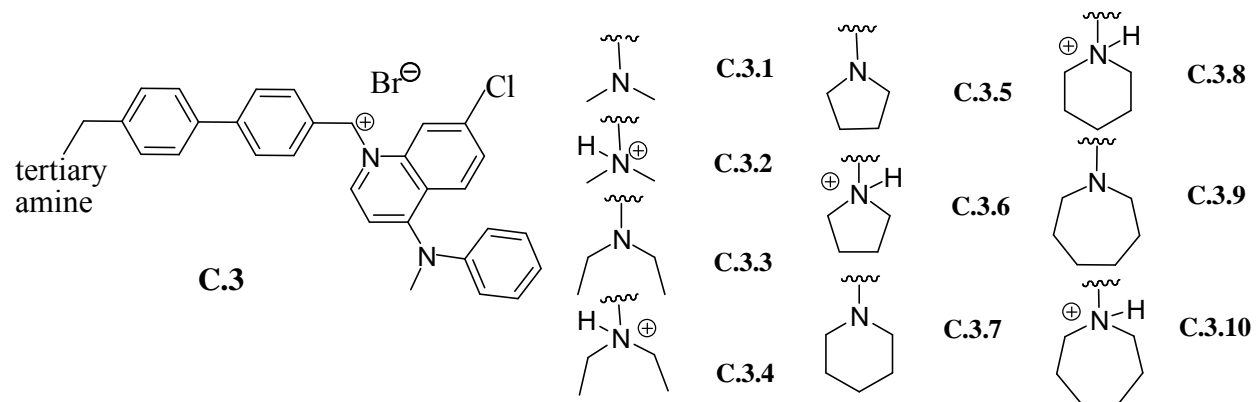
Compound	K_d (μM)		Selectivity <i>HsChoKα1</i> / β	% Inhib. <i>HsChoKα1</i>		IC_{50} purified <i>HsChoKα1</i>	% Antiprolif. Act. HepG2		EC_{50} (μM)						
	<i>HsChoKα1</i>	<i>HsChoKβ</i>		10 μM	50 μM		10 μM	50 μM	HepG2	A549	HT29	MCF7	HCT116	Mia Paca	Jurkat
C.1.1	0.400 \pm 0.01	n.d	n.d	59.65 \pm 4.53	70.44 \pm 2.06	0.82 \pm 0.14	7.15 \pm 4.99	11.71 \pm 2.00	> 100	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.2	n.d	n.d	n.d	71.88 \pm 2.92	81.19 \pm 1.19	n.d	10.26 \pm 2.26	11.56 \pm 3.98	> 100	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.3	n.d	n.d	n.d	57.14 \pm 2.51	71.68 \pm 3.54	n.d	-	-	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.4	n.d	n.d	n.d	55.91 \pm 0.54	70.47 \pm 0.51	n.d	16.91 \pm 4.36	31.00 \pm 4.12	> 100	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.5	n.d	n.d	n.d	n.d	68.77 \pm 10.83	n.d	-	-	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.6	n.d	n.d	n.d	48.21 \pm 1.89	65.99 \pm 2.47	n.d	-	24.25 \pm 5.20	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.7	0.303 \pm 0.08	29 \pm 7	96	56.31 \pm 3.01	69.09 \pm 3.84	3.34 \pm 0.01	-	-	38.92 \pm 0.23	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.1.8	n.d	n.d	n.d	53.17 \pm 2.53	71.50 \pm 3.80	n.d	-	21.89 \pm 8.15	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

n.d: non determined

Table 6.7. Biological activity for compounds C.2.1-C.2.5.

Compound	K_d (μM)		Selectivity <i>HsChoKa1</i> / β	% Inhib. <i>HsChoKa1</i>		IC_{50} purified <i>HsChoKa1</i>	% Antiprolif. Act. HepG2		EC_{50} (μM)						
	<i>HsChoKa1</i>	<i>HsChoKβ</i>		10 μM	50 μM		10 μM	50 μM	HepG2	A549	HT29	MCF7	HCT116	MiaPaca	Jurkat
C.2.1	0.400 \pm 0.10	4 \pm 0.3	10	49.76 \pm 2.26	72.01 \pm 3.25	3.18 \pm 0.73	22.23 \pm 0.86	42.08 \pm 5.69	64.68 \pm 1.50	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.2.2	n.d	n.d	n.d	14.34 \pm 7.65	44.15 \pm 7.62	n.d	44.24 \pm 6.01	49.94 \pm 2.08	47.78 \pm 9.40	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.2.3	n.d	n.d	n.d	29.54 \pm 2.54	50.85 \pm 2.04	n.d	28.37 \pm 5.03	64.78 \pm 2.79	30.46 \pm 8.70	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.2.4	n.d	n.d	n.d	19.38 \pm 4.98	45.39 \pm 2.33	n.d	13.44 \pm 1.50	43.64 \pm 2.16	71.02 \pm 5.10	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.2.5	0.654 \pm 0.14	44 \pm 8	67	4.05 \pm 0.37	34.95 \pm 3.15	n.d	-	22.25 \pm 8.60	> 100	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

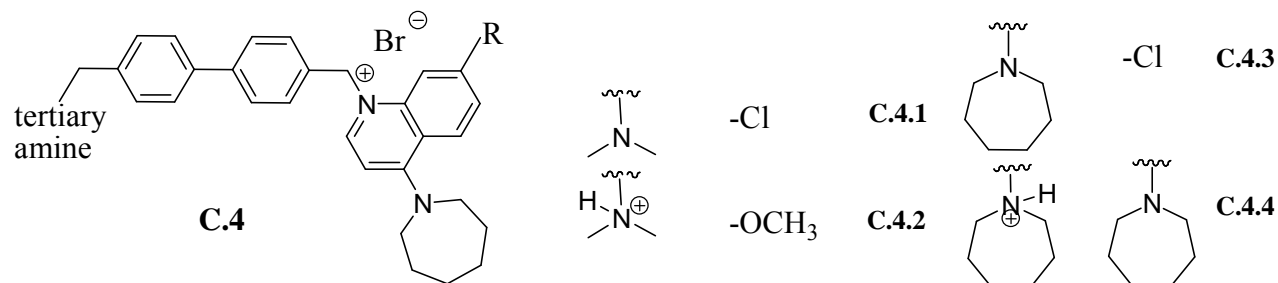
n.d: non determined

Table 6.8. Biological activity for compounds C.3.1-C.3.10.

Compound	K _d (μM)		Selectivity <i>HsChoKα1/β</i>	% Inhib. <i>HsChoKα1</i>		IC ₅₀ purified <i>HsChoKα1</i>	% Antiprolif. Act. HepG2		EC ₅₀ (μM)						
	<i>HsChoKα1</i>	<i>HsChoKβ</i>		10 μM	50 μM		10 μM	50 μM	HepG2	A549	HT29	MCF7	HCT116	Mia Paca	Jurkat
C.3.1	0.069±0.01	9±1.3	130	53.47±0.20	82.63±2.81	2.18±0.07	Tóxico a 5μM		n.d	7.2±0.21	2.65 ±1.55	14.65 ±3.15	7.18 ±0.52	8.40 ±1.90	1.63 ±0.24
C.3.2	n.d	n.d	n.d	-	27.71±0.70	n.d	15.58±2.75	43.98±0. 69	55.17±6.15	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.3	n.d	n.d	n.d	78.12±1.37	88.99±1.70	n.d	Tóxico desde 1 μM		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.4	n.d	n.d	n.d	82.85±1.02	92.37±0.39	n.d	Tóxico desde 1 μM		n.d	12.11 ±1.72	0.87 ±0.02	13.93 ±2.64	10.10 ±1.74	11.27 ±3.22	2.45 ±0.29
C.3.5	n.d	n.d	n.d	35.17±1.32	65.31±3.16	n.d	5 μM tóxico y no efecto entre 50 nM-1μM		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.6	n.d	n.d	n.d	24.23±1.48	59.25±8.94	n.d	Tóxico desde 1 μM		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Table 6.8. Continuation.

C.3.7	n.d	n.d	n.d	35.06±8.63	53.17±5.97	n.d	Tóxico a 5µM	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.8	n.d	n.d	n.d	15.26±0.59	46.65±6.49	n.d	Tóxico a 5µM	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.9	0.413±0.15	17 ± 3	41	3.62±0.04	26.85±2.40	6.74±0.13	Tóxico a 5 µM	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C.3.10	n.d	n.d	n.d	-	27.85±3.76	n.d	Tóxico a 5 µM	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
n.d: non determined														

Table 6.9. Biological activity for compounds C.4.1-C.4.4.

Compound	K _d (μM)		Selectivity <i>HsChoKα1/β</i>	% Inhib. <i>HsChoKα1</i>		IC ₅₀ purified <i>HsChoKα1</i>	% Antiprolif. Act. HepG2		EC ₅₀ (μM)							
	<i>HsChoKα1</i>	<i>HsChoKβ</i>		10 μM	50 μM		10 μM	50 μM	HepG2	A549	HT29	MCF7	HCT116	Mia Paca	Jurkat	
C.4.2	0.100±0.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.41±0.01	Tóxico a 25 μM		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
C.4.3	0.556±0.04	17 ± 6	31	16.52±0.63	50.51±0.72	3.61±0.60	32.20±1.39	muertas	38.92±0.23	16.58 ± 1.05	4.20 ± 2.38	16.57 ± 2.99	23.45 ± 2.65	19.40 ± 3.23	4.48 ± 0.60	
C.4.4	n.d.	n.d.	n.d.	52.15±1.84	85.76±1.84	1.17±0.01	51.69±4.06	muertas	14.60±3.83	6.35 ± 0.67	1.75 ± 0.60	8.07 ± 1.82	12.26 ± 2.24	7.57 ± 1.75	3.35 ± 0.63	
n.d. non determined																

3.3.3. Crystallization studies

Crystallization studies provided experimental evidences about the recognition mechanism or interaction profile that explained the binding affinity results on *HsChoK α 1* as well as the inhibition values.

Family A

In general, the four final compounds of family A showed the worst binding affinity and inhibitory activity results in comparison with the rest of the families.

According to the interactions that compound **A.2** (**Figure 6.10**) sets with residues into the choline binding site, the bad results on their biological activity could be due to non parallel π - π interactions with residues Tyr354 and Phe345. Weak interactions make the compound to be easily removed from the active site, so if we attend to what the second mechanism of action for *HsChoK α 1* postulates,²⁷ compound **A.4** could be ejected from the choline binding site after the phosphorylation of Asp306.

Family B

According to their K_d values, compounds of family B bind better to *HsChoK α 1* than family **A** derivatives. Nevertheless, the inhibition assays proved that compound **B.1** and **B.2** do not disrupt the phosphocholine biosynthesis unlike what happens with compounds **B.3** and **B.4**.

Crystal structure of compound **B.2** shows that two molecules of the compound bind to the choline pocket. Moreover, it can be observed that the amount and intensity of its interactions increase in comparison to the ones of its analog **A.2** (**Figure 6.10**). Most exactly, molecule 1 sets parallel, T-shaped and edge-to-face π - π interactions with residues Tyr354, Phe435 and Tyr440, respectively. By its hand, molecule 2 establishes parallel π - π interactions with Tyr333.

In agreement with docking studies, compound **B.3** set some extra parallel and non parallel π - π interactions through the additional phenyl of the spacer, the quinoline cationic head and the *N*-methylaniline group. These extra interactions could explain its better binding affinity on *HsChoK α 1* as well as its greater potency as inhibitor in comparison with compounds **B.1**, **B.2**, **A.3** and **A.4**.

Family C

Tryptophan fluorescence assays and inhibitory activity experiments pointed out that compounds of family C with non bulky tertiary amines (protonated or not) bind better to *HsChoK α 1* and also that they are more potent inhibitors than the final compounds of families A and B.

Crystal complexes of *HsChoKα1* with compounds **C.2.1**, **C.3.1** and **C.3.2**, demonstrate that *HsChoKα1* binds the smallest functional group (amines) deeply into the choline binding pocket whereas the cationic heads are exposed to the solvent (**Figure 6.10**).

In the three cases, the compounds set two parallel π - π interactions through the biphenyl spacer with the residues Tyr354 and Phe435. Moreover, compounds **C.2.1** and **C.3.2** set π -cation interactions with Trp420. Furthermore, quinoline derivatives disorder the *N*-terminal loop constituted by residues Arg117-Ser121, which could contribute to increase the entropic factor (ΔS), and consequently, the Gibbs free energy (ΔG) of the complex. According to molecular dynamic studies of compound **C.3.1**, the tertiary amine is able to form hydrogen bonds with some molecules of water into the active site. All these reasons could be responsible for the greatest values of binding affinity and inhibitory potency of the compounds of family C in comparison with the ones of families A and B.

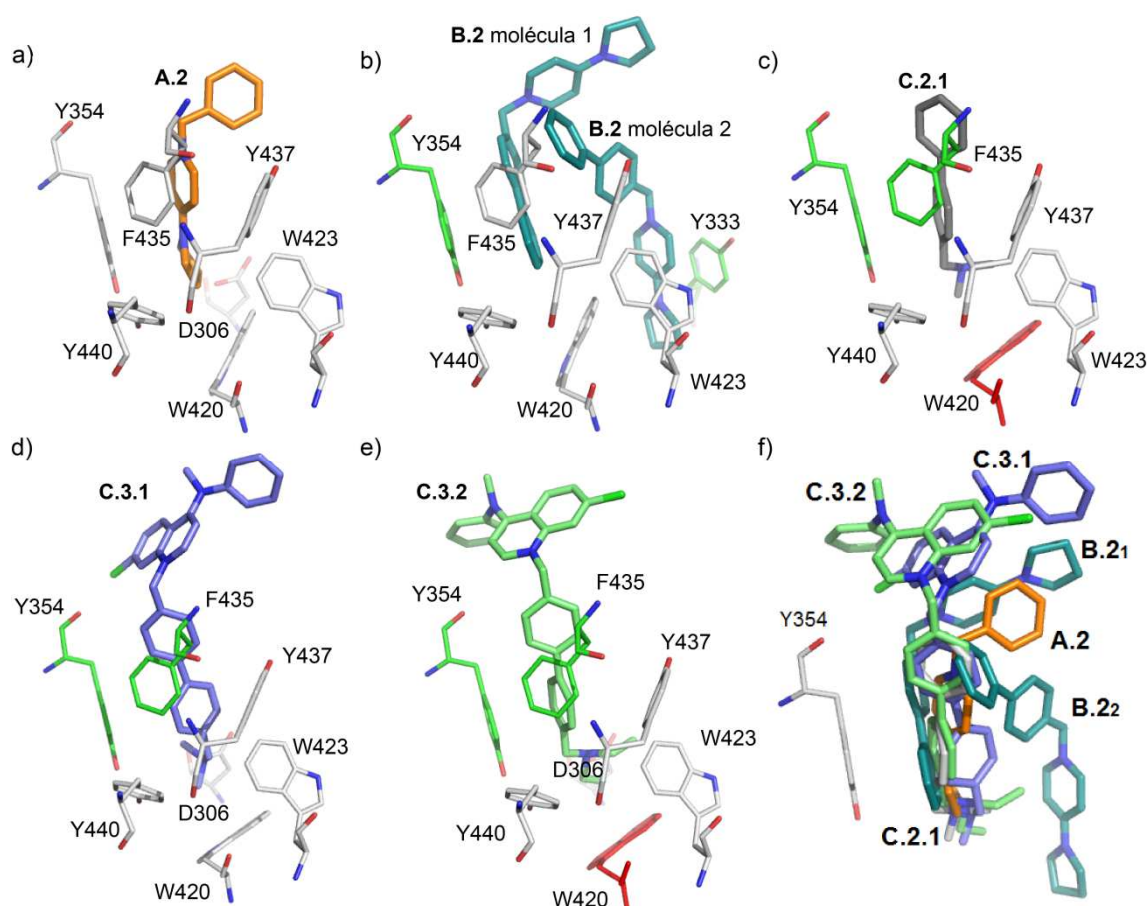


Figure 6.10. a) Crystal structure of *HsChoKα1*/A.2. b) *HsChoKα1*/B.2. c) *HsChoKα1*/C.2.1. d) *HsChoKα1*/C.3.1. e) *HsChoKα1*/C.3.2. f) Superposition of the five ligands. Hydrophobic residues

involved in parallel π - π interactions are coloured in green, whereas those ones that set π -cation interactions are shown in red. The rest of the residues into the hydrophobic pocket are represented in white.

3.4. ChoK homologues comparative study and validation

The comparative study among ChoK homologous was carried out with the objective of finding new targets for the *HsChoK α 1* inhibitors and consequently, new potential diseases where they could be used as a therapeutic alternative.

On one hand, the structure conservation analysis and the sequence alignment of ten ChoKs from different eukaryotic and bacterial pathogens gave as result great residue conservation into the active site of *Plasmodium falciparum*, *P.Knowlesi* (69%) and *Cryptosporidium parvum* (80%) (**Figure 6.11**).

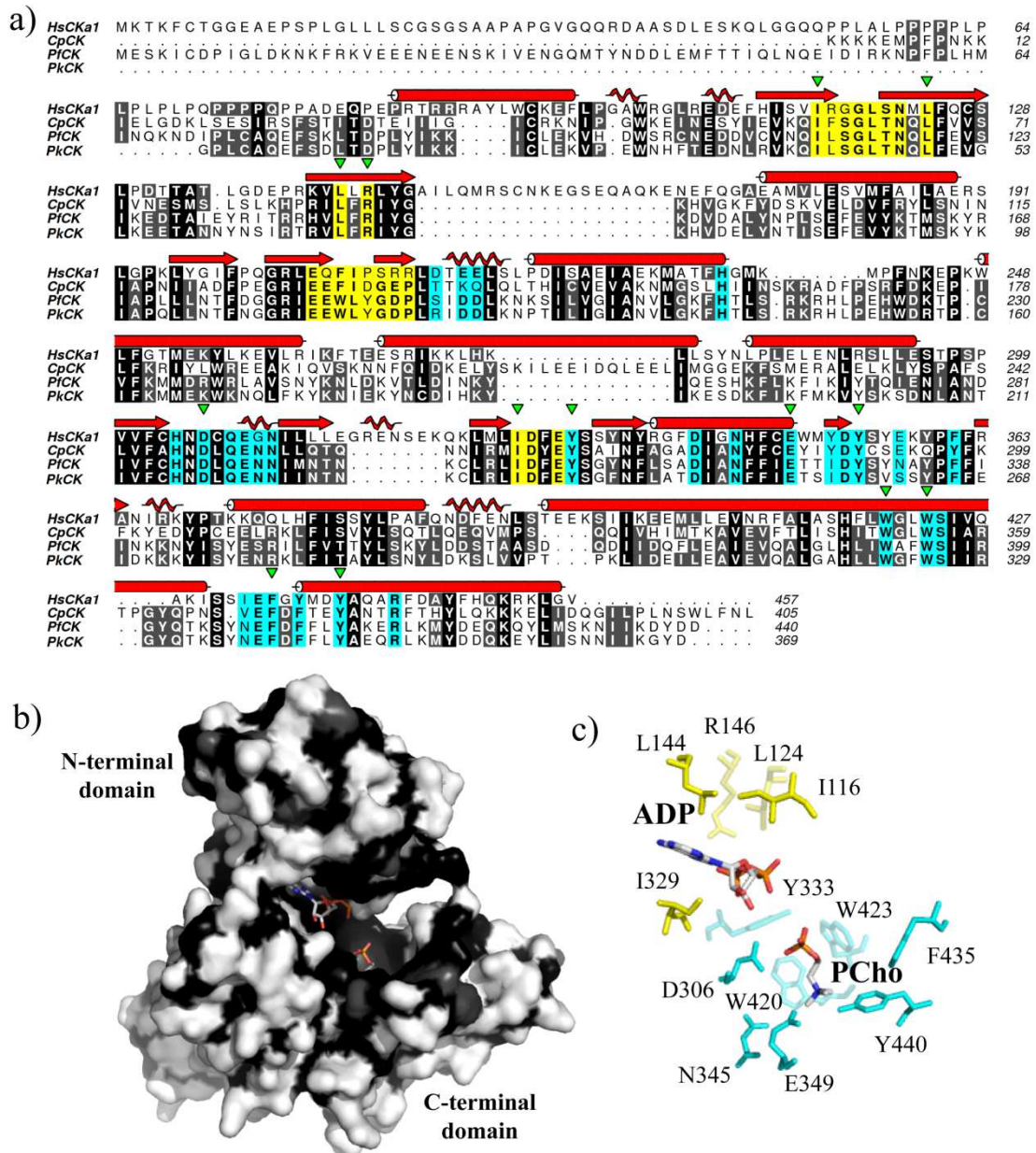


Figure 6.11. Structural comparison between the *Plasmodium* and *Cryptosporidium* ChoKs with the *HsChoKα1*. **a)** Multiple sequence alignment of the *HsChoKα1*, *PfChoK*, *PkChoK* and *CpChoK*. Residues located in the ADP binding site are highlighted in yellow whereas the amino acids in the choline binding site are highlighted in cyan. Green triangles denote conserved residues that interact through hydrogen bonds or hydrophobic interactions with ADP and PCho. The secondary structure elements inferred from the *HsChoKα1* (PDB ID: 3G15) are represented in red. **b)** Surface representation of the *HsChoKα1* coloured by sequence conservation from black (100% identity), to grey (<50% identity). **c)** Active site of *HsChoKα1* (PDB ID: 3G15) in complex with ADP and modelled PCho that shows the conserved residues interacting through hydrophobic or hydrogen bond interactions with ADP and PCho. The products are shown as sticks with white carbon atoms. Only the identical residues between the different ChoKs are shown with the same colour as in Fig. 1a.

On the other hand, molecular dynamic (MD) studies demonstrated that the four homologous showed a very similar ligand recognition mechanism since all of them set very stable hydrogen bonds with the phosphate of ATP (through residues Arg146 and Gln207) and phosphocholine (PCho, through the Asp306), as well as electrostatic bonds with residues Glu349, Tyr440, Phe435, Trp420 y Trp423 (through the quaternary amine of PCho) (**Figure 6.12**).

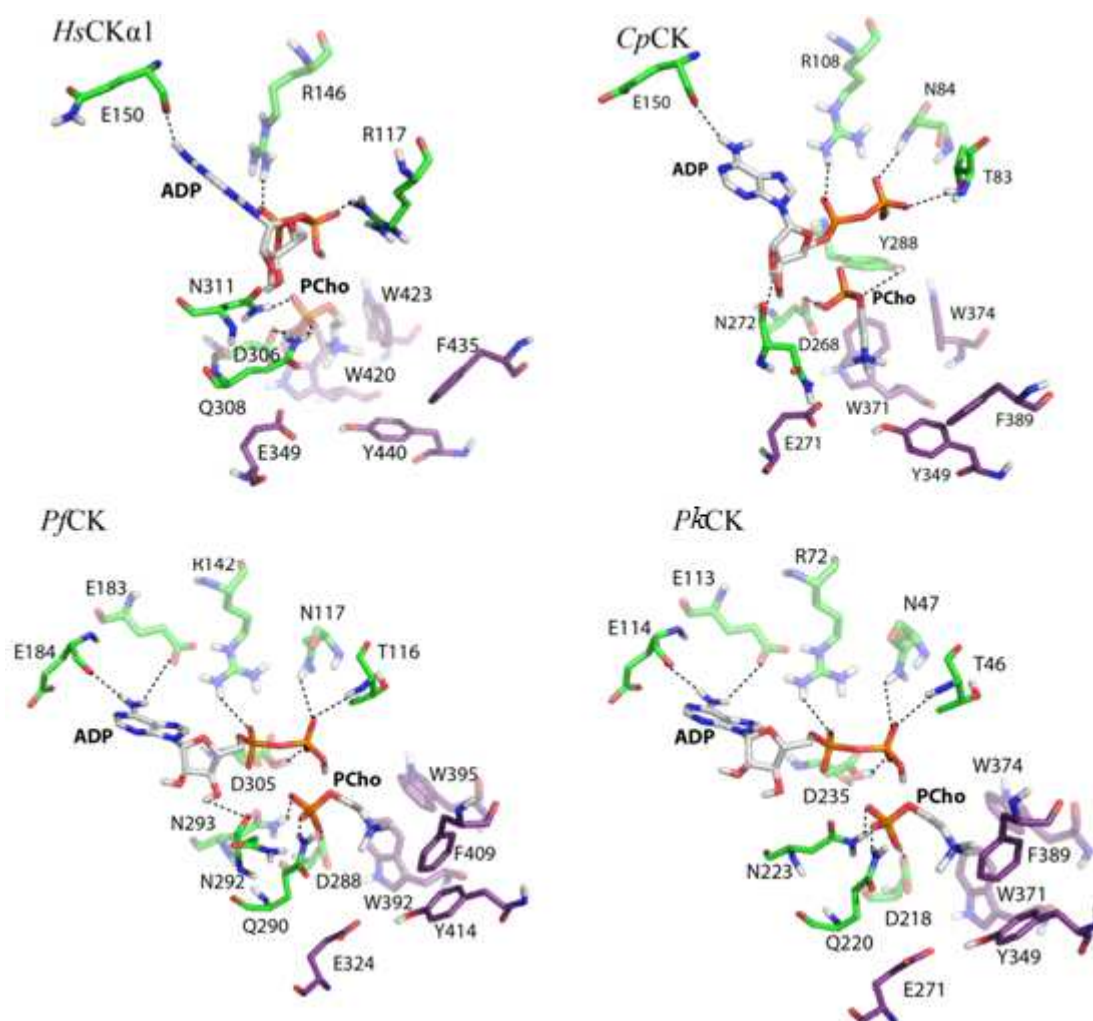


Figure 6.12. Residues involved in **ADP** and **PCho** stabilization through conserved and non-conserved hydrogen bonds (colours in green) and hydrophobic contacts (colours in purple). Hydrogen bonds are represented by black dashes.

Those evidences indicate that the biological effect of a ligand in one homologous could be very similar to the one in the other proteins in terms of binding affinity and inhibition.

To the end of validating this working hypothesis, tryptophan fluorescence assays together with inhibitory activity assays were developed with two compounds that had been previously synthesized in this doctoral thesis (**B.1** and **C.4.4**).

The results indicated that the binding affinity of both compounds against the homologous was very similar and also that it was in the low micromolar range (**Figure 6.13**, **Table 6.10**). Moreover, it was confirmed that compound **C.4.4** not only is an inhibitor of *HsChoK* α 1, but also of *PfChoK* and *CpChoK* (**Table 6.10**). In addition, when the K_{is} were inferred from the IC_{50} values (Cheng-Prusoff equation for competitive inhibitors) it was noticed that they are quite similar ($K_i = 152$ and 387 nM for *HsChoK* α 1 and *PfChoK*, respectively) (**Table 6.10**).

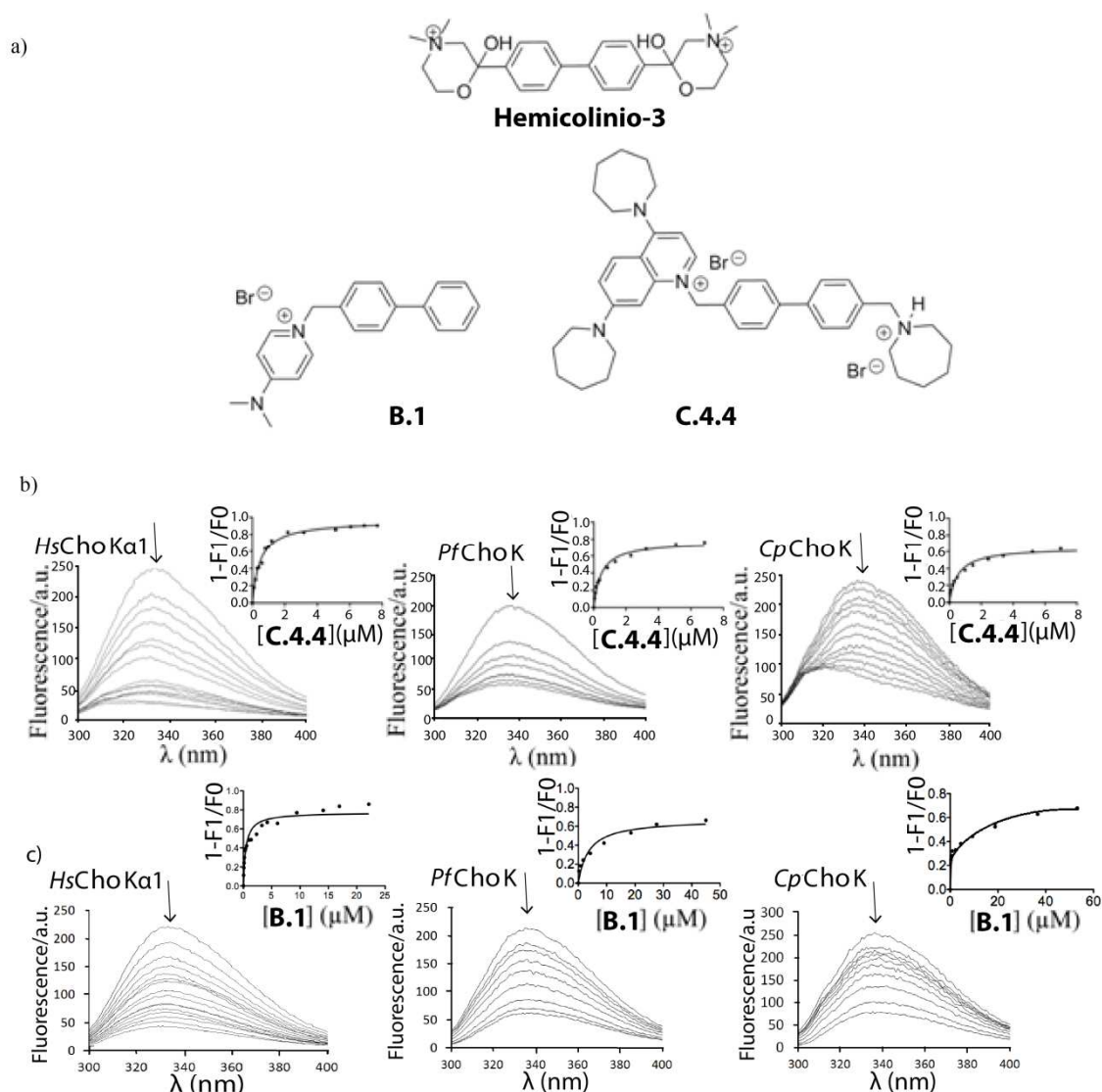


Figure 6.13. a) Chemical structure of HC-3, compounds **B.1** and **C.4.4**. b) Quenching of intrinsic *HsChoK* α 1, *PfChoK* and *CpChoK* tryptophan fluorescence measured at increasing concentrations of

compound **C.4.4**. c) Quenching of intrinsic *HsChoK α 1*, *PfChoK* and *CpChoK* tryptophan fluorescence measured at increasing concentrations of compound **B.1**. All data points represent the means \pm S.D. for three measurements. The K_d for compounds **B.1** and **C.4.4** was determined by fitting fluorescence intensity data against compound **B.1** and **C.4.4** concentrations respectively.

Table 6.10. K_d , IC_{50} and K_i values of compounds **B.1** and **C.4.4** against *HsChoK α 1*, *PfChoK* and *CpChoK*.

Compound	K_d	IC_{50}	K_i	K_d	IC_{50}	K_i	K_d	IC_{50}
	<i>HsChoKα1</i>	<i>HsChoKα1</i>	<i>HsChoKα1</i>	<i>PfChoK</i>	<i>PfChoK</i>	<i>PfChoK</i>	<i>CpChoK</i>	<i>CpChoK</i>
B.1	1700 \pm 45	nd		1960 \pm 134	nd		2927 \pm 225	nd
C.4.4	265 \pm 62	1170 \pm 10	195 \pm 0.001	430 \pm 28	18020 \pm 80	387 \pm 0.001	425 \pm 123	19170 \pm 1230

n.d: non detectable

K_i for *C.parvum* was not calculated because the K_m was not determined.

To complete the study, antimalarial experiments in *P.falciparum* infected erythrocytes were carried out with compound **C.4.4** in order to compare the results with the ones of the antiproliferative activity assays that had been previously determined (**Table 6.9**). Finally, it was demonstrated that the antimalarial effect of compound **C.4.4** is more potent than the antiproliferative one in most of tumour cell lines (**Table 6.11**).

Table 6.11. EC_{50} and IC_{50} values of compound **C.4.4** in several tumor cell lines as well as in *P. falciparum* infected erythrocytes.

C.4.4	Infected erythrocytes	HepG2	A549	HT29	HCT116	MCF7	Mia Paca	Jurkat
EC_{50} (μ M)	-	14.60 \pm 3.83	6.35 \pm 0.67	1.75 \pm 0.6	12.26 \pm 2.24	8.07 \pm 1.82	7.57 \pm 1.75	3.35 \pm 0.63
IC_{50} (μ M)	3.6 \pm 1.1							

3.5. Antimalarial activity of the synthesized compounds

The similarities of *HsChoK α 1* with its homologous *PfChoK* and *CpChoK* at the structural and molecular levels encouraged us to develop tryptophan fluorescence assays in *PfChoK* and also antimalarial activity assays in infected erythrocytes with some selected compounds of the three families.

According to the results, it was corroborated that all the tested compounds showed binding affinity against *PfChoK* as well as antimalarial activity (**Table 6.12**).

In general, the improvement in the antimalarial potency of families A, B and C final compounds is the result of the gradual increase in the binding affinity on *PfChoK* as

well as on the lipophilicity. In this way, compounds of family C are in general the most potent antimalarial agents (**Table 6.12**).

Nevertheless, this behaviour is not observed for 7-chloro-4-(azepin-1-yl)quinolinium derivatives because all of them experience a worsening of activity when the complexity of the structure increases. Due to the fact that their binding affinity together with their lipophilicity improve with the complexity of the molecule, it could be possible that these kinds of derivatives go into the cytoplasm through an active mechanism of transport. In this way, the more complex the compound is, the worse may be the binding affinity on transport proteins.

Finally, all the tested compounds are more potent as antimalarial than as antiproliferative agents, so mechanisms of synergy in other structure related proteins that are not inhibited in humans together with different penetration processes through the parasite membranes are being studied nowadays in order to explain this observation.

To conclude, the best antimalarial agent is the compound **C.3.1**, which is the second one with the best binding affinity on *Pf*ChoK, and the first with the best IC₅₀ value (28 nM) on infected erythrocytes. Moreover, its IC₅₀ is very similar to the one of chloroquine (23.11 nM) and it has also demonstrated to be 218 fold selective on infected erythrocytes than in healthy L6 cells (primary cell line derived from rat skeletal myoblasts), so it could be used as non toxic antimalarial agent.

Table 6.12. K_d (μM) and IC_{50} (μM) values of the final compounds of families **A**, **B** and **C** in *P. falciparum* infected erythrocytes.

Family A	A.1	A.2	A.3	A.4
K_d <i>Pf</i> ChoK	4.005 \pm 1.805	5.478 \pm 0.144	4.225 \pm 0.275	4.96 \pm 0.035
IC_{50} <i>P. falciparum</i>	nd	5.9 \pm 0.6	nd	0.7 \pm 0.1
Family B	B.1	B.2	B.3	B.4
K_d <i>Pf</i> ChoK	1.960 \pm 1.820	2.317 \pm 1.343	1.149 \pm 0.513	3.079 \pm 0.070
IC_{50} <i>P. falciparum</i>	nd	1.2 \pm 0.2	nd	1.5 \pm 0.5
Family C	C.1.1	C.2.1	C.3.1	C.4.4
K_d <i>Pf</i> ChoK	1.107 \pm 0.194	0.341 \pm 0.049	0.358 \pm 0.049	0.430 \pm 0.028
IC_{50} <i>P. falciparum</i>	1.173	1.875	0.049	3.6 \pm 0.1
Family C	C.1.7	C.2.5	C.3.9	C.4.3
K_d <i>Pf</i> ChoK	1.826 \pm 0.049	1.227 \pm 0.132	0.496 \pm 0.038 nM	0.638 \pm 0.128
IC_{50} <i>P. falciparum</i>	0.312	0.494	0.383	3 \pm 0.1
Chloroquine; IC_{50} <i>P. falciparum</i>				23.11 nM

7. CONCLUSIONS

7.1. Conclusions

1. The computational analysis of symmetric biscationic *HsChoK α 1* inhibitors has provided a pharmacophore model (RRRPN) that has been used as a tool in virtual screening studies (VS) and synthesis.

2. Virtual Screening studies have yielded six new hits that show binding affinity against *HsChoK α 1* but no inhibitory potency. Nevertheless, crystallization experiments has shown that compound **5217714** binds to the active site, so that unknown processes responsible for a displacement of the compound from the binding pocket may happen during the catalytic reaction. Only compound **5664997** is a potent antiproliferative agent in A549 and HT29 tumour cell lines, so its mechanism of action could be associated to an *off-target* effect.

3. Pharmacophore optimization in a pharmacomodulation process has supplied a total of 35 final products that have been classified into three families (**A**, **B** and **C**) according to their linker. The increase in the complexity of their chemical structure is translated into a gradual increase in their binding affinity, and inhibitory activity against *HsChoK α 1*, as well as in their antiproliferative potency in HepG2, A549, MCF7, HCT116, HT29, Mia Paca and Jurkat tumour cell lines.

4. The best biological activity in terms of binding affinity, inhibitory activity and antiproliferative potency was shown by compounds of subfamilies **C.3** and **C.4**. They are biphenyl derivatives that include in 1 and 4' positions a quinoline-derived moiety (cationic head) and an amine (tertiary or quaternary), respectively. The most biologically active compounds are **C.3.1**, **C.3.4**, **C.4.3** and **C.4.4**.

5. Crystallography studies of *HsChoKα1* in complex with compounds **A.2**, **B.2**, **C.2.1**, **C.3.1** and **C.3.2**, evidenced that the gradual increase in the binding affinity could be due an improvement in the interaction profile that contributes to increase the stability of the protein-ligand complex. Unlike the rest of the compounds, quinoline derivatives (**C.3.1** and **C.3.2**) not only stablish π - π hydrophobic bonds with the residues into the active site, but also set π -cation interactions or hydrogen bonds with water molecules and even disorder the *N*-terminal domain.

6. The comparative study of homologous ChoKs (*HsChoKα1*, *PfChoK*, *PkChoK* and *CpChoK*) has demonstrated that the active sites of all of them are highly conserved (69 % in *Plasmodium sp.* and 80 % in *CpChoK*). Moreover, these proteins use very similar ligand mechanisms of recognition, so that they set conserved interactions. The biological validation of the previous computational evidences results in the conclusion that compounds show a very similar effect (inhibitory or not) in all the homologous, which is an interesting approach to treat malaria or cryptosporidiosis with anticancer ChoK inhibitors.

7. Antimalarial assays of binding affinity on *PfChoK*, as well as *in vivo* experiments in *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes have demonstrated that the synthesized compounds are potent antimalarial agents. Moreover, their potency as antimalarials is much more noticeable than the antiproliferative one and for instance, compound **C.3.1**, whose potency ($IC_{50} = 49$ nM) is very similar to the one of chloroquine ($IC_{50} = 23$ nM), is 218 fold more selective on infected erythrocytes than in healthy cells.

7.2. Conclusiones

1. El análisis computacional de los inhibidores de *HsChoKα1* de estructura simétrica biscatiónica, ha permitido proponer un modelo de farmacóforo constituido por cinco grupos funcionales (RRRPN) que ha sido usado como herramienta en estudios de cribado virtual y síntesis química.

2. Mediante el cribado virtual se han descubierto seis prototipos que muestran afinidad por *HsChoKα1*, pero que carecen de efecto inhibitorio. No obstante, los estudios de cristalografía han revelado que el compuesto **5217714** se une al sitio activo, de modo que, probablemente durante la reacción catalítica tenga lugar la expulsión del compuesto del sitio activo mediante mecanismos que desconocemos. Únicamente el

compuesto **5664997** actúa como agente antiproliferativo en las líneas tumorales A549 y HT29, proponiéndose para éste un efecto inespecífico.

3. La optimización del farmacóforo mediante un proceso de farmacomodulación ha dado como resultado un total de 35 productos finales organizados en tres familias (**A**, **B** y **C**) en función de la naturaleza química de su espaciador. En conjunto, el aumento de complejidad de la estructura química conlleva un aumento gradual de afinidad y actividad inhibitoria frente a *HsChoK α 1*, así como de potencia antiproliferativa frente a las líneas celulares HepG2, A549, MCF7, HCT116, HT29, Mia Paca y Jurkat.

4. La mejor actividad biológica expresada en términos de afinidad, actividad inhibitoria y potencia antiproliferativa fue mostrada por los compuestos de las subfamilias **C.3** y **C.4**, que son derivados de bifenilo que incluyen en las posiciones 1 y 4' un grupo quinolínico (cabeza catiónica) y una amina (terciaria o cuaternaria), respectivamente. Los compuestos más activos biológicamente son **C.3.1**, **C.3.4**, **C.4.3** y **C.4.4**.

5. Los estudios de cristalografía de la forma holo- de *HsChoK α 1* con los compuestos **A.2**, **B.2**, **C.2.1**, **C.3.1** y **C.3.2**, evidencian que el aumento gradual de afinidad por la proteína a medida que se incrementa la complejidad de la estructura química de los compuestos sintetizados, puede deberse a una mejora del perfil de interacción que contribuye a aumentar la estabilidad del complejo proteína-ligando. A diferencia del resto de compuestos, los derivados quinolínicos (**C.3.1** y **C.3.2**) no sólo establecen interacciones hidrofóbicas de tipo π - π con los residuos del sitio activo, sino que también muestran interacciones de tipo π -catión o puentes de hidrógeno, e incluso desordenan el dominio *N*-terminal.

6. El estudio comparativo de ChoK homólogas (*HsChoK α 1*, *PfChoK*, *PkChoK* y *CpChoK*) demuestra un alto grado de conservación de los sitios activos (69 % para *Plasmodium sp.* y 80 % para *CpChoK*). Además, pone de manifiesto que estas proteínas usan mecanismos de reconocimiento de ligandos muy parecidos, ya que se observa el establecimiento de interacciones conservadas. La validación biológica de las evidencias previas permitió concluir que los compuestos que actúen como ligandos en cada momento mostrarán un efecto muy parecido (inhibitorio o no) en todas las homólogas. Esto podría ser de interés para tratar malaria y criptosporidiosis con fármacos anticancerígenos que sean inhibidores de ChoK.

7. Los estudios de fluorescencia de los compuestos sintetizados frente a *Pf*ChoK, así como de actividad antimalárica en eritrocitos infectados con *P.falciparum* ponen de manifiesto que los compuestos sintetizados son potentes agentes antipalúdicos. Además, dicha actividad es mucho más potente que su actividad antiproliferativa, y por ejemplo el compuesto **C.3.1**, cuya potencia ($CI_{50} = 49$ nM) es muy similar a la de la cloroquina ($CI_{50} = 23$ nM), es 218 veces más selectivo de eritrocitos infectados que de células sanas.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Globocan 2012, IARC. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
2. Cekanova, M.; Rathore, K., Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug design, development and therapy* **2014**, *8*, 1911-1922.
3. Mak, I. W.; Evaniew, N.; Ghert, M., Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *American journal of translational research* **2014**, *6* (2), 114-8.
4. Meacham, C. E.; Morrison, S. J., Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **2013**, *501* (7467), 328-37.
5. Negrini, S.; Gorgoulis, V. G.; Halazonetis, T. D., Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2010**, *11* (3), 220-8.
6. Cancer Research UK. http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/what-is-cancer/cells/how-cancer-starts#genes_and_mutation.
7. Plati, J.; Bucur, O.; Khosravi-Far, R., Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of cellular biochemistry* **2008**, *104* (4), 1124-49.
8. Vesely, M. D.; Schreiber, R. D., Cancer immunoediting: antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2013**, *1284*, 1-5.
9. Munoz-Pinedo, C.; El Mjiyad, N.; Ricci, J. E., Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell death & disease* **2012**, *3*, e248.
10. Sakurai, T.; Kudo, M., Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncology* **2011**, *81 Suppl 1*, 24-9.
11. Tan, G. J.; Peng, Z. K.; Lu, J. P.; Tang, F. Q., Cathepsins mediate tumor metastasis. *World journal of biological chemistry* **2013**, *4* (4), 91-101.
12. WHO, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
13. Ghavifekr Fakhr, M.; Farshdousti Hagh, M.; Shanehbandi, D.; Baradaran, B., DNA methylation pattern as important epigenetic criterion in cancer. *Genetics research international* **2013**, *2013*, 317569.
14. <http://www.google.com/patents/WO2012085171A2?cl=en>.
15. Gibbs, J. B., Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* **2000**, *287* (5460), 1969-73.

16. Preissner, S.; Dunkel, M.; Hoffmann, M. F.; Preissner, S. C.; Genov, N.; Rong, W. W.; Preissner, R.; Seeger, K., Drug cocktail optimization in chemotherapy of cancer. *PLoS one* **2012**, *7* (12), e51020.
17. Plenderleith, I. H., Treating the treatment: toxicity of cancer chemotherapy. *Canadian family physician Medecin de famille canadien* **1990**, *36*, 1827-30.
18. Iqbal, N.; Iqbal, N., Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemotherapy research and practice* **2014**, *2014*, 357027.
19. Bos, J. L., ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research* **1989**, *49* (17), 4682-9.
20. Wittenberg, J.; Kornberg, A., Choline phosphokinase. *The Journal of biological chemistry* **1953**, *202* (1), 431-44.
21. Gibellini, F.; Smith, T. K., The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB life* **2010**, *62* (6), 414-28.
22. Vance, J. E.; Vance, D. E., The role of phosphatidylcholine biosynthesis in the secretion of lipoproteins from hepatocytes. *Canadian journal of biochemistry and cell biology = Revue canadienne de biochimie et biologie cellulaire* **1985**, *63* (8), 870-81.
23. Fagone, P.; Jackowski, S., Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle. *Biochimica et biophysica acta* **2013**, *1831* (3), 523-32.
24. Michel, V.; Yuan, Z.; Ramsbair, S.; Bakovic, M., Choline transport for phospholipid synthesis. *Experimental biology and medicine* **2006**, *231* (5), 490-504.
25. (a) Goin, M.; Pignataro, O.; Jimenez de Asua, L., Early cell cycle diacylglycerol (DAG) content and protein kinase C (PKC) activity enhancement potentiates prostaglandin F₂ alpha (PGF₂ alpha) induced mitogenesis in Swiss 3T3 cells. *FEBS letters* **1993**, *316* (1), 68-72; (b) Moolenaar, W. H., LPA: a novel lipid mediator with diverse biological actions. *Trends in cell biology* **1994**, *4* (6), 213-9.
26. Malito, E.; Sekulic, N.; Too, W. C.; Konrad, M.; Lavie, A., Elucidation of human choline kinase crystal structures in complex with the products ADP or phosphocholine. *Journal of molecular biology* **2006**, *364* (2), 136-51.
27. Hudson, C. S.; Knegetel, R. M.; Brown, K.; Charlton, P. A.; Pollard, J. R., Kinetic and mechanistic characterisation of Choline Kinase-alpha. *Biochimica et biophysica acta* **2013**, *1834* (6), 1107-16.
28. Adams, J. A., Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chemical reviews* **2001**, *101* (8), 2271-90.
29. Aoyama, C.; Liao, H.; Ishidate, K., Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Progress in lipid research* **2004**, *43* (3), 266-81.
30. Aoyama, C.; Ohtani, A.; Ishidate, K., Expression and characterization of the active molecular forms of choline/ethanolamine kinase-alpha and -beta in mouse tissues, including carbon tetrachloride-induced liver. *The Biochemical journal* **2002**, *363* (Pt 3), 777-84.
31. Gallego-Ortega, D.; Ramirez de Molina, A.; Ramos, M. A.; Valdes-Mora, F.; Barderas, M. G.; Sarmentero-Estrada, J.; Lacal, J. C., Differential role of human choline kinase alpha and beta enzymes in lipid metabolism: implications in cancer onset and treatment. *PLoS one* **2009**, *4* (11), e7819.
32. Ramirez de Molina, A.; Penalva, V.; Lucas, L.; Lacal, J. C., Regulation of choline kinase activity by Ras proteins involves Ral-GDS and PI3K. *Oncogene* **2002**, *21* (6), 937-46.
33. Ramirez de Molina, A.; Gallego-Ortega, D.; Sarmentero, J.; Banez-Coronel, M.; Martin-Cantalejo, Y.; Lacal, J. C., Choline kinase is a novel oncogene that potentiates RhoA-induced carcinogenesis. *Cancer research* **2005**, *65* (13), 5647-53.
34. Sher, R. B.; Aoyama, C.; Huebsch, K. A.; Ji, S.; Kerner, J.; Yang, Y.; Frankel, W. N.; Hoppel, C. L.; Wood, P. A.; Vance, D. E.; Cox, G. A., A rostrocaudal muscular dystrophy caused by a defect in choline kinase beta, the first enzyme in phosphatidylcholine biosynthesis. *The Journal of biological chemistry* **2006**, *281* (8), 4938-48.

35. Ramirez de Molina, A.; Gutierrez, R.; Ramos, M. A.; Silva, J. M.; Silva, J.; Bonilla, F.; Sanchez, J. J.; Lacal, J. C., Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene* **2002**, *21* (27), 4317-22.
36. Ramirez de Molina, A.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Gutierrez, R.; Martinez-Pineiro, L.; Sanchez, J.; Bonilla, F.; Rosell, R.; Lacal, J., Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochemical and biophysical research communications* **2002**, *296* (3), 580-3.
37. Ramirez de Molina, A.; Sarmentero-Estrada, J.; Belda-Iniesta, C.; Taron, M.; Ramirez de Molina, V.; Cejas, P.; Skrzypski, M.; Gallego-Ortega, D.; de Castro, J.; Casado, E.; Garcia-Cabezas, M. A.; Sanchez, J. J.; Nistal, M.; Rosell, R.; Gonzalez-Baron, M.; Lacal, J. C., Expression of choline kinase alpha to predict outcome in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a retrospective study. *The Lancet. Oncology* **2007**, *8* (10), 889-97.
38. Nakagami, K.; Uchida, T.; Ohwada, S.; Koibuchi, Y.; Suda, Y.; Sekine, T.; Morishita, Y., Increased choline kinase activity and elevated phosphocholine levels in human colon cancer. *Japanese journal of cancer research : Gann* **1999**, *90* (4), 419-24.
39. Iorio, E.; Mezzanzanica, D.; Alberti, P.; Spadaro, F.; Ramoni, C.; D'Ascenzo, S.; Millimaggi, D.; Pavan, A.; Dolo, V.; Canevari, S.; Podo, F., Alterations of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer research* **2005**, *65* (20), 9369-76.
40. Hernando, E.; Sarmentero-Estrada, J.; Koppie, T.; Belda-Iniesta, C.; Ramirez de Molina, V.; Cejas, P.; Ozu, C.; Le, C.; Sanchez, J. J.; Gonzalez-Baron, M.; Koutcher, J.; Cordon-Cardo, C.; Bochner, B. H.; Lacal, J. C.; Ramirez de Molina, A., A critical role for choline kinase-alpha in the aggressiveness of bladder carcinomas. *Oncogene* **2009**, *28* (26), 2425-35.
41. Gallego-Ortega, D.; Ramirez De Molina, A.; Gutierrez, R.; Ramos, M. A.; Sarmentero, J.; Cejas, P.; Nistal, M.; Gonzalez Baron, M.; Lacal, J. C., Generation and characterization of monoclonal antibodies against choline kinase alpha and their potential use as diagnostic tools in cancer. *International journal of oncology* **2006**, *29* (2), 335-40.
42. Clem, B. F.; Clem, A. L.; Yalcin, A.; Goswami, U.; Arumugam, S.; Telang, S.; Trent, J. O.; Chesney, J., A novel small molecule antagonist of choline kinase-alpha that simultaneously suppresses MAPK and PI3K/AKT signaling. *Oncogene* **2011**, *30* (30), 3370-80.
43. Uchida, T., Stimulation of phospholipid synthesis in HeLa cells by epidermal growth factor and insulin: activation of choline kinase and glycerophosphate acyltransferase. *Biochimica et biophysica acta* **1996**, *1304* (2), 89-104.
44. Chung, T.; Huang, J. S.; Mukherjee, J. J.; Crilly, K. S.; Kiss, Z., Expression of human choline kinase in NIH 3T3 fibroblasts increases the mitogenic potential of insulin and insulin-like growth factor I. *Cellular signalling* **2000**, *12* (5), 279-88.
45. Ko, K. W.; Cook, H. W.; Vance, D. E., Reduction of phosphatidylcholine turnover in a Nb 2 lymphoma cell line after prolactin treatment. A novel mechanism for control of phosphatidylcholine levels in cells. *The Journal of biological chemistry* **1986**, *261* (17), 7846-52.
46. Vigo, C.; Vance, D. E., Effect of diethylstilboestrol on phosphatidylcholine biosynthesis and choline metabolism in the liver of roosters. *The Biochemical journal* **1981**, *200* (2), 321-6.
47. Neeman, M.; Degani, H., Metabolic studies of estrogen- and tamoxifen-treated human breast cancer cells by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Cancer research* **1989**, *49* (3), 589-94.
48. Ramirez de Molina, A.; Banez-Coronel, M.; Gutierrez, R.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Olmeda, D.; Megias, D.; Lacal, J. C., Choline kinase activation is a critical requirement for the proliferation of primary human mammary epithelial cells and breast tumor progression. *Cancer research* **2004**, *64* (18), 6732-9.
49. Jimenez, B.; del Peso, L.; Montaner, S.; Esteve, P.; Lacal, J. C., Generation of phosphorylcholine as an essential event in the activation of Raf-1 and MAP-kinases in growth factors-induced mitogenic stimulation. *Journal of cellular biochemistry* **1995**, *57* (1), 141-9.

50. Cuadrado, A.; Carnero, A.; Dolfi, F.; Jimenez, B.; Lacal, J. C., Phosphorylcholine: a novel second messenger essential for mitogenic activity of growth factors. *Oncogene* **1993**, *8* (11), 2959-68.
51. Glunde, K.; Shah, T.; Winnard, P. T., Jr.; Raman, V.; Takagi, T.; Vesuna, F.; Artemov, D.; Bhujwala, Z. M., Hypoxia regulates choline kinase expression through hypoxia-inducible factor-1 alpha signaling in a human prostate cancer model. *Cancer research* **2008**, *68* (1), 172-80.
52. Zhao, C.; Du, G.; Skowronek, K.; Frohman, M. A.; Bar-Sagi, D., Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to Ras activation by Sos. *Nature cell biology* **2007**, *9* (6), 706-12.
53. Rizzo, M. A.; Shome, K.; Vasudevan, C.; Stolz, D. B.; Sung, T. C.; Frohman, M. A.; Watkins, S. C.; Romero, G., Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274* (2), 1131-9.
54. Yalcin, A.; Clem, B.; Makoni, S.; Clem, A.; Nelson, K.; Thornburg, J.; Siow, D.; Lane, A. N.; Brock, S. E.; Goswami, U.; Eaton, J. W.; Telang, S.; Chesney, J., Selective inhibition of choline kinase simultaneously attenuates MAPK and PI3K/AKT signaling. *Oncogene* **2010**, *29* (1), 139-49.
55. Fang, Y.; Vilella-Bach, M.; Bachmann, R.; Flanigan, A.; Chen, J., Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* **2001**, *294* (5548), 1942-5.
56. Smith, T. A.; Bush, C.; Jameson, C.; Titley, J. C.; Leach, M. O.; Wilman, D. E.; McCready, V. R., Phospholipid metabolites, prognosis and proliferation in human breast carcinoma. *NMR in biomedicine* **1993**, *6* (5), 318-23.
57. Hernandez-Alcoceba, R.; Saniger, L.; Campos, J.; Nunez, M. C.; Khaless, F.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Lacal, J. C., Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene* **1997**, *15* (19), 2289-301.
58. Contractor, K.; Challapalli, A.; Barwick, T.; Winkler, M.; Hellawell, G.; Hazell, S.; Tomasi, G.; Al-Nahhas, A.; Mapelli, P.; Kenny, L. M.; Tadrous, P.; Coombes, R. C.; Aboagye, E. O.; Mangar, S., Use of [11C]choline PET-CT as a noninvasive method for detecting pelvic lymph node status from prostate cancer and relationship with choline kinase expression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2011**, *17* (24), 7673-83.
59. Tomas, A.; Futter, C. E.; Eden, E. R., EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends in cell biology* **2014**, *24* (1), 26-34.
60. Yang, C.; Robbins, P. D., The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. *Clinical & developmental immunology* **2011**, *2011*, 842849.
61. Filipazzi, P.; Burdek, M.; Villa, A.; Rivoltini, L.; Huber, V., Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Seminars in cancer biology* **2012**, *22* (4), 342-9.
62. Janardhan, S.; Srivani, P.; Sastry, G. N., Choline kinase: an important target for cancer. *Current medicinal chemistry* **2006**, *13* (10), 1169-86.
63. Rodriguez-Gonzalez, A.; Ramirez de Molina, A.; Fernandez, F.; Lacal, J. C., Choline kinase inhibition induces the increase in ceramides resulting in a highly specific and selective cytotoxic antitumoral strategy as a potential mechanism of action. *Oncogene* **2004**, *23* (50), 8247-59.
64. Banez-Coronel, M.; Ramirez de Molina, A.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Sarmentero, J.; Ramos, M. A.; Garcia-Cabezas, M. A.; Garcia-Oroz, L.; Lacal, J. C., Choline kinase alpha depletion selectively kills tumoral cells. *Current cancer drug targets* **2008**, *8* (8), 709-19.
65. Spanner, S.; Ansell, G. B., Choline metabolism in discrete areas of the brain: the effect of hemicholinium-3. *Biochem. Soc. Trans.* **1973**, *1*, 475-477.

66. Clary, G. L.; Tsai, C. F.; Guynn, R. W., Substrate specificity of choline kinase. *Archives of biochemistry and biophysics* **1987**, *254* (1), 214-21.
67. Cannon, J. G., Structure-activity aspects of hemicholinium-3 (HC-3) and its analogs and congeners. *Medicinal research reviews* **1994**, *14* (5), 505-31.
68. Binding Database. <http://www.bindingdb.org/>.
69. Campos, J.; Nunez, M. C.; Conejo-Garcia, A.; Sanchez-Martin, R. M.; Hernandez-Alcoceba, R.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Lacal, J. C.; Gallo, M. A.; Espinosa, A., QSAR-derived choline kinase inhibitors: how rational can antiproliferative drug design be? *Current medicinal chemistry* **2003**, *10* (13), 1095-112.
70. Gordon, B. L.; Finnerty, B. M.; Aronova, A.; Fahey, T. J., 3rd, Genomic medicine for cancer diagnosis. *Journal of surgical oncology* **2014**.
71. Campos, J. M.; Nunez, M. C.; Sanchez, R. M.; Gomez-Vidal, J. A.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Banez, M.; Gallo, M. A.; Lacal, J. C.; Espinosa, A., Quantitative structure-activity relationships for a series of symmetrical bisquaternary anticancer compounds. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2002**, *10* (7), 2215-31.
72. Conejo-Garcia, A.; Banez-Coronel, M.; Sanchez-Martin, R. M.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Ramos, A.; Ramirez de Molina, A.; Espinosa, A.; Gallo, M. A.; Campos, J. M.; Lacal, J. C., Influence of the linker in bispyridium compounds on the inhibition of human choline kinase. *Journal of medicinal chemistry* **2004**, *47* (22), 5433-40.
73. Hernandez-Alcoceba, R.; Fernandez, F.; Lacal, J. C., In vivo antitumor activity of choline kinase inhibitors: a novel target for anticancer drug discovery. *Cancer research* **1999**, *59* (13), 3112-8.
74. Sanchez-Martin, R.; Campos, J. M.; Conejo-Garcia, A.; Cruz-Lopez, O.; Banez-Coronel, M.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Gallo, M. A.; Lacal, J. C.; Espinosa, A., Symmetrical bis-quinolinium compounds: new human choline kinase inhibitors with antiproliferative activity against the HT-29 cell line. *Journal of medicinal chemistry* **2005**, *48* (9), 3354-63.
75. TCD-Pharma. <http://www.tcdpharma.com/html/TCD/717.html>.
76. Lacal, J. C.; Campos, J. M., Preclinical Characterization of RSM-932A, a Novel Anticancer Drug Targeting the Human Choline Kinase Alpha, an Enzyme Involved in Increased Lipid Metabolism of Cancer Cells. *Molecular cancer therapeutics* **2015**, *14* (1), 31-9.
77. Conejo-Garcia, A.; Campos, J.; Sanchez, R. M.; Rodriguez-Gonzalez, A.; Lacal, J. C.; Gallo, M. A.; Espinosa, A., Choline kinase inhibitory effect and antiproliferative activity of new 1,1',1''-(benzene-1,3,5-triylmethylene)tris[4-[(disubstituted)amino]pyridinium] tribromides. *European journal of medicinal chemistry* **2003**, *38* (1), 109-16.
78. Conejo-Garcia, A.; Campos, J. M.; Sanchez-Martin, R. M.; Gallo, M. A.; Espinosa, A., Bispyridinium cyclophanes: novel templates for human choline kinase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **2003**, *46* (17), 3754-7.
79. Gómez Pérez, V. Nuevos piridofanos simétricos con actividad antiproliferativa y leishmanicida. Granada, 2013.
80. Sahun-Roncero, M.; Rubio-Ruiz, B.; Saladino, G.; Conejo-Garcia, A.; Espinosa, A.; Velazquez-Campoy, A.; Gervasio, F. L.; Entrena, A.; Hurtado-Guerrero, R., The mechanism of allosteric coupling in choline kinase alpha1 revealed by the action of a rationally designed inhibitor. *Angewandte Chemie* **2013**, *52* (17), 4582-6.
81. Schiaffino Ortega, S. Nuevos inhibidores de Colino Quinasa no simétricos y simétricos más polares con actividad antitumoral y antimalárica. 2012.
82. Peisach, D.; Gee, P.; Kent, C.; Xu, Z., The crystal structure of choline kinase reveals a eukaryotic protein kinase fold. *Structure* **2003**, *11* (6), 703-13.
83. Yuan, C.; Kent, C., Identification of critical residues of choline kinase A2 from *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279* (17), 17801-9.
84. Milanese, L.; Espinosa, A.; Campos, J. M.; Gallo, M. A.; Entrena, A., Insight into the inhibition of human choline kinase: homology modeling and molecular dynamics simulations. *ChemMedChem* **2006**, *1* (11), 1216-28.

85. Hong, B. S.; Allali-Hassani, A.; Tempel, W.; Finerty, P. J., Jr.; Mackenzie, F.; Dimov, S.; Vedadi, M.; Park, H. W., Crystal structures of human choline kinase isoforms in complex with hemicholinium-3: single amino acid near the active site influences inhibitor sensitivity. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285* (21), 16330-40.
86. Rubio Ruiz, B. Diseño y síntesis de nuevos inhibidores no simétricos de colina quinasa como fármacos antitumorales y antimaláricos. Granada, 2013.
87. Greenman, C.; Stephens, P.; Smith, R.; Dalgliesh, G. L.; Hunter, C.; Bignell, G.; Davies, H.; Teague, J.; Butler, A.; Stevens, C.; Edkins, S.; O'Meara, S.; Vastrik, I.; Schmidt, E. E.; Avis, T.; Barthorpe, S.; Bhamra, G.; Buck, G.; Choudhury, B.; Clements, J.; Cole, J.; Dicks, E.; Forbes, S.; Gray, K.; Halliday, K.; Harrison, R.; Hills, K.; Hinton, J.; Jenkinson, A.; Jones, D.; Menzies, A.; Mironenko, T.; Perry, J.; Raine, K.; Richardson, D.; Shepherd, R.; Small, A.; Tofts, C.; Varian, J.; Webb, T.; West, S.; Widaa, S.; Yates, A.; Cahill, D. P.; Louis, D. N.; Goldstraw, P.; Nicholson, A. G.; Basseur, F.; Looijenga, L.; Weber, B. L.; Chiew, Y. E.; DeFazio, A.; Greaves, M. F.; Green, A. R.; Campbell, P.; Birney, E.; Easton, D. F.; Chenevix-Trench, G.; Tan, M. H.; Khoo, S. K.; Teh, B. T.; Yuen, S. T.; Leung, S. Y.; Wooster, R.; Futreal, P. A.; Stratton, M. R., Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **2007**, *446* (7132), 153-8.
88. Sahun-Roncero, M.; Rubio-Ruiz, B.; Conejo-Garcia, A.; Velazquez-Campoy, A.; Entrena, A.; Hurtado-Guerrero, R., Determination of potential scaffolds for human choline kinase alpha1 by chemical deconvolution studies. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2013**, *14* (11), 1291-5.
89. Rubio-Ruiz, B.; Figuerola-Conchas, A.; Ramos-Torrecillas, J.; Capitan-Canadas, F.; Rios-Marco, P.; Carrasco, M. P.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Marco, C.; Ruiz, C.; Entrena, A.; Hurtado-Guerrero, R.; Conejo-Garcia, A., Discovery of a new binding site on human choline kinase alpha1: design, synthesis, crystallographic studies, and biological evaluation of asymmetrical bispyridinium derivatives. *Journal of medicinal chemistry* **2014**, *57* (2), 507-15.
90. Srivani, P.; Sastry, G. N., Potential choline kinase inhibitors: a molecular modeling study of bis-quinolinium compounds. *Journal of molecular graphics & modelling* **2009**, *27* (6), 676-88.
91. WHO, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>.
92. World Malaria Report. 2013.
93. Prime, version 3.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
94. <http://www.lifechemicals.com/>.
95. WHO, *Guidelines for the treatment of malaria*. Second edition. ed.; 2010; p 194.
96. Farooq, U.; Mahajan, R. C., Drug resistance in malaria. *Journal of vector borne diseases* **2004**, *41* (3-4), 45-53.
97. Achan, J.; Talisuna, A. O.; Erhart, A.; Yeka, A.; Tibenderana, J. K.; Baliraine, F. N.; Rosenthal, P. J.; D'Alessandro, U., Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria journal* **2011**, *10*, 144.
98. The History of Malaria, an Ancient Disease. <http://www.cdc.gov/malaria/about/history/>.
99. Abay, S. M., Blocking malaria transmission to Anopheles mosquitoes using artemisinin derivatives and primaquine: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & vectors* **2013**, *6* (1), 278.
100. Li, Y., Qinghaosu (artemisinin): chemistry and pharmacology. *Acta pharmacologica Sinica* **2012**, *33* (9), 1141-6.
101. Whitty, C. J.; Chandler, C.; Ansah, E.; Leslie, T.; Staedke, S. G., Deployment of ACT antimalarials for treatment of malaria: challenges and opportunities. *Malaria journal* **2008**, *7* Suppl 1, S7.
102. WHO, *Access to antimalarial medicine: improving the affordability and financing of artemisinin-based combination therapies*. 2003.
103. Yeung, S.; Van Damme, W.; Socheat, D.; White, N. J.; Mills, A., Access to artemisinin combination therapy for malaria in remote areas of Cambodia. *Malaria journal* **2008**, *7*, 96.
104. <http://www.chembridge.com/>.

105. Alberge, B.; Gannoun-Zaki, L.; Bascunana, C.; Tran van Ba, C.; Vial, H.; Cerdan, R., Comparison of the cellular and biochemical properties of Plasmodium falciparum choline and ethanolamine kinases. *The Biochemical journal* **2010**, *425* (1), 149-58.
106. Sen, P.; Vial, H. J.; Radulescu, O., Kinetic modelling of phospholipid synthesis in Plasmodium knowlesi unravels crucial steps and relative importance of multiple pathways. *BMC systems biology* **2013**, *7*, 123.
107. Biagini, G. A.; Pasini, E. M.; Hughes, R.; De Koning, H. P.; Vial, H. J.; O'Neill, P. M.; Ward, S. A.; Bray, P. G., Characterization of the choline carrier of Plasmodium falciparum: a route for the selective delivery of novel antimalarial drugs. *Blood* **2004**, *104* (10), 3372-7.
108. Richier, E.; Biagini, G. A.; Wein, S.; Boudou, F.; Bray, P. G.; Ward, S. A.; Precigout, E.; Calas, M.; Dubremetz, J. F.; Vial, H. J., Potent antihematozoan activity of novel bithiazolium drug T16: evidence for inhibition of phosphatidylcholine metabolism in erythrocytes infected with Babesia and Plasmodium spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2006**, *50* (10), 3381-8.
109. N.Mago; Khuller, G. K., Biosynthesis of major phospholipids in Candida albicans. *Current Microbiology* **1990**, *20* (6), 369-372.
110. Mago, N.; Khuller, G. K., Lipids of Candida albicans: subcellular distribution and biosynthesis. *Journal of general microbiology* **1990**, *136* (6), 993-6.
111. Bansal, V. S.; Chopra, A.; Kasinathan, C.; Khuller, G. K., In vivo studies on phospholipid biosynthesis in Microsporium gypseum. *The Indian journal of medical research* **1982**, *76*, 832-6.
112. Kasinathan, C.; Khuller, G. K., Biosynthesis of major phospholipids of Microsporium gypseum. *Biochimica et biophysica acta* **1983**.
113. C.Kasinathan; U.Govindarajan; A.Chopra; G.K.Khuller, Phospholipids synthesizing enzymes of dermatophytes: II.Characterization of Choline Kinase. *Lipids* **1983**, *18*, 727-731.
114. Poxton, I. R.; Leak, D. J., The biosynthesis of a choline nucleotide by a cell-free extract from Streptococcus pneumoniae. *Journal of general microbiology* **1977**, *100* (1), 23-9.
115. Setty, P. N.; Krishnan, P. S., Choline kinase in Cuscuta reflexa. *The Biochemical journal* **1972**, *126* (2), 313-24.
116. Sampels, V.; Hartmann, A.; Dietrich, I.; Coppens, I.; Sheiner, L.; Striepen, B.; Herrmann, A.; Lucius, R.; Gupta, N., Conditional mutagenesis of a novel choline kinase demonstrates plasticity of phosphatidylcholine biogenesis and gene expression in Toxoplasma gondii. *The Journal of biological chemistry* **2012**, *287* (20), 16289-99.
117. Gibellini, F.; Hunter, W. N.; Smith, T. K., Biochemical characterization of the initial steps of the Kennedy pathway in Trypanosoma brucei: the ethanolamine and choline kinases. *The Biochemical journal* **2008**, *415* (1), 135-44.
118. Aguiar, A. C.; Rocha, E. M.; Souza, N. B.; Franca, T. C.; Krettli, A. U., New approaches in antimalarial drug discovery and development: a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **2012**, *107* (7), 831-45.
119. Burrows, J. N.; Chibale, K.; Wells, T. N., The state of the art in anti-malarial drug discovery and development. *Current topics in medicinal chemistry* **2011**, *11* (10), 1226-54.
120. Wells, T. N., Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? *Malaria journal* **2011**, *10 Suppl 1*, S3.
121. (a) Perecko, T.; Kassab, R. B.; Vasicek, O.; Pekarova, M.; Jancinova, V.; Lojek, A., The Effects of Chloroquine and Hydroxychloroquine on Nitric Oxide Production in RAW 264.7 and Bone Marrow-Derived Macrophages. *Folia biologica* **2014**, *60 Suppl 1*, 39-44; (b) Mollapour, M.; Neckers, L., Quinacrine: New anti-tumor application for an old anti-malaria drug. *Cell cycle* **2010**, *9* (2), 228; (c) Hamainza, B.; Masaninga, F.; Moonga, H.; Mwenda, M.; Chanda-Kapata, P.; Chalwe, V.; Chanda, E.; Kamuliwo, M.; Ayorinde Babaniyi, O., Therapeutic efficacy of artemether-lumefantrine on treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum mono-infection in an area of high malaria transmission in Zambia. *Malaria journal* **2014**, *13* (1), 430.
122. Winstanley, P., The contribution of clinical pharmacology to antimalarial drug discovery and development. *British journal of clinical pharmacology* **2003**, *55* (5), 464-8.

123. Cortopassi, W. A.; Penna-Coutinho, J.; Aguiar, A. C.; Pimentel, A. S.; Buarque, C. D.; Costa, P. R.; Alves, B. R.; Franca, T. C.; Krettli, A. U., Theoretical and experimental studies of new modified isoflavonoids as potential inhibitors of topoisomerase I from *Plasmodium falciparum*. *PLoS one* **2014**, *9* (3), e91191.
124. Ben Mamoun, C.; Prigge, S. T.; Vial, H., Targeting the Lipid Metabolic Pathways for the Treatment of Malaria. *Drug development research* **2010**, *71* (1), 44-55.
125. Ancelin, M. L.; Calas, M.; Bonhoure, A.; Herbute, S.; Vial, H. J., In vivo antimalarial activities of mono- and bis quaternary ammonium salts interfering with *Plasmodium* phospholipid metabolism. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2003**, *47* (8), 2598-605.
126. Ancelin, M. L.; Calas, M.; Vidal-Sailhan, V.; Herbute, S.; Ringwald, P.; Vial, H. J., Potent inhibitors of *Plasmodium* phospholipid metabolism with a broad spectrum of in vitro antimalarial activities. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2003**, *47* (8), 2590-7.
127. Wengelnik, K.; Vidal, V.; Ancelin, M. L.; Cathiard, A. M.; Morgat, J. L.; Kocken, C. H.; Calas, M.; Herrera, S.; Thomas, A. W.; Vial, H. J., A class of potent antimalarials and their specific accumulation in infected erythrocytes. *Science* **2002**, *295* (5558), 1311-4.
128. Roggero, R.; Zufferey, R.; Minca, M.; Richier, E.; Calas, M.; Vial, H.; Ben Mamoun, C., Unraveling the mode of action of the antimalarial choline analog G25 in *Plasmodium falciparum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2004**, *48* (8), 2816-24.
129. Wein, S.; Maynadier, M.; Bordat, Y.; Perez, J.; Maheshwari, S.; Bette-Bobillo, P.; Tran Van Ba, C.; Penarete-Vargas, D.; Fraisse, L.; Cerdan, R.; Vial, H., Transport and pharmacodynamics of albitiazolium, an antimalarial drug candidate. *British journal of pharmacology* **2012**, *166* (8), 2263-76.
130. Caldarelli, S. A.; Hamel, M.; Duckert, J. F.; Ouattara, M.; Calas, M.; Maynadier, M.; Wein, S.; Perigaud, C.; Pellet, A.; Vial, H. J.; Peyrottes, S., Disulfide prodrugs of albitiazolium (T3/SAR97276): synthesis and biological activities. *Journal of medicinal chemistry* **2012**, *55* (10), 4619-28.
131. Choubey, V.; Maity, P.; Guha, M.; Kumar, S.; Srivastava, K.; Puri, S. K.; Bandyopadhyay, U., Inhibition of *Plasmodium falciparum* choline kinase by hexadecyltrimethylammonium bromide: a possible antimalarial mechanism. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2007**, *51* (2), 696-706.
132. Ortega, S. S., Nuevos inhibidores de colina quinasa no simétricos y simétricos más polares con actividad antitumoral y antimalárica. **2012**, 1-306.
133. Rubio-Ruiz, B.; Castillo-Acosta, V. M.; Perez-Moreno, G.; Espinosa, A.; Gonzalez-Pacanowska, D.; Ruiz-Perez, L. M.; Entrena, A.; Conejo-Garcia, A., In vitro antiplasmodial and cytotoxic activities of asymmetrical pyridinium derivatives. *European journal of medicinal chemistry* **2014**, *85*, 289-92.
134. Zimmerman, T.; Moneriz, C.; Diez, A.; Bautista, J. M.; Gomez Del Pulgar, T.; Cebrian, A.; Lacal, J. C., Antiplasmodial activity and mechanism of action of RSM-932A, a promising synergistic inhibitor of *Plasmodium falciparum* choline kinase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2013**, *57* (12), 5878-88.
135. L., H. T., *An Introduction to Statistical Thermodynamics*. Dover Publications: New York, 1986.
136. Rester, U., From virtuality to reality - Virtual screening in lead discovery and lead optimization: a medicinal chemistry perspective. *Current opinion in drug discovery & development* **2008**, *11* (4), 559-68.
137. Rollinger, J. M.; Stuppner, H.; Langer, T., Virtual screening for the discovery of bioactive natural products. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques* **2008**, *65*, 211, 213-49.
138. Sharma, A. a. S., S. G., *Introduction to Fluorescence Spectroscopy*. . Wiley interscience.: 1999.

139. Gruber, J.; See Too, W. C.; Wong, M. T.; Lavie, A.; McSorley, T.; Konrad, M., Balance of human choline kinase isoforms is critical for cell cycle regulation: implications for the development of choline kinase-targeted cancer therapy. *The FEBS journal* **2012**, *279* (11), 1915-28.
140. Wang, S. S.; Xie, X.; Wong, C. S.; Choi, Y.; Fung, M. C., HepG2 cells recovered from apoptosis show altered drug responses and invasiveness. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT* **2014**, *13* (3), 293-300.
141. Li, L. J.; Li, G. D.; Wei, H. L.; Chen, J.; Liu, Y. M.; Li, F.; Xie, B.; Wang, B.; Li, C. L., Insulin resistance reduces sensitivity to Cis-platinum and promotes adhesion, migration and invasion in HepG2 cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **2014**, *15* (7), 3123-8.
142. Liu, M.; Jiang, L.; Guan, X. Y., The genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma: a recent update. *Protein & cell* **2014**, *5* (9), 673-91.
143. Rich, T. A.; Woodson, A. H.; Litton, J.; Arun, B., Hereditary breast cancer syndromes and genetic testing. *Journal of surgical oncology* **2014**.
144. Wu, L.; Zhang, Z.; Yao, H.; Liu, K.; Wen, Y.; Xiong, L., Clinical efficacy of second-generation tyrosine kinase inhibitors in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis of recent clinical trials. *Drug design, development and therapy* **2014**, *8*, 2061-7.
145. Smock, R. G.; Gierasch, L. M., Sending signals dynamically. *Science* **2009**, *324* (5924), 198-203.
146. Weisstein, E. W. "Root-Mean-Square" <http://mathworld.wolfram.com/Root-Mean-Square.html>.
147. Sahun-Roncero, M.; Rubio-Ruiz, B.; Conejo-Garcia, A.; Velazquez-Campoy, A.; Entrena, A.; Hurtado-Guerrero, R., Determination of Potential Scaffolds for Human Choline Kinase [alpha]1 by Chemical Deconvolution Studies. *ChemBioChem* **2013**, *14* (11), 1291.
148. Tahl Zimmerman, C. M., Amalia Diez, José Maria Bautista, Teresa Gómez del Pulgar, Arancha Cebrián, Juan Carlos Lacal, Antiplasmodium activity and mechanism of action of RSM-932A, a promising synergistic inhibitor of Plasmodium falciparum choline kinase *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**.
149. Smilkstein, M.; Sriwilaijaroen, N.; Kelly, J. X.; Wilairat, P.; Riscoe, M., Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2004**, *48* (5), 1803-6.
150. Calas, M.; Ancelin, M. L.; Cordina, G.; Portefaix, P.; Piquet, G.; Vidal-Sailhan, V.; Vial, H., Antimalarial activity of compounds interfering with Plasmodium falciparum phospholipid metabolism: comparison between mono- and bisquaternary ammonium salts. *Journal of medicinal chemistry* **2000**, *43* (3), 505-16.
151. Ginsburg, H.; Kutner, S.; Zangwil, M.; Cabantchik, Z. I., Selectivity properties of pores induced in host erythrocyte membrane by Plasmodium falciparum. Effect of parasite maturation. *Biochimica et biophysica acta* **1986**, *861* (1), 194-6.
152. Martin, R. E.; Henry, R. I.; Abbey, J. L.; Clements, J. D.; Kirk, K., The 'permeome' of the malaria parasite: an overview of the membrane transport proteins of Plasmodium falciparum. *Genome biology* **2005**, *6* (3), R26.
153. Rodriguez-Gonzalez, A.; Ramirez de Molina, A.; Fernandez, F.; Ramos, M. A.; del Carmen Nunez, M.; Campos, J.; Lacal, J. C., Inhibition of choline kinase as a specific cytotoxic strategy in oncogene-transformed cells. *Oncogene* **2003**, *22* (55), 8803-12.
154. Rodriguez-Gonzalez, A.; Ramirez de Molina, A.; Banez-Coronel, M.; Megias, D.; Lacal, J. C., Inhibition of choline kinase renders a highly selective cytotoxic effect in tumour cells through a mitochondrial independent mechanism. *International journal of oncology* **2005**, *26* (4), 999-1008.
155. Dipartimento di Scienze Farmaceutiche. <http://www.dsf.unipg.it/>.
156. Maestro, version 9.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.

157. Schrödinger Suite 2012 Protein Preparation Wizard; Epic version 2.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; Impact version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012; Prime version 3.1, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
158. Glide, version 5.8, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
159. Salam, N. K.; Nuti, R.; Sherman, W., Novel method for generating structure-based pharmacophores using energetic analysis. *Journal of chemical information and modeling* **2009**, *49* (10), 2356-68.
160. Phase, version 3.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
161. ConfGen, version 2.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2012.
162. <http://www.enamine.net/>.
163. UniProtKB. <http://www.uniprot.org/>.
164. Bond, C. S.; Scüttelkopf, A. W., ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. *Acta Crystallography* **2009**, *65*, 510-12.
165. MacroModel, version 9.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2011.
166. Desmond Molecular Dynamics System, v., D. E. Shaw Research, New York, NY, 2010. Maestro-Desmond Interoperability Tools, version 2.4, Schrödinger, New York, NY, 2010.
167. Wassenaar, T. A.; Mark, A. E., The effect of box shape on the dynamic properties of proteins simulated under periodic boundary conditions. *Journal of computational chemistry* **2006**, *27* (3), 316-25.
168. Berendsen, H. J. C. P. J. P. M.; Van Gunsteren, W. D.; Dinola, A. H., J.R., Molecular-Dynamics with Coupling to an External Bath. *Journal of Chemical Physics* **1984**, *81*, 3684-3690.
169. Ulrich Essmann, L. P., and Max L. Berkowitz, A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys* **1995**, *103* (19), 8577-8593.
170. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K., VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics* **1996**, *14* (1), 33-8, 27-8.
171. Haenel, H. A. S. M., Synthesen von [2.2](4,4')biphenylophan, [2.2](2,7)phenantrenophan und [2](4,4')biphenylo[2](2,7)phenantrenophan. *Chem. Ber.* **1973**, *106*, 2190-2202.
172. Steinberg, D. J. C. H., Macro rings. I. Preparation and spectra of the paraciclophanes. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 5691-5704.
173. Sánchez Martin, R. M. Nuevos antitumorales específicos frente a células transformadas por el oncogen ras, con estructura bisquinolinica, dirigidos a la colina quinasa. . 2002.
174. BIFI, Departamento de Bioquímica y Biología Celular. <http://bifi.es/en/research/biochemistry-and-mcb>.
175. Diamond Light Source. <http://www.diamond.ac.uk/Home.html>.
176. ALBA synchrotron. <https://www.cells.es/en/>.
177. Emsley, P.; Cowtan, K., Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2004**, *60* (Pt 12 Pt 1), 2126-32.
178. Vagin, A. A.; Steiner, R. A.; Lebedev, A. A.; Potterton, L.; McNicholas, S.; Long, F.; Murshudov, G. N., REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2004**, *60* (Pt 12 Pt 1), 2184-95.
179. CCP4.
180. PRODRG.
181. Laskowski, R. A.; Rullmann, J. A.; MacArthur, M. W.; Kaptein, R.; Thornton, J. M., AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal of biomolecular NMR* **1996**, *8* (4), 477-86.
182. PROCHECK.

183. Jimenez-Lopez, J. M.; Carrasco, M. P.; Segovia, J. L.; Marco, C., Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of HepG2 cells. *European journal of biochemistry / FEBS* **2002**, *269* (18), 4649-55.
184. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, UGR. http://bbm1.ugr.es/pages/profesorado/carmen_marco.
185. CIBA. <http://www.iacs.aragon.es/awgc/inicio.estaticas.do?app=ciba&file=index.html>.
186. Pardo, J.; Perez-Galan, P.; Gamen, S.; Marzo, I.; Monleon, I.; Kaspar, A. A.; Susin, S. A.; Kroemer, G.; Krensky, A. M.; Naval, J.; Anel, A., A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *Journal of immunology* **2001**, *167* (3), 1222-9.
187. Abad-Zapatero, C., Ligand efficiency indices for effective drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* **2007**, *2* (4), 469-88.

ANEXO I

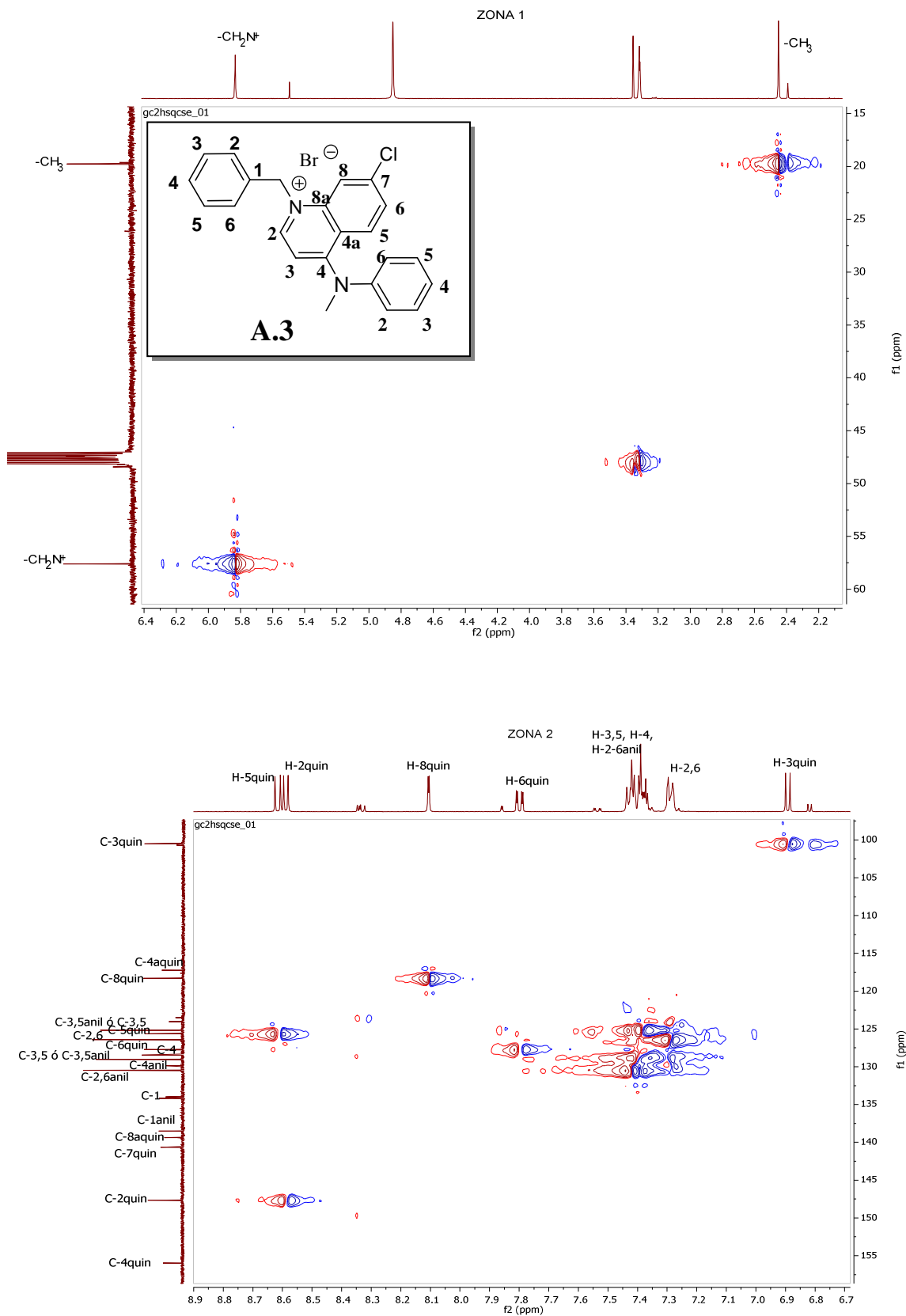


Figura A.1. Espectro de HSQC del compuesto A.3 (familia A).

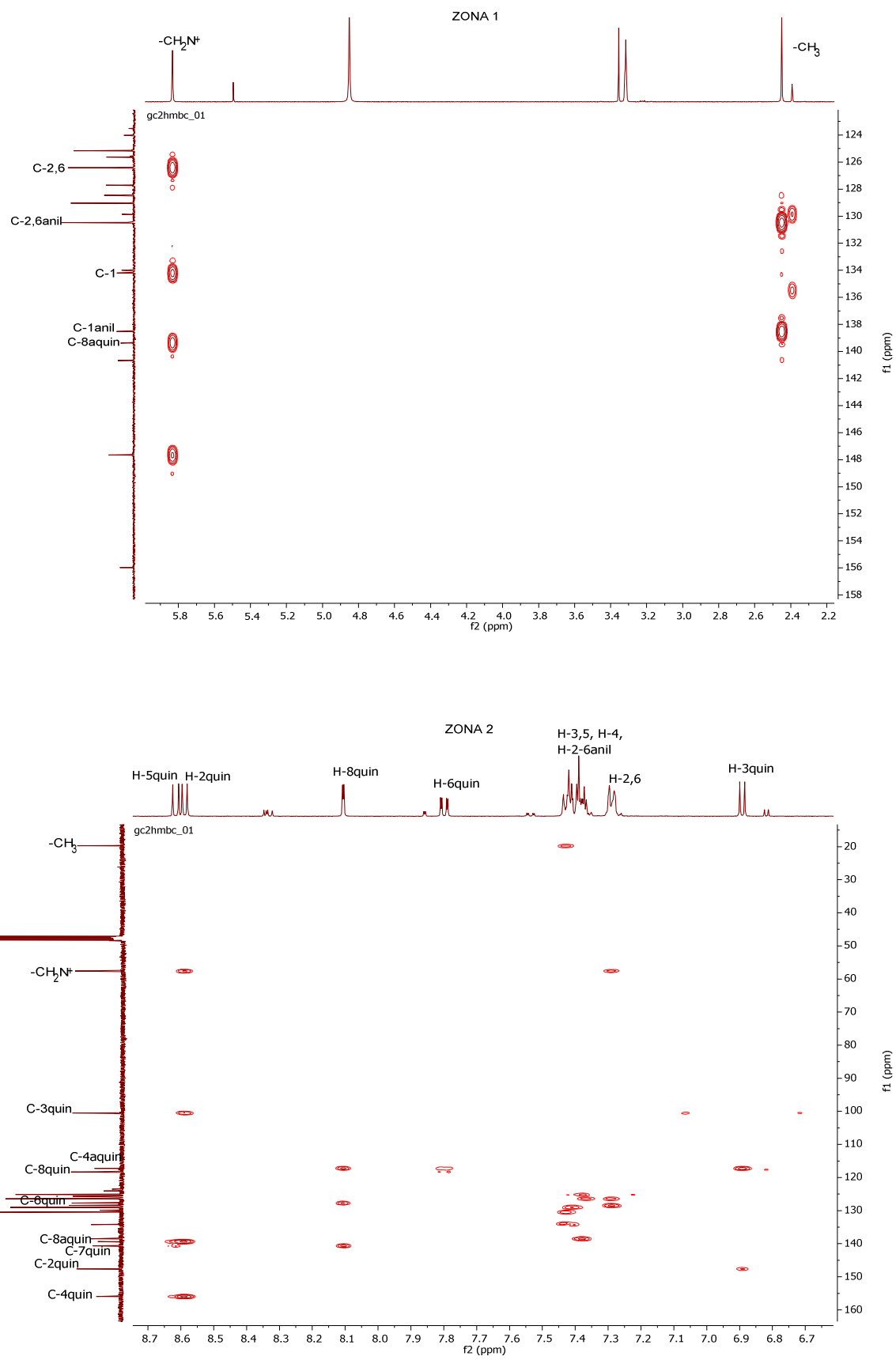


Figura A.2. Espectro de HMBC del compuesto **A.3** (familia **A**).

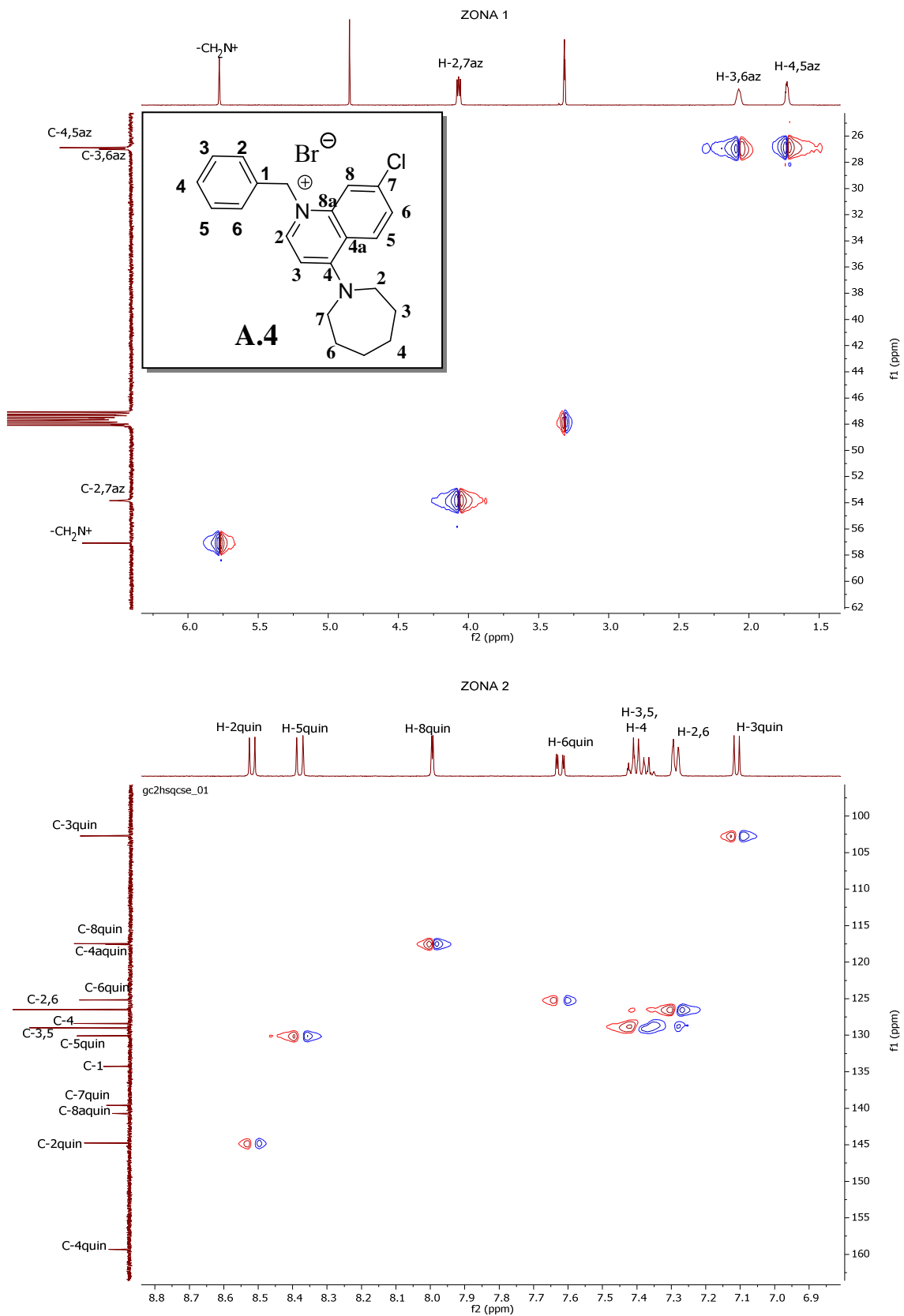


Figura A.3. Espectro de HSQC del compuesto **A.4** (familia **A**).

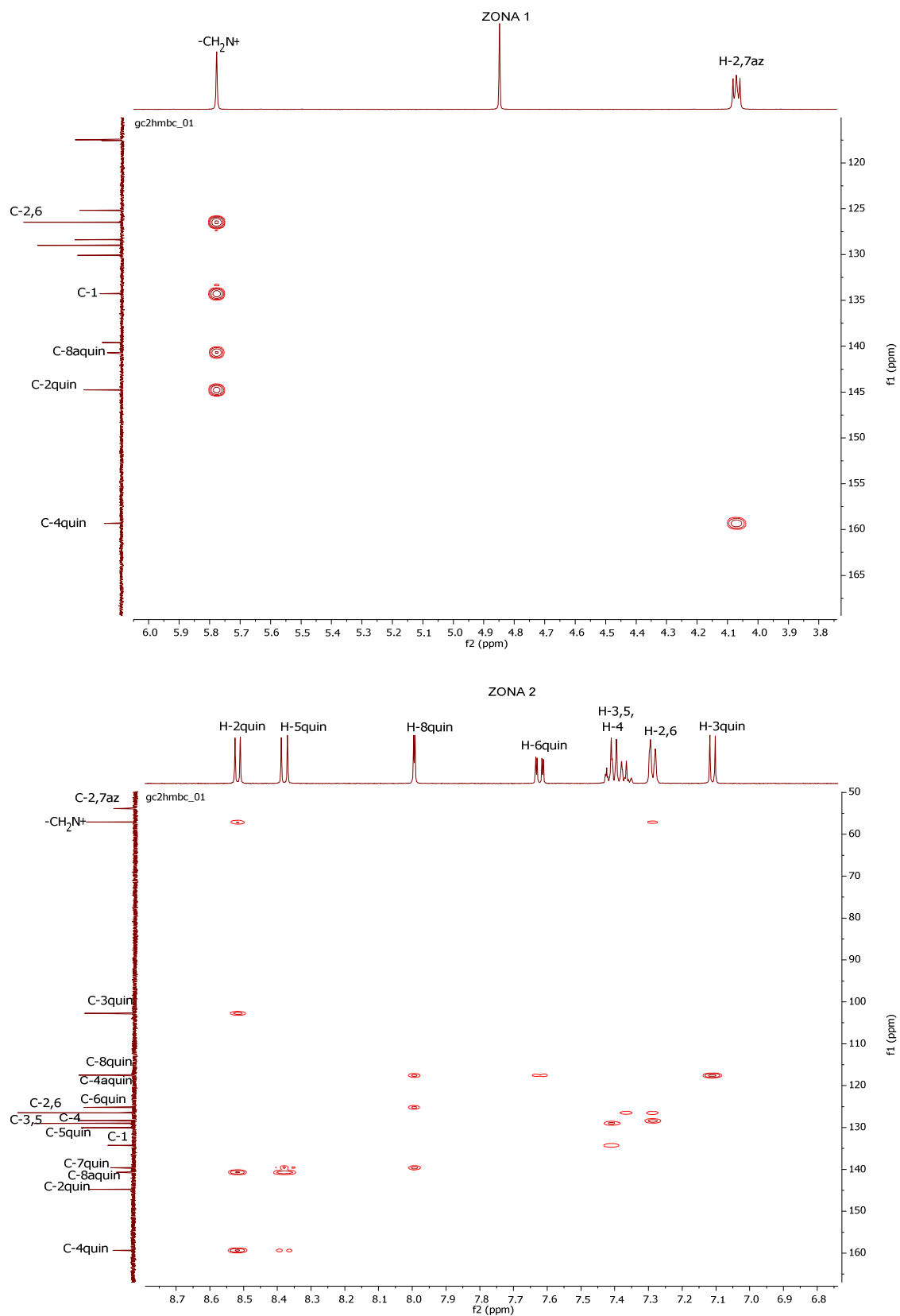


Figura A.4. Espectro de HMBC del compuesto A.4 (familia A).

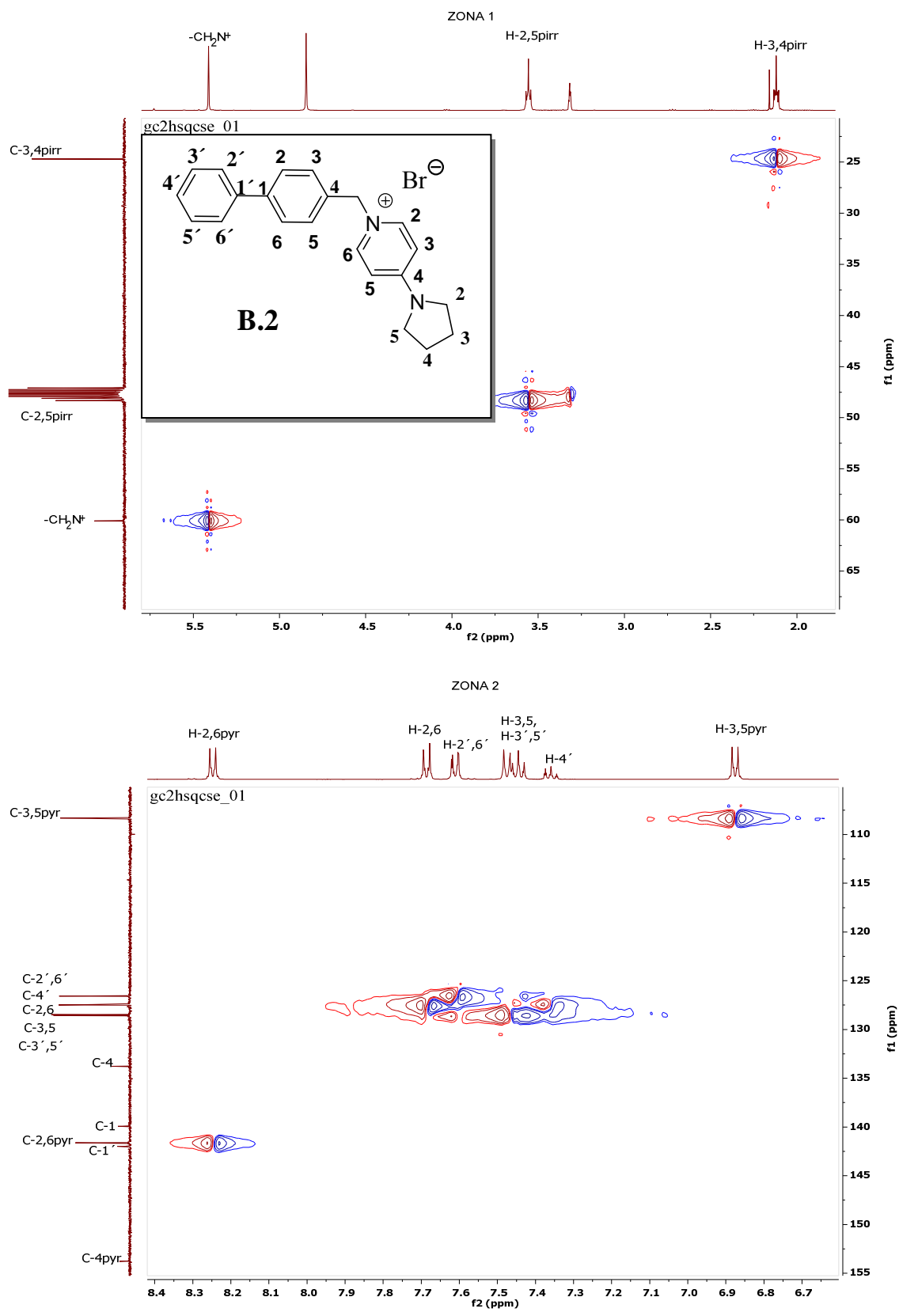


Figura A.5. Espectro de HSQC del compuesto **B.2** (familia **B**).

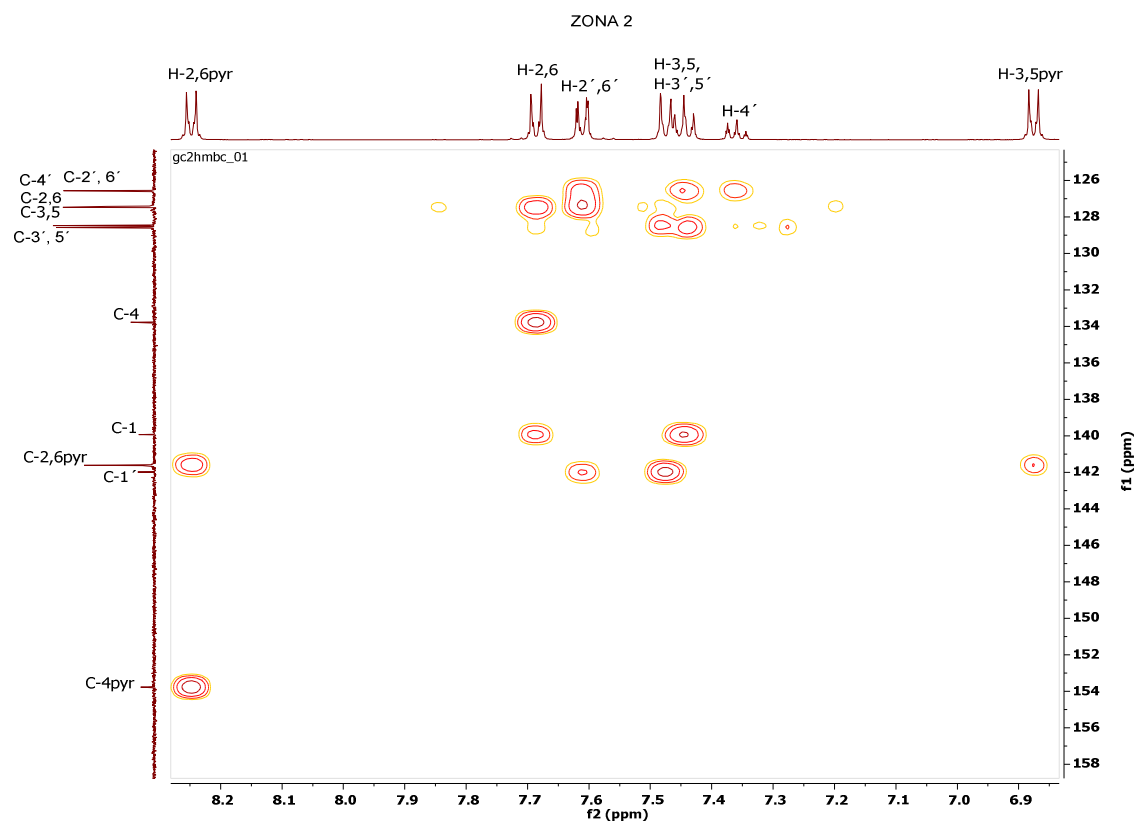
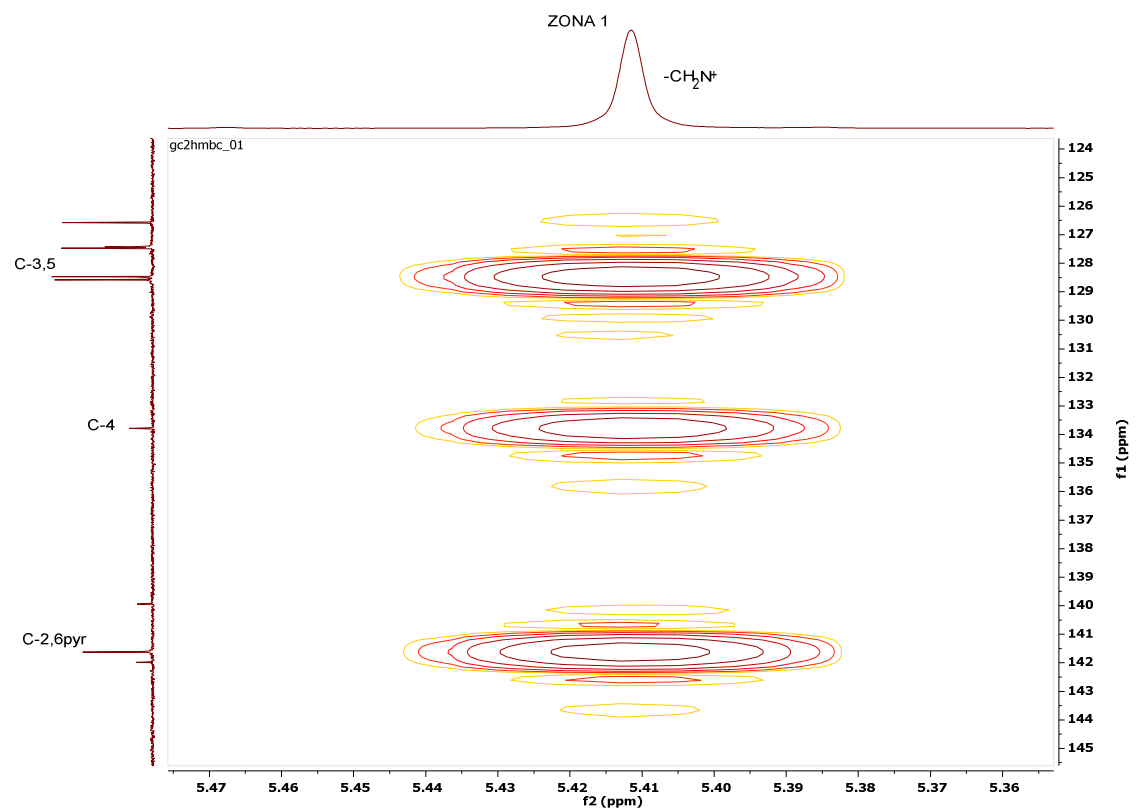


Figura A.6. Espectro de HMBC del compuesto **B.2** (familia **B**).

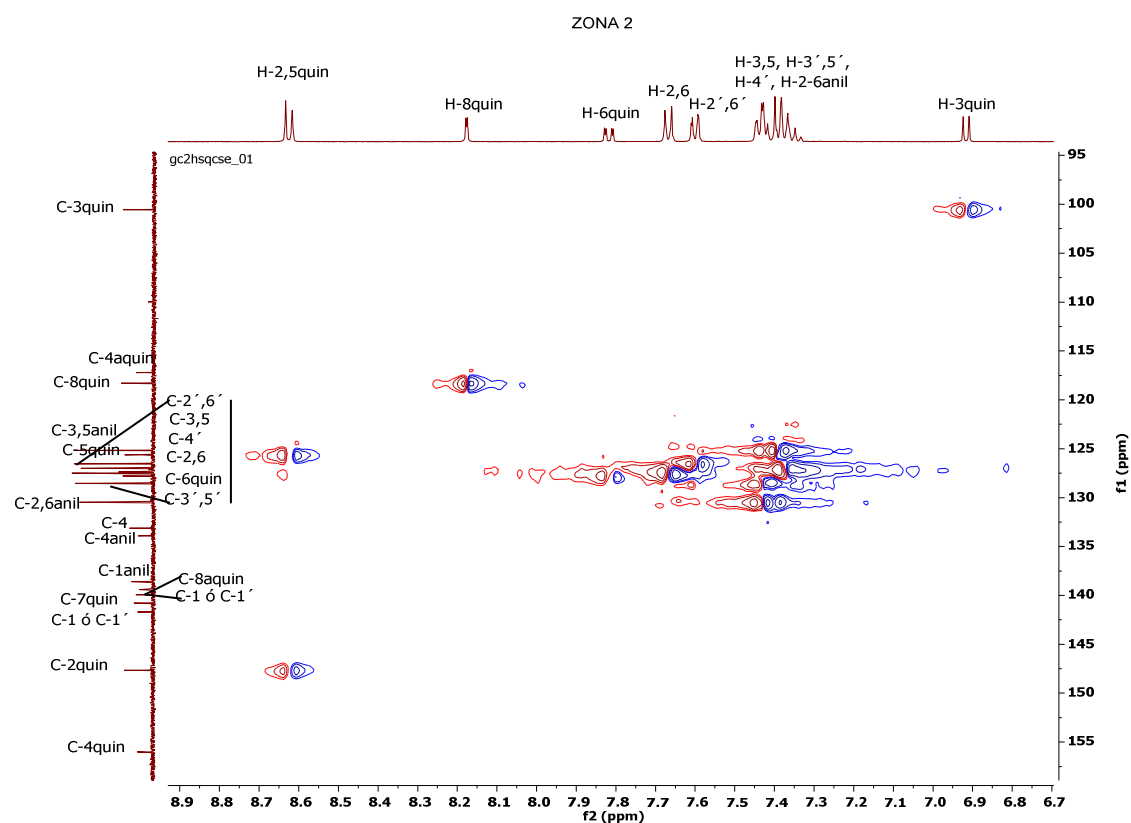
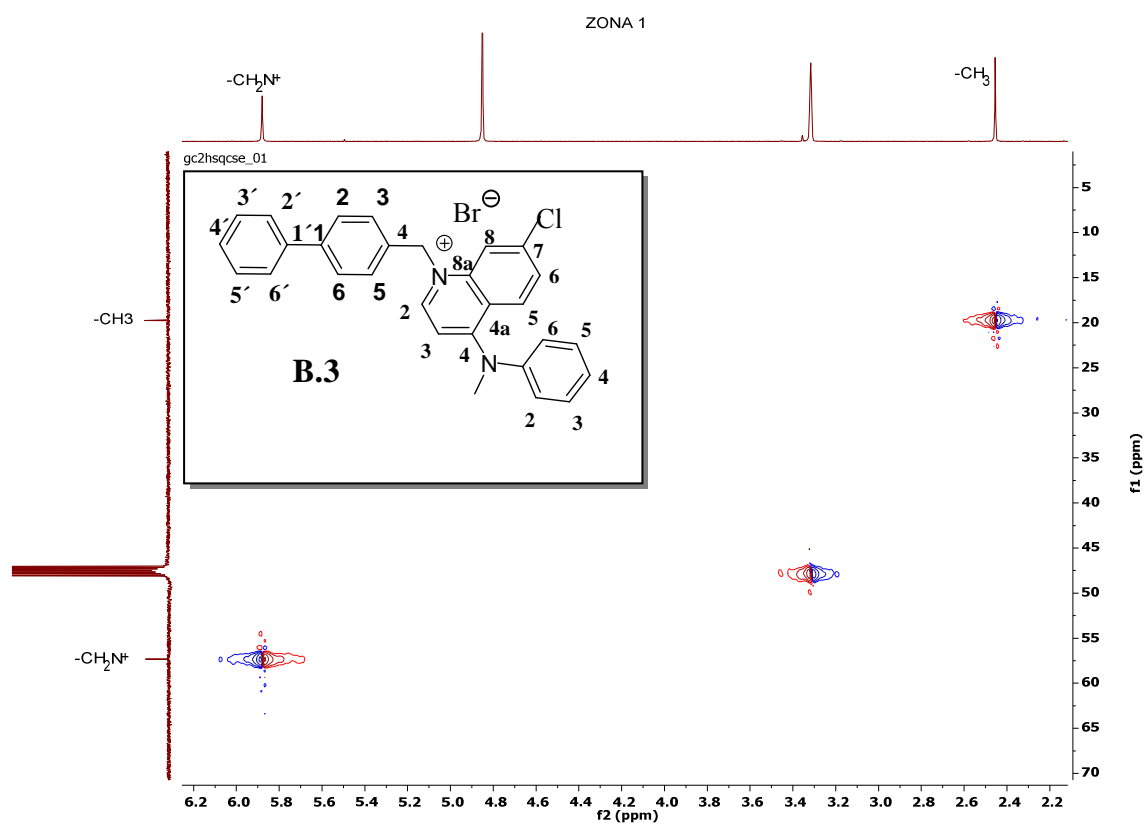


Figura A.7. Espectro de HSQC del compuesto **B.3** (familia **B**).

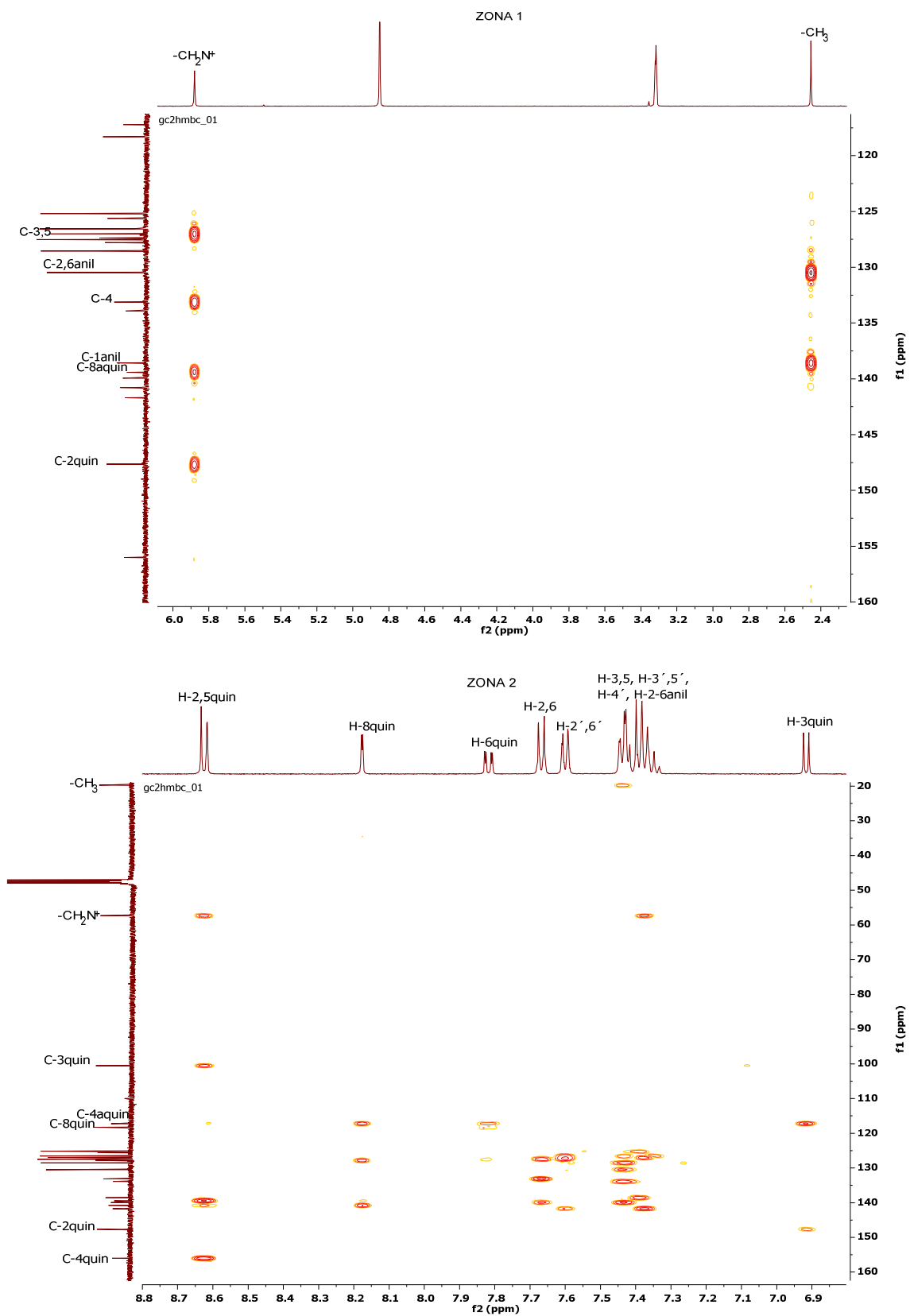


Figura A.8. Espectro de HMBC del compuesto B.3 (familia B).

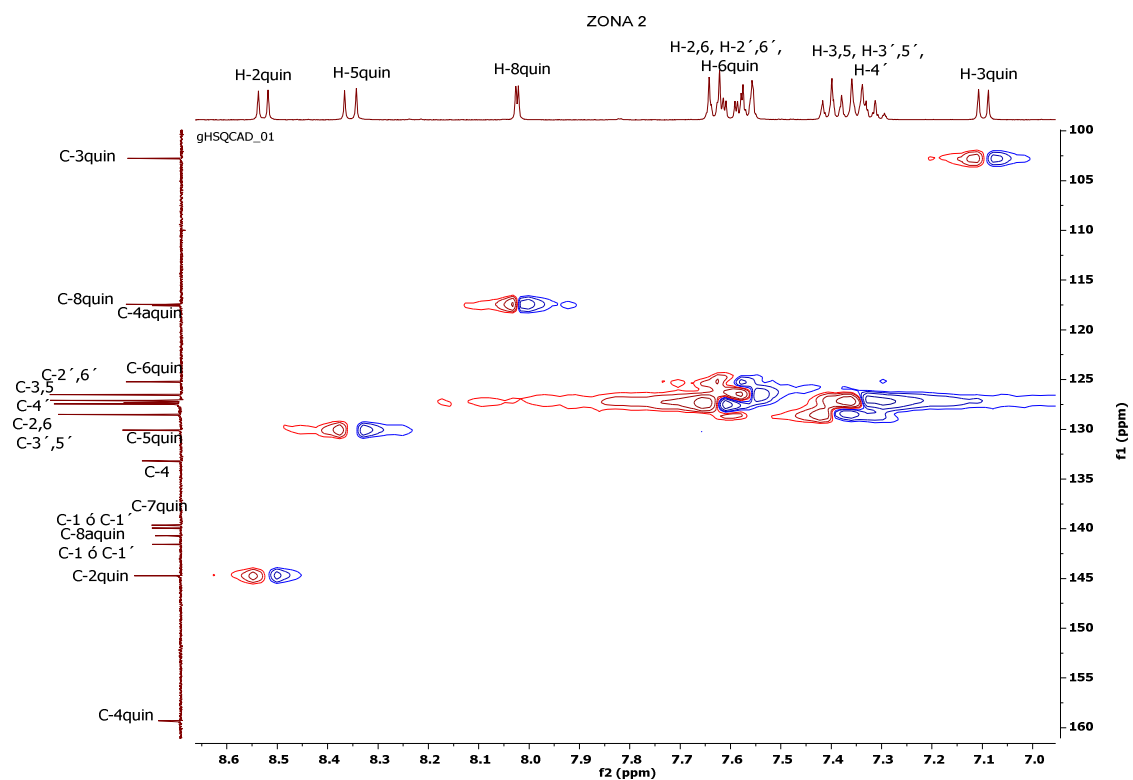
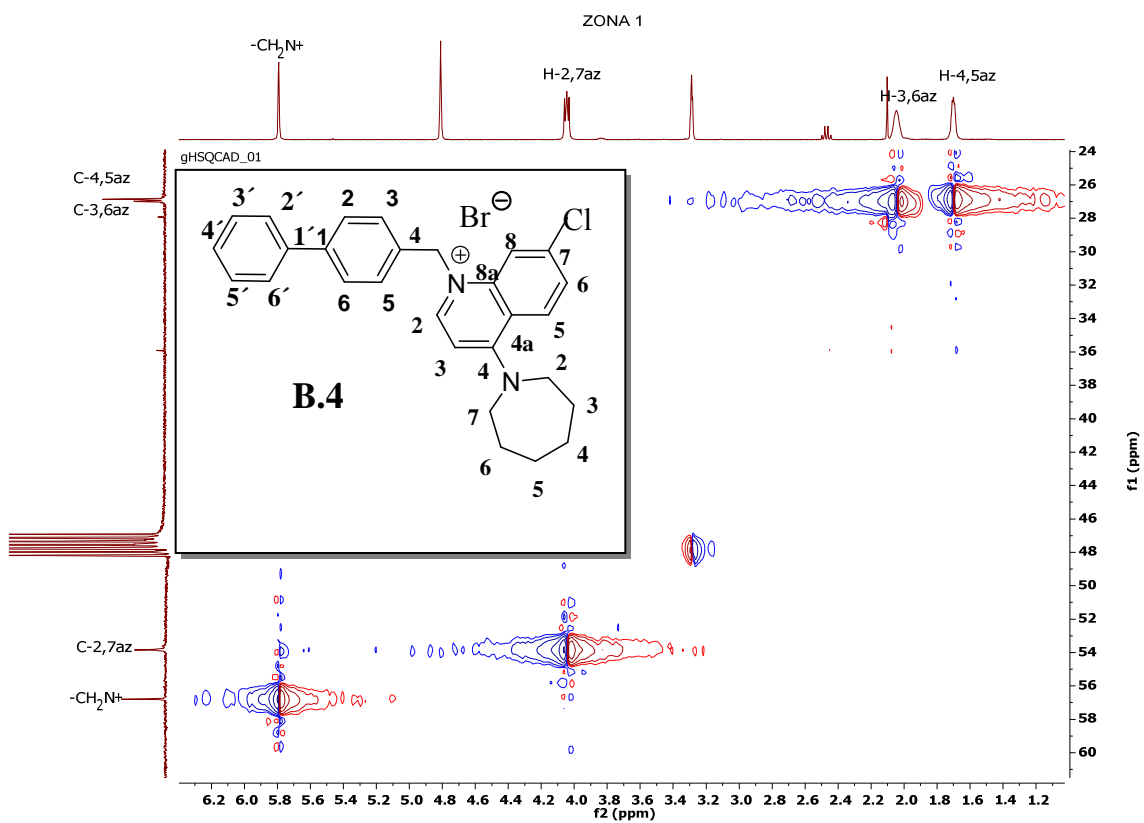


Figura A.9. Espectro de HSQC del compuesto **B.4** (familia **B**).

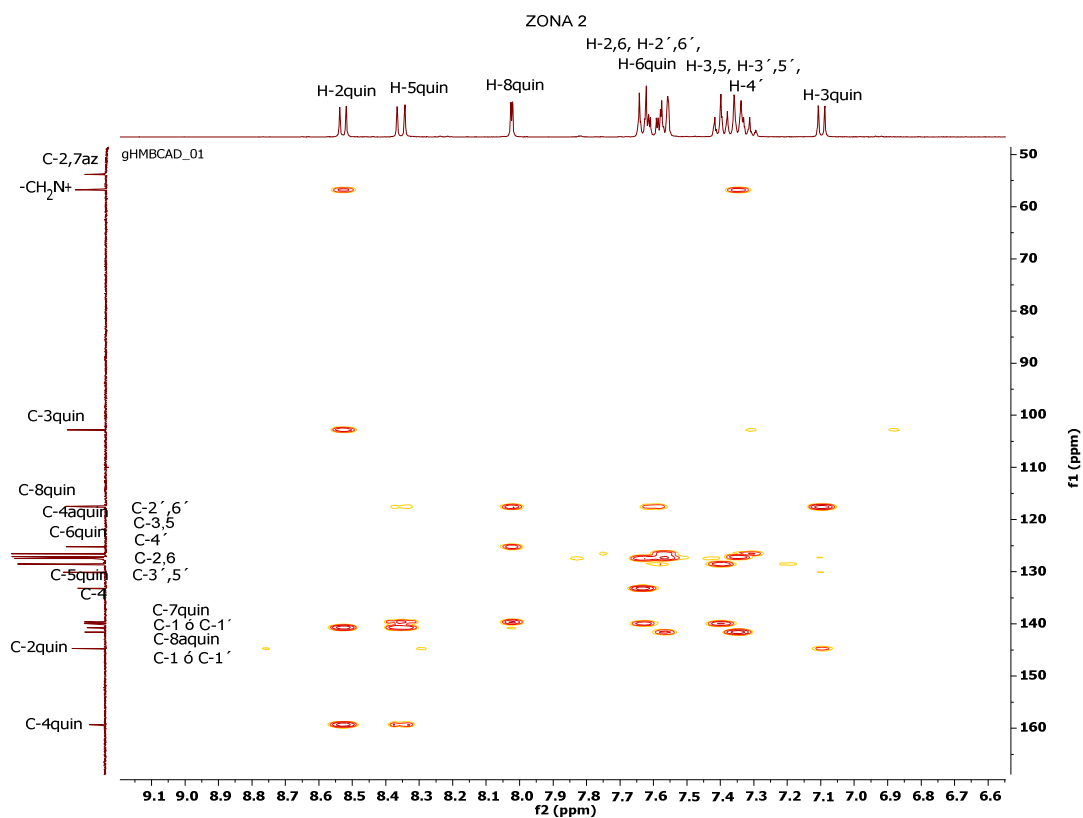
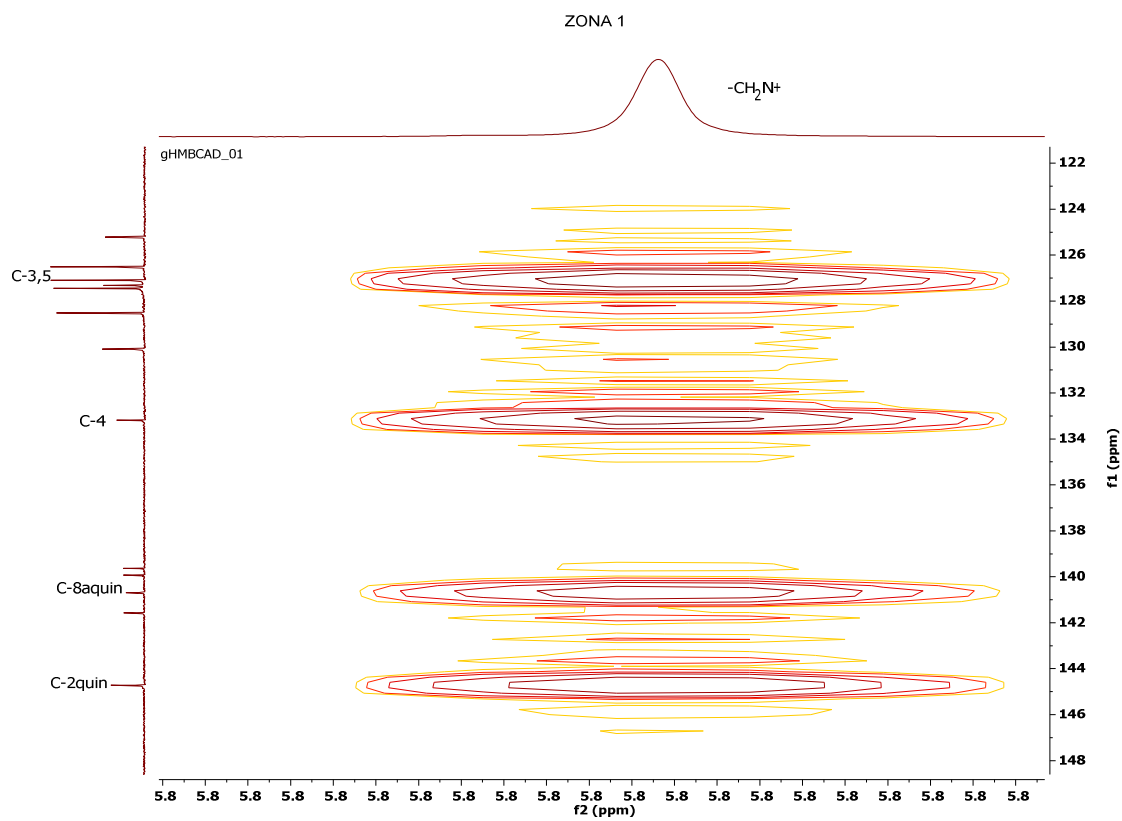


Figura A.10. Espectro de HMBC del compuesto **B.4** (familia **B**).

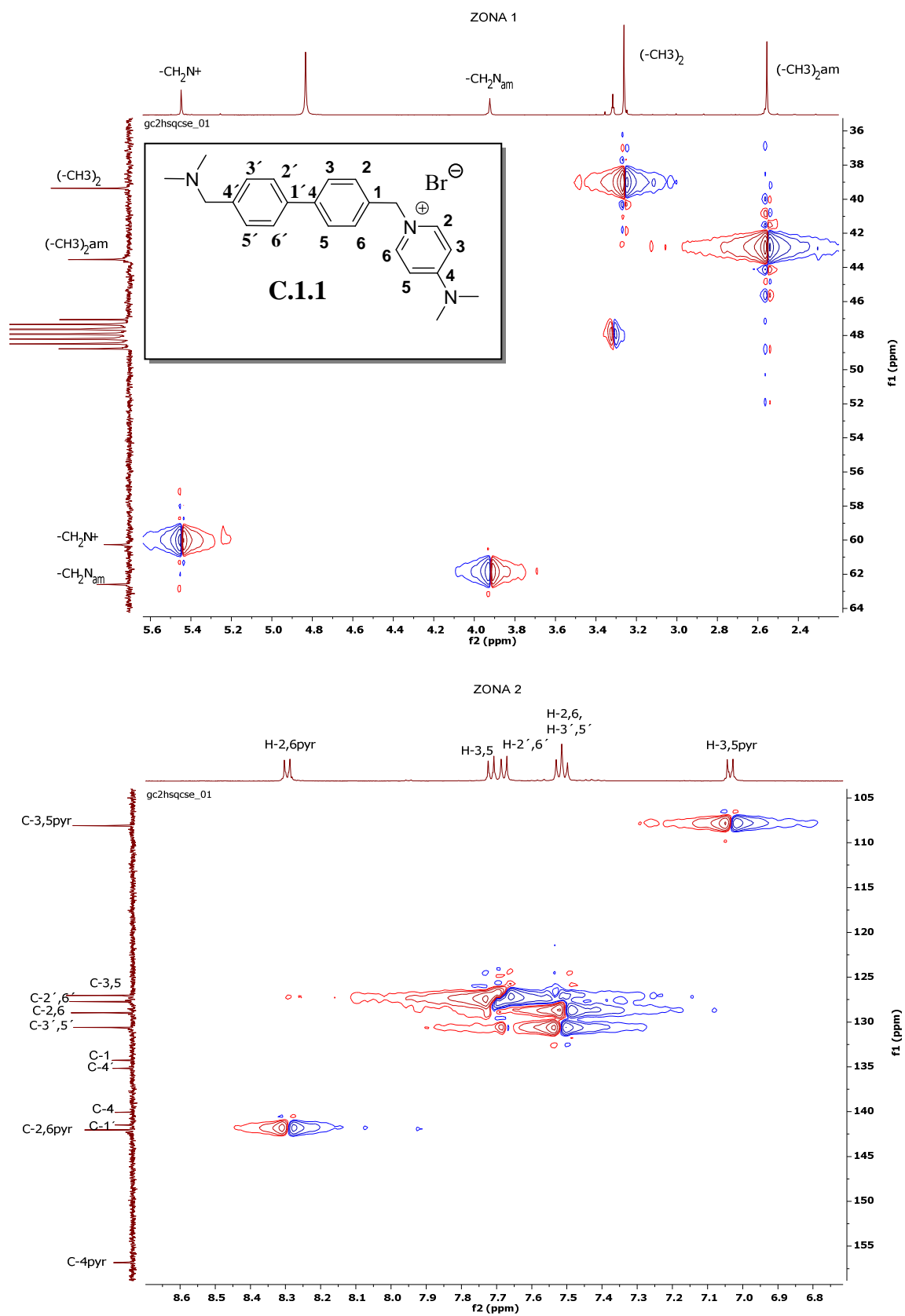


Figura A.11. Espectro de HSQC del compuesto **C.1.1** (familia C, subfamilia C.1).

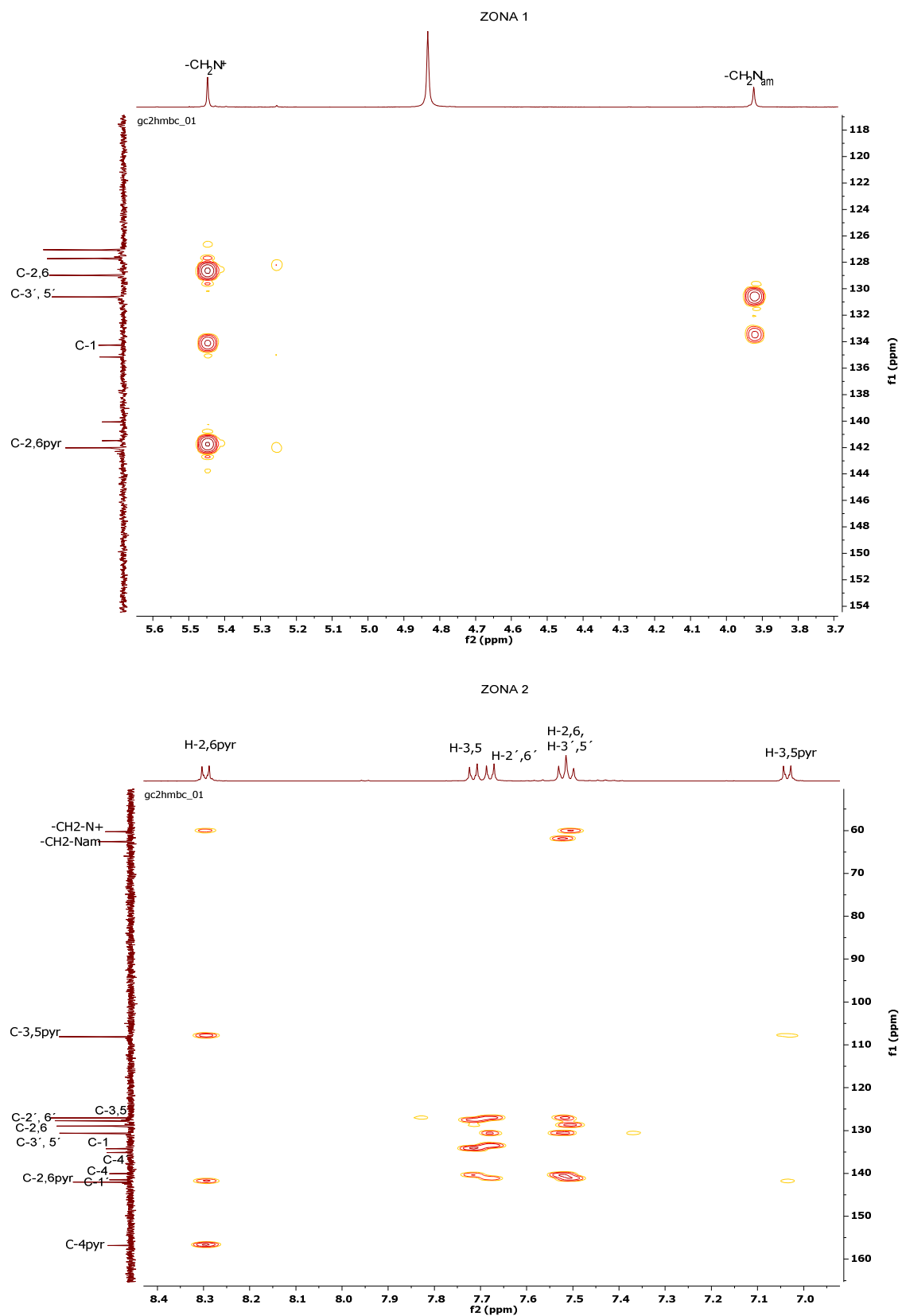


Figura A.12. Espectro de HMBC del compuesto C.1.1 (familia C, subfamilia C.1).

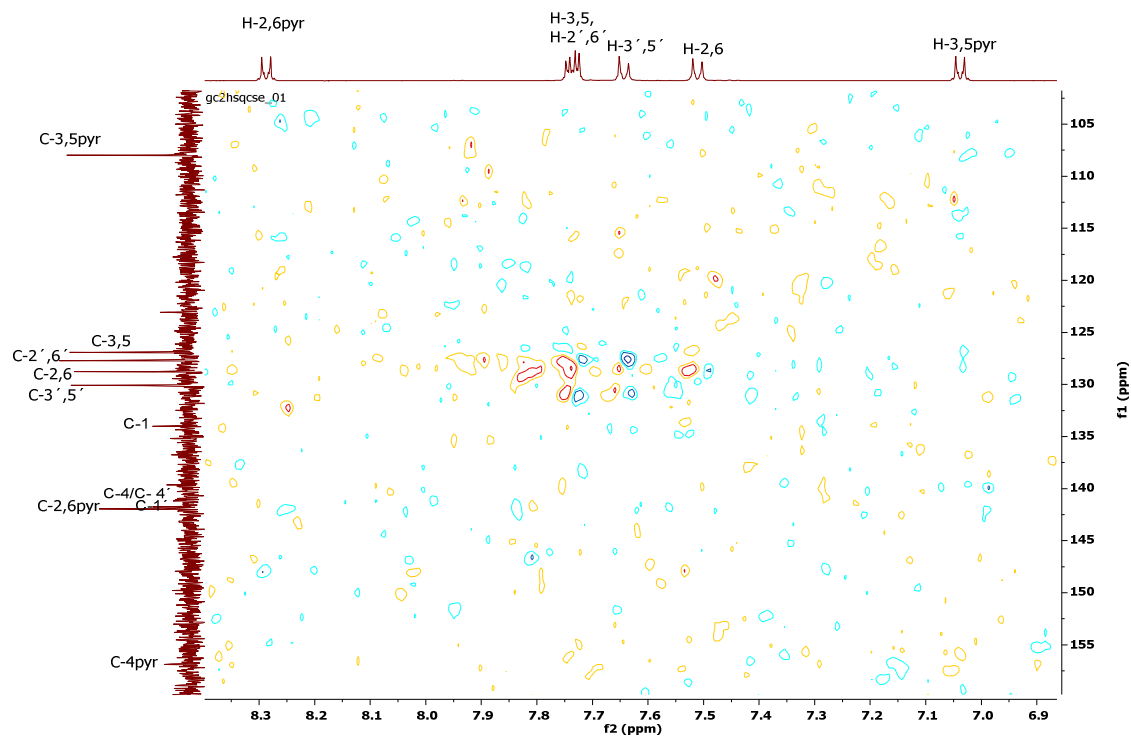
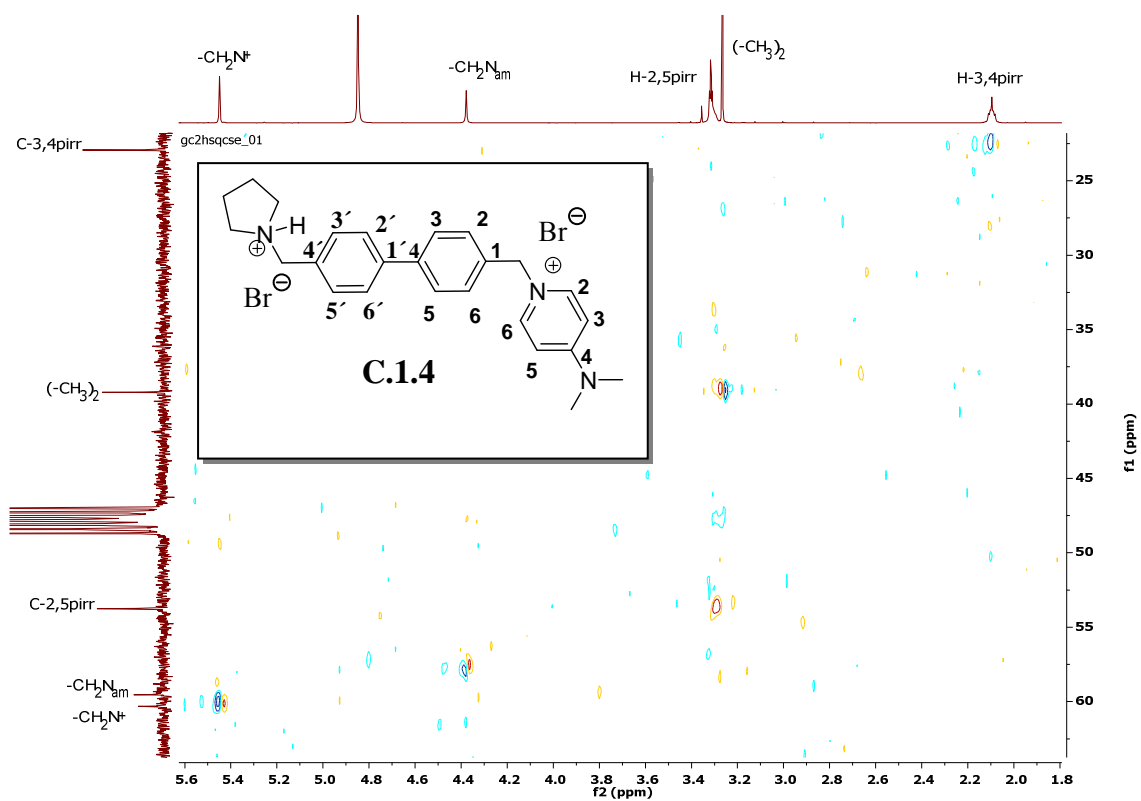


Figura A.13. Espectro de HSQC del compuesto C.1.4 (familia C, subfamilia C.1).

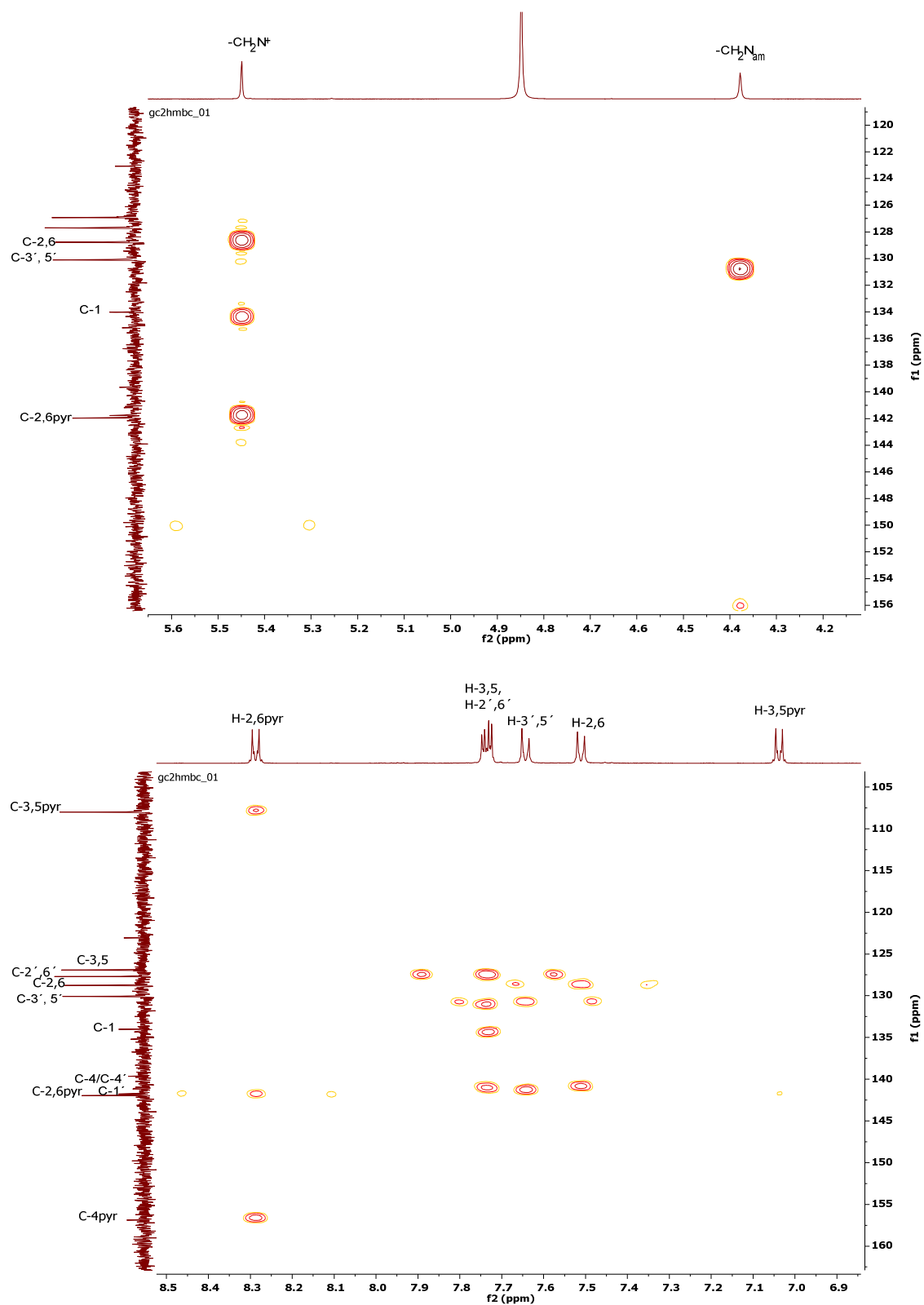


Figura A.14. Espectro de HMBC del compuesto C.1.4 (familia C, subfamilia C.1).

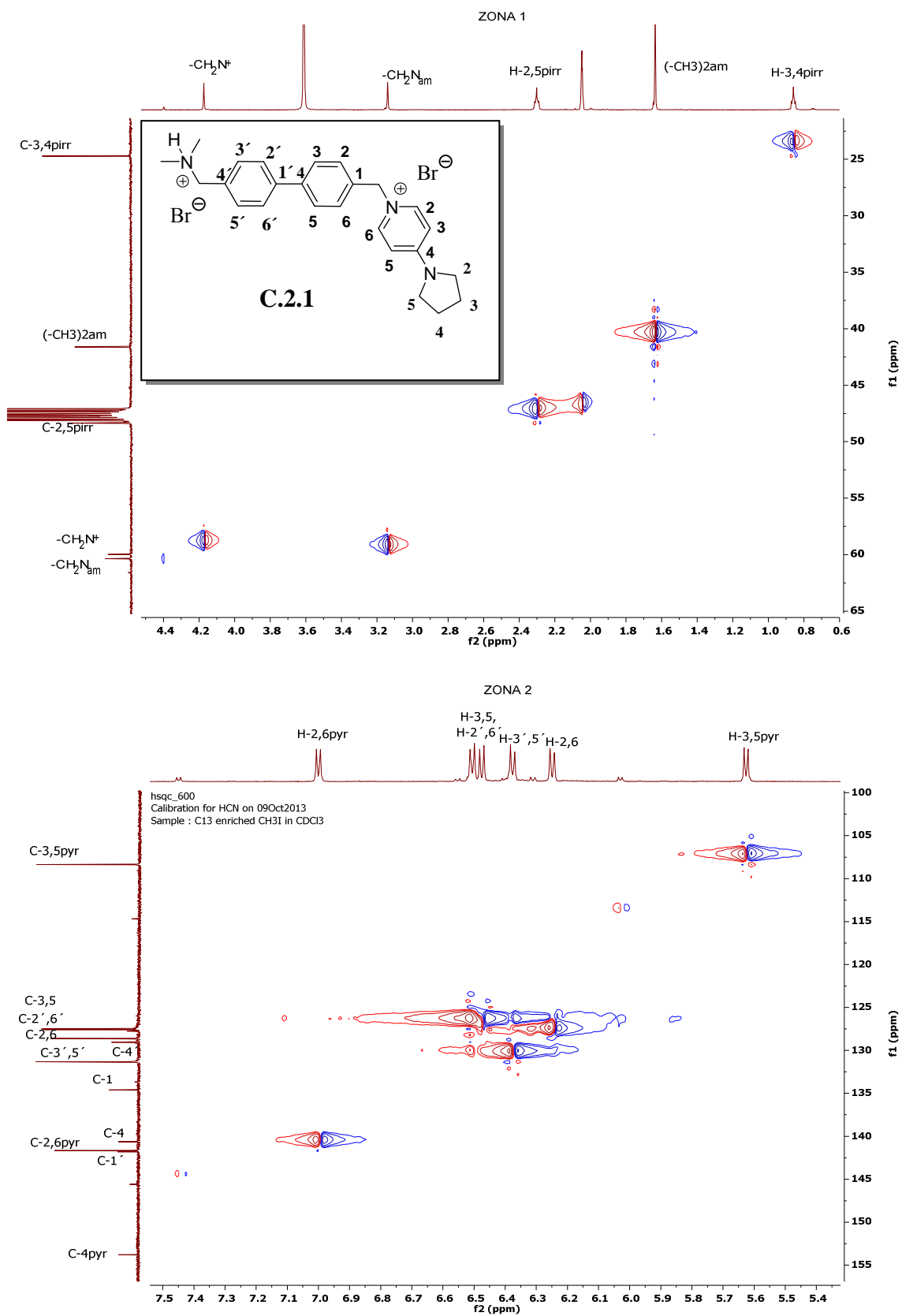


Figura A.15. Espectro de HSQC del compuesto **C.2.1** (familia **C**, subfamilia **C.2**).

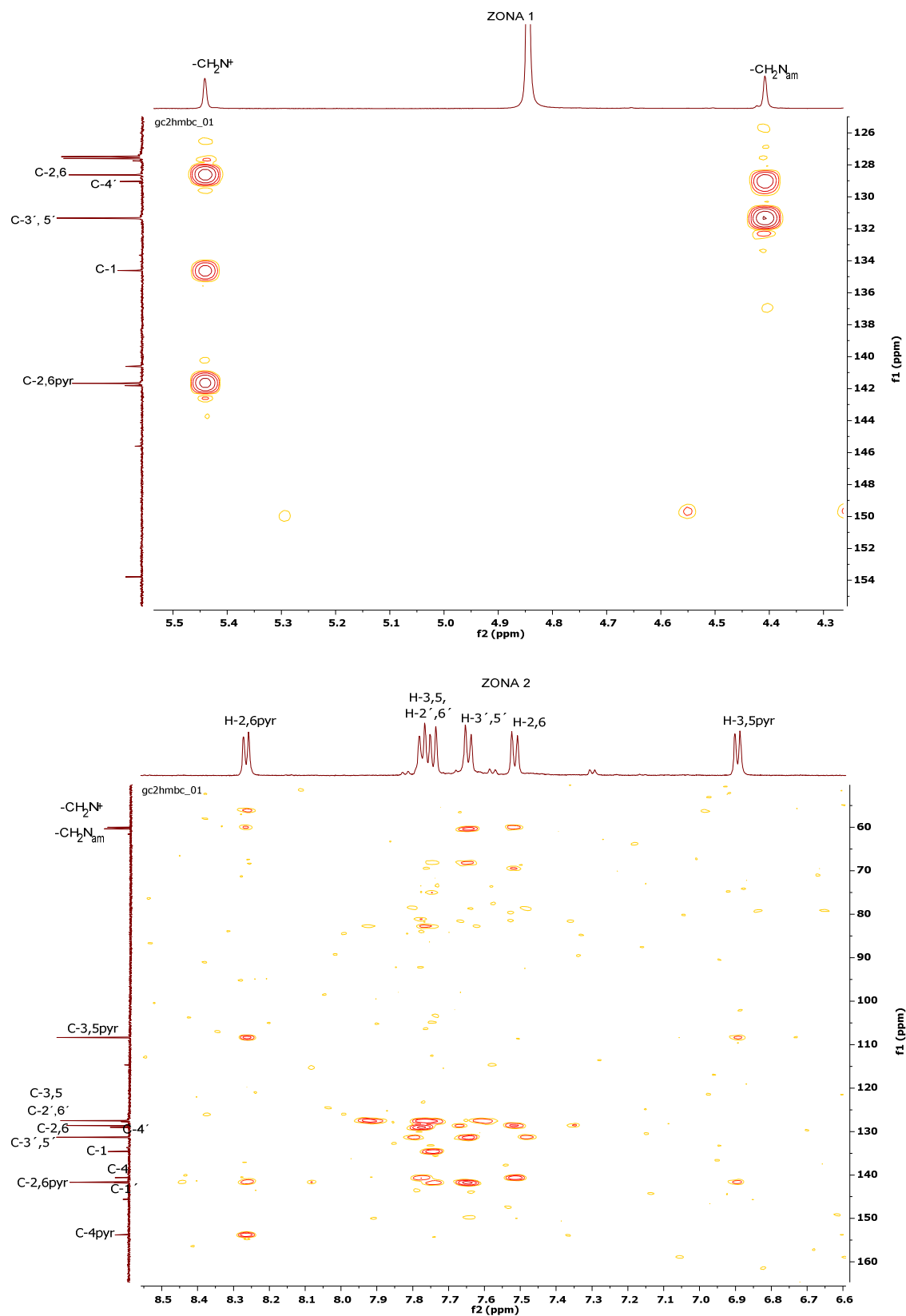


Figura A.16. Espectro de HMBC del compuesto C.2.1 (familia C, subfamilia C.2).

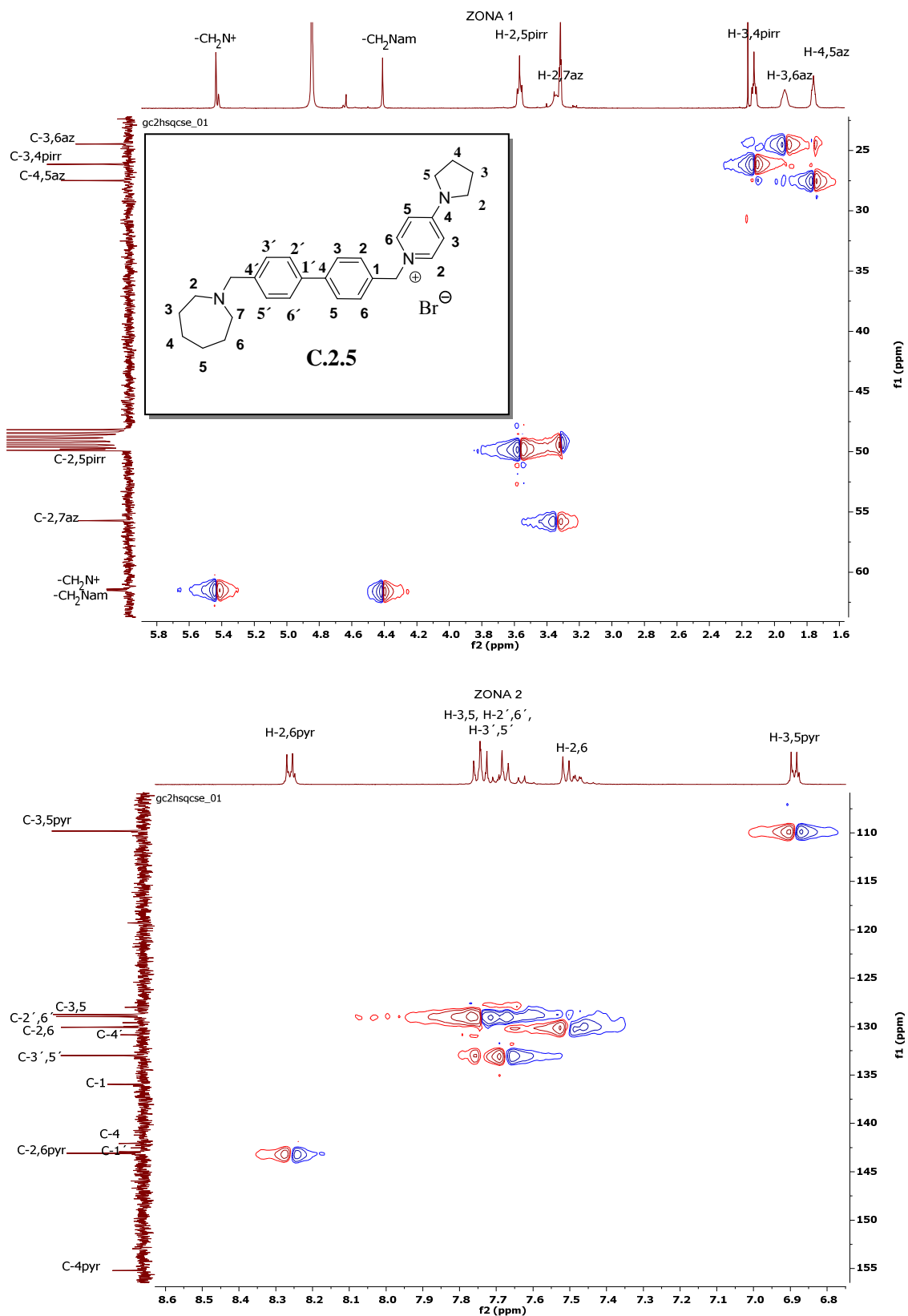


Figura A.17. Espectro de HSQC del compuesto **C.2.5** (familia **C**, subfamilia **C.2**).

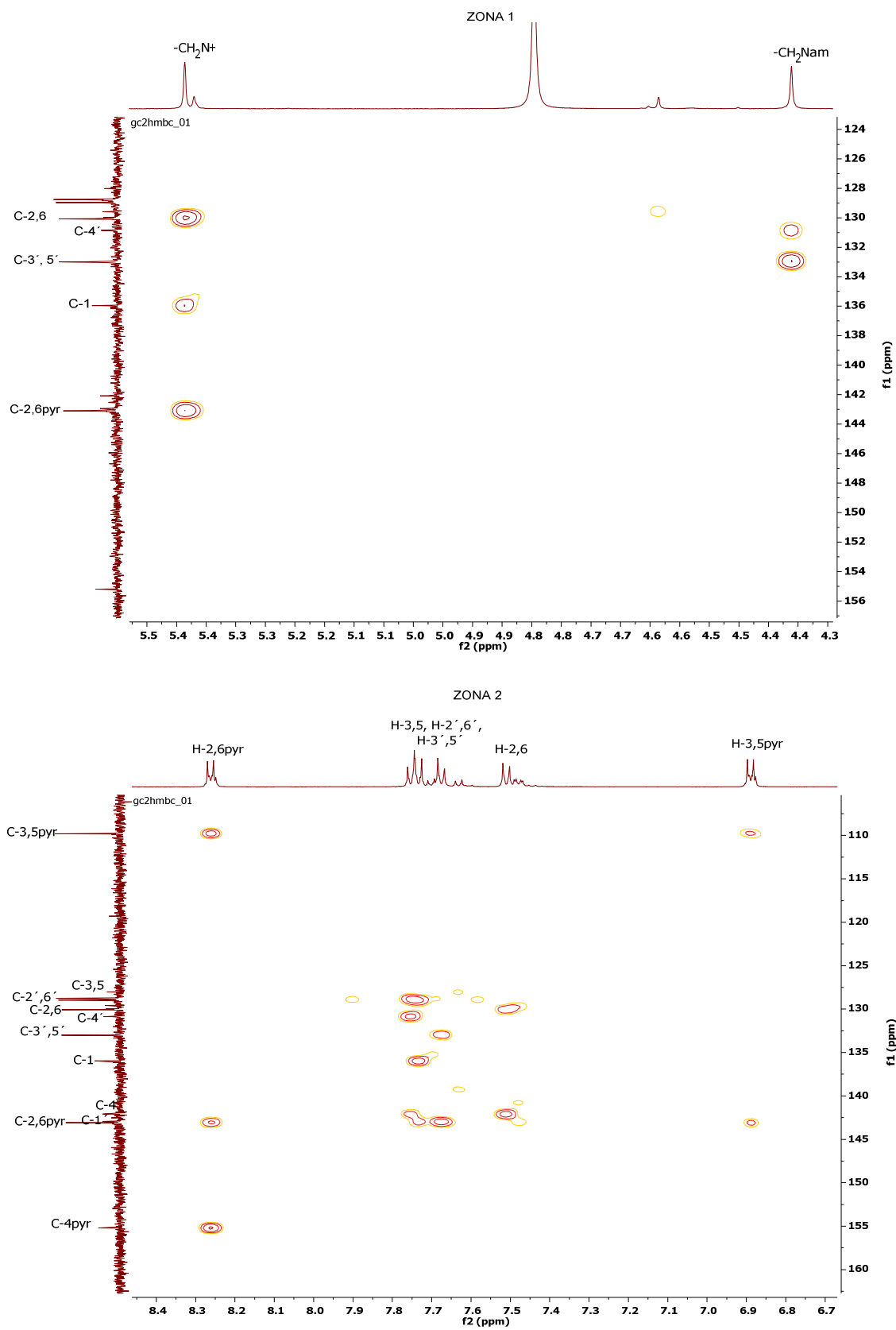


Figura A.18. Espectro de HMBC del compuesto C.2.5 (familia C, subfamilia C.2).

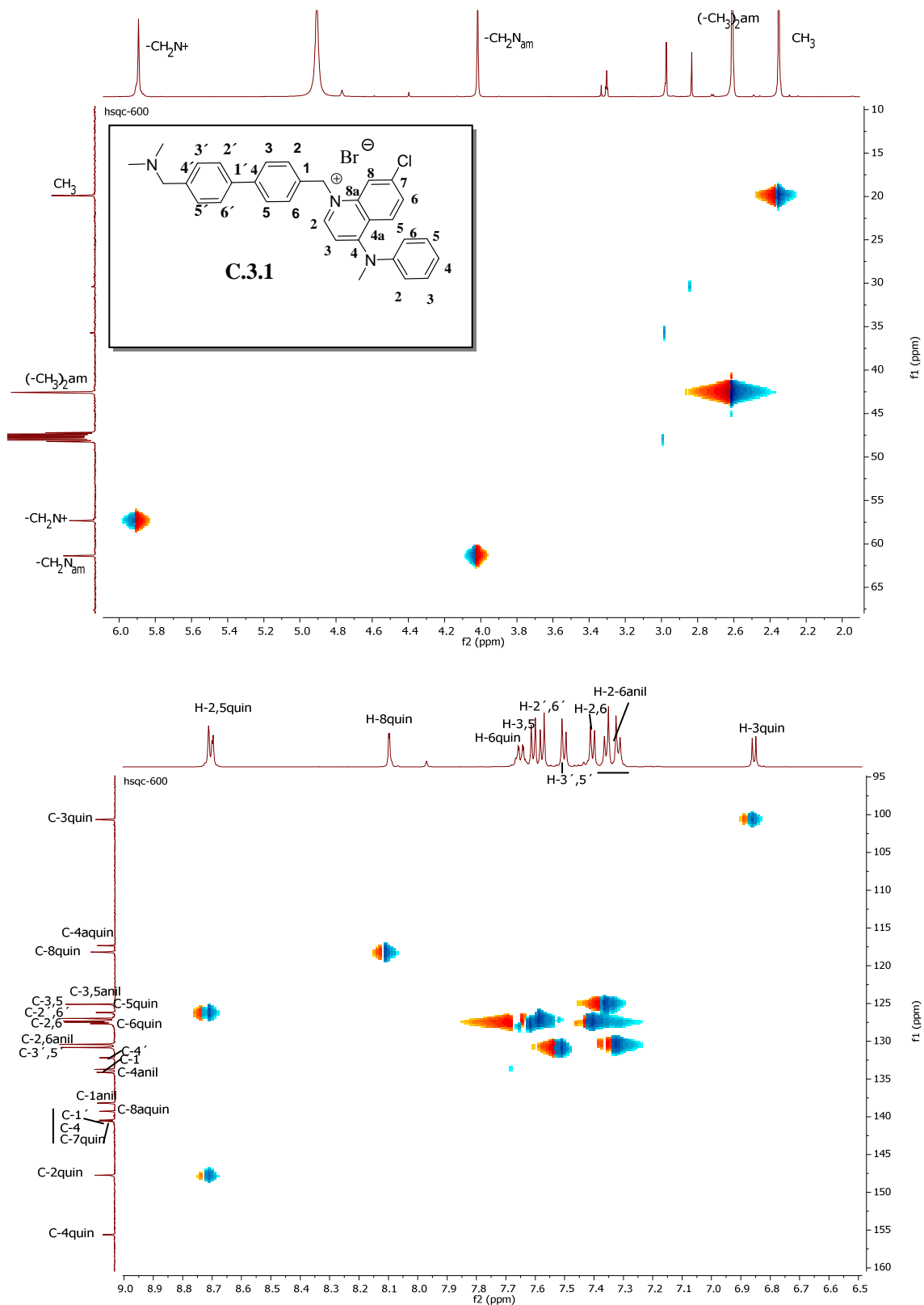


Figura A.19. Espectro de HSQC del compuesto C.3.1 (familia C, subfamilia C.3).

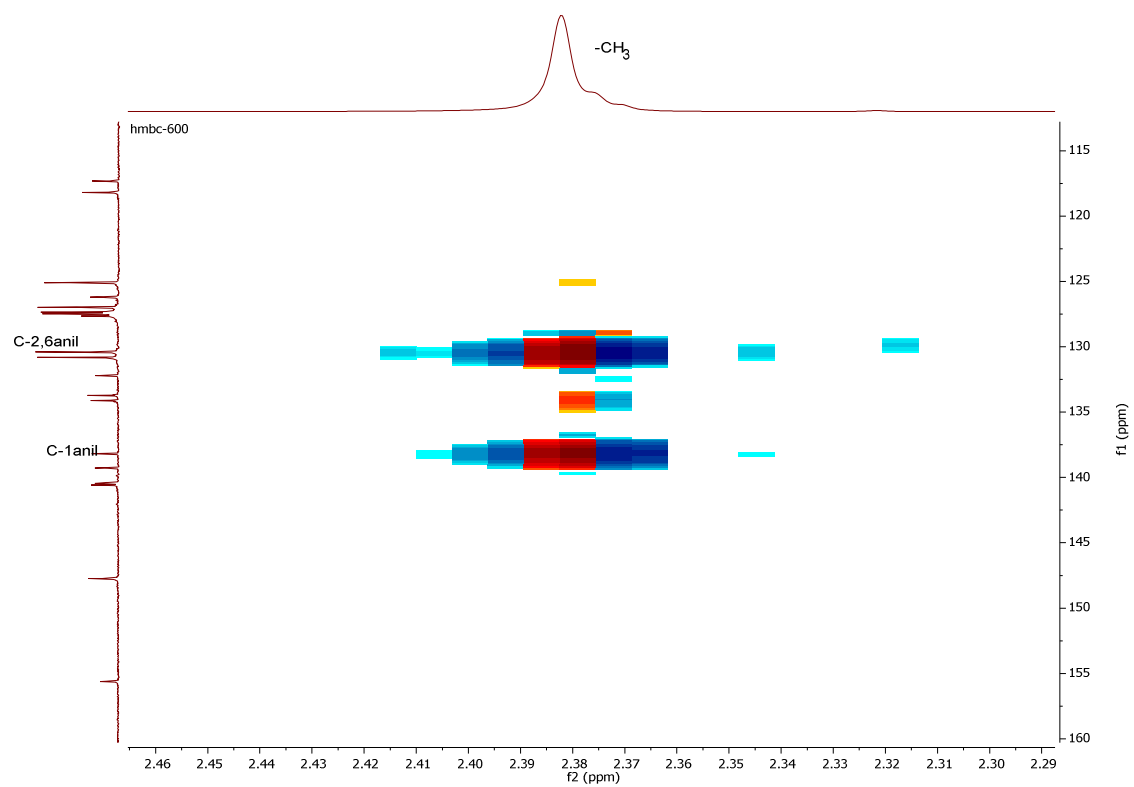
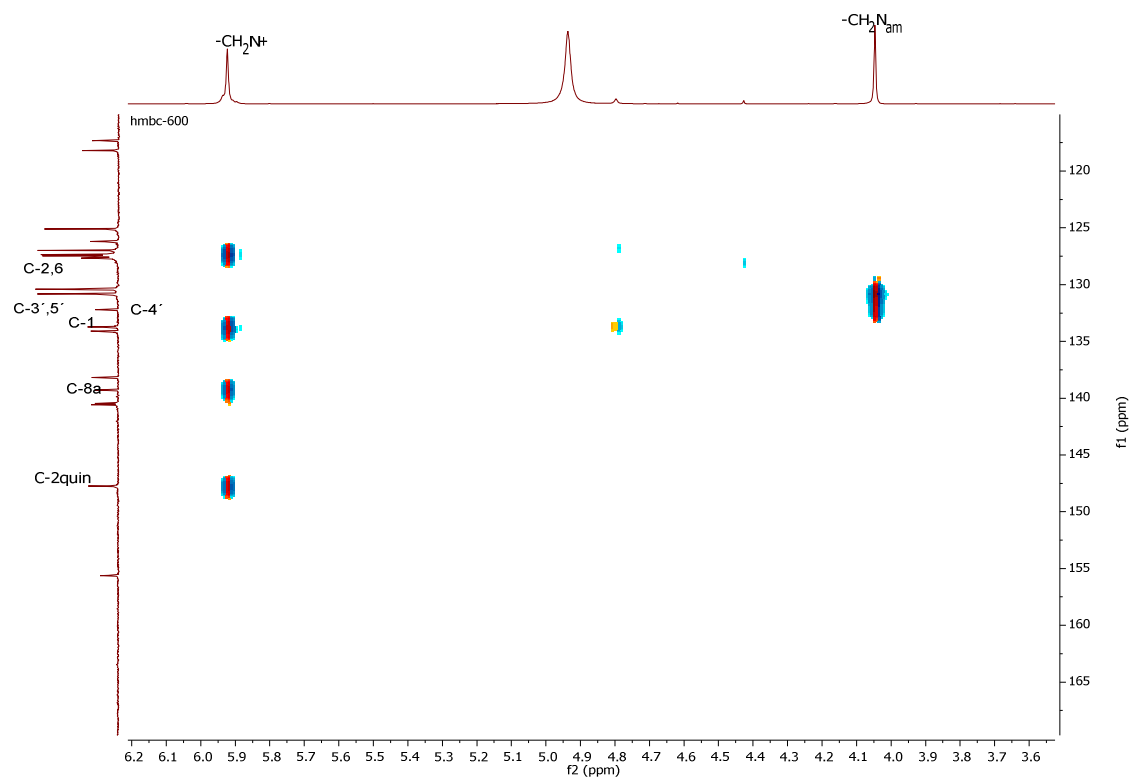


Figura A.20. Espectro de HMBC del compuesto C.3.1 (familia C, subfamilia C.3).

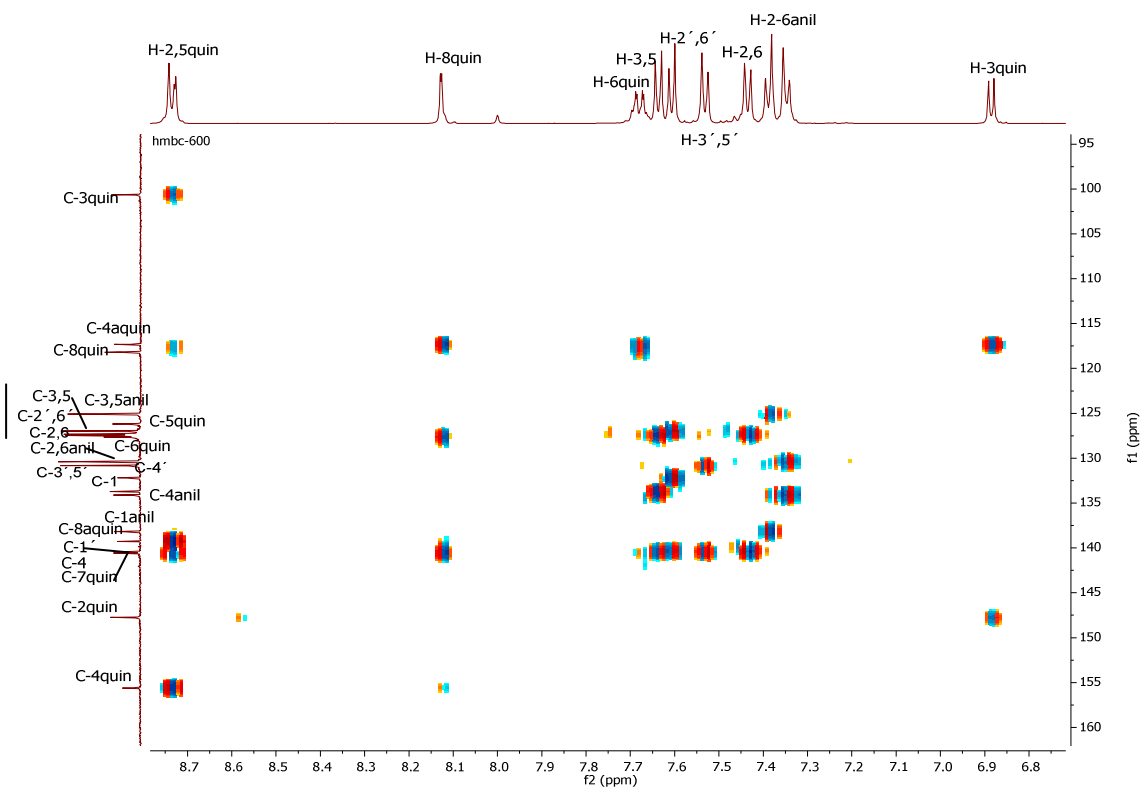


Figura A.21. Espectro de HMBC del compuesto **C.3.1** (familia **C**, subfamilia **C.3**).

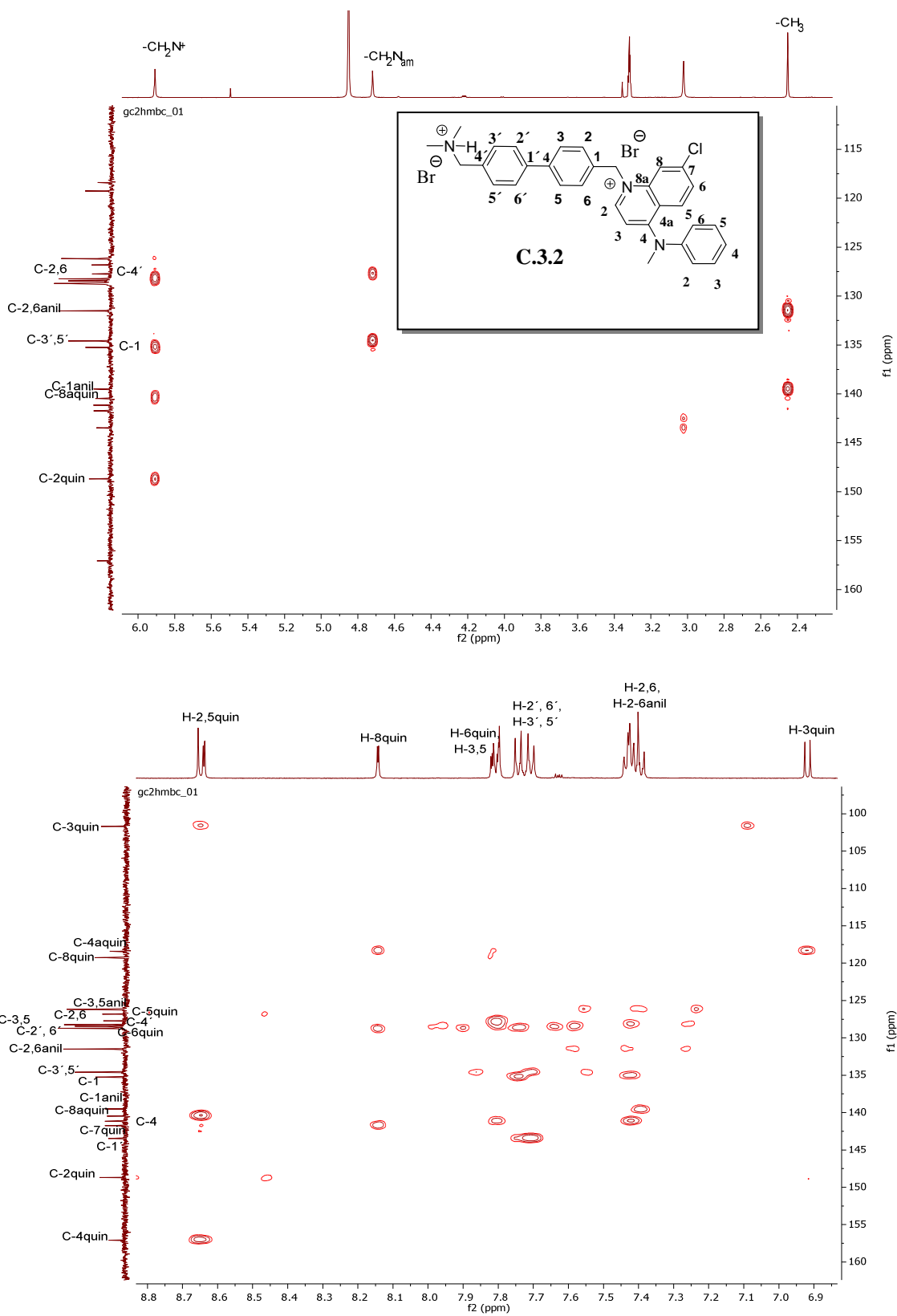


Figura A.22. Espectro de HMBC del compuesto C.3.2 (familia C, subfamilia C.3).

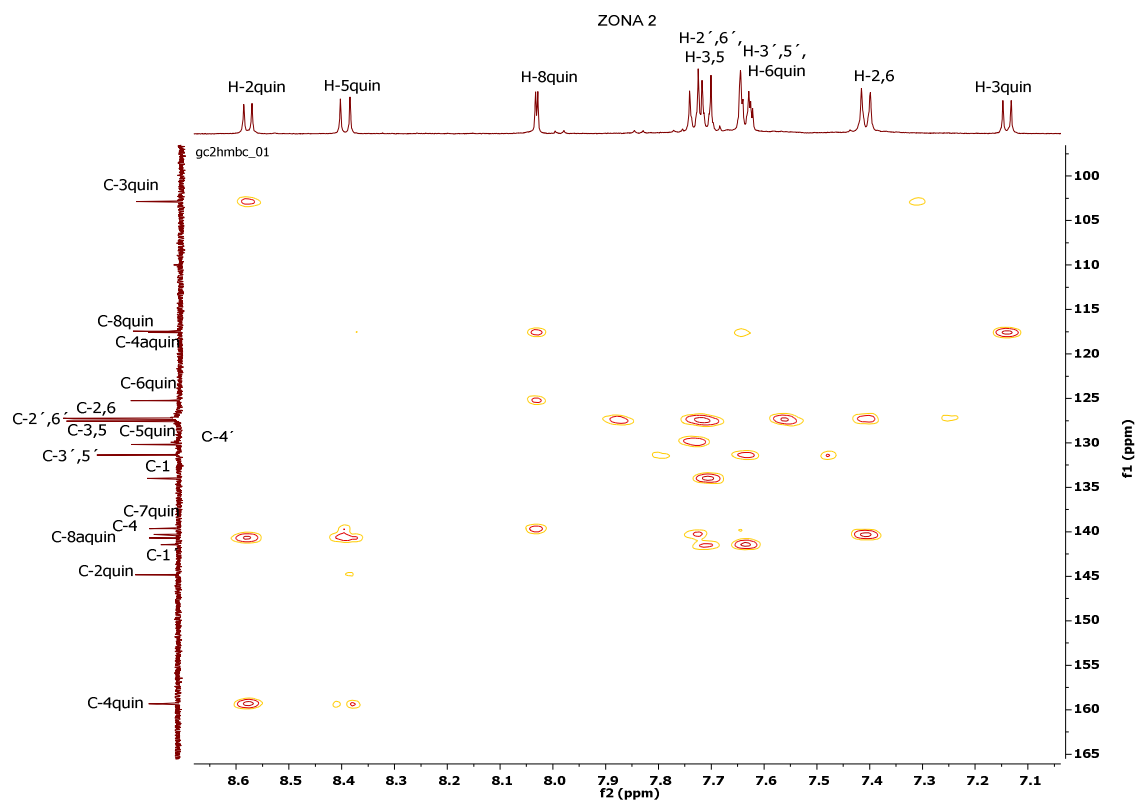
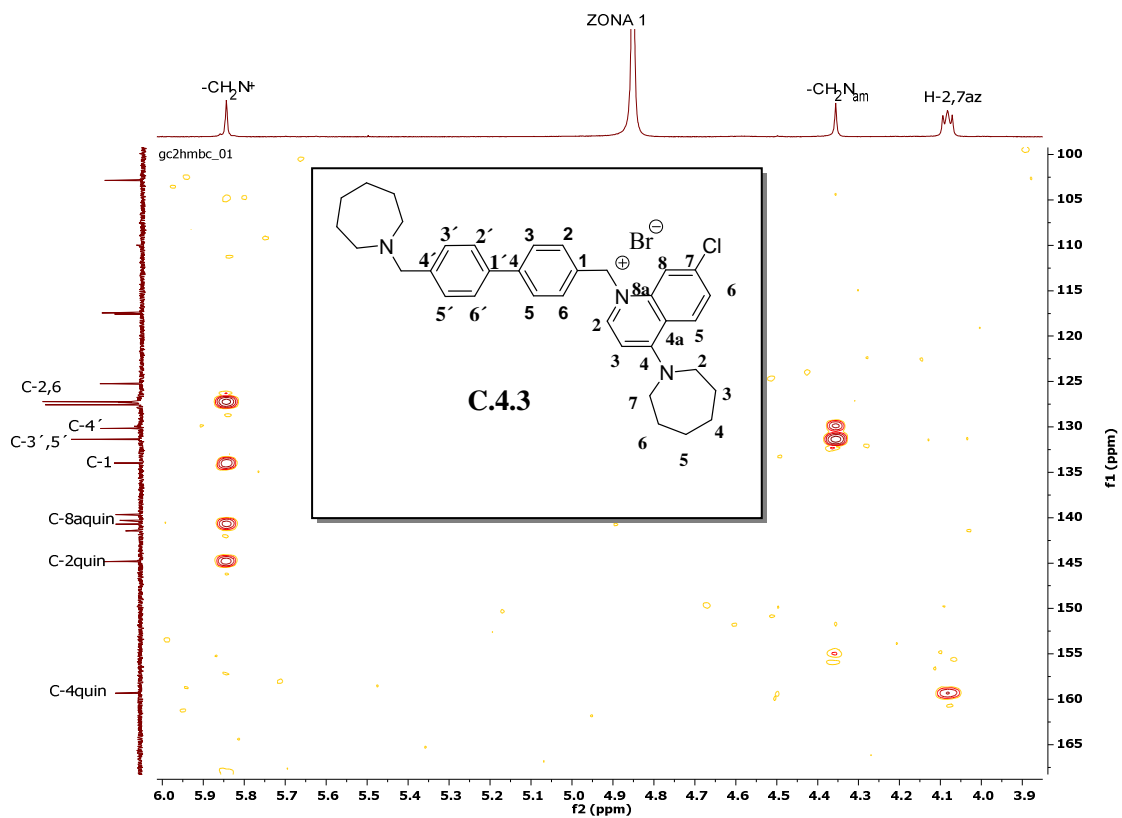


Figura A.23. Espectro de HMBC del compuesto C.4.3 (familia C, subfamilia C.4).

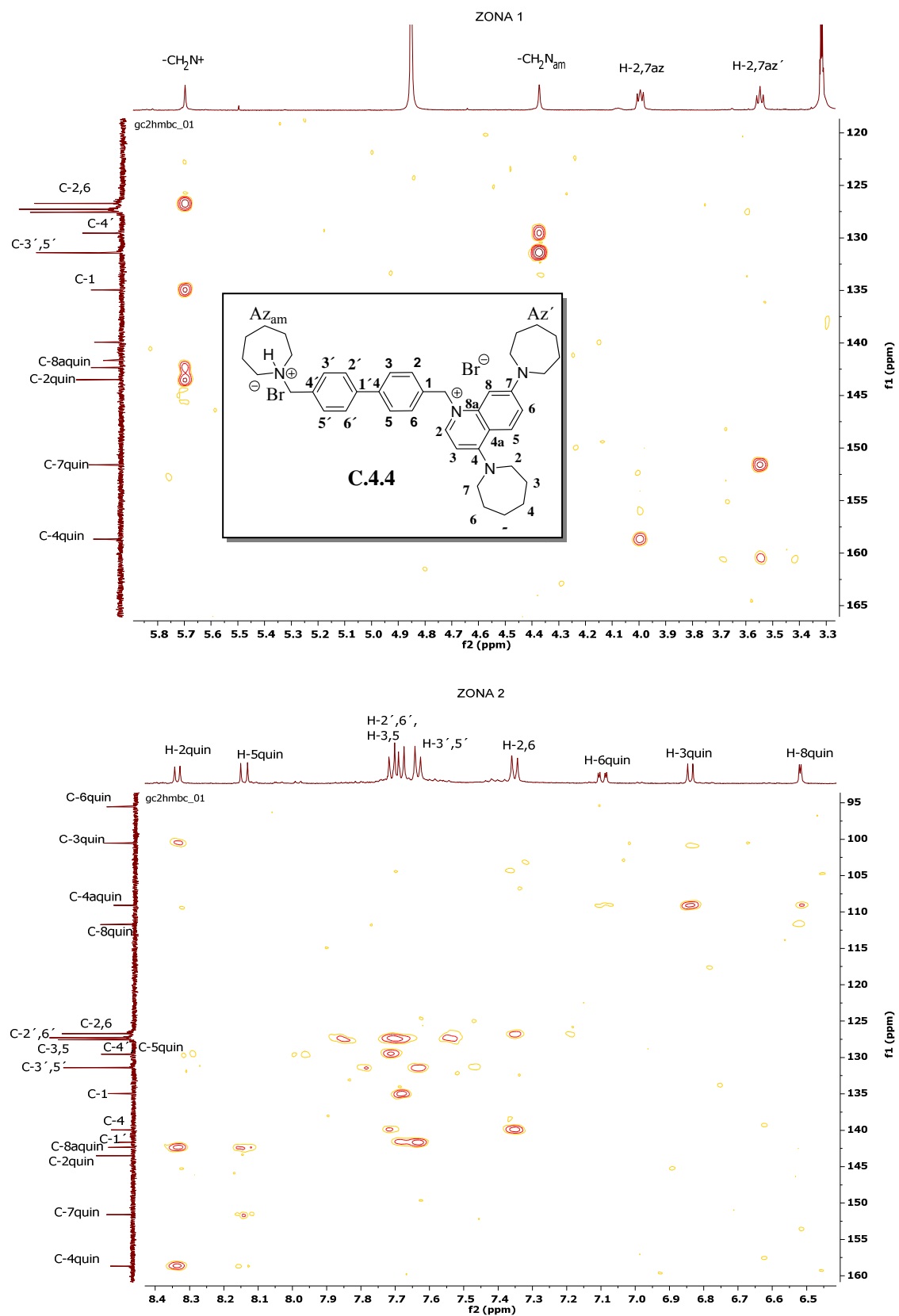


Figura A.24. Espectro de HMBC del compuesto **C.4.4** (familia C, subfamilia C.4).