

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica



**NUEVOS INHIBIDORES DE COLINA QUINASA NO SIMÉTRICOS Y
SIMÉTRICOS MÁS POLARES CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y
ANTIMALÁRICA**

Santiago Schiaffino Ortega
Granada 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Santiago Schiaffino Ortega
D.L.: GR 592-2013
ISBN: 978-84-9028-410-0



Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica.

Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Memoria presentada por **Santiago Schiaffino Ortega** para aspirar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad de Granada.

Granada, Septiembre 2012.

DIRECTORES:

Fdo. Antonio Espinosa Úbeda.

Catedrático de Química
Orgánica.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada.

Fdo. Antonio Entrena Guadix.

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

Fdo. L. Carlota López Cara.

Prof. Titular de Química
Farmacéutica y Orgánica.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Granada.

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

Mahatma Gandhi

Por estar siempre ahí cuando los necesito, por su paciencia, consuelo, sacrificio y siempre acertados consejos. Quiero dedicar esta Memoria:

A mis padres y a Irene

Llegado este momento resulta difícil el poder agradecer sólo con palabras a todo el mundo que ha estado a mi lado o ha padecido conmigo la realización de esta Memoria. Son muchas las personas a las que tendría que agradecer, ya que de una forma u otra me han dado fuerzas, apoyo y vías de escape en estos últimos años, así que si no son nombrados en estos agradecimientos no es porque no las tenga en cuenta sino más bien porque si lo hiciera, esta memoria se vería duplicada en su número de páginas.

Quiero agradecer sinceramente a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo de investigación, en especial:

Al Dr. Antonio Espinosa Úbeda y el Dr. Miguel Ángel Gallo Mezo, por permitirme trabajar en este Grupo de Investigación y su constante trabajo al frente del mismo.

Al Dr. Antonio Entrena Guadix y la Dra. Luisa Carlota López Cara, por su constante dedicación y por aguantar durante una y otra vez las numerosas “visitas” que he realizado a sus despachos con un innumerable número de ruegos y preguntas que siempre han sabido resolver. Muchas gracias, sin vosotros la realización de esta Memoria no habría sido posible.

Al resto de profesores y compañeros del Departamento que, por su colaboración y amistad, han hecho que el trabajo de laboratorio sea cada día más ameno y llevadero.

A la “escalada” y todos los que conmigo han sufrido alguna vía, ya que de ella y ellos he aprendido muchas cosas que son aplicables a la vida cotidiana.

Y por último, no por ello menos importante ya que ellos saben que son lo primero:

A Irene, mis ojos, mi estrella y mi guía, la cual ha sufrido día a día esta Memoria y ha sabido colmarse de paciencia, ayudarme y comprenderme hasta el final de este trabajo.

A mis padres, por su infinita confianza en mí, su constancia, su paciencia, su amor incondicional y un sinfín de cosas que si las escribiese no terminaría nunca. Muchas gracias, os quiero.

Al mejor hermano del mundo, que siempre tiene las palabras adecuadas para apaciguar mi espíritu y sacarme una sonrisa.

A mis primos y amigos, que son la evasión de mis pensamientos, un refugio en la montaña, un día de risas, un día de campo, un viaje sin planear, una “primada”, un día de no hacer nada, momentos de tensión, una aventura y la cuerda que tira de mí para poner mis pies en en la tierra y dejar a un lado el pensamiento científico que me ha embargado durante estos últimos cuatro años. Con vosotros estoy “más a gusto que en brazos”. Gracias.

A Romo, el mejor compañero que un hombre puede tener.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. Introducción	3
2. Antecedentes Bibliográficos	9
2.1. El ciclo celular	11
2.1.1. Fases del ciclo celular	12
2.1.2. Regulación del ciclo celular	14
2.1.2.1. Regulación intracelular del ciclo celular	14
2.1.2.1.1. Puntos de control del ciclo celular	17
2.1.2.2. Regulación extracelular del ciclo celular	21
2.1.2.3. Apoptosis	22
2.2. Transducción de la señal mitogénica al núcleo celular: Factores de crecimiento	24
2.3. Protooncogenes nucleares: Factores de transcripción	25
2.4. Los proto-oncogenes que codifican proteínas citoplásmicas que transducen la señal mitogénica: La vía de Ras	26
2.4.1. Ciclo de activación de Ras	27
2.4.2. Efectores de Ras	29
2.4.3. Implicaciones de Ras en la oncogenicidad	30
2.4.3.1. Ras y el fenotipo transformado	31
2.5. La enzima Colina Quinasa (ChoK)	37
2.5.1. Regulación de la actividad ChoK	39
2.5.2. La ChoK en la transformación celular y la tumorigénesis	39
2.5.2.1. ChoK alfa y beta	40
2.5.2.2. Inhibición de ChoK como estrategia contra el cáncer	42
2.6. Moléculas inhibidoras de Colina Quinasa (ChoK)	43
2.6.1. HC-3: precursor de las moléculas inhibidoras de ChoK	43
2.6.2. Nueva clase de fármacos inhibidores de ChoK	44
2.6.2.1. Estructura cristalina de ChoK: cambio de estrategia	48
2.6.3. Inhibidores de ChoK con actividad antimalárica	51
3. Objetivos	79
4. Parte Teórica	87
4.1. Síntesis química	87
4.1.1. Consideraciones generales	87
4.1.2. Análisis retrosintético	95

4.1.3. Síntesis química de los espaciadores (Familia A)	96
4.1.4. Síntesis química de los productos intermedios (Familia A)	97
4.1.4.1. Síntesis de los derivados de sales de pirrolidinopiridinio.....	97
4.1.4.2. Síntesis de los derivados de sales de dimetilaminopiridinio	98
4.1.4.3. Síntesis de los derivados de sales de quinuclidinio	99
4.1.5. Síntesis química de los compuestos finales monocatiónicos (Familia A)	103
4.1.5.1. Síntesis de la Subfamilia A ₁ : Derivados Fenólicos	103
4.1.5.2. Síntesis de la Subfamilia A ₂ : Derivados Nitrados.....	103
4.1.5.3. Síntesis de la Subfamilia A ₃ : Derivados Amínicos.....	104
4.1.6. Síntesis química del espaciador (Familia B)	106
4.1.7. Síntesis química de las cabezas catiónicas (Familia B)	107
4.1.8. Síntesis química de los compuestos finales biscatiónicos (Familia B)	108
4.2. Análisis espectroscópico de los compuestos finales sintetizados	110
4.2.1. Análisis espectroscópico de ¹ H-RMN de los compuestos finales monocatiónicos no simétricos (Familia A)	110
4.2.1.1. Análisis espectroscópico de ¹ H-RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A ₁	110
4.2.1.2. Análisis espectroscópico de ¹ H-RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A ₂	116
4.2.1.3. Análisis espectroscópico de ¹ H-RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A ₃	119
4.2.2. Análisis espectroscópico de ¹³ C-RMN de los compuestos finales monocatiónicos no simétricos (Familia A)	124
4.2.3. Análisis espectroscópico de ¹ H-RMN de los compuestos finales biscatiónicos simétricos (Familia B).....	144
4.2.3.1. Análisis espectroscópico de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia B ₁	144
4.2.3.2. Análisis espectroscópico de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia B ₂	149
4.2.3.3. Análisis espectroscópico de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia B ₃	158
4.2.4. Análisis espectroscópico bidimensional.....	163
4.2.4.1. Análisis bidimensional del compuesto SOS-3 (Subfamilia A ₁)	164
4.2.4.2. Análisis bidimensional del compuesto SOS-13 (Subfamilia A ₂)	168
4.2.4.3. Análisis bidimensional del compuesto SOS-29 (Subfamilia A ₃)	171

4.2.4.4. Análisis bidimensional del compuesto SOS-32 (Subfamilia B ₁)	174
4.2.4.5. Análisis bidimensional del compuesto SOS-38 (Subfamilia B ₂)	177
4.2.4.6. Análisis bidimensional del compuesto SOS-41 (Subfamilia B ₃)	181
4.3. Diseño y modelado molecular	184
4.4. ChoK humana: Resultados biológicos y discusión	189
4.4.1. Generalidades	189
4.4.2. Resultados biológicos de los compuestos monocatiónicos no simétricos (Familia A) ...	190
4.4.2.1. Derivados Fenólicos de los compuestos monocatiónicos (Subfamilia A ₁)	190
4.4.2.2. Derivados Nitrados de los compuestos monocatiónicos (Subfamilia A ₂)	192
4.4.2.3. Derivados Amínicos de los compuestos monocatiónicos (Subfamilia A ₃)	194
4.4.3. Resultados biológicos de los compuestos biscatiónicos simétricos (Familia B)	199
4.4.3.1. Derivados de sales de bisquinuclidinio (Subfamilia B ₁)	199
4.4.3.2. Compuestos pertenecientes a la Subfamilia B ₂ y B ₃	200
4.5. Plasmodium falciparum: Resultados biológicos y discusión	202
4.5.1. Ensayos <i>in vitro</i> de la actividad antimalárica	202
4.5.2. Actividad antimalárica de los compuestos monocatiónicos no simétricos (Familia A)..	203
4.5.2.1. Derivados Fenólicos de los compuestos monocatiónicos (Subfamilia A ₁	203
4.5.2.2. Derivados Nitrados de los compuestos monocatiónicos (Subfamilia A ₂)	204
4.5.2.3. Derivados Amínicos de los compuestos monocatiónicos (Subfamilia A ₃)	205
4.5.3. Actividad antimalárica de los compuestos biscatiónicos simétricos (Familia B)	207
4.5.3.1. Derivados de sales de bisquinuclidinio (Subfamilia B ₁)	207
4.5.3.2. Compuestos pertenecientes a la Subfamilia B ₂ y B ₃	208
5. Parte Experimental	215
5.1. Condiciones generales	215
5.2. Síntesis química de la Familia A	216
5.2.1. Síntesis de materias primas.....	216
5.2.1.1. Síntesis de 4,4'-bis(bromometil)bifenilo (2)	216
5.2.1.2. Síntesis de 1,2-bis(4-bromometilfenil)etano (3)	217
5.2.1.3. Síntesis de 1,4-bis(4-bromometilfenil)butano (4)	217
5.2.2. Síntesis de productos intermedios de la Familia A	218
5.2.2.1. Síntesis de derivados de sales de piridinio	218
5.2.2.1.1. Sales de 4-pirrolidinopiridinio	218
5.2.2.1.1.1. Síntesis de Bromuro de 1-[4-(bromometil)benzyl]-4-(1-pirrolidin-1-il)-piridinio (1a)	219

5.2.2.1.1.2. Síntesis de Bromuro de 1-[[4'-(bromometil)bifenil-4-il]metil]-4-(pirrolidin-1-il)piridinio (2a)	219
5.2.2.1.1.3. Síntesis de Bromuro de 1-{4-[2-(4-bromometilfenil)-etil]-bencil-4-pirrolidin-1-il-piridinio (3a)	220
5.2.2.1.1.4. Síntesis de Bromuro de 1-{4-[4-(4-bromometil-fenil)-butil]-bencil}-4-pirrolidin-1-il-piridinio (4a)	220
5.2.2.1.2. Sales de dimetilamino piridinio	221
5.2.2.1.2.1. Síntesis de Bromuro de 1-[4-(bromometil)bencil]-4-(dimetilamino)piridinio (1b)	221
5.2.2.1.2.2. Síntesis de Bromuro de 1-[[4'-(bromometil)bifenil-4-il]metil]-4-(dimetilamino)piridinio (2b)	222
5.2.2.1.2.3. Síntesis de Bromuro de 1-(4-{2-[4-(bromometil)fenil]etil}fenil)-4-(dimetilamino)piridinio (3b)	222
5.2.2.1.2.4. Síntesis de Bromuro de 1-(4-{4-[4-(bromometil)fenil]butil}bencil)-4-(dimetilamino)piridinio (4b)	223
5.2.2.2. Síntesis de derivados de sales de quinuclidinio	223
5.2.2.2.1. Síntesis de Bromuro de 1-(4-bromometilbencil)-1-quinuclidinio (1c)	224
5.2.2.2.2. Síntesis de Bromuro de 1-(4''-bromometilbifenil-4-ilmetil)-1-quinuclidinio (2c) ..	224
5.2.2.2.3. Síntesis de Bromuro de 1-4[2-(4-bromometilfenil)etil]bencil]-1-quinuclidinio (3c)	225
5.2.3.- Síntesis de productos finales monocatiónicos (Familia A)	226
5.2.3.1. Derivados Fenólicos (Subfamilia A₁)	226
5.2.3.1.1. Síntesis de Bromuro de 1-(4-(3-hidroxifenilaminometil)bencil)-4-pirrolidinapiridino (SOS-1)	226
5.2.3.1.2. Síntesis de Bromuro de de 1-4'-[[3-hidroxi-fenilamino)-metil]-bifenil-4-il-metil]-4-pirrolidin-1-il-piridinio (SOS-2)	226
5.2.3.1.3. Síntesis de Bromuro de 1-[4-(2-[4-[(3-hidroxi-fenilamino)-metil]-fenil]-etil)-bencil]-4-pirrolidin-1-il-piridinio (SOS-3)	228
5.2.3.1.4. Síntesis de Bromuro de 1-[4-(4-[4-[(3-hidroxifenilamino)-metil]-fenil]-butil)-bencil]-4-pirrolidin-1-il-piridinio (SOS-4)	228
5.2.3.1.5. Síntesis de Bromuro de 1-(4-[[3-hidroxifenil]amino]metil)bencil]-4-dimetilamino piridinio (SOS-5)	229
5.2.3.1.6. Síntesis de Bromuro de 1-[[4'-[[3-hidroxifenil]amino]metil]bifenil-4-il)metil]-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-6)	230

5.2.3.1.7. Síntesis de Bromuro de 1-{4-[2-(4-[(3-hidroxifenil)amino]metil)fenil]etil}bencil}-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-7)	230
5.2.3.1.8. Síntesis de Bromuro de 1-{4-[4-(4-[(3-hidroxifenil)amino]metil)phenil]butil}bencil}-4-(dimetilamino)-piridinio (SOS-8).....	231
5.2.3.1.9. Síntesis de Bromuro de 1-{4-[(3-hidroxifenilamino)metil]bencil}-1-quinuclidinio (SOS-9)	231
5.2.3.1.10. Síntesis de Bromuro de 1-{4''-[(3-hidroxifenilamino)metil]bifenil-4-ilmetil}-1-quinuclidinio (SOS-10)	232
5.2.3.1.11. Síntesis de Bromuro de 1-[4-(2-[4-[(3-hidroxifenilamino)metil]fenil]etil)bencil]-1-quinuclidinio (SOS-11)	233
5.2.3.2. Derivados Nitrados (Subfamilia A₂).....	233
5.2.3.2.1.- Síntesis de Bromuro de 1-{4-[(3-nitrofenoxi)metil]bencil}-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-12)	234
5.2.3.2.2. Síntesis de Bromuro de 1-{{4'-[(3-aminofenoxi)metil]bifenil-4-il}metil}-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-13)	234
5.2.3.2.3. Síntesis de Bromuro de 1-[4-(2-[4-[(3-nitrofenoxi)metil]fenil]etil)bencil]-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-14)	235
5.2.3.2.4. Síntesis de Bromuro de 1-[4-(4-[4-[(3-nitrofenoxi)metil]fenil]butil)bencil]-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-15)	235
5.2.3.2.5. Síntesis de Bromuro de 1-[4-(3-nitrofenoximetil)bencil]-1-quinuclidinio (SOS-16)	236
5.2.3.2.6. Síntesis de Bromuro de 1-{4''-(3-nitrofenoximetil)-4-ilmetil}-1-quinuclidinio (SOS-17)	236
5.2.3.2.7. Síntesis de Bromuro de 1-(4-{2-[3-nitrofenoximetil]fenil}etil}bencil)-1-quinuclidinio (SOS-18)	237
5.2.3.3. Derivados Amínicos (Subfamilia A₃).....	238
5.2.3.3.1. Síntesis de Bromuro de 1-(4-(3-aminofenoximetil)fenilmetil)-4-(1-pirrolidin)-piridinio (SOS-19)	238
5.2.3.3.2. Síntesis de Bromuro de 1-[4'-(3-aminofenoximetil)bifenil-4-il-pirrolidin-1-il-piridinio (SOS-20)	239
5.2.3.3.3. Síntesis de Bromuro de 1-(4-{2-[4-(3-aminofenoximetil)-fenil]-etil}-bencil)-4-pirrolidin-1-il-piridinio (SOS-21)	239
5.2.3.3.4. Síntesis de Bromuro de 1-(4-{4-[4-(3-aminofenoximetil)-fenil]-butil}-bencil)-4-pirrolidin-1-il-piridinio (SOS-22)	240

5.2.3.3.5. Síntesis de Bromuro de 1-{4-[(3-aminofenoxi)metil]bencil}-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-23)	240
5.2.3.3.6. Síntesis de Bromuro de 1-{4'-[(3-aminofenoxi)metil]bifenil-4-il}metil}-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-24)	241
5.2.3.3.7. Síntesis de Bromuro de 1-[4-(2-[4-[(3-aminofenoxi)metil]fenil]etil)bencil]-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-25)	242
5.2.3.3.8. Síntesis de Bromuro de 1-[4-(4-[4-[(3-aminofenoxi)metil]fenil]butil)bencil]-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-26)	242
5.2.3.3.9. Síntesis de Bromuro de 1-[4-(3-aminofenoximetil)bencil]-1-quinuclidinio (SOS-27)	243
5.2.3.3.10. Síntesis de Bromuro de 1-[4''-(3-aminofenoximetil)bifenil-4-ilmetil]-1-quinuclidinio (SOS-28)	243
5.2.3.3.11. Síntesis de Bromuro de 1-(4-{2-[4-(3-aminofenoximetil)fenil]etil}bencil)-1-quinuclidinio (SOS-29)	244
5.3. Síntesis química de la Familia B.....	245
5.3.1. Síntesis del espaciador de la Familia B.....	245
5.3.2. Síntesis de las cabezas catiónicas de la Familia B	246
5.3.2.1. Síntesis de la 4-cloroquinolina (8).....	247
5.3.2.2. Síntesis de la 4-perhidroazepinoquinolina (13).....	247
5.3.2.3. Síntesis de la 4-N-metilanilinoquinolina (14)	247
5.3.2.4. Síntesis de la 4-(4-cloro-N-metilanilino)quinolina (15).....	248
5.3.2.5. Síntesis de la 7-cloro-4-(N-metilanilino)quinolina (16).....	248
5.3.2.6. Síntesis de la 7-cloro-4-(4-cloro-N-metilanilino)quinolina (17)	248
5.3.2.7. Síntesis de la 7-cloro-4-(pirrolidino)quinolina (18).....	249
5.3.2.8. Síntesis de la 7-cloro-4-(perhidroazepina)quinolina (19).....	249
5.3.3. Síntesis de productos finales biscatiónicos (Familia B)	250
5.3.3.1. Síntesis de productos finales biscatiónicos pertenecientes a la Subfamilia B₁ (Familia B).....	250
5.3.3.1.1. Síntesis de dibromuro de 1,1'-[1,4-fenilenodi(metileno)]bis-1-azabicyclo[2.2.2]octano (SOS-30)	250
5.3.3.1.2. Síntesis de dibromuro de 1,1'- 1,1'-[bifenil-4,4'-diil]di(metileno)]bis-1-azabicyclo[2.2.2]octano (SOS-31)	250
5.3.3.1.3. Síntesis de dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(4,1-fenilenometileno)]bis-1-azabicyclo [2.2.2]octano (SOS-32)	251

5.3.3.1.4. Síntesis de dibromuro de 1,1'-[butano-1,4-diilbis(4,1-fenilenometileno)]bis-1-azabicyclo[2.2.2]octano (SOS-33)	251
5.3.3.2. Síntesis de productos finales biscatiónicos pertenecientes a la Subfamilia B ₂ y Subfamilia B ₃ (Familia B).....	252
5.3.3.2.1. Síntesis de dibromuro de 4-[metil(fenil)amino]-1-(4-{2-[4-({4-[metil(fenil)amino]-5,8-dihidroquinolino-1-il}metil)fenoxi]etoxi}bencil)quinolinio (SOS-34)	252
5.3.3.2.2. Síntesis de dibromuro de 7-cloro-1-(4-{2-[4-({7-cloro-4-[metil(fenil)amino]-5,8-dihidroquinolino-1-il}metil)fenoxi]etoxi}bencil)-4-[metil(fenil)amino]quinolinio (SOS-35)	253
5.3.3.2.3. Síntesis de dibromuro de 4-[(4-clorofenil)(metil)amino]-1-(4-{2-[4-({4-[(4-clorofenil)(metil)amino]-5,8-dihidroquinolino-1-il}metil)fenoxi]etoxi}bencil)quinolinio (SOS-36)	254
5.3.3.2.4. Síntesis de dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis{7-cloro-4-[(4-clorofenil)(metil)amino]quinolinio} (SOS-37)	254
5.3.3.2.5. Síntesis de dibromuro de 4-azepan-1-il-1-[4-(2-{4-[(4-azepan-1-il-5,8-dihidroquinolino-1-il)metil]fenoxi]etoxi}bencil)quinolinio (SOS-38)	255
5.3.3.2.6. Síntesis de dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis(4-azepan-1-il-7-cloroquinolinio) (SOS-39).....	255
5.3.3.2.7. Síntesis del dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis(7-cloro-4-pirrolidin-1-il-quinolinio) (SOS-40).....	256
5.3.3.2.8. Síntesis de dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis(4-pirrolidin-1-il-piridinio) (SOS-41).....	257
5.3.3.2.9. Síntesis de dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis[4-(dimetilamino)piridinio] (SOS-42).....	257
5.3.3.2.10. Síntesis de dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis-1-azabicyclo[2,2,2]octano (SOS-43)	258
5.3.3.2.11. Síntesis de dibromuro de (SS/RR y RS) 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis(3-hidroxi-1-azabicyclo[2,2,2]octano) (SOS-44)	258
5.4. Ensayos biológicos de los compuestos sintetizados. Material y métodos	259
5.4.1. Cultivo celular.....	259
5.4.2. Ensayos de inhibición de la proliferación celular	259
5.4.3. Preparación de la fracción citosólica.....	260
5.4.4. Ensayos de inhibición de la actividad colina quinasa (ChoK) <i>ex vivo</i>	260
Summary.....	267

6. Conclusions.....287

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan los tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte del individuo¹. En los países industrializados está considerada la primera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares, pero está destinada a ser la primera².

El aumento paralelo de la incidencia del cáncer con respecto a la esperanza de vida de la población explica el interés médico y social de esta enfermedad, siendo la edad el principal factor de riesgo para desarrollar un cáncer.

Un cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos:

1. El aumento de la proliferación de un grupo de células denominado tumor o neoplasia.
2. Adquisición por estas células de la capacidad invasiva que les permite escapar de su sitio natural en el organismo y colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos, proceso conocido como metástasis.

Cuando las células de un tumor son capaces de invadir los tejidos circundantes o los distantes tras penetrar en el torrente circulatorio sanguíneo o linfático, es decir de formar metástasis, se habla de **tumor maligno o cáncer**; mientras que si el aumento del crecimiento de estas células se produce donde normalmente se hallan, se denomina **tumor benigno**. Hoy día se sabe que todas las células de un tumor benigno o maligno derivan de una sola célula, es decir que los tumores son monoclonales (Theodor Boveri). Esto no significa que las células de un tumor sean genéticamente idénticas, ya que el proceso de carcinogénesis tumoral tiene un carácter microevolutivo que se compone de: a) alteración génica (mutación); b) competición; y, c) selección celular. Es decir, el proceso de formación de un tumor a partir de una célula implica necesariamente la acumulación sucesiva de alteraciones en los genes durante el periodo de años de crecimiento, hasta que se hace aparente. Durante este proceso dinámico de tipo evolutivo, aquellas células que van adquiriendo alteraciones en su material genético, que les proporcionan una ventaja en cuanto al crecimiento, van siendo seleccionadas y serán mayoritarias en el tumor¹.

La mayoría de los fallos en los tratamientos y, por tanto, la muerte de los individuos se producen debido a las metástasis. Además, la falta de tratamiento se debe básicamente a nuestro insuficiente conocimiento de los mecanismos biológicos que causan la aparición y progresión del cáncer, a pesar de que en las últimas décadas se haya avanzado enormemente en este sentido³.

El 90% de los tumores se producen en células epiteliales y se les denomina carcinomas; mientras que el otro 10 % se produce en el resto de células del organismo: células del tejido conectivo/muscular (sarcoma), células de la sangre (leucemias, linfomas y mielomas) y células del sistema nervioso (neuroblastomas y gliomas). Esto se debe fundamentalmente a dos causas: a) la primera es que las células epiteliales son las que mantienen durante más tiempo la capacidad de dividirse a lo largo de la vida del individuo, manteniendo así la maquinaria de proliferación en funcionamiento; b) la segunda se debe fundamentalmente a la localización de las mismas, ya que se encuentran recubriendo las superficies externas e internas del organismo y, por tanto, están más expuestas a la acción de agentes tóxicos de todo tipo que alteran su comportamiento.

El cáncer se inicia por mutación de genes que controlan la proliferación celular¹. Las mutaciones causantes de los procesos que conducen a la aparición de un cáncer tienen lugar en 3 tipos de genes: los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de reparación del ADN.

Los oncogenes son, en realidad, formas mutadas de genes normales, los proto-oncogenes. La mutación de éstos, que origina proteínas con función alterada que estimulan el crecimiento o la invasividad celular, los convierte en oncogenes. La mayoría de las veces incluso la mera expresión excesivamente elevada de la proteína normal codificada es suficiente para inducir alteraciones en el crecimiento y morfología de la célula, proceso conocido como transformación celular.

Los genes supresores son genes cuya función normal es controlar el ciclo de división celular, evitar el crecimiento excesivo y promover las características que especifican la localización de las células en un lugar determinado. La mutación de estos genes induce la aparición de cánceres, pues, dejan de expresarse o producen una proteína no funcional.

Así, la velocidad de crecimiento de una célula en cada momento es el resultado de la acción simultánea de los productos de ambos genes.

Por lo tanto, el cáncer es una enfermedad causada por una multiplicidad de mutaciones genéticas que inducen la transformación de las células normales en células cancerosas a causa de las alteraciones de señales que controlan las vías de transducción intracelular en los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis⁴.

La mayor parte de los productos de los proto-oncogenes que están implicados en la proliferación celular son:

- Factores de crecimiento o Receptores para ellos.
- Componentes de la maquinaria de la transducción de la señal mitogénica al núcleo.
- Factores de transcripción que regulan la expresión de genes esenciales para la proliferación o invasividad celular.

Por tanto conocer la función de las proteínas codificadas por los proto-oncogenes y entender como la actividad anormal las convierte en oncogénicas, causando la transformación de una célula normal en cancerosa, es de máximo interés para comprender el cáncer y también para el diseño de tratamientos mejores⁵.

Dentro de los oncogenes más importantes cabe destacar al oncogén *ras*, que codifica proteínas citoplásmicas que transducen la señal mitogénica, encontrándose activado en una cuarta parte de los tumores humanos, incluidos los cánceres de colon, páncreas, mama y pulmón^{6,7}. La activación de dicho oncogén desencadena una cascada de señalizaciones intracelulares que provocan la proliferación celular incontrolada^{8,9}.

La dificultad fundamental del cáncer, común a todas las terapias, es la falta de especificidad de los tratamientos, que no distinguen las células cancerosas de las sanas y, consecuentemente, la elevada toxicidad de dichos tratamientos¹.

En los últimos años se ha producido un espectacular incremento en el conocimiento de los mecanismos moleculares del cáncer humano, que está permitiendo ir descifrando las diferencias que existen entre células normales y tumorales². Todo esto, junto al diseño racional de fármacos, está posibilitando desarrollar fármacos antitumorales dirigidos hacia dianas terapéuticas que sólo están presentes y/o activadas en las células malignas¹⁰.

Una de las dianas que ha sido más estudiada en las últimas dos décadas, por nuestro grupo de investigación y otros grupos, y que se ha visto ampliamente relacionada con células transformadas por el oncogén *ras* es la enzima colina quinasa (ChoK), cuya actividad se encuentra muy elevada en tumores activados por dicho oncogén. Ha sido ampliamente demostrado que la inhibición de ChoK es una estrategia antitumoral eficiente y específica como tratamiento citotóxico frente a células transformadas^{10,11}.

En consecuencia, en esta memoria se continúa con el diseño, síntesis y análisis de nuevos compuestos dirigidos hacia la inhibición de la ChoK de forma selectiva y en la búsqueda de fármacos con actividad antitumoral, lo que supone una gran perspectiva de futuro en la lucha contra el cáncer.

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Resumen: La dificultad fundamental del cáncer es la falta de especificidad de los tratamientos, que no distinguen células cancerosas de células sanas y, por tanto, la elevada citotoxicidad de los mismos. El conocimiento de las bases moleculares implicadas en la pérdida de control de la proliferación, junto con el descubrimiento de los oncogenes, ha sido un hecho muy destacado en la investigación contra el cáncer. Así, el oncogén *ras* ha sido uno de los más estudiados por su relación con más de una cuarta parte de los tumores humanos, ya que las proteínas que codifica este oncogén transducen la señal mitogénica hasta en núcleo, lo que conlleva un aumento en la proliferación celular. Se ha correlacionado un aumento en la actividad de una enzima llamada colina quinasa (ChoK) y, consecuentemente, de su producto de catálisis, la fosforilcolina (PCho), con células transformadas por el oncogén *ras*. Se ha visto que la fosforilcolina (PCho) es un segundo mensajero, que por un mecanismo aún desconocido, está implicado en la transmisión de la señal mitogénica al núcleo. Existen evidencias que indican que tanto la exposición celular a factores de crecimiento o a carcinógenos químicos como la activación de ciertos oncogenes como *ras* y *rho1* estimulan la formación de PCho intracelular. Por tanto, la identificación de la enzima ChoK como una potencial diana terapéutica, y más recientemente, el oncogén que la codifica, están siendo procesos claves para el diseño de nuevos fármacos antitumorales más selectivos. El diseño de fármacos que inhiban selectivamente dicha enzima, como ya se ha demostrado, ha de tener potenciales propiedades antineoplásicas en células transformadas por el oncogén *ras*.

Se cree que muchos tumores son el resultado de una multitud de pasos, de los que una alteración mutagénica no reparada del ADN podría ser el primer paso. Las alteraciones resultantes hacen que las células inicien un proceso de proliferación descontrolada e invadan tejidos normales. El desarrollo de un tumor maligno requiere de muchas transformaciones genéticas. La alteración genética progresa, reduciendo cada vez más la capacidad de respuesta de las células al mecanismo normal regulador del ciclo celular.

Los genes que participan de la carcinogénesis resultan de la transformación de los genes normalmente implicados en el control del ciclo celular, la reparación de daños en el ADN y la adherencia entre células vecinas. Para que la célula se transforme en neoplásica se requieren, al menos, 2 mutaciones: una en un gen supresor de tumores y otra en un proto-oncogén, que dé lugar, entonces, a un oncogén.

Los conocimientos proporcionados por la investigación sobre los mecanismos de acción de los productos de los proto-oncogenes y genes supresores han abierto un abanico de posibles nuevas dianas terapéuticas. El conocimiento de estos procesos, que constituyen la base molecular del cáncer, permite ahora el diseño de métodos de screening más racionales.

Gran parte de las proteínas codificadas por los oncogenes intervienen en la transducción de la señal mitogénica que, tras la unión de los factores de crecimiento, se dirige desde la membrana al núcleo celular, interviniendo así en la producción de proteínas esenciales para el desarrollo del ciclo celular. Por otra parte, en el control del ciclo celular es donde se concentra la acción de los genes supresores de tumores más importantes.

Es obvio que el control de las rutas intracelulares de señalización que median los efectos de los oncogenes activados, o que son vulnerables a la inactivación de los genes supresores, representa una nueva y esperanzadora posibilidad de tratar el cáncer¹².

Así, para llegar a comprender como las células normales se convierte en malignas dando lugar a un crecimiento y una proliferación descontrolados, saltándose de esta manera las “reglas” o “normas” que rigen el crecimiento celular controlado, es importante conocer como funciona el mecanismo básico de crecimiento y división de una célula, es decir, el ciclo celular. Por ello, en este apartado comenzaremos explicando brevemente el ciclo celular, cómo funciona y cuáles son las moléculas y/o proteínas implicadas en la regulación del mismo para así llegar a comprender de que manera la diana propuesta en esta tesis, la enzima Colina Quinasa (ChoK), afecta y está implicada en el crecimiento anormal de una célula en células transformadas por el oncogén *ras* y otros oncogenes.

2.1. El ciclo celular.^{1, 13, 14}

Las células proliferan aumentando, por un lado, su contenido de moléculas y orgánulos, es decir, produciendo un crecimiento en masa o tamaño; y, por otro, duplicando y segregando sus cromosomas. Ambos procesos permiten a la célula dividirse en dos células hijas que son genéticamente iguales¹.

La proliferación celular tiene lugar de un modo controlado de acuerdo con las necesidades generales del organismo. Y no sólo es la base del desarrollo de un organismo a partir del cigoto según un modelo de divisiones celulares en el que cada tipo celular se divide cuanto y cuando debe, sino también la raíz del primero de los procesos que originan un cáncer: el crecimiento descontrolado de un grupo de células¹.

El ciclo celular es controlado por un sistema que vigila cada paso realizado. En regiones concretas del ciclo, la célula comprueba que se cumplan las condiciones para pasar a la etapa siguiente: de este modo, si no se cumplen estas condiciones, el ciclo se detiene¹³. Existen cuatro transiciones principales:

- Paso de G0 a G1: comienzo de la proliferación.
- Transición de G1 a S: iniciación de la replicación.
- Paso de G2 a M: iniciación de la mitosis.
- Avance de metafase a anafase

Los genes que regulan el ciclo celular se dividen en tres grandes grupos¹⁴:

1. Genes que codifican proteínas para el ciclo: enzimas y precursores de la síntesis de ADN, enzimas para la síntesis y ensamblaje de tubulina, etc.
2. Genes que codifican proteínas que regulan positivamente el ciclo, también llamados proto-oncogenes. Las proteínas que codifican activan la proliferación celular, para que células quiescentes pasen a la fase S y entren en división. Algunos de estos genes codifican las proteínas del sistema de ciclinas y quinasas dependientes de ciclina. Pueden ser:
 - Genes de respuesta temprana, inducidos a los 15 minutos del tratamiento con factores de crecimiento, sin necesidad de síntesis proteica.
 - Genes de respuesta tardía, inducidos más de una hora después del tratamiento con factores de crecimiento. Su inducción parece estar causada por las proteínas producidas por los genes de respuesta temprana.
3. Genes que codifican proteínas que regulan negativamente el ciclo, también llamados genes supresores tumorales.

Las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclina (CDK), son sintetizadas a partir de proto-oncogenes y trabajan en cooperación para regular el ciclo positivamente. Fosforilan serinas y treoninas de proteínas diana para desencadenar procesos celulares.

Los proto-oncogenes son genes cuya presencia o activación a oncogenes pueden estimular el desarrollo de cáncer. Cuando se activan exageradamente en las células normales provocan que ellas pierdan el control de la división y se mantengan proliferando sin control.

2.1.1. Fases del ciclo celular.¹

La serie de sucesos por los que una célula da lugar a dos células hijas se denomina *ciclo celular*, y comprende el periodo entre dos divisiones mitóticas (**Figura 2.1**). Consta de cuatro fases: G_1 , S, G_2 y M. El ciclo completo, aunque hay variaciones, dura unas 24 horas.

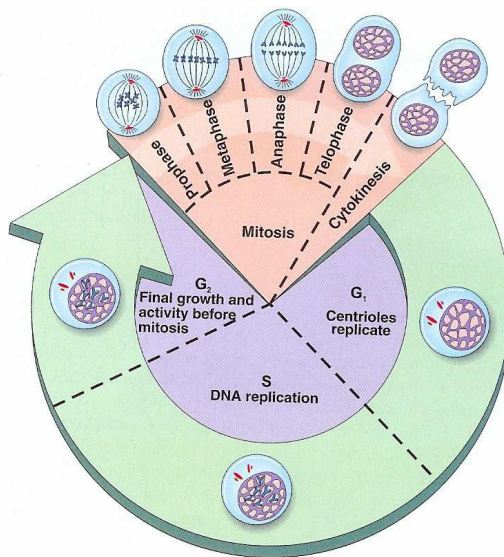


Figura 2.1.- Fases del ciclo celular.

Fase G_1 : es el periodo de 6 a 12 horas que sigue a una división celular, previo a la síntesis o replicación del ADN. Durante este tiempo, la célula dobla su tamaño y su masa, debido a la síntesis continua de todos sus componentes como resultado de la transcripción y traducción de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular.

Existe un punto de control llamado **punto de control de restricción R** y seguidamente el **punto de control G_1** en el que la célula comprueba que ha generado la masa necesaria para seguir adelante y comenzar la síntesis de ADN y, también, que las condiciones ambientales son favorables: presencia de nutrientes, sales y temperatura adecuadas; y factores que induzcan el crecimiento actuando sobre receptores en la membrana celular. La búsqueda de factores externos es muy importante, pues estos estimulan la síntesis de proteínas como algunas CDKs y ciclinas; la continuación y control del ciclo celular sería imposible sin estas proteínas. Es el punto de control y decisión más importante.

Hay células que pueden parar su progresión hacia la división en este estadio y permanecer durante días, meses o años en estado de reposo sin aumento de masa, en lo que se ha denominado fase G_0 .

Fase S: corresponde al tiempo (6-8 h) durante el cuál se replica el ADN. Cada cromosoma pasa a tener dos cromátidas, es decir, dos moléculas de ADN de cadena doble, que son copia una de la otra.

Fase G_2 : es el periodo comprendido entre la finalización de la replicación del ADN y el inicio de la división. Las células se preparan para la escisión en dos células hijas.

Existe, en esta fase, un segundo **punto de control G_2 -M**, en el que la célula debe comprobar dos condiciones antes de dividirse: una, que ha duplicado la masa de modo que puede dar lugar a dos células hijas, y, otra, que ha completado la replicación del ADN y sólo lo ha hecho una vez.

Fase M: esta es la fase de mitosis propiamente dicha (1 h). Los cromosomas se condensan enormemente y los microtúbulos se organizan a partir de dos *cuerpos polares* que se sitúan en ambos extremos de la célula formando el *huso cromático* que va a servir como guía a los cromosomas. Durante la primera fase de la mitosis (profase), desaparece la membrana nuclear, los cromosomas se unen por medio de los cinetocoros, unas estructuras asociadas a su centrómeros, a los microtúbulos en la zona media celular formando la placa ecuatorial (metafase).

En este momento existe otro **punto de control M**, que solo permite seguir adelante si todos los cromosomas están alineados sobre el huso. Si esto es así, una señal da lugar a que las cromátidas hermanas se separen, yendo cada una hacia un polo de la célula (anafase). Cuando llegan a los extremos (telofase), la célula comienza a escindir (citocinesis) por la zona media dando lugar a dos células hijas. El reparto de los demás componentes tiene lugar prácticamente por el flujo del citoplasma, la membrana vuelve a formarse y los cromosomas a descondensarse.

La existencia de puntos de control (**Figura 2.2**) es clave. Permiten que todo el proceso tenga lugar cuando la célula está correctamente preparada mediante una triple comprobación de que se han dado las condiciones necesarias para iniciar una nueva fase y, además, sirven de freno durante el ciclo, asegurando que una fase no se inicia antes de que la anterior haya finalizado, y permiten el control del ciclo por señales externas¹³.

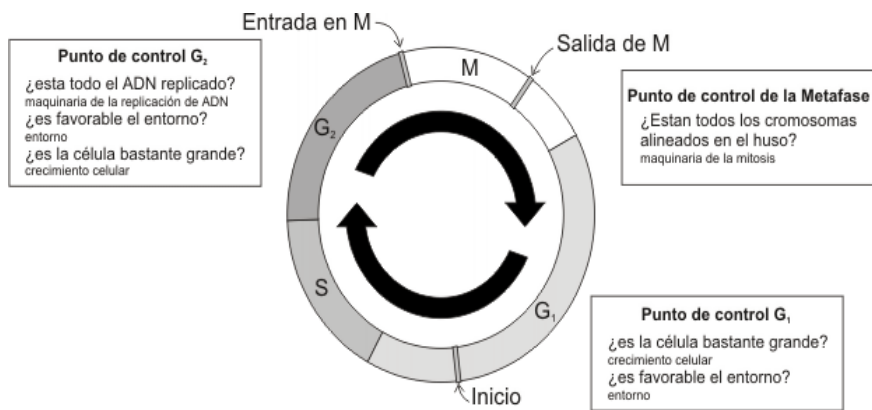


Figura 2.2.- Puntos de control del ciclo celular.

2.1.2. Regulación del ciclo celular.^{13, 15, 16}

Todo lo anteriormente expuesto indica que existe un control exhaustivo del metabolismo celular para adecuar el crecimiento a la división.

El conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular llevan un orden y supervisión estrictos. Señales provenientes del medio y algunos controladores dentro de la célula, se encargan de dirigir el progreso de ésta a través de las distintas fases del ciclo celular. Entonces se habla de que hay una *regulación extracelular* y una *regulación intracelular*.

2.1.2.1.- Regulación intracelular del ciclo celular.

La maquinaria básica del control interno del ciclo celular está constituida por enzimas denominadas *quinasas* o *proteín-quinasas* (*protein-kinase* o *PK*), capaces de fosforilar otras proteínas mediante la transferencia de grupos fosfato a aminoácidos específicos. En la proliferación celular, y en otros muchos procesos celulares, la fosforilación tiene un papel esencial como método para modular, activar o inactivar, la funcionalidad de proteínas. La eliminación del grupo fosfato, que revierte el efecto de la fosforilación, tiene lugar por unas enzimas llamadas *fosfatasas*¹.

Los principales efectores de esta regulación (las proteínas que permiten el progreso del ciclo) son dos:

- 1) Los complejos CDK/ciclinas.
- 2) Las proteínas CKIs o inhibidores de complejos CDK-ciclinas.

1) Las quinasas que coordinan los complejos procesos de control del ciclo celular se denominan quinasas dependientes de ciclina o CDKs (Cyclin-Dependent Kinases), porque su actividad de fosforilar proteínas está regulada por la asociación reversible con otras proteínas, las ciclinas¹.

Hay dos clases principales de ciclinas: las **ciclinas G₁**, que se unen a CDKs durante la fase G₁ y son necesarias para el inicio de la fase S, y las **ciclinas mitóticas**, que se unen a CDKs durante la fase G₂ siendo esenciales para la entrada en mitosis¹.

Los complejos CDK-ciclina están compuestos por 2 tipos de proteínas: las CDK, quinasas dependiente de ciclina, y las ciclinas, que pasan por un ciclo de síntesis y degradación. Se conocen seis CDKs, pero sólo se ha caracterizado la función de cuatro de ellas (CDK 1, 2, 4 y 6); mientras que sólo se conocen 4 tipos de ciclinas (ciclinas A, B, D y E). La CDK fosforila aminoácidos específicos de algunas proteínas, pero sólo si está unida a una ciclina. Se conocen 6 distintas combinaciones de CDK-ciclina que actúan en tiempos específicos durante el ciclo (**Figura 2.3**).

El proceso de síntesis y ensamblaje de ciclinas/CDK está regulado por tres tipos de factores: a) mitógenos, que estimulan la división celular; b) factores de crecimiento (GFs), que producen un aumento de tamaño al estimular la síntesis proteica; y, c) factores de supervivencia, que suprimen la apoptosis.

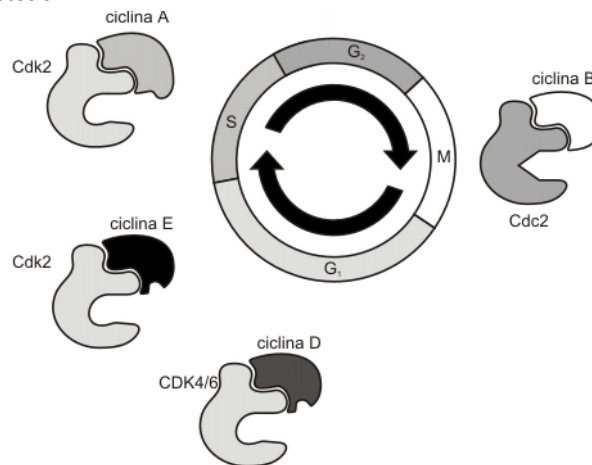


Figura 2.3.- Complejos CDK-ciclinas formados durante el ciclo celular.

2) Se sabe que las células sintetizan proteínas inhibitoras de los complejos CDK-ciclinas (CKIs), que colaboran en el control del ciclo celular. Estas proteínas se han agrupado en dos: las proteínas INK4 (inhibidoras de quinasas 4) y las CIP (proteínas inhibitoras de CDKs).

Las INK4 se unen e inhiben sólo los complejos cdk4-ciclina D y cdk6-ciclina D, la única caracterizada es la p16 (p = fosfoproteína y el número es su peso en kDa).

Las CIP se unen e inhiben a todos los complejos que tengan CDK 1, 2, 4 y 6, actualmente se conocen las: p21, p27 y p53 (**Figura 2.4**).

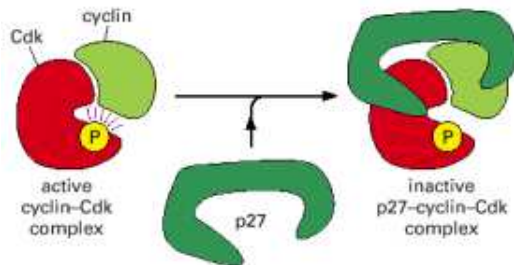


Figura 2.4.- Proteína p27 inhibidora de CDKs.

Las proteínas INK4 y CIP, llamadas en conjuntos inhibidores de CDKs (CDIs), y algunos factores de transcripción, como el p53, tienen la función de impedir la proliferación celular. La mutación de los genes que las codifican y/o la pérdida de función de estas proteínas, resulta en la pérdida de control sobre el ciclo celular y la incapacidad para detenerlo, (proliferación celular con errores). Por su acción normal, a los genes que codifican estas proteínas se les denominaron “genes supresores de tumores”.

Estas proteínas actúan en diferentes espacios de tiempo, permitiendo o inhibiendo el progreso adecuado del ciclo celular. Esta capacidad de orden, se debe principalmente, a que las proteínas (p.e. las ciclinas) que no se utilizan son eliminadas por un complejo de degradación llamado ubiquitinaproteasoma.

Las enzimas ligasas de ubiquitina conducen a la ubiquitinación de las ciclinas, lo que las marca para su degradación en el proteasoma y, por tanto, destruye la funcionalidad del complejo con la CDK. Una enzima ligasa de ubiquitina implicada en este proceso de regulación del ciclo celular es el complejo SCF, que actúa sobre las ciclinas G1/S. Otro complejo denominado APC (*anaphase promoting complex*) actúa sobre ciclinas M (**Figura 2.5**).

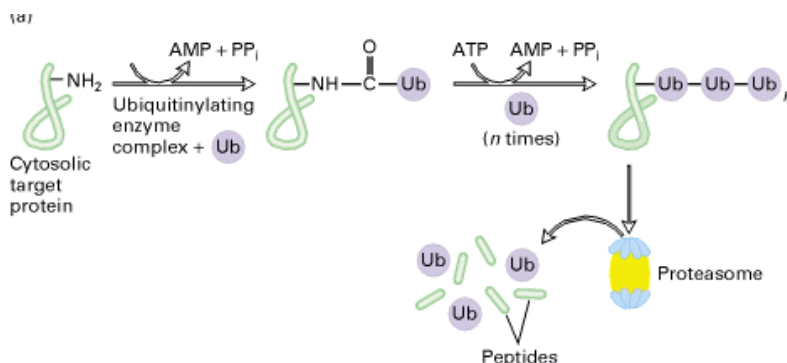


Figura 2.5.- Proceso de degradación de las ciclinas.

En resumen, el paso ordenado por cada una de las fases del ciclo celular está altamente regulado por los complejos CDK-ciclinas y sus inhibidores, entre otras proteínas. Además, para el control del ciclo celular, se postularon cuatro puntos en los que se controla la célula y el medio extracelular para dar lugar o restringir las acciones propias de cada una de las fases del ciclo. Estos cuatro puntos son: un punto de restricción y tres puntos de control.

2.1.2.1.1. Puntos de control del ciclo celular.

Las ciclinas G₁ regulan el punto de restricción R

Las ciclinas de la etapa G₁ son de dos tipos, D y E. Tienen una vida media corta y sus niveles se regulan por transcripción.

Las **ciclinas de tipo D**, llamadas D1, D2 y D3, están implicadas en la regulación del punto de restricción. Su síntesis es inducida en las células por factores de crecimiento, e inhibida por factores que reducen la proliferación celular, como el factor TGF- β (factor de crecimiento transformante- β). Las ciclinas D se unen a varias CDKs: CDK2, CDK4, CDK5 y CDK6, pero principalmente lo hacen a CDK4 y CDK6 durante un periodo muy concreto, el final de la fase G₁ y el inicio de la fase S¹.

Una de las funciones básicas del complejo ciclina D-CDK4 y CDK6 es fosforilar la proteína Rb (retinoblastoma), activando la expresión de genes necesarios para la entrada en fase S. Esta proteína es fosforilada específicamente en la transición G₁-S y permanece así hasta el final de la fase M.

La proteína Rb, producto del gen supresor de tumores *Rb*, cuando está hipofosforilada se une e inhibe varias proteínas, entre ellas algunos factores activadores de la transcripción, como E2F, que controlan la expresión de genes críticos para la síntesis de ADN, bloqueando la progresión de las células y manteniéndolas en fase G1. Sin embargo, tras su fosforilación al final de la fase G1, Rb ya no es capaz de unirse y bloquear a estos factores activadores, permitiendo así la liberación del factor de transcripción E2F y promoviendo la entrada en la fase S.

El E2F estimula la síntesis de CDK2 y ciclina E (necesarios para el progreso de G1 a S), de proteínas necesarias para la síntesis de ADN y de él mismo, inactivando aún más Rb's y disminuyendo la concentración de p27. La inactivación de Rb es mantenida a lo largo del ciclo por la concentración de distintos complejos CDK-ciclina pero, una vez que las ciclinas se degradan, el Rb es de nuevo activo y se une al E2F (**Figura 2.6**).

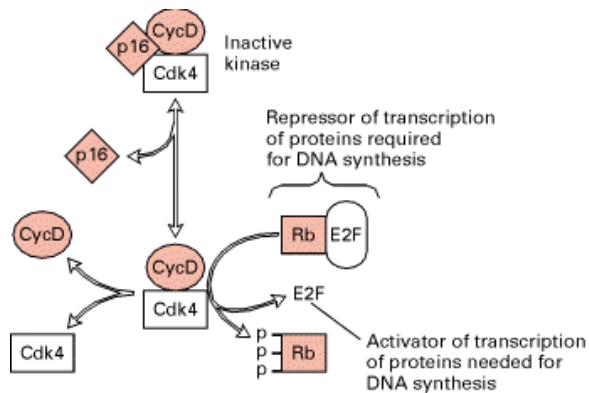


Figura 2.6.- Liberación del factor de transcripción E2F tras la fosforilación de Rb por CDK 4-ciclina D.

El paso por este punto es también vigilado por la p16 (INK4) que como se describió antes, se encarga de inhibir a los complejos CDK4, 6-ciclina D. La p16 inhibe la unión de CDK y ciclina, se interpone entre ellos, por lo que son inactivos; esto es, el E2F no se puede liberar y, en consecuencia, no se pasa el punto de restricción. La acción de la p16 tiene que ver con el medio extracelular, pues se sabe que si no existen suficientes señales del exterior (mitógenos, factores de crecimiento, nutrientes, etc.) p16 y p27 tienden a acumularse, por lo que se hacen muy activos.

La fosfoproteína p27 es una CIP, y su importancia radica no sólo en que se encarga de suprimir la actividad de los complejos CDK-ciclina en los primeros dos puntos de control, sino que, además, ayuda a retirar a la célula del ciclo celular llevándola a G0.

Primer punto de control: Las ciclinas G₁ regulan el punto G1-S

La **ciclina E** forma complejos con la CDK2, que están implicados en el inicio de la fase S, es decir, en la replicación del ADN. Su síntesis comienza al final de G1 y continúa hasta la entrada en la fase S, siendo entonces rápidamente degradada.

Participan en este punto, el complejo CDK2-ciclina E que, como los implicados en el punto de restricción, también se encarga de inactivar a Rb y de favorecer el trabajo de E2F, al objeto de preparar las enzimas necesarias para comenzar la síntesis de ADN en la fase S.

Los encargados de la inhibición en este punto de control son un factor de transcripción y una CIP: la p53 y la p21, en ese orden.

La p53 es uno de los más conocidos supresores de tumores, usualmente se encuentra en la célula, pero es muy inestable en condiciones normales porque se encuentra unido a otra proteína llamada Mdm2, que funciona como un "marcador" para que la p53 se degrade. Si existe una lesión en el ADN, se activan distintas enzimas que ayudan a "separar" la p53 de su "marcador". Así, una mayor concentración de p53 estimula la síntesis de p21 (CIP) que se une a CDK2 y ciclina E, inhibiendo la acción del complejo. La célula entonces no puede pasar a la fase S (**Figura 2.7**).

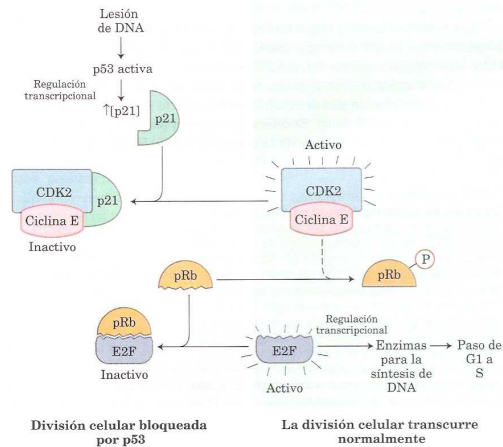


Figura 2.7.- Inhibidores del punto de control G1-S.

Fase sin punto de control: Fase S

La fase S no tiene como tal un punto de control, aun cuando algunos autores lo consideran así. Sin embargo, es indispensable la presencia del complejo CDK2-ciclina A para que la síntesis de ADN se lleve a cabo. Como se explicó antes, durante la fase S el ADN se replica, siendo necesario que se arme la “maquinaria” específica. Dentro de ellas hay un conjunto de proteínas conocido como complejo de reconocimiento del origen u ORC, que reconocen secuencias bien definidas de bases en el ADN llamadas orígenes de replicación.

Durante la fase G1 se forma el ORC, tras el cual otras proteínas (como cdc6 y mcm) se unen para formar el complejo de prereplicación (pre-RC). El complejo CDK2-ciclina A se encarga de deshacerse de las proteínas del pre-RC y de unir las enzimas necesarias para la replicación (como la ADN polimerasa). De este modo se asegura que la “maquinaria” de replicación no vuelva a armarse hasta que se haya terminado el ciclo y que la replicación sólo suceda una sola vez.

Segundo punto de control: Las ciclinas mitóticas regulan el punto G₂-M

Las ciclinas mitóticas, A y B, son estables durante la interfase siendo degradadas rápida y específicamente durante la mitosis.

El segundo punto de control se encuentra al final de G₂. Los complejos CDK1- ciclina A y ciclina B permiten el paso a través de este punto. En conjunto, la actividad de estos dos complejos se ha denominado Factor Promotor de la Mitosis (MPF).

A grandes rasgos, el segundo punto de control se encarga de revisar:

- 1) que el material genético se haya duplicado completamente.
- 2) que el material genético no tenga errores.
- 3) que el medio extracelular sea adecuado.

Se sabe que, una vez activado, el complejo CDK-ciclina se encarga de llevar a cabo tareas indispensables durante las primeras subfases de la mitosis.

En resumen, los complejos CDK1-ciclina A y ciclina B, se encargan de inducir el ensamblaje del huso mitótico y en parte de asegurarse de que los cromosomas se unan a éste. Se encarga además de: a) iniciar la condensación del material genético, activando un grupo de proteínas conocidas como condensitas; b) desensamblar la envoltura nuclear fosforilando las láminas nucleares; c) armar nuevamente el citoesqueleto celular; y, d) la reorganización del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático.

En este punto actúa también la p53 que, como ya se ha descrito, detecta alteraciones en el ADN y desencadena la activación de la CIP p21, encargada de la inhibición de cualquier complejo CDK- 1,2, 4 y 6-ciclina.

Separación de la cromátidas hermanas

Las cohesinas son proteínas requeridas para mantener unidas a las cromátidas hermanas. Las cromátidas se separan durante la anafase. Para que esto suceda es necesaria la actividad de varios complejos proteicos. El principal de éstos es el complejo promotor de la anafase (APC). Este complejo es activado por la unión de una proteína semejante a una CDK, llamada cdc20 (cdc= ciclo de división celular). Una vez activado, el APC se encarga de marcar a diversas proteínas para que se degraden; una de ellas es la securina, que inactiva a la separasa. Esta separasa es la proteína encargada de inactivar a las cohesinas eliminando las uniones entre las cromátidas hermanas (**Figura 2.8**).

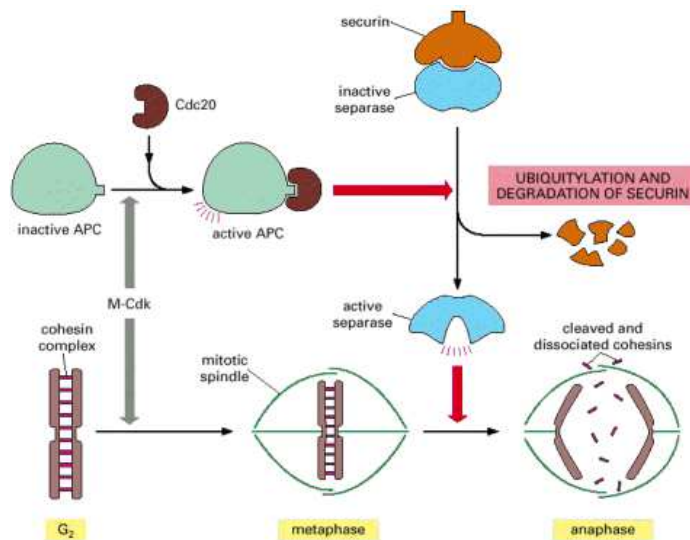


Figura 2.8.- Separación de cromátidas hermanas: Activación de APC por cdc20.

Tercer punto de control: Punto de control M

Este último punto de control se encuentra en la fase M, entre la metafase y la anafase. Se encarga de revisar que todos los cromosomas se hayan unido al huso mitótico. Si detecta que uno de los cinetocoros no se encuentra unido manda una señal negativa al sistema de control, bloqueando la activación de proteínas implicadas en la separación de las cromátidas hermanas. Inactiva específicamente al conjunto APC- cdc20, lo que inhibe la liberación de la separasa, impidiendo que las cromátidas hermanas se separen hasta que la señal desaparezca.

2.1.2.1.- Regulación extracelular del ciclo celular.

La forma y el tamaño de un organismo están definidos por los tres procesos fundamentales que dan forma y tamaño al individuo: el crecimiento celular, la muerte celular y la proliferación celular. Esta última es el resultado del ciclo celular que como se vio en apartados anteriores, está regulado por mediadores intracelulares (CDK-ciclinas).

Cabe señalar que la entrada al ciclo celular no es un proceso autónomo de la célula, se requiere la activación de estas vías (CDK-ciclinas) a través de la señalización mediante factores solubles de naturaleza proteica denominados mitógenos. De esta manera, las células proliferan en organismos multicelulares sólo cuando se requieren más células.

La mayoría de los mitógenos controlan la tasa de división celular actuando en la fase G1, liberando el control negativo del ciclo celular y permitiendo la entrada a la fase S. Actúan uniéndose a receptores de membrana con actividad de tirosina-quinasas, los cuales activan a la proteína G monomérica *Ras* cambiándola de su estado unido a GDP por GTP. Esta activación desencadena una cascada de fosforilaciones a través de las proteínas MAPK (quinasas activadas por mitógenos). A su vez estas proteínas MAPK transmiten el estímulo a diversas moléculas efectoras (quinasas de proteínas o factores de transcripción). Esta cascada de fosforilaciones ocasiona la transcripción de genes tempranos (entre los que destacan los que codifican a las ciclinas G1) y algunos de estos genes, a su vez, activan la transcripción de otros genes denominados genes tardíos. De esta manera, la vía de señalización Ras-MAPK transmite señales extracelulares al núcleo activando la maquinaria del ciclo celular.

Muchos tipos celulares, como los fibroblastos o las células epiteliales, requieren la adhesión a sustratos de la matriz extracelular (fibronectina o laminina) para crecer y proliferar en adición de las señales y medio adecuados. Este requerimiento se debe a que la unión de las moléculas de matriz extracelular a las integrinas (moléculas receptoras de matriz en la membrana celular, que están unidas al citoesqueleto) activa otras vías de señalización requeridas para entrar al ciclo celular, mediadas por la activación de otras quininas (FAK, quinasa de adhesión focal), las cuáles también terminan por activar a *Ras* y la cascada de quininas MAP.

Es decir, que la entrada al ciclo celular no es una decisión que la célula toma individualmente, sino que se requieren de las señales adecuadas (mitógenos), ya sean del medio extracelular o de otras células.

2.1.2.3.- Apoptosis.

Las células forman una comunidad organizada en un organismo, donde el número de células está estrictamente regulado: si una célula ya no es requerida muere o se “suicida” por apoptosis. Este fenómeno es bastante común, tanto en organismos en desarrollo como en adultos, lo cual podría parecer un desperdicio ya que, por lo general, las células que mueren por apoptosis son células sanas (a diferencia de las células que mueren por necrosis). En realidad es un proceso necesario para la homeostasis y la morfogénesis.

La apoptosis, a diferencia de la necrosis, es un proceso ordenado: la célula muere “limpiamente” sin dañar a sus células vecinas con el contenido de su citoplasma, la célula se condensa y reduce su tamaño, se colapsa el citoesqueleto, la membrana nuclear se destruye, el ADN se fragmenta y, finalmente, la superficie de la célula cambia de manera que puede ser reconocida por células vecinas o macrófagos para ser fagocitada.

La maquinaria intracelular de la apoptosis depende de una familia de proteasas llamadas caspasas que cortan a la proteína blanco en residuos de aspartato. Las caspasas se encuentran en las células en forma inactiva (procaspasas), las cuales son activadas por un corte proteolítico. Éstas, a su vez, activan otras procaspasas en una cascada de amplificación. Las caspasas cortan proteínas clave en la célula como la laminina, que al romperse desintegra la membrana nuclear, y degradan a la enzima que inactiva a la DNAasa, ocasionando la degradación del material genético.

La entrada a la apoptosis, al igual que la entrada a un nuevo ciclo celular, es un “todo o nada” donde una célula que ha iniciado este proceso no puede detenerse. El mecanismo propuesto de la activación de estas procaspasas gira alrededor de proteínas adaptadoras que juntan múltiples caspasas en un agregado. En este agregado, las caspasas se activan entre sí mediante una pequeña actividad de proteasa basal. En unos momentos, estas caspasas activas desencadenan la cascada de activación amplificando la señal de muerte.

Las señales de muerte pueden originarse a dos niveles (**Figura 2.9**):

- En algunas células se puede inducir la apoptosis presentando el ligando de Fas en su membrana, el cual se une a un receptor de muerte (Fas) en la superficie celular de la célula blanco. El agregado Fas/ligando recluta a los adaptadores que unen y activan a la procaspasa 8.
- La célula también puede activar la apoptosis en respuesta a daño o estrés. Por ejemplo, un daño severo al ADN puede inducir la apoptosis mediante la p53, la cual activa la transcripción de genes que codifican ciertas proteínas que, a su vez, promueven la liberación del citocromo C de la mitocondria. Este, en el citoplasma, se une al factor promotor de la apoptosis 1 (Apaf1) el cual agrega y activa a la procaspasa 9.

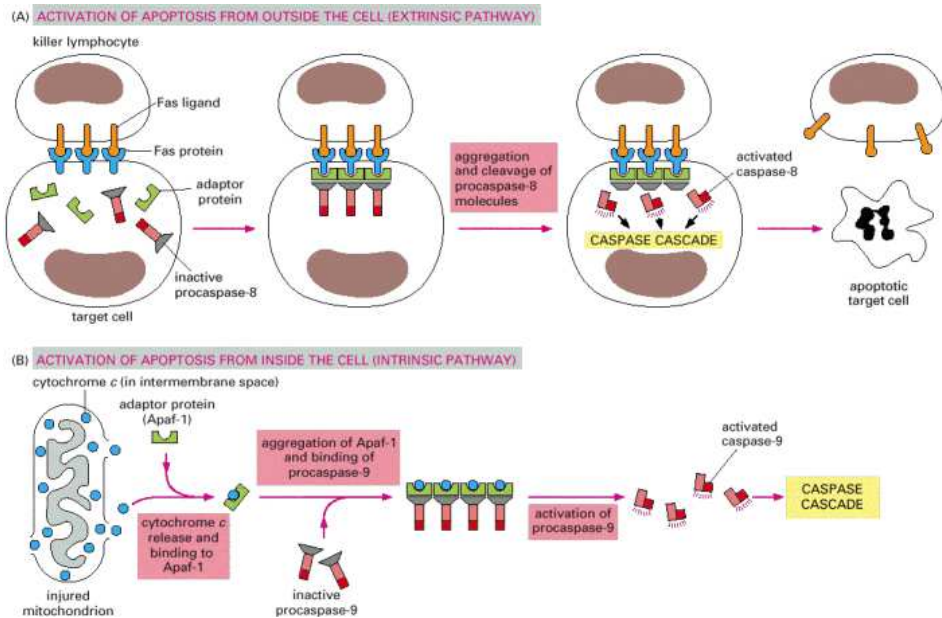


Figura 2.9.- Activación de la apoptosis por señales extracelulares e intracelulares.

En resumen:

- El ciclo celular es un conjunto de procesos ordenados, que la célula lleva a cabo cuando se le ha instruido el dividirse; está dividido en interfase y mitosis.
- El control del ciclo celular se presenta a dos niveles: intracelular y extracelular.
- El control intracelular está a cargo de mediadores proteicos que ejercen un control negativo y positivo sobre el ciclo celular (CDK-ciclinas y CKIs).
- Existen un punto de restricción y tres puntos de control, los cuales son supervisados por distintas combinaciones de CDKs-ciclinas.
- La entrada al ciclo celular no es una decisión que la célula toma individualmente; se requieren señales adecuadas (mitógenos), ya sea del medio extracelular o de otras células.
- Cuando una célula no es necesaria o es una posible amenaza, ésta puede morir por apoptosis, ya sea por señales intracelulares o extracelulares.

2.2. Transducción de la señal mitogénica al núcleo celular: Factores de crecimiento.

La proliferación o crecimiento celular está regulada por una serie de agentes, generalmente proteínas presentes en el suero, que son activas a concentraciones muy reducidas (nanomolar), los cuales reciben el nombre de *factores de crecimiento*. La mayoría activan la división celular, regulando el crecimiento, la diferenciación o adquisición de un fenotipo diferenciado y toda una serie de respuestas celulares como la movilidad, adhesividad, transmisión del impulso nervioso, etc.

Los factores de crecimiento actúan mediante su unión, reversible y con alta afinidad, a receptores específicos que se encuentran en la membrana plasmática celular, induciendo una serie de procesos bioquímicos conocidos genéricamente como *transducción de la señal mitogénica*. Dicha señal llega finalmente al núcleo, donde se produce la modulación del ciclo de división celular¹⁷.

La velocidad de proliferación de los distintos tipos celulares es muy diversa, existiendo incluso células que nunca se dividen. Esto se debe a que las células necesitan la presencia de factores que las empujen a seguir el ciclo, en concreto a pasar de la fase G1 a la S sobrepasando el punto de restricción R. En ausencia de estos factores, las células no sólo se detienen en fase G1, sino que entran en la etapa de descanso denominada G0, en el que su metabolismo se reduce en gran medida¹⁸.

Hoy día se conocen unos 50 factores del crecimiento, agrupables en varias familias que regulan tanto la proliferación celular como las respuestas fisiológicas de distintos tipos de células. Algunos de los más conocidos son:

- El factor derivado de las plaquetas o PDGF (Platelet-Derived Growth Factor).
- El factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF.
- El factor de crecimiento insulínico tipo 1 o IGF-1.
- El factor de crecimiento epidérmico (EGF y TGF- α).
- El factor de crecimiento de hepatocitos o HGF.

Existen también factores inhibidores del crecimiento celular, como el Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β), cuyos receptores activan factores de transcripción de genes como SMADs.

En la mayoría de las células epiteliales, TGF- β es un inhibidor del crecimiento, ya que promueve la expresión de inhibidores del ciclo celular de las familias Cip/Kip e INK4/ARF. A menudo, durante el desarrollo de un tumor, las células cancerosas escapan de las acciones de estos factores inhibidores, lo que proporciona una ventaja adaptativa a las células tumorales¹⁹.

2.3. Proto-oncogenes nucleares: Factores de transcripción.

La vía de transducción de la señal mitogénica finaliza en el núcleo con la expresión de genes esenciales para la proliferación celular.

Los proto-oncogenes nucleares codifican proteínas localizadas generalmente en el núcleo celular. La función de la mayoría de estas proteínas es la regulación (activación o inhibición) de la expresión génica, actuando como factores de transcripción inducibles.

Los factores de transcripción son estimulados por señales citoplasmáticas. Al ser activados adquieren la capacidad de regular la expresión génica en el núcleo celular, bien activando o bien reprimiendo la transcripción de diversos genes.

Ciertos factores de transcripción pueden sufrir mutaciones que los mantienen continuamente activos sin necesidad de señales externas, transformándose así en oncogenes y estimulando sin control la síntesis de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular. Esto puede dar lugar al crecimiento incontrolado de las células y, por tanto, a un tumor.

Son numerosos los factores de transcripción cuya importancia ha sido demostrada en el cáncer. Entre los factores de transcripción que actúan como oncoproteínas, cabe destacar *Myc*, *Max*, *Myb*, *Fos*, *Jun*, *Rel*, *Ets*, etc.

Las proteínas *Jun* y *Fos* muestran homologías estructurales, teniendo ambas un dominio responsable de activar la transcripción y otro de unión a ADN. Éste último contiene dos subregiones: una rica en aminoácidos básicos, que interacciona con el ADN, y otra cremallera de leucina necesaria para la dimerización, requisito imprescindible para unirse al ADN.

La capacidad transformante de estas proteínas depende de su actividad transcripcional formando el *factor AP-1*, como se deduce del hecho de que las mutaciones en la cremallera de leucina anulan su oncogenicidad²⁰.

La *proteína activadora 1* o *AP-1* es un factor de transcripción y está implicada en la regulación de la expresión de genes relacionados con la respuesta a diversos estímulos, como citoquinas, factores de crecimiento, estrés e infecciones virales o bacterianas. *AP-1* controla, de este modo, diversos procesos celulares incluyendo diferenciación, proliferación y apoptosis²¹.

La actividad biológica de *Jun* y *Fos* está regulada por fosforilaciones que activan la acción sobre la transcripción génica. Los complejos *Fos* y *Jun*, junto con *AP-1*, están implicados en el proceso de transformación y progresión del cáncer en células transformadas por el oncogén *ras*, a través de la activación de diferentes vías de señalización, como son Raf/MEK/ERK (*Fos*), Ral-GDS/SEK/JNK (*Jun*) y PLC/DAG/PKC (*Jun*)^{1, 21, 22, 23, 28}.

2.4. Los proto-oncogenes que codifican proteínas citoplásmicas que transducen la señal mitogénica: La vía de Ras.

Las proteínas G intervienen en la transducción de señales que llegan del exterior hacia el interior de la célula. Ras pertenece a una gran familia de GTPasas que regulan múltiples procesos celulares.^{24,25}

Los genes *ras* codifican cuatro proteínas altamente relacionadas entre sí, cuyo tamaño es de 21 kDa: H-ras, N-ras y K-ras, el último de los cuáles da lugar a dos variantes, Kras4A y Kras4B. Cada proteína monomérica ras consiste en aproximadamente 190 residuos aminoacídicos altamente conservados. La mayoría de estas proteínas difieren entre sí en 25 aminoácidos que hay cerca del dominio hipervariable C-terminal. Esta variación en el dominio C-terminal es la que determina las diferentes funciones biológicas de las isoformas de las proteínas ras. Las proteínas ras median sus efectos biológicos a través de diferentes moléculas denominadas "efectores", que desencadenan la activación de diferentes vías de señalización implicadas en la regulación de funciones esenciales celulares, como el control de la proliferación celular, desarrollo y diferenciación, apoptosis, metabolismo lipídico, citoarquitectura y tráfico de membrana^{26,27}.

Algunos de los efectores más estudiados de Ras son la serina treonina quinasa Raf-1, el Ral-GDP estimulador de disociación Ral-GDS, y la fosfatidilinositol 3-quinasa PI3K.

Dentro de la superfamilia de Ras, existen diferentes subfamilias con diferentes funciones dentro de la célula^{24,25}:

- La subfamilia rho, rac y cdc42 regulan la organización del citoesqueleto.
- La subfamilia rab está implicada en el tráfico a través de membrana.
- La subfamilia ARF media el tráfico a través de vesículas.
- La subfamilia Ran está implicada en el transporte nuclear.

La señalización a través de las proteínas ras conduce a la síntesis proteica y la regulación de la supervivencia, diferenciación y apoptosis celular²⁸. Los genes *ras* tienen un papel clave en el control de crecimiento celular y en la aparición de cánceres, habiéndose encontrado mutado alguno de los genes de la familia en un 30% de todos los tumores humanos²⁹.

2.4.1. Ciclo de activación de Ras.

Las proteínas Ras se sintetizan como precursores citosólicos biológicamente inactivos. Estos han de ser modificados postranslacionalmente en su extremo carboxílico, para convertirse en proteínas biológicamente activas localizadas en la membrana celular³⁰.

Estas modificaciones incluyen farnesilación, proteolisis, carboximetilación y palmitoilación³¹. La farnesilación es el primer paso, siendo determinante en las modificaciones postraslacionales que sufren las proteínas Ras. Consiste en la transferencia de un grupo farnesilo desde pirofosfato de farnesilo (FPP), catalizado por la enzima farnesil transferasa (FT), a la cisteína terminal del extremo carboxílico. Esta cisteína está incluida en una secuencia específica de 4 aminoácidos "CAAX".

Así que las proteínas Ras están unidas a la cara interna de la membrana a través del residuo Cys¹⁸⁶ a través de un lípido isoprenoide, el radical farnesilo. Tras esta unión, los tres aminoácidos carboxiterminales ("AAX") siguientes a este residuo son eliminados mediante proteolisis y la Cys¹⁸⁶ es carboximetilada³². Finalmente, tras llevarse a cabo el anclaje a la membrana, se produce la palmitoilación de otros grupos SH de los residuos de cisteína terminales (Figura 2.10).

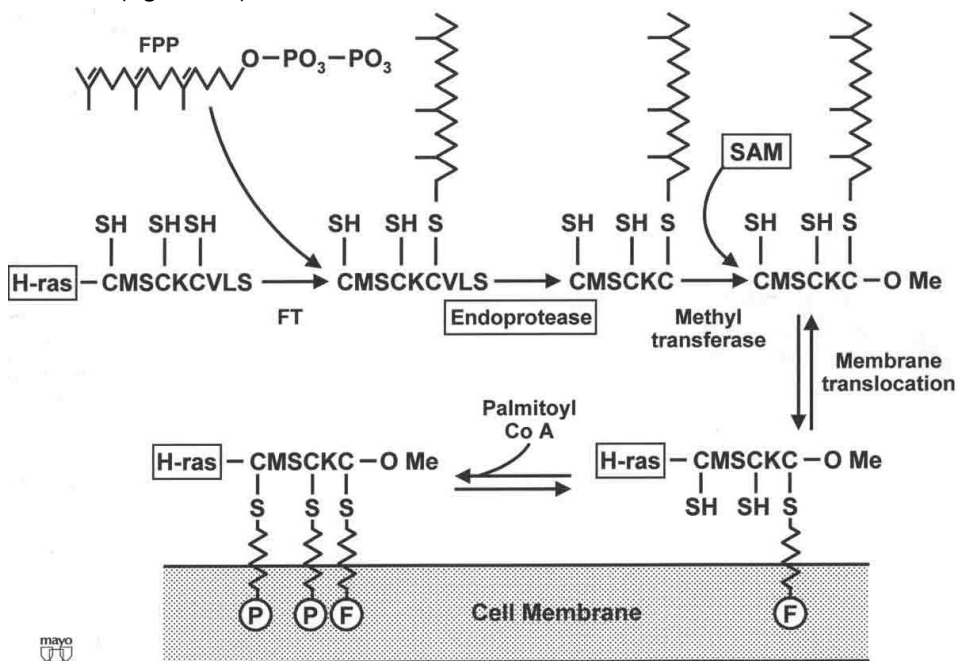


Figura 2.10.- Modificaciones postraslacionales de H-Ras.

Las proteínas Ras, una vez modificadas postraslacionalmente y unidas a la membrana plasmática, se acoplan específicamente a nucleótidos de guanina (GTP y GDP) y, de esta forma, participan en la transmisión de nuevas señales celulares constituidas por segundos mensajeros.

La actividad de las proteínas Ras está regulada por la unión e hidrólisis de nucleótidos de guanina. En ausencia de estimulación, la proteína Ras se encuentra inactiva en el citoplasma y unida al nucleótido difosfato de guanina o GDP. La proteína Ras se activa cuando intercambia el GDP por el nucleótido trifosfato o GTP. Esta reacción de intercambio está catalizada por los llamados factores intercambiadores de nucleótidos o proteínas estimuladoras de la disociación de nucleótidos de guanina (GEFs o GDSs). Una vez activada, entonces transmite la señal a otras moléculas, que se denominan *efectores*, modulando su actividad e influyendo de esta manera en las diferentes vías de la transmisión de la señal mitogénica. Tras ello, el GTP unido a Ras es hidrolizado a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de Ras, que vuelve así a su estado inactivo. Esta reacción es potenciada por otros factores que se denominan proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAPs).

Por lo tanto, los GEFs inducen la forma activa de Ras, es decir, Ras unido a GTP; mientras que los GAPs inducen la inactiva, esto es, Ras unido a GDP^{31, 33} (**Figura 2.11**).

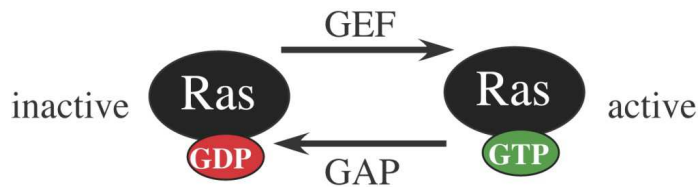


Figura 2.11.- Regulación de la actividad de la proteína Ras.

Tanto las mutaciones del protooncogen *ras* que produzcan proteínas con reducida actividad GTPasa, como las que aumentan la actividad de las GEFs o GDSs, incrementan el nivel de Ras-GTP y, por tanto, su función transmisora de la señal mitogénica generada en la membrana celular por la estimulación de receptores de factores de crecimiento (EGFR y otros), receptores asociados a proteína G (GPCR), integrinas y receptores de citoquinas tales como la interleuquina-2 (IL-2R)³⁴.

Ras participa en la transducción de la señal mitogénica inducida por los factores de crecimiento cuando se unen a receptores de tirosín-quinasa, la señal generada por receptores de factores y hormonas que se encuentran asociados a proteínas G, así como la señal producida a través de tirosín-quinasas no receptoras.

2.4.2. Efectores de Ras.

Varias dianas citoplásmicas de Ras han sido las descritas hasta la fecha. Las implicaciones específicas de algunos de estos efectores son todavía desconocidas. Algunos de los efectores más conocidos y estudiados hasta la fecha se describen a continuación (**Figura 2.12**).

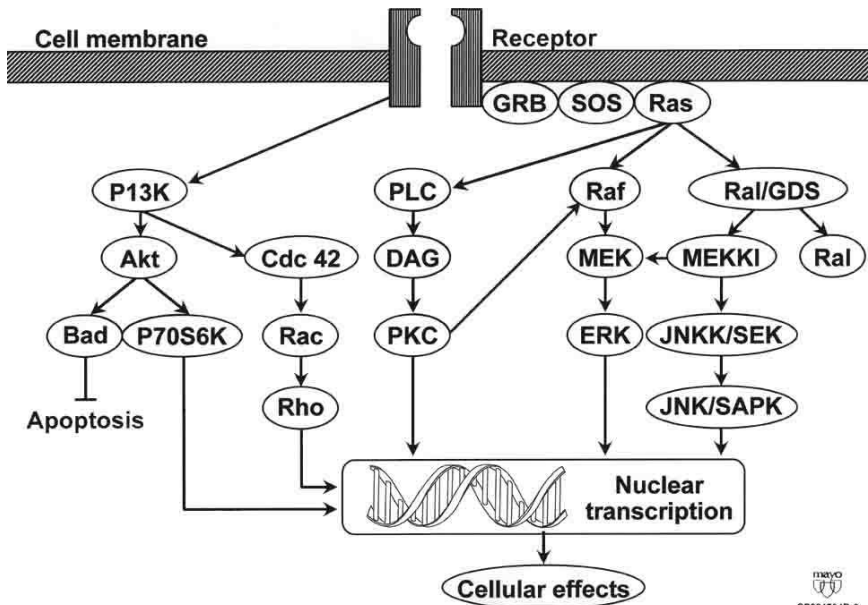


Figura 2.12.- Vías de señalización a través de los efectores de Ras.

La vía de señalización raf-MEK-ERK es una de los sistemas de señalización mejor caracterizados de ras. Las serinas/treoninas quinasas solubles (B-Raf y C-Raf) son reclutadas hacia la membrana plasmática y activadas por Ras-GTP. Una vez activado, el Raf activa, a su vez la cascada de proteínas quinasas MAP/ERK quinasa (MEK, MAPKK) que activan, a su vez a MAP quinasa o quinasa de regulación extracelular (ERK1/ERK2). La activación de ERK resulta en la fosforilación y activación de factores de transcripción como *c-Jun*, *c-Myc* y *c-Fos*, lo que da lugar a la activación de genes asociados con la proliferación³⁵.

Otro efector de ras es la subunidad catalítica de la fosfatidilinositol 3-OH quinasa (PI3K)³⁶. Esta vía da lugar a la activación de la proteína quinasa Akt^{37,38}, así como a la activación de proteínas relacionadas con ras de la familia Rho/Rac/Cdc42. Akt actúa sobre factores de supervivencia y muerte como las proteínas pro-apoptóticas Bad³⁹ y la caspasa 9⁴⁰, que están bajo la regulación de Akt y mTOR que, corriente abajo, actúa sobre la quinasa p70 S6 y PHAS-1, los cuales son importantes para la progresión del ciclo celular^{41,42}. La familia de rho/rac/Cdc42 está implicada en el control del estado de polimerización del citoesqueleto de actina, la adhesión celular y la transcripción génica^{43,44}.

Ras también activa a Ral GTPasa a través de las proteínas estimuladoras de disociación o factores intercambiadores de nucleótidos RalGEFs, que son efectores directos de Ras⁴⁵⁻⁴⁸. Uno de los miembros de esta familia que mejor ha sido caracterizado es RalGDS⁴⁹.

En la mayoría de los sistemas celulares, la acción complementaria de al menos dos de estas tres vías de señalización (Raf, PI3K y RalGEFs) es necesaria para la transformación de fibroblastos de ratón en cultivo a través de Ras^{44, 46, 50-52}.

2.4.3. Implicaciones de Ras en la oncogenicidad.

Las proteínas Ras actúan como una llave de activación en diferentes vías de transducción de señales, ciclando entre el estado activo, unido a GTP, y el estado inactivo, unido a GDP^{26, 27, 53, 54}.

Las formas oncogénicas de Ras están constitutivamente bloqueadas en su estado activo y transducen señales que median la proliferación celular, transformación y tumorigénesis. Hay varios mecanismos mediante los cuáles las proteínas Ras pueden participar directamente en el proceso carcinogénico⁵⁵:

- Mutaciones en los genes *ras* que alteren la actividad GTPasa intrínseca o la actividad intercambiadora de las proteínas de Ras. Es probablemente la más relevante. La alteración (de mecanismo o estructural) de los factores intercambiadores de nucleótidos hace que las proteínas ras permanezcan activadas permanentemente.
- La sobreexpresión de las proteínas normales de Ras puede tener el mismo efecto que la activación mediante una simple mutación puntual.
- Mutaciones en los propios efectores de Ras.

Una de las cuestiones sin resolver, concerniente a los principios moleculares de la activación oncogénica de Ras, es si la mutación en una isoforma particular de Ras produce un efecto oncogénico único. Se pueden observar los patrones de distribución de las isoformas activadas de Ras entre los diferentes tipos de cáncer^{29, 56}:

- Las mutaciones en K-Ras son más frecuentes en tumores colorectales, carcinomas de pulmón (cáncer no microcítico de pulmón (NSCLC)) y carcinomas de páncreas.
- Las mutaciones en H-Ras están asociadas con tumores de piel, cabeza y cuello.
- Las mutaciones en N-Ras son comunes en tumores hematopoyéticos.

2.4.3.1.- Ras y el fenotipo transformado.

Las proteínas Ras, durante el proceso carcinogénico, están implicadas en:

- La promoción de la proliferación.
- Supresión de la apoptosis.
- Remodelado del microambiente.
- Evasión de la respuesta inmune.
- Metabolismo.

Los oncogenes Ras establecen una independencia de los factores de crecimiento e inhibidores de crecimiento extracelulares, promocionando, de este modo, la salida de la fase G0 del ciclo celular, progresando a través de la fase G1 y entrando en fase S.

Promoción de la proliferación (Figura 2.13):

- RAS induce la sobreregulación transcripcional de factores de crecimiento, como HBEGF, TGF- α y AREG⁵⁷⁻⁵⁹, y altera la expresión de receptores de factores de crecimiento^{57,58}.
- Ras interfiere con la señal del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) a través de la inhibición del receptor de TGF- β o corriente abajo disminuyendo la regulación, tanto de la expresión de SMAD3 como de la acumulación nuclear de SMAD2 y SMAD3⁶⁰⁻⁶⁵.
- RAS también sobreregula los niveles de ciclina D1 mediante la sobreregulación de factores de crecimiento como Fos, Jun, ELK-1, el factor de respuesta al suero (SRF), ATF-2 y el factor nuclear-kB (NF-kB)⁶⁶⁻⁶⁸, mediante la activación de la vía RAF-MAPK, PI3K, la familia de GTPasas Rho (Rac1) y RaIGDS^{66, 67, 69-73}.
- Además de la estimulación de la transcripción génica de la ciclina D1, RAS también regula la estabilidad metabólica de la ciclina D1, a través de la inhibición de la quinasa glucógeno sintetasa 3 β (GSK3 β) dependiente de PI3K, que es la quinasa responsable de la fosforilación y la cosecuente ubiquitinación y degradación de la ciclina D1⁷⁴.
- RAS inhibe los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs) p21 y p27^{64, 75-78}.

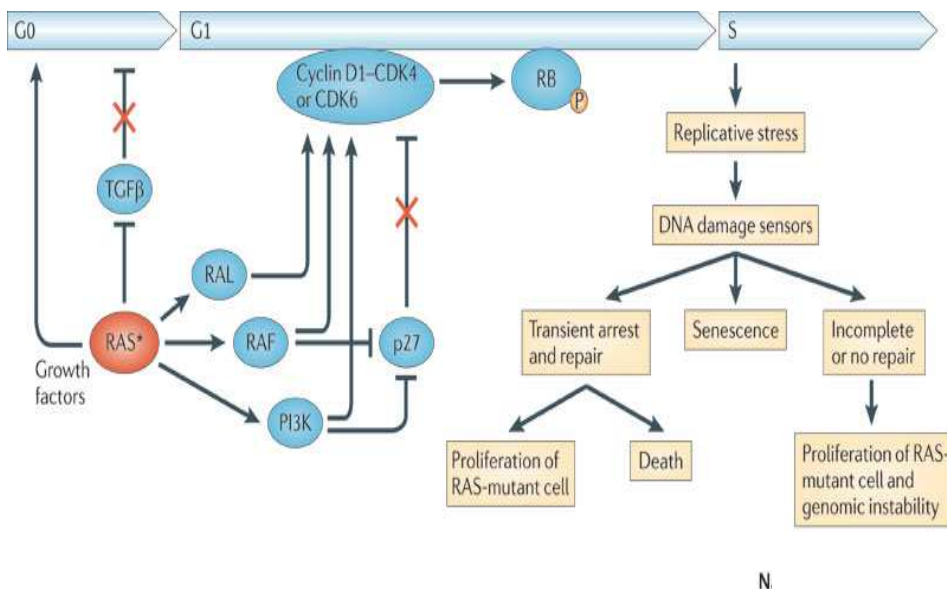


Figura 2.13.- Efectos de Ras sobre la proliferación.

Así, las nuevas ciclinas D1 sintetizadas, junto con las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6, dan lugar a la fosforilación de la proteína Rb y la consecuente disociación del complejo RB-EF2. Una vez liberado el factor de transcripción EF2, éste transactiva varios genes que son requeridos para la progresión del ciclo celular, incluyendo las ciclinas E y A, las cuáles permiten la transición a través del punto de control G1/S.

La persistente estimulación mitogénica impuesta por Ras es el inicio de un estrés replicativo, lo que da lugar a la activación de los puntos de control de respuesta por daño en el ADN (DDR), como p53 y p19⁷⁹⁻⁸². Esto da lugar al arresto y restauración de la integridad del genoma, entrando en un estado de arresto irreversible conocido como senescencia inducida por oncogenes (OIS)⁷⁹ o a padecer la apoptosis. Sin embargo, en células donde existe una deficiencia en los puntos de control por daño en el ADN (p. ej. pérdida de p53) se produce una mala reparación del ADN que da lugar a mutaciones y aberraciones cromosómicas, contribuyendo, de esta forma, al proceso tumorigénico⁸³⁻⁸⁷.

Supresión de la apoptosis:

Las funciones de muerte celular apoptótica son un mecanismo de defensa crucial frente a la malignidad y la corrupción de la maquinaria apoptótica es una firma definida de las células cancerígenas.

Los oncogenes Ras dirigen la erosión de las vías apoptóticas y su contribución al cáncer ha sido muy bien documentada⁸⁸.

Mediante la activación de las vías de PI3K y Raf, los oncogenes Ras pueden disminuir la regulación de señales pro-apoptóticas y sobreregular moléculas anti-apoptóticas:

- La activación de PI3K disminuye los niveles de proteínas pro-apoptóticas BCL-2, como BAK1, y aumenta los niveles de inhibidores de la apoptosis (IAPs) a través de la activación de NF- κ B^{89,92}.
- La activación de Raf contribuye a la supresión de la apoptosis inducida por Ras, mediante la desregulación del represor transcripcional de próstata de respuesta a apoptosis 4 (PAR4)^{93, 94}, y sobreregularando las proteínas anti-apoptóticas BCL-2 y el represor de la apoptosis con reclutamiento del dominio caspasa (ARC o NOL3)^{95,96}.
- Ambas vías, Ras-PI3K-Akt y Ras-Raf, han demostrado ser las mediadoras de la fosforilación de miembros de la familia de proteínas BCL-2, como BAD, lo que conduce a la formación de un complejo inactivo y a la subsecuente inactivación de BCL-2 y BCL-X₁^{97,98}.
- Silenciando de forma epigenética el gen pro-apoptótico CD95^{99,100}.

Además de las funciones pro-supervivencia de los oncogenes Ras, según el tipo celular y el contexto específico de la señalización, los oncogenes Ras también pueden promover programas pro-apoptóticos^{101,102}.

Aunque es aún desconocido en qué contexto se promulgan las capacidades pro-apoptóticas de Ras, el balance entre las señales pro-supervivencia y pro-apoptóticas determinará en último caso si las células transformadas por el oncogen Ras viven o mueren. La total prevalencia de los oncogenes Ras en el cáncer es un indicativo de que el eje pro-supervivencia tiene un rol dominante.

Remodelado del microambiente:

Los oncogenes ras producen cambios en el microambiente celular que tienen un papel esencial en la iniciación y progresión de un tumor. Un primer ejemplo de ello es que son capaces de inducir la angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos, lo que proporciona a las células del interior del tumor un aporte suplementario de nutrientes y oxígeno, acomodándose de esta manera a las necesidades fisiológicas^{103, 104}. Son capaces de modular los niveles de los factores de crecimiento endotelial (VEGFA) y también de incrementar la inflamación local y el remodelado estromal¹⁰⁵⁻¹⁰⁷.

De hecho, la disrupción de la expresión de KRAS^{G12V} o KRAS^{G13D} y la consecuente reducción en los niveles de VEGFA lleva a una disminución en el crecimiento del tumor¹⁰⁴⁻¹⁰⁸.

El oncogén HRAS^{G12V} media la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-8, IL-6), lo que contribuye a la inducción de la angiogénesis⁸⁹. Las citoquinas pro-inflamatorias reclutan células inmunes, como neutrófilos y macrófagos, los cuáles producen factores de crecimiento angiogénico¹⁰⁹⁻¹¹¹.

Además para que los factores de crecimiento endotelial lleguen a su diana y para que los vasos sanguíneos recién formados alcancen el tumor es necesario la modificación de la matriz extracelular (ECM). Los oncogenes HRAS median la sobrerregulación de algunas metaloproteasas como MMP2, MMP9 y el plasminógeno tipo uroquinasa (uPA)^{106, 112, 113}.

Evasión de la respuesta inmune:

Se han encontrado dos mecanismos mediante los cuáles los oncogenes Ras son capaces de evadir la respuesta inmune:

- La activación oncogénica de Ras reduce la expresión en la superficie de las células cancerígenas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), lo que da lugar a una menor inmunogenicidad en las células transformadas por RAS¹¹⁴⁻¹¹⁸.
- Los cánceres dirigidos por RAS poseen la capacidad de evadir la respuesta inmune adaptativa. En pacientes con cáncer de colon, páncreas y melanoma se han encontrado células T (linfocitos T) específicas frente antígenos de formas mutadas de Ras, pero con frecuencia son anérgicas o muy inactivas frente al tumor¹¹⁹⁻¹²³.

Queda aún por elucidar si las células transformadas RAS influyen en la respuesta inmune a través del reclutamiento directo de células inmunosupresoras o en conjunción con la inducción de la respuesta inflamatoria^{124, 125}.

Metástasis:

Los oncogenes RAS contribuyen a este proceso induciendo alteraciones en las interacciones célula-célula/célula-matriz, y mediante la adquisición de un fenotipo migratorio:

- La perturbación del contacto célula-célula la produce actuando sobre la maquinaria molecular que mantiene la adhesión entre células, como el receptor de la E-cadherina dependiente de calcio y su proteína citoplasmática asociada β -catenina¹²⁶⁻¹²⁹.
- Reduciendo la unión a la matriz (ECM) mediante la desregulación de las subunidades de integrina (como la integrina $\alpha_5 \beta_1$), la cuál facilita el mantenimiento de unos complejos de adhesión estables¹³⁰⁻¹³³.
- Contribuye a aumentar la motilidad en células cancerígenas produciendo cambios en la polimerización, organización y contracción de la actina; la polimerización y/o estabilidad de los microtúbulos; y la regulación transcripcional de genes de productos mitogénicos^{133, 134}.
- Controlando la degradación de la matriz, produciendo proteasas, disminuyendo la expresión de inhibidores de proteasas y protegiendo a las células tumorales de la apoptosis inducida por la privación de la matriz^{88, 89, 104, 127, 135-137}.

Son varias las vías de señalización que juegan un papel fundamental en la progresión metastásica, incluyendo Ras-MAPK, Ras-PI3K, Ras-RalGTPase y Ras-RhoGTPase^{134, 138}.

Metabolismo:

Como resultado de las altas tasas de proliferación, las células cancerígenas dependen de forma crucial de las vías metabólicas que generan los bloques de construcción necesarios para producir nuevas células¹³⁹. Estas necesidades metabólicas únicas fueron descritas por primera vez en 1920 por Otto Warburg y se tipificaban por un incremento en el consumo de glucosa y un cambio de la fosforilación oxidativa de la mitocondria por glicolisis aeróbica^{140, 141}. A pesar de que todas las ramificaciones de este fenotipo metabólico están todavía sin descifrar, se ha postulado que, aunque es menos eficiente en generar ATP, el catabolismo de la glucosa a través de la glicolisis es mucho más efectivo, proveyendo los precursores macromoleculares que son necesarios para la replicación de biomasa, como son los nucleótidos, aminoácidos y lípidos¹⁴².

Los oncogenes RAS contribuyen a la reprogramación metabólica de las células cancerígenas predominantemente a través de la sobrerregulación del factor hipoxia-inducible 1 α (HIF1 α) a través de la activación de los efectores de MAPK y PI3K^{143, 144}. La sobrerregulación del HIF1 ha sido implicada en una mejora en el transporte y la captura glicolítica de glucosa, incrementando la transcripción de transportadores de glucosa GLUT1^{145, 146}, así como en su procesamiento a intermedios biosintéticos, incrementando los niveles de enzimas glicolíticas claves¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

Por lo tanto, RAS oncogénico contribuye directamente en las reacciones metabólicas que promocionan el uso de glucosa como sustrato anabólico en la generación de material de construcción para el crecimiento celular¹³⁹.

Las proteínas Ras juegan un papel esencial en muchos procesos celulares como la proliferación, el desarrollo y la diferenciación mediante la regulación de vías de señalización específicas como las cascadas de kinasas y el metabolismo fosfolipídico^{53, 150}.

Además de la función estructural de los fosfolípidos como un componente de las membranas celulares, algunos de ellos constituyen un reservorio para la producción de segundos mensajeros que están involucrados en cascadas específicas que dan lugar a la mitogénesis¹⁵¹⁻¹⁵⁴.

Ras actúa directamente sobre enzimas que están implicadas en el metabolismo fosfolipídico y cuya acción dará lugar a la amplificación de la señal mitótica. Estas enzimas son: la fosfolipasa D (PLD) y la colina quinasa (ChoK), que están implicadas en la modulación y la transducción de la señal mitótica hasta el núcleo¹⁵⁵ (**Figura 2.14**).

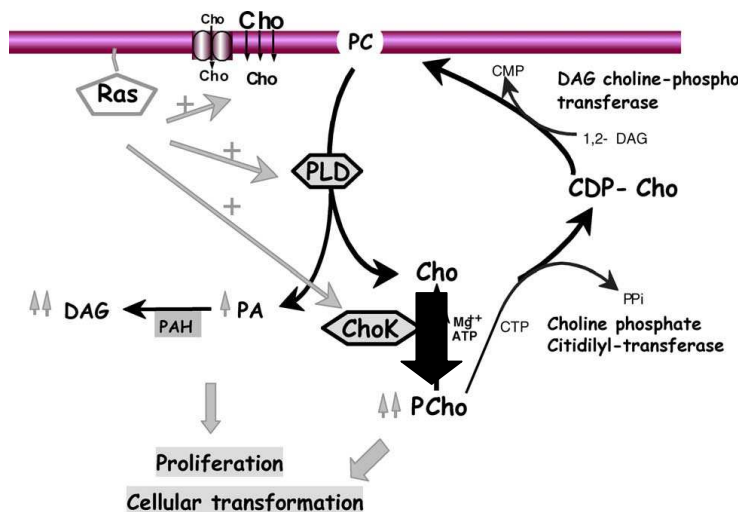


Figura 2.14.- Activación de la PLD y ChoK mediada por Ras.

La activación de la fosfolipasa D, por factores de crecimiento y por transformación oncogénica, provoca la hidrólisis de la fosfatidilcolina (PC), uno de los principales fosfolípidos de membrana, para dar ácido fosfatídico (PA) y colina (Cho)^{151, 156, 157}. El PA es hidrolizado por la PA-fosfatasa para dar diacilglicerol (DAG); y la Cho es fosforilada por la colina quinasa (ChoK) para dar fosforilcolina (PCho), que se biotransforma de nuevo en PC¹⁵⁸.

La proliferación celular debe cumplir con una serie de eventos que llevan a la duplicación de sus componentes estructurales. Estos eventos ocurren en un estricto orden temporal. Los fosfolípidos de membrana están situados entre los componentes más críticos que necesitan ser duplicados. Por ello, la acumulación de fosfatidilcolina (PC) es un evento típico y periódico que está coordinado en el ciclo celular. La acumulación de PC ocurre cuando las células entran en la fase S del ciclo celular, resultado de las interacciones entre las oscilaciones de la velocidad de biosíntesis y degradación de PC dependientes del ciclo celular, y resulta necesario para la división celular¹⁵⁹.

Por ello se ha visto a la colina quinasa (ChoK) como un enlace de conexión entre el metabolismo fosfolipídico y la regulación del ciclo celular¹⁶⁰.

Se ha demostrado que la transformación celular producida por las tres oncoproteínas de Ras (H-Ras, N-Ras y K-Ras) da lugar a un incremento en los niveles de fosforilcolina (PCho), como consecuencia de un incremento constitutivo de la actividad de ChoK. También se ha observado que la sensibilidad a los inhibidores de ChoK, como fármacos antiproliferativos, es similar en las líneas celulares transformadas por cada uno de los tres oncogenes Ras¹⁶¹.

Estos resultados indican que la ChoK puede ser usada como diana para el diseño de fármacos anticancerígenos frente a la tumorigénesis dependiente de Ras.

2.5. La enzima colina quinasa (ChoK).

El gen que codifica la enzima colina-quinasa (Chok) se ha identificado recientemente como un oncogén. Esta enzima cataliza la síntesis de fosfo-colina (PCho) a través de la fosforilación de colina (Cho), en una reacción estrictamente dependiente de ATP y magnesio. Es la primera reacción de fosforilación del ciclo de citidinfosfatasa-colina, también conocido como ciclo de Kennedy¹⁶². El objetivo final de este ciclo es el recambio de uno de los principales fosfolípidos de la membrana celular, que es la fosfatidilcolina (PC)¹⁶³. Así, tanto la integridad global de las membranas celulares como la producción de éstas durante los procesos de división celular dependen del adecuado funcionamiento de este ciclo y de su primer enzima, la colina-quinasa. En esta enzima también reside la capacidad de fosforilar otros sustratos diferentes a la colina, tal y como se ha observado al evidenciar la actividad quinasa sobre etanolamina de Chok purificada a partir de células de mamíferos^{164, 165}. (Figura 2.15)

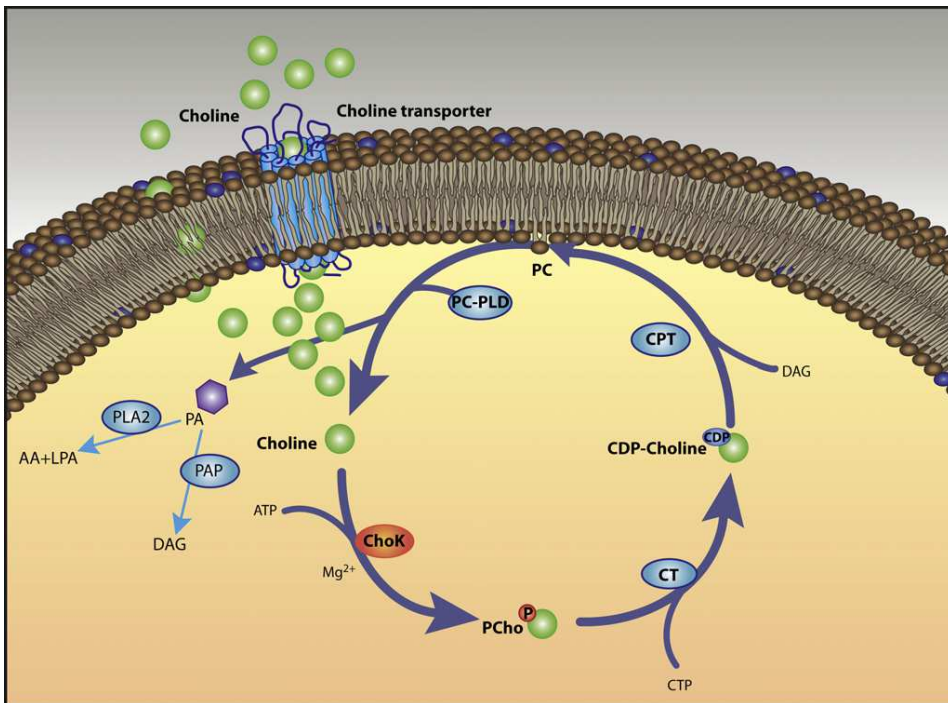


Figura 2.15.- Vía de Kennedy donde interviene la ChoK.

Por otro lado, la fosfatidilcolina (PC) está implicada en la síntesis de esfingomielosina (SM) a través de la regulación de los niveles intracelulares de colina (Cho) y fosfo-colina (PCho), y se encuentra en equilibrio con otros dos abundantes fosfolípidos de membrana: PS y PE. De este modo, las ceramidas, un subproducto del metabolismo de SM, han sido implicadas en la regulación de la apoptosis, diferenciación y arresto celular¹⁶⁶.

Se han descrito dos genes que codifican las distintas variantes de esta enzima con homología cercanas al 60%¹⁶⁷. Por un lado, *chkα* contiene 13 exones y está situado en el cromosoma 11q13.2, codificando dos isoformas producidas por “splicing alternativo” (*Chok-α1* y *Chok-α2*). Así, el exón II’ se transcribe en la isoforma alfa-2 mientras que está ausente en la isoforma alfa-1. Las proteínas que se traducen poseen 457 y 439 aminoácidos respectivamente. Por otro lado, el gen *chkβ* situado en el cromosoma 22q13.3, codifica la *Chok-β* y posee 11 exones (carece de los exones II’ y II’”), produciendo una proteína de 394 aminoácidos (**Figura 2.16**).

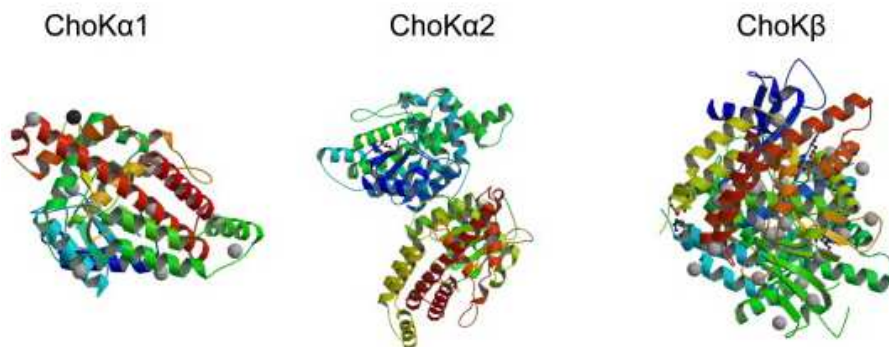


Figura 2.16.- Estructura de las isoformas de ChoK.

Las formas homodiméricas y heterodiméricas de ChoK son las que le confieren su actividad enzimática de fosforilación de la colina (Cho) para formar fosforilcolina (PCho). De esta manera, se ha propuesto que la forma más activa de colina quinasa es la formada por el homodímero α/α , seguida del heterodímero α/β , siendo la menos activa la formada por el homodímero β/β ¹⁶⁷ (**Figura 2.17**).

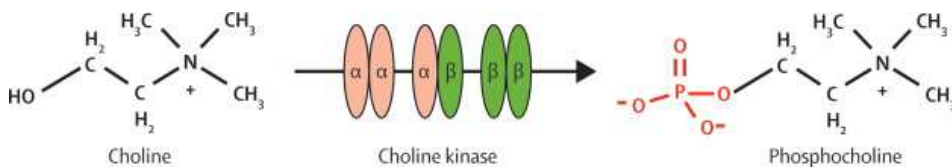


Figura 2.17.- Reacción enzimática e isoformas de ChoK.

2.5.1. Regulación de la actividad ChoK.

Existen evidencias de que la enzima ChoK podría estar regulada por mecanismos alternativos:

1. Regulación transcripcional: En un primer momento se sugirió que la enzima podía estar regulada por la concentración de colina intracelular libre¹⁶⁸, pero esta posibilidad fue cuestionada cuando se describió un sistema de regulación donde la concentración de sustrato no jugaba un papel relevante¹⁵⁵. Alternativamente, se ha sugerido una regulación de la actividad de ChoK a nivel transcripcional^{169, 170}. Revelándose, en ratones, la presencia de dos promotores diferentes, uno proximal con varias secuencias consenso SP-1, y otra distal (no encontrada en chk β) con varios elementos sensibles, algunas de ellos específicos para cada tejido, como las cajas XRE, CCAAT, CREB y AP-1¹⁶⁷. Por otro lado, se ha encontrado que el gen *chk α* es una diana para el factor de hipoxia inducible (HIF-1 α) en un modelo de cáncer de próstata humano¹⁷¹. Finalmente y consistente con la regulación transcripcional de la expresión de ChoK, varios estudios demuestran una regulación mediada por la acción de hormonas y varios factores de crecimiento, como EGF, insulina, prolactina y vasopresina¹⁷²⁻¹⁷⁷. Además, las actividades Chok y EtnK de ChoK α 1 son reguladas por las GTPasas Ras y RhoA a través de efectores muy conocidos^{162, 178, 179}.
2. Regulación post-translacional: ha sido evidenciada una regulación post-translacional de la actividad ChoK de la isoforma α de *Saccharomyces cerevisiae*, a través de la fosforilación mediada por la proteína quinasa A (PKA)^{180, 181} y la proteína quinasa C (PKC)¹⁸².

2.5.2. La ChoK en la transformación celular y la tumorigénesis.

La primera evidencia sugiriendo que ChoK podía jugar un papel crucial en la carcinogénesis humana tuvo su origen al observarse que durante la transformación celular mediada por el oncogén RAS, se producía un incremento de PCho^{183, 184}. Más tarde fue demostrado que el incremento de PCho era producido por un incremento en la actividad de ChoK^{161, 183, 185-187}. Este incremento en la activación está mediada por distintos sistemas de señalización, entre los que destaca *ras*, a través de Ral GDS, PI3K¹⁷⁹ y la quinasa ROCK. Esta última enzima es efectora de RhoA y está implicada en los cambios de citoesqueleto, transformación celular y promoción de las metástasis asociadas a la actividad de esta GTPasa homóloga a ras. Además, la coexpresión de Chok y RhoA induce un importante aumento en la tasa proliferativa del tumor¹⁶². Por otro lado, ha sido demostrado que el incremento en la actividad de ChoK es común en la señalización de fibroblastos de ratón, no sólo mediado por las tres oncoproteínas de RAS^{161, 187, 188}, sino también por otros oncogenes como SRC y MOS¹⁸⁹.

La producción de fosforilcolina (PCho) fue descrita como un proceso esencial en el crecimiento celular inducido por factores de crecimiento, tanto en fibroblastos de ratón como en

diferentes sistemas celulares humanos. En las células humanas, el tratamiento con fármacos específicos frente a ChoK da como resultado un bloqueo en la síntesis de ADN inducida por diferentes factores como EGF, PDGF o HRG¹⁹⁰⁻¹⁹³. Además, se ha podido observar que la inhibición de ChoK afecta a células tumorales mientras que no afecta a las células normales, lo que hace que sea una diana terapéutica bastante selectiva frente al cáncer¹⁰.

Muchos estudios han situado en un punto relevante a la ChoK en el proceso carcinogénico como recurso de PCho. En este sentido, se han encontrado elevados los niveles de actividad de ChoK en tejidos derivados de tumores humanos de colon, ovario, próstata, vejiga, mama y pulmón¹⁹³⁻¹⁹⁸. También se ha observado que la sobreexpresión de la ChoK en fibroblastos de ratón produce un incremento en la síntesis de ADN, en respuesta al factor de crecimiento IGF-I y a la insulina¹⁹⁹, y que la sobreexpresión de la ChoK α humana en células epiteliales primarias mamarias (HMEC) es suficiente para inducir la entrada en fase S¹⁹³. Además, se han encontrado elevados niveles de ARNm de ChoK en respuesta a carcinógenos químicos¹⁶⁹.

Por otro lado, altas concentraciones de PCho constituyen una característica común en líneas celulares derivadas de tumores humanos¹⁸⁵. Se ha observado que la transformación celular da lugar a una alteración en el metabolismo fosfolipídico, lo que conduce a un incremento intracelular de los niveles de PCho^{184, 190, 200}. Diversos estudios realizados mediante resonancia magnética nuclear (RMN), como técnica no invasiva, han permitido detectar un metabolismo fosfolipídico anormal en el cáncer, encontrando elevados niveles de PCho que se asocian con la malignidad celular²⁰¹. También se ha demostrado con esta técnica que diferentes tumores, tanto de ratones como humanos, presentan niveles elevados de PCho en comparación con sus correspondientes tejidos normales^{194, 196}. Además, mediante la tecnología PET (Positron Emission Tomography), se ha observado que el metabolismo de colina (Cho) puede usarse para el diagnóstico del cáncer y, lo que es más importante, para la monitorización de la respuesta a la terapia con fármacos en pacientes de cáncer de mama²⁰². Estos datos permiten usar a la PCho como marcador útil para el diagnóstico y la monitorización de la progresión del cáncer.

2.5.2.1. Chok alfa y beta.

Se ha podido observar que la ChoK-alfa presenta actividades colino quinasa (ChoK) y etanolamino quinasa (EtnK), lo que es suficiente para una correcta homeostasis de PC en las células y que es capaz, por sí sola, de inducir la transformación celular *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo* cuando se encuentra sobreexpresada. La ChoK-beta sólo tiene actividad EtnK, insuficiente para una correcta homeostasis de PC, siendo incapaz, cuando se encuentra sobreexpresada, de inducir transformación y crecimiento tumoral bajo las mismas condiciones que ChoK-alfa¹⁷⁸.

Por otro lado, en líneas celulares derivadas de tumores de pecho, pulmón y ovarios se ha observado, mediante el estudio del ARNm, una sobreexpresión de ChoK α en comparación con sus correspondientes células normales, pero sin ningún cambio en ChoK-beta^{178, 194, 196}.

Además, se ha observado que pacientes con diferente tipo de cáncer, como el cáncer no microcítico de pulmón (NSCLC) y el de vejiga, donde la ChoK-alfa se encuentra sobreexpresada, muestran estadísticamente una peor pronóstico y, por tanto, los tumores son más agresivos^{198, 203}.

La ChoK α se encuentra sobreexpresada en un alto porcentaje de líneas celulares derivadas de tumores humanos, así como en tejidos tumorales de mama, colorectal, pulmón, vejiga, próstata y ovarios. Este tipo de tumores representan más del 70% del total de los casos de cáncer en los países desarrollados. El porcentaje de sobreexpresión o sobreactividad de ChoK α en este tipo de tumores es muy alto, llegando a un 40-60%^{6, 193, 195-197, 203}.

Gracias a la sobreexpresión de ChoK-alfa se ha podido implicar a esta enzima en la regulación del ciclo celular. La sobreexpresión de ChoK-alfa induce la regulación transcripcional de genes involucrados en la proliferación, transformación y apoptosis celular, contribuyendo a la pérdida de respuestas TGF β en células transformadas por este oncogén y ayudando a las células a pasar de la fase G1 a S¹⁶⁰ (Figura 2.18).

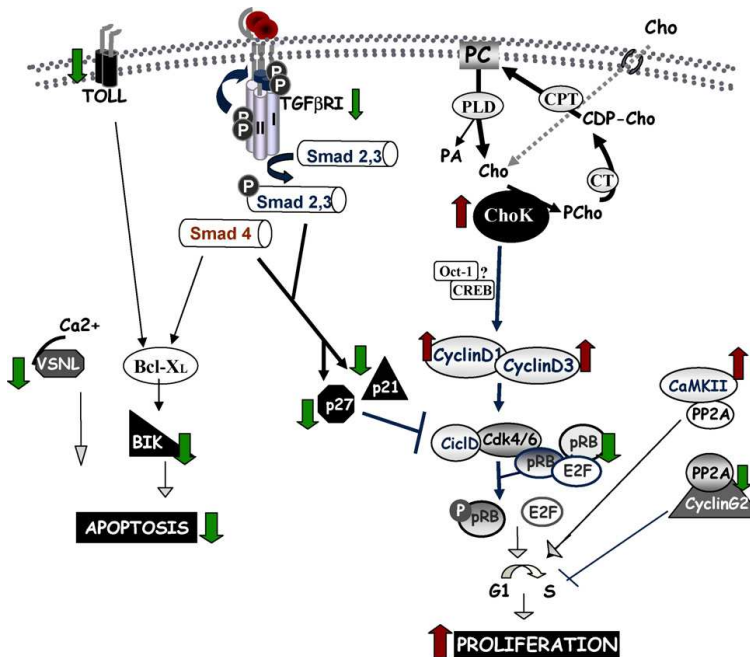


Figura 2.18.- ChoK α y el ciclo celular.

Por tanto, es indudable el importante papel que la isoforma ChoK-alfa juega en el proceso carcinogénico, el cuál se ha visto reforzado por el reciente hallazgo de conexión entre ChoK y uno de las más importantes vías de señalización en la supervivencia celular, la vía de señalización PI3K^{179, 204}.

2.5.2.2. Inhibición de ChoK como estrategia contra el cáncer.

Dada la relevancia de la ChoK en la carcinogénesis humana, la inhibición de ChoK y, más concretamente, de ChoK-alfa constituye una estrategia antitumoral eficiente. Además de lo anteriormente citado, mediante el uso de fármacos selectivos frente a ChoK se han podido observar los siguientes datos:

- Producen inhibición frente a líneas celulares transformadas por los tres oncogenes de Ras: H-ras, K-ras, N-ras¹⁶¹.
- Dicha inhibición de ChoK da lugar a una actividad antiproliferativa *in vitro* y antitumoral *in vivo*^{155, 189}.
- Poseen una potente acción antitumoral *in vivo* contra modelos de tumores humanos de colon, mama y vejiga^{193, 203}.
- La inhibición de ChoK afecta a células transformadas mientras que no afecta a células normales¹⁰.
- La inhibición de ChoK da lugar a una alteración del metabolismo fosfolipídico en células transformadas, produciendo un incremento de ceramidas, lo que conlleva a la apoptosis de las células transformadas y a un arresto reversible en G0/G1 de las células normales^{160, 205}.
- Los inhibidores de ChoK actúan específicamente sobre la ChoK-alfa, reduciendo los niveles de producción de *de novo* PCho, mientras que no afectan a la ChoK-beta, a otras enzimas implicadas en el metabolismo relacionado con PC ni a otras vías de señalización como PI3K o ERKs¹⁰.

Además, la deplección de la ChoK α mediante shRNA induce apoptosis en varias líneas celulares derivadas de tumores de carcinomas de mama, vejiga, pulmón y cervix, mientras que la viabilidad de las células normales primarias permanece inalterada²⁰⁶. Este dato ha confirmado lo anteriormente observado para los inhibidores de ChoK.

Por tanto, todo lo anterior confirma la importancia de la enzima colino quinasa (ChoK) en el proceso carcinogénico, así como que su inhibición selectiva supone una estrategia bastante efectiva contra el cáncer, tanto el inducido por oncogenes como por los carcinógenos químicos.

Con este fin, a lo largo de los últimos veinte años han sido sintetizados numerosos compuestos inhibidores de ChoK.

2.6. Moléculas inhibidoras de colina quinasa (ChoK).

Debido al gran interés que ha suscitado la enzima colino quinasa (ChoK) como diana biológica en las últimas décadas, su inhibición selectiva representa una estrategia en el diseño de nuevos compuestos anticancerosos. Por ello, en nuestro grupo de investigación se ha venido desarrollando un riguroso proceso de farmacomodulación y diseño tomando como modelo el primer inhibidor de colino quinasa conocido: el hemicolinio-3 (HC-3).

2.6.1. HC-3: precursor de las moléculas inhibidoras de ChoK.

El Hemicolinio-3 (HC-3) es un inhibidor competitivo de la ChoK debido a su homología estructural con la colina. Fue descrito como un inhibidor de ChoK con una IC_{50} de $57\mu M$ ²⁰⁷. Este compuesto era el mejor inhibidor de ChoK conocido, con la ventaja de que no afectaba a la enzima etanolamina.

El HC-3 es una molécula simétrica con dos regiones claramente diferenciadas: una formada por el bifenilo, de naturaleza lipofílica, y otra de tipo polar formada por el ciclo de oxazonio con un nitrógeno cuaternizado (cadenas que se asemejan a la colina). Este compuesto se presenta en equilibrio tautomérico entre la forma ciclohemicetálica y la forma abierta, desplazándose dicho equilibrio hacia la formación del ciclohemicetal en solución²⁰⁸ (Figura 2.19).

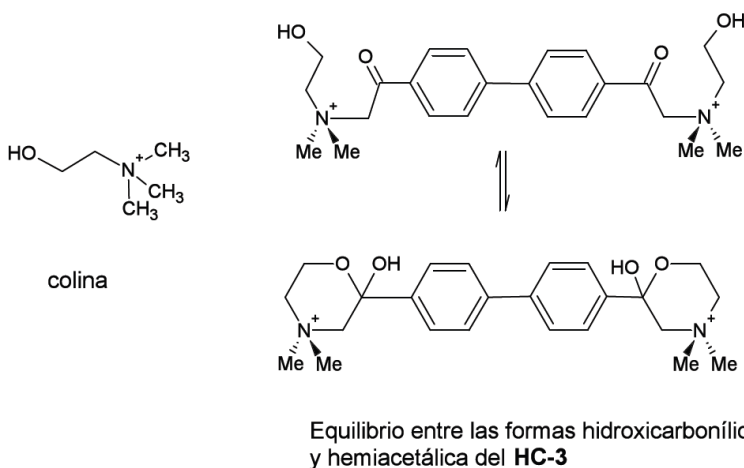


Figura 2.19.- Estructura del hemicolinio-3 en equilibrio tautomérico.

Sin embargo, el HC-3 tiene un potente efecto inhibitorio sobre un transportador de colina de alta afinidad, con efectos tóxicos drásticos en las terminales nerviosas colinérgicas y, además, también es un sustrato competitivo para la acetilcoenzima A y un inhibidor débil de acetilcolinesterasa y colinesterasas plasmáticas²⁰⁷. Así, debido a su papel como potente paralizador respiratorio fue excluido para su uso en clínica. Además, los estudios *in vitro*

usando líneas celulares inmortalizadas muestran que el HC-3 es un débil inhibidor de ChoK ($IC_{50} = 600\mu M$) en células de mamífero intactas. No obstante, a pesar de sus efectos negativos, el HC-3 se ha usado como modelo estructural para el desarrollo de inhibidores de ChoK más activos, más específicos y menos tóxicos¹⁸⁹.

2.6.2. Nueva clase de fármacos inhibidores de ChoK.

El desarrollo de inhibidores con actividad antiproliferativa comenzó a partir del diseño y síntesis de análogos del HC-3. La síntesis de diversos inhibidores de ChoK estuvo basada en la modificación estructural del HC-3 al objeto de incrementar el efecto inhibitor de esta molécula y evitar los efectos tóxicos de la misma. Este trabajo ha dado lugar al desarrollo de cinco Tesis Doctorales²⁰⁹⁻²¹³ donde se muestran distintos tipos de estructuras que son capaces de inhibir tanto la enzima colina quinasa como la proliferación celular.

Todos los compuestos sintetizados por nuestro grupo de investigación en estos años pueden ser reagrupados en dos grupos principales (**Figura 2.20**):

- Compuestos bispiridinio, trispiridinio y bisquinolinio (**1 y 2**).
- Compuestos ciclofánicos bispiridínicos (**3**), considerados como los análogos rígidos de los compuestos biscatiónicos precedentes.

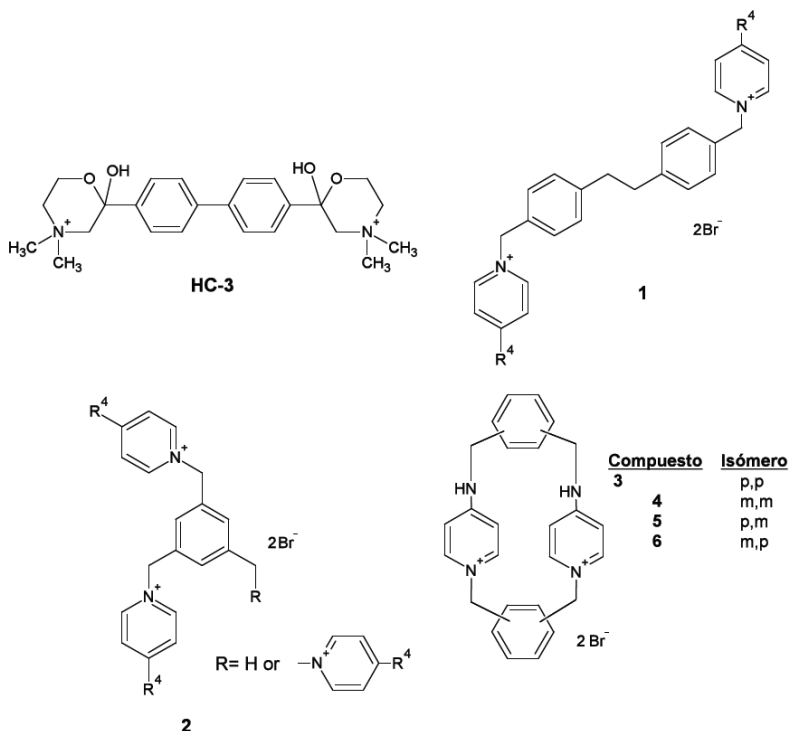


Figura 2.20.- Esquema de los compuestos sintetizados por nuestro grupo de investigación.

Se correlacionó el efecto antiproliferativo de compuestos catiónicos biscuaternarios simétricos con su capacidad para disminuir la producción de PCho a través de la inhibición de ChoK en células¹⁸⁹. Se han ensayado numerosos derivados de la estructura **1**, que contiene dos cabezas catiónicas con estructura de piridinio 4-sustituido, como inhibidores de ChoK aislada. El grupo R₄ es una amina terciaria cuya contribución es crucial para la actividad y se ha sugerido que su influencia es de tipo electrónico²¹⁴, ayudando a la deslocalización de la carga positiva, como lo demuestra la relación entre la actividad antiproliferativa y la energía del orbital LUMO de compuestos modelo²¹⁵.

La síntesis y ensayo posterior de otros compuestos bis-catiónicos con diferentes cabezas catiónicas, como quinolinio, isoquinolinio, etc., y distintos espaciadores entre los nitrógenos cargados, permitieron confirmar la importancia de las características electrónicas del sustituyente en la posición 4 del heterociclo y el carácter lipofílico de la molécula en su conjunto, como factores que afectan significativamente la actividad antitumoral de estos compuestos²¹⁶.

Se ha estudiado también la influencia de una tercera carga positiva sobre la inhibición de la ChoK y la actividad antiproliferativa, en compuestos de estructura representada por la fórmula **2**. Estos compuestos trispiridínicos son más potentes que los bispiridínicos como inhibidores de la ChoK humana, aunque su actividad antiproliferativa es inferior, debido a una pérdida importante de lipofilia en las moléculas triscatiónicas²¹⁷, lo que les impide atravesar la membrana celular.

Al objeto de estudiar cómo afecta el aumento de la rigidez de los compuestos a la actividad biológica de los mismos, se desarrollaron compuestos de estructura ciclofánica (compuestos **3-6**), probándose su actividad antiproliferativa e inhibitoria sobre ChoK²¹⁸. Entre ellos, el isómero **6** era el más potente inhibidor de ChoK (IC₅₀ = 0.3 μM) publicado hasta la fecha y ha demostrado tener una gran actividad antirroliferativa (IC₅₀ = 28.8 μM).

Basados en la actividad de los compuestos **3-6** se consideró interesante el aumentar aún más la rigidez de la molécula insertando un tercer puente entre los anillos bencénicos, obteniendo los compuestos de estructura biciclofánica **7-9**²¹⁹ (**Figura 7**).

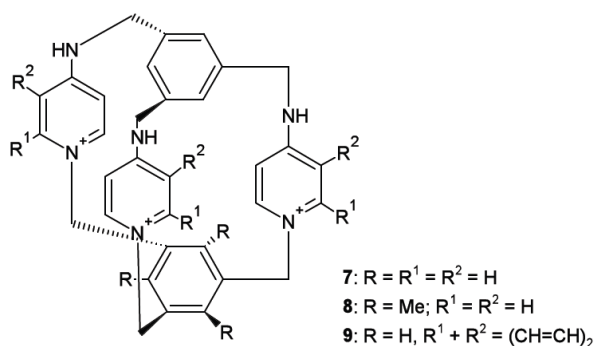


Figura 2.21.- Compuestos con estructura biciclofánica.

Estos compuestos, además de poseer una estructura más rígida, están caracterizados por la presencia de un tercer centro catiónico. Estas moléculas presentaron una actividad muy baja, posiblemente debido a la presencia de esta tercera carga positiva, que las convierte en compuestos demasiado polares para poder atravesar la membrana celular.

Por otra parte, con el objeto de ver la influencia del tamaño del espaciador, se sintetizaron nuevas estructuras en las que el espaciador situado entre los dos centros catiónicos se acorta de acuerdo al esquema mostrado en la **Figura 2.22**. El resultado más interesante fue que la actividad inhibitoria de ChoK por parte de estas moléculas se incrementa al crecer la distancia entre las cadenas catiónicas, siendo el óptimo el correspondiente a la distancia del espaciador 3,3-bifenilo, disminuyendo si dicha distancia excede²²⁰.

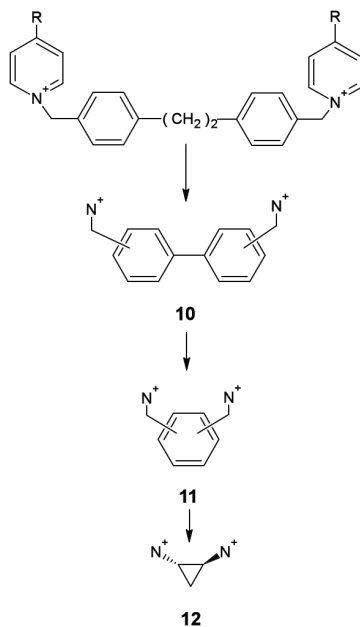


Figura 2.22.- Compuestos sintetizados para ver la influencia del espaciador.

Del mismo modo, con la intención de paliar el problema de la lipofilia de las estructuras, se modificó la naturaleza de las cabezas catiónicas, sustituyendo el resto de piridina por quinolina, obteniéndose compuestos con la estructura **13**^{220, 221} (**Figura 2.23**).

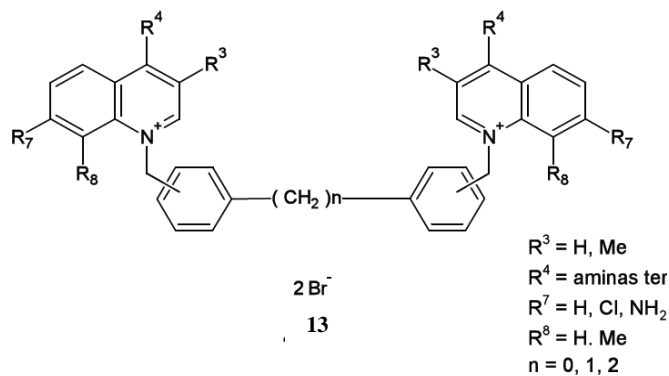


Figura 2.23.- Compuestos bisquinolinicos.

Entre estos compuestos se han encontrado los mejores inhibidores de la actividad ChoK, presentando además, en muchos casos, una muy buena actividad antiproliferativa. El agente de esta serie que presenta la mayor actividad antiproliferativa se muestra en la **Figura 2.24**, con una IC₅₀ = 0.20 μM²²¹.

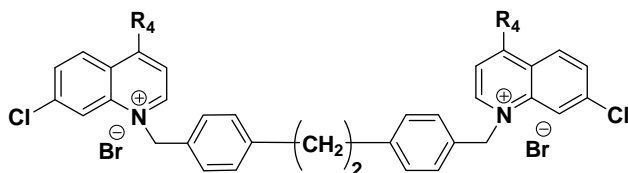


Figura 2.24. Derivado de bisquinolinio con actividad antiproliferativa.

Algunos de estos compuestos han sido ensayados *in vivo* al objeto de establecer su toxicidad en ratones, encontrándose que los valores de DL₅₀ son muy superiores a los valores de CI₅₀ para la actividad antiproliferativa²²².

2.6.2.1. Estructura cristalina de ChoK: Cambio de estrategia.

Como se ha comentado en los párrafos anteriores, las moléculas inhibitoras de ChoK sintetizadas hasta la fecha son estructuras bispiridinio, bisquinolinio, trispiridinio, ciclofanos y biciclofanos. La mayoría conservan la estructura biscatiónica del hemicolinio y responden a una estructura simétrica. De esta manera se han obtenido los más potentes y selectivos inhibidores de ChoK y gracias a la síntesis de estos compuestos se han podido recavar conclusiones importantes sobre las características necesarias tanto para la inhibición de la enzima como para la actividad antiproliferativa. Sin embargo, cuando se sintetizaron estas moléculas aún no se conocía la estructura cristalina de la enzima ni los residuos de unión a la misma.

En el año 2003, Peisach y col.²²³ determinaron la primera estructura 3D de ChoK, la cuál fue aislada, purificada y cristalizada de *Caenorhabditis elegans* (CKA2), encontrándose una estructura homodimérica con cada monómero organizado en un plegamiento típico de las proteínas quinasas de eucariotas, con un dominio N-terminal y otro C-terminal. (**Figura 2.25**). La comparación con otras proteínas quinasas llevo a los autores a proponer la disposición de los sitios de unión del ATP y la Cho a la enzima.

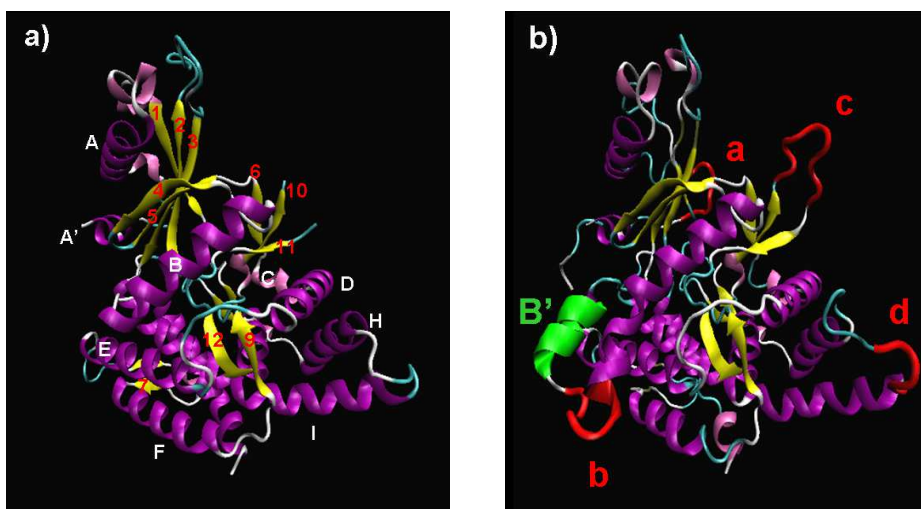


Figura 2.25.- a) Estructura cristalina de ChoK de *C.elegans* (Código PDB: 1NW1); **b)** Modelo de homología de ChoK humana.

Posteriormente, en el año 2004, se describían estudios de mutagénesis de dicha enzima, en los que se determinaba la influencia de la mutación de diversos residuos sobre la actividad catalítica de la misma, habiéndose propuesto definitivamente los sitios de unión del ATP y la Colina²²⁴.

Basándose en estos antecedentes, en nuestro grupo de investigación²²⁵ se desarrolló un modelo de homología de ChoK α humana (**Figura 2.25**). Los estudios de dinámica molecular sobre dicho modelo justificaban los resultados de mutagénesis observados y confirmaban los hipotéticos sitios de unión del ATP y la Colina.

En el 2006, algo más tarde de la publicación de nuestro modelo de homología de ChoK α , Malito *et al.* consiguieron elucidar la estructura tridimensional de la isoforma ChoK α 2 humana²²⁶. Dichos estudios mostraban una estructura cristalina de la proteína sola (forma apo; Código PDB: 2CKO) y otras dos conteniendo, cada una de ellas, ADP (Código PDB: 2CKP) y PCho (Código PDB: 2CKQ) (los productos de catálisis enzimática), respectivamente (**Figura 2.26**). Estas estructuras confirmaron definitivamente los sitios de unión de ambos sustratos y abrieron las puertas a un diseño racional de nuevos inhibidores más potentes y selectivos.

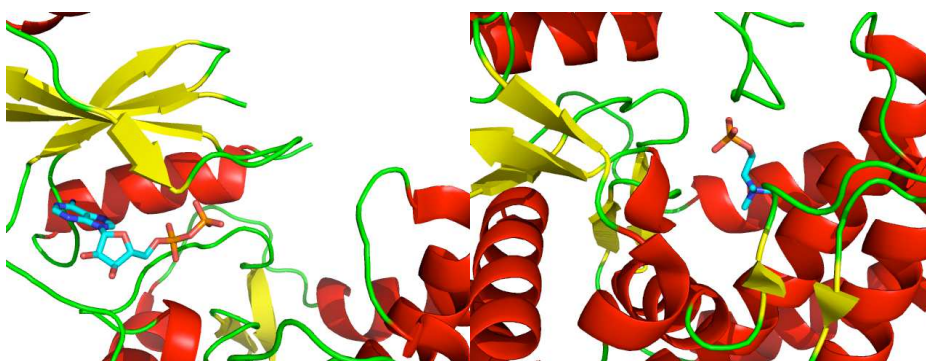


Figura 2.26.- Izquierda: estructura cristalina de ChoK conteniendo ADP (Código PDB: 2CKP). Derecha: Estructura cristalina de ChoK conteniendo PCho (Código PDB: 2CKQ).

Mediante la superposición de los dominios N-terminales de las tres estructuras cristalinas se reveló que la rotación del loop de unión del ATP es independiente de la rotación del dominio N-terminal. Estos cambios conformacionales indican que la unión de la PCho dentro de la ChoK α 2 induce una rotación significativa en el dominio N-terminal que da lugar al cierre de los sitios de unión de la Cho y el ATP.

Recientemente, Hong *et al.* han publicado la estructura cristalina 3D de las isoformas ChoK α 1 (Código PDB: 3G15) y ChoK β (Código PDB: 3FEG) complejadas con HC-3, el primer inhibidor conocido de la enzima²²⁷. En la estructura cristalina de ChoK α 1 están presentes tanto el HC-3 como el ADP, mientras que en la estructura de ChoK β sólo está presente el HC-3 en la forma fosforilada (PHC-3) (**Figura 2.27**).

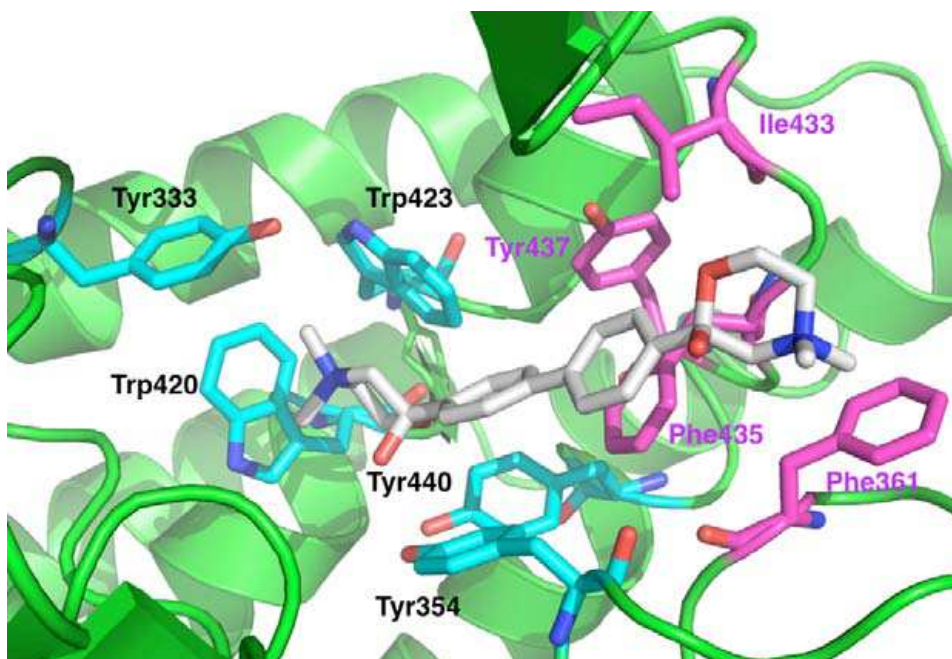


Figura 2.27.- Detalle de la inserción del HC-3 en el bolsillo de unión de la Cho de la isoforma ChoK α 1.

Anteriores a esta última publicación, los estudios de Docking realizados sobre el modelo de homología por nuestro grupo de investigación han permitido proponer, aunque con algunas limitaciones, un mecanismo de inhibición por parte de los compuestos simétricos biscatiónicos. Según este modelo, dichas moléculas podrían unirse simultáneamente a los sitios de unión del ATP y la Colina, de tal modo que, una de las cabezas catiónicas de los inhibidores podría insertarse en el sitio de unión de la Cho, donde se estabilizaría por interacciones π -catión con los residuos que forman el bolsillo hidrofóbico, mientras que la otra cabeza catiónica podría insertarse en la zona de unión de la adenina en el bolsillo del ATP.

Sin embargo, el sitio de unión del ATP no posee aminoácidos que estabilizen de forma eficaz la cabeza catiónica, pues, la estabilización del ATP se produce fundamentalmente a través de enlaces de hidrógeno.

De estos resultados se consideró interesante preparar inhibidores monocatiónicos no simétricos que pudieran insertarse simultáneamente en ambos sitios de unión.

2.6.3. Inhibidores de ChoK con actividad antimalárica.

La malaria es una de las enfermedades con mayor amenaza a nivel global, que actualmente causa la muerte de más de 2 millones de personas al año. La malaria o paludismo es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium*. La enfermedad puede ser causada por una o varias de la especies de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* o *P. knowlesi*. Los vectores de esta enfermedad son diversas especies del mosquito del género *Anopheles*. El ciclo de vida (**Figura 2.28**) comprende una reproducción asexual (en el hombre) y una reproducción sexual (en el mosquito).

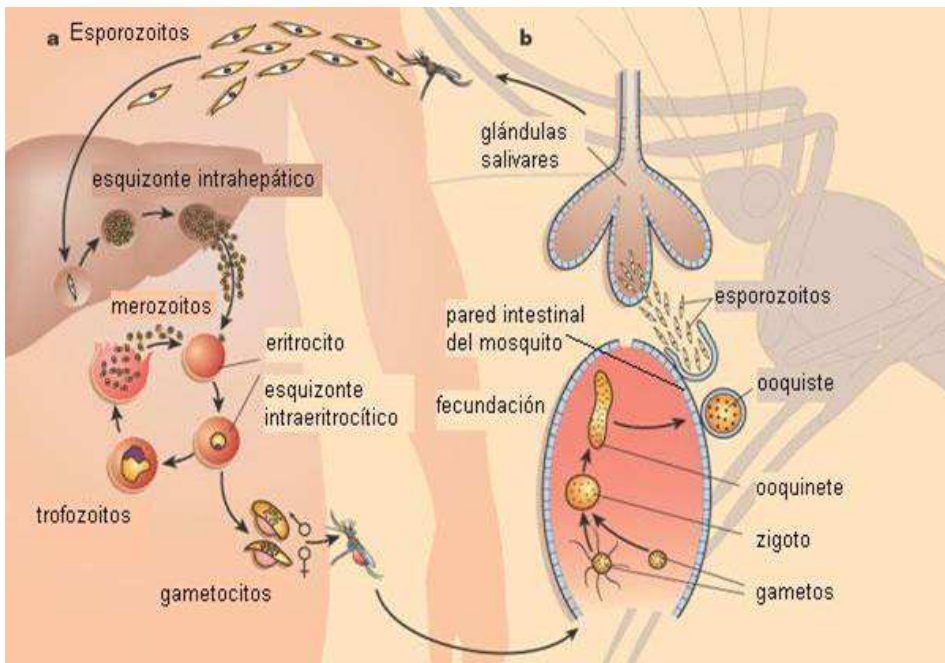


Figura 2.28.- Ciclo de vida del género *Plasmodium*. **a)** En el hombre (reproducción asexual) **b)** En el mosquito (reproducción sexual).

El tratamiento de la malaria se está volviendo extremadamente difícil debido a la aparición de resistencia a fármacos por parte de los parásitos, a la ausencia de una vacuna efectiva y a la propagación de vectores resistentes a insecticidas. El objetivo principal de los investigadores se centra en el desarrollo de nuevas estrategias de acción antimalárica utilizando como diana las vías metabólicas intracelulares del parásito que llevan a la formación de componentes estructurales de vital importancia para su desarrollo²²⁸. De hecho se han observado altos niveles de lípidos en los eritrocitos infectados por el plasmodio con respecto a los eritrocitos no infectados.

De este modo, se han podido observar altos niveles de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) en las células infectadas de *Plasmodium*. Datos genéticos y farmacológicos confirman que las vías de biosíntesis *de novo* de ambos fosfolípidos son esenciales para la supervivencia del parásito²²⁹.

La fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido de mayor abundancia en el plasmodio, sintetizado a través de dos vías principales: la vía Kennedy o CDP-colina y la vía de metilación descarboxilación-fosfoetanolamina a serina. Esta última vía no ha sido caracterizada en el plasmodio debido a la ausencia de fosfatidiletanolamina metiltransferasa (vía Bremer) (**Figura 2.29**).

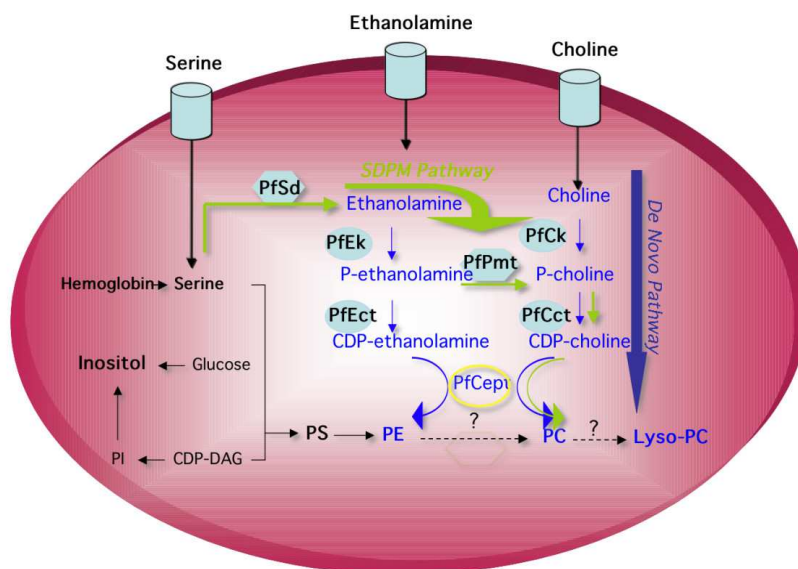


Figura 2.29.- Síntesis *de novo* de PC.

La vía intracelular de Kennedy es la vía de síntesis *de novo* de PC en el plasmodio y ha sido propuesta como diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos antimaláricos, al objeto de reducir y combatir la farmacoresistencia. En concreto, la enzima ChoK ha sido propuesta como diana terapéutica ya que interviene en la vía Kennedy del plasmodio con una probable actividad reguladora en la biosíntesis de PC, aunque su función no ha sido todavía determinada con certeza. Controla, entre otros, el transporte de colina, nutriente de vital importancia para el desarrollo del plasmodio.

Recientemente ha sido clonada, hiperexpresada y caracterizada a nivel molecular una colina quinasa putativa del parásito humano *Plasmodium falciparum* (PfCK). De esta forma se ha demostrado que esta enzima recombinante presenta actividad colina quinasa, se localiza a nivel citosólico y cataliza la formación de fosforilcolina en presencia de colina, usando ATP y Mg^{2+} como cofactores.

El mapa y la secuencia completa del genoma del plasmodio han permitido el aislamiento de un gen putativo de la colina quinasa en el cromosoma 14, formado por un exón aislado sin intrones que interrumpen la secuencia. Este gen codifica una proteína de 440aa con un peso molecular de 52,2 KDa. El alineamiento de las secuencias proteicas de PfCK con las de ChoK presente en los mamíferos, plantas y levaduras revela un número de residuos altamente

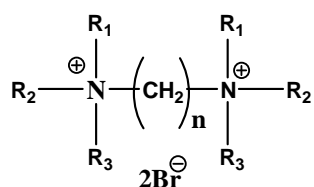
conservados en el interior de la secuencia aislada conteniendo dos dominios notables. El primero es similar al residuo hidrofóbico de la fosfotransferasa que se encuentra en muchas proteínas quinasa. El segundo dominio, localizado en la proximidad del dominio de la fosfotransferasa de Brenner, está altamente conservado, resulta específico para la familia de la colina quinasa y es posiblemente importante para la unión de la colina²³⁰.

El gen PfCK, a diferencia de la colina quinasa humana, existe como una sola copia en el genoma del plasmodio y, por tanto, da lugar a la ausencia de las isoformas presentes en la ChoK²²⁹.

Por todo lo anteriormente citado, la biosíntesis de fosfolípidos en el plasmodio se ha convertido en una potencial diana antimalárica.

De esta forma, sales de amonio biscuaternarias, análogos estructurales del precursor fosfolípido colina, han mostrado tener como diana la biogénesis de la membrana en *Plasmodium falciparum* mediante el bloqueo de la biosíntesis de PC. La primera generación de estos compuestos consistió en sales de amonio mono- y biscuaternarias^{139, 140}, y su compuesto líder G25 (**Figura 2.30**) que inhibía de forma competitiva el crecimiento *in vitro* de cepas de *P.falciparum* fármaco-resistentes¹⁴¹, y abolían la infección de Plasmodium sin recidiva en modelos de roedores y primates a dosis muy bajas^{231, 232}.

G25



$$\text{R}_1 = \text{CH}_3$$

$$\text{R}_2 = -(\text{CH}_2)_4 - \text{R}_3$$

$$n = 16$$

Figura 2.30.- Compuesto G25.

Por tanto, diversos compuestos mono- y biscuaternarios con cadenas alifáticas, son en grado de inhibir el crecimiento de *Plasmodium in vitro* e *in vivo*. Y aunque aún no está del todo claro el mecanismo de acción de los mismos, recientes estudios han sugerido la capacidad, por parte de éstas moléculas, de atacar a nivel de los pasajes enzimáticos de la vía de Kennedy²³⁰.

BIBLIOGRAFÍA

1. Muñoz, A. Cáncer. Genes y Nuevas terapias. Eds. Feduchi, E.; Irunzun, A.: Hélice: Madrid, **1997**.
2. Gibbs, Jackson B.; Mechanism-Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research. *Science*, **2000**, 287, 1969.
3. Campos, J. *et al.*; Choline kinase inhibitory effect and antiproliferative activity of new 1,1',1''-(benzene-1,3,5-trimethylene)tris{4-[(disubstituted)amino]pyridinium} tribromides. *Chem. Eur. J.*, **2003**, Vol. 38, 109-116.
4. Campos Joaquín M. *et al.*; QSAR-derived choline kinase inhibitors: How rational can antiproliferative drug design be? *Curr. Med. Chem.*, **2003**, 10, 1095-1112.
5. C. J. Marshall. "Ras effectors". *Curr. Opin. Cell Biol.*, **1996**, 8, 197-204.
6. Ramírez de Molina, A. *et al.*; 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*, **2002c**, 296, 580-583.
7. Ramírez de Molina *et al.*; Choline Kinase Activation Is a Critical Requirement for the Proliferation of Primary Human Mammary Epithelial Cells and Breast Tumor Progression. *Cancer Research*, **2004**, 64, 6732-6739.
8. Barbacid, M. ras oncogenes: their role in neoplasia. *Eur. J. Clin. Invest.*, **1990**, 20, 225-235.
9. Yuliya Pilayeva-Gupta *et al.*; Ras oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature reviews Cancer*, **2011**, 11, 761-774.
10. Lacal, J. C. *et al.*; Inhibition of Choline kinase as a specific cytotoxic strategy in oncogene-transformed cells. *Oncogene*, **2003**, 22, 8803-8812.
11. Campos, Joaquín M. *et al.* Symmetrical Bis-Quinolinium Compounds: New Human Choline Kinase Inhibitor with Antiproliferative Activity against the HT-29 Cells Line. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 3354-3363.

12. Elsayed, Y. A.; Sausville, E. A. Selected novel anticancer treatments targeting cell signalling proteins. *Oncologist*, **2001**, 6, 517-537.
13. Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. "*Molecular Cell Biology*", *WH Freeman and Company*, **2000**.
14. Graña X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin-dependent kinase (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene*, **1995**, 11(2), 211-9.
15. Alberts et al. "*Biología Molecular de la célula*" *Barcelona: Omega*, (**2004**). ISBN 54-282-1351-8.
16. Nelson & Cox. "*Lehninger, Principios de Bioquímica*" 3a ed. *Ed Omega*, **2000**.
17. C. S. Hill and R. Treisman. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*, **1995**, 80, 199-211.
18. S. A. Aaronson. "Growth factors and cancer". *Science*, **1991**, 254, 1146-1153.
19. Kumar, MBBS, MD, FRCPath, V.; Abul K. Abbas, MBBS, Nelson Fausto, MD and Jon Aster, MD. "Ch3-Tissue Renewal, Regeneration and Repair". En Saunders (Elsevier). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease* (8th edicion).
20. M.Pfahl. "Nuclear receptor/ AP-1 interaction". *Endo. Rev.*, **1993**, 14, 651-658.
21. R. Jonhson, B. Spiegelman, D. Hanahan and R. Widsom. "Cellular transformation and malignancy induced by Ras require c-jun". *Mol. Cell. Biol.*, **1996**, 16, 4504-4511.
22. M. Karin. "The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated proteina kinases". *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270, 16483-16486.
23. Kerkhoff, E.; Rapp, U. R. Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene*, **1998**, 17, 1457.
24. Campbell, S. L., Khosravi-Far, R., Rossman, K. L., Clark, G. J., Der, C. J. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* **1998**, 17 (11 Reviews), 1395-1413.
25. Macara, I. G., Lounsbury, K. M., Richards, S. A., McKiernan, C., Bar-Sagi, D. The ras superfamily of GTPases. *FASEB J.* **1996**, 10, 625-630.

26. S. Aznar, J.C. Lacal. Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett.*, **2001**, 165, 1-10.
27. A. Ramírez-De Molina, A. Rodríguez-González, J. C. Lacal. Targeting new anticancer drugs within signalling pathways regulated by Ras GTPase superfamily. *Int. J. Oncol.*, **2001**, 19, 5-17.
28. Alex A. Adjei. "Ras Signalling Pathway Proteins as Therapeutic Target". *Current Pharmaceutical Design*, **2001**, 7, 1581-1594.
29. J. L. Bos. Ras oncogenes and human tumors. *Semin. Cancer Biol.*, **1992**, 3, 241-247.
30. Wittinghofer, A.; Waldmann, H. Ras as a drug target. *Angew. Chem. Int.*, **2000**, 39, 4192-4214.
31. D. R. Lowy and B. M. Willumsen. " Function and regulation of ras". *Annu. Rev. Biochem.*, **1993**, 62, 851-891.
32. Clarke, S. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu. Rev. Biochem.*, **1992**, 61, 355-386.
33. Larry A. Feig and Rachel J. Buchsbaum. Cell Signaling: Life or Death Decisions of Ras Proteins. *Current Biology*, **2002**, 12, 259-261.
34. Ellis, C. A.; Clark, G. The importance of being K-Ras. *Cell. Sign.*, **2000**, 12, 425-434.
35. Khosravi-Far, R.; Campbell, S.; Rossman, K. L. et al. Increasing complexity of Ras signal transduction: involvement of Rho family proteins. *Adv. Cancer Res.*, **1998**, 72, 57-107.
36. Rodríguez-Viciano, P.; Warne, P.; Dhand, R.; Vanhaesebroeck, B.; Gout, I.; Fry, M. J.; Waterfield, M. D.; Downward, J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, **1994**, 370, 527-532.
37. Burgering, B. M. T.; Coffey, P. J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, **1995**, 376, 599- 602.

38. Franke, T. F.; Yang, S. I.; Chan, T. O.; Datta, K.; Kazlauskas, A.; Morrison, D. K.; Kaplan, D.; Tsichlis, P. N. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, **1995**, 81, 727-736.
39. Datta, S. R.; Dudek, H.; Tao, X.; Masters, S.; Fu, H.; Gotoh, Y.; Greenberg, M. E. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell*, **1997**, 91, 231-241.
40. Cardone, M. H.; Roy, N.; Stennicke, H. R.; Salvesen, G.; Franke, T. F.; Stanbridge, E.; Frisch, S.; Reed, J. C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, **1998**, 282, 1318-1321.
41. Raught, B.; Gingras, A. C. eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **1999**, 31, 43-57.
42. Gingras, A. C.; Gygi, S. P.; Raught, B.; Polakiewicz, R. D.; Abraham, R. T.; Hoekstra, M. F.; Aebersold, R.; Sonenberg, N. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.*, **1999**, 13, 1422-1437.
43. Hall, A.; Rho, G. T. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **1998**, 279, 509-514.
44. RodriguezViciano, P.; Warne, P. H.; Khawaja, A.; Marte, B. M.; Pappin, D.; Das, P.; Waterfield, M. D.; Ridley, A.; Downward, J. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell*, **1997**, 89, 457-467.
45. Urano, T.; Emkey, R.; Feig, L. A. Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO J.*, **1996**, 15, 810-816.
46. White, M. A.; Vale, T.; Camonis, J. H.; Schaefer, E.; Wigler, M. H. A Role for RalGDS and a Novel Ras Effector in the Ras-mediated Inhibition of Skeletal Myogenesis. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 16439-16442.
47. Kishida, S.; Koyama, S.; Matsubara, K.; Kishida, M.; Matsuura, Y.; Kikuchi, A. Colocalization of Ras and Ral on the membrane is required for Ras-dependent Ral activation through Ral GDP dissociation stimulator. *Oncogene*, **1997**, 15, 2899-2907.

48. Wolthuis, R. M. F.; Zwartkuis, F.; Moen, T. C.; Bos, J. L. Ras-dependent activation of the small GTPase Ral. *Curr. Biol.*, **1998**, *8*, 471-474.
49. Albright, C. F.; Giddings, B. W.; Liu, J.; Vito, M.; Weinberg, R. A. Characterization of a guanine nucleotide dissociation stimulator for a ras-related GTPase. *EMBO J.*, **1993**, *12*, 339-347.
50. Kikuchi, A.; Demo, S. D.; Ye, Z. H.; Chen, Y. W.; Williams, L. ralGDS family members interact with the effector loop of ras p21. *Mol. Cell. Biol.*, **1994**, *14*, 7483-7491.
51. Wolthuis, R. M.; Bauer, B.; van't Veer, L. J.; de Vries-Smits, A. M.; Cool, R.; Spaargaren, M.; Wittinghofer, A.; Burgering, B. M. T.; Bos, J. L. RalGDS-like factor (Rlf) is a novel Ras and Rap 1A-associating protein. *Oncogene*, **1996**, *13*, 353-362.
52. D'Adamo, D. R.; Novick, S.; Khan, J. M.; Leonardi, P.; Pellicer, A. rsc: a novel oncogene with structural and functional homology with the gene family of exchange factors for Ral. *Oncogene*, **1997**, *14*, 1295-1305.
53. Malumbres, M.; Pellicer, A. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci.*, **1998**, *3*, 887-912.
54. Van Aelst, L.; D'Souza-Shorey, C. RhoGTPases and signalling networks. *Genes Dev.*, **1997**, *11*, 2295-2322.
55. Ramírez de Molina, A.; Rodríguez-González, A.; Lacal, J. C. From Ras signalling to Chok inhibitors: a further advance in anticancer drug design. *Cancer Letters*, **2004**, *206*, 137-148.
56. Karnoub, A. E.; Weinberg, R. A. Ras oncogenes: split personalities. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2008**, *9*, 517-531.
57. McCarthy, S. A.; Samuels, M. L.; Pritchard, C. A.; Abraham, J. A.; McMahon, M. Rapid induction of heparin-binding epidermal growth factor/diphtheria toxin receptor expression by Raf and Ras oncogenes. *Genes Dev.*, **1995**, *9*, 1953-1964.
58. Gangarosa, L. M. *et al.* A raf-independent epidermal growth factor receptor autocrine loop is necessary for Ras transformation of rat intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 18926-18931.

59. Schulze, A.; Lehmann, K.; Jefferies, H. B.; McMahon, M.; Downward, J. Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes Dev.*, **2001**, *15*, 981-994.
60. Filmus, J.; Zhao, J.; Buick, R. N. Overexpression of H-ras oncogene induces resistance to the growth inhibitory action of transforming growth factor β -1 (TGF- β 1) and alters the number and type of TGF- β 1 receptors in rat intestinal epithelial cell clones. *Oncogene*, **1992**, *7*, 521-526.
61. Zhao, J. and Buick, R. N. Regulation of transforming growth factor β receptors in H-ras oncogene transformed rat intestinal epithelial cells. *Cancer Res.*, **1995**, *55*, 6181-6188.
62. Massague, J. How cells read TGF- β signals. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, **2000**, *1*, 169-178.
63. Kretzschmar, M.; Doody, J.; Timokhina, I.; Massague, J. A mechanism of repression of TGF β /Smad signalling by oncogenic ras. *Genes Dev.*, **1999**, *13*, 804-816.
64. Kfir, S. *et al.* Pathway and expression level-dependent effects of oncogenic N-Ras: p27 (Kip 1) mislocalization by the ral-GEF pathway and Erk-mediated interference with Smad signalling. *Mol. Cell Biol.*, **2005**, *25*, 8239-8250.
65. Daly, A. C.; Vizan, P.; Hill, S. C. Smad3 protein levels are modulated by Ras activity and during the cell cycle to dictate transforming growth factor- β responses. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 6489-6497.
66. Filmus, J. *et al.* Induction of cyclin D 1 overexpression by activated ras. *Oncogene*, **1994**, *9*, 3627-3633.
67. Albanese, C. *et al.* Transforming p21 ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 23589-23597.
68. Winston, J. T.; Coats, S. R.; Wang, Y. Z.; Piedger, W. J. Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. *Oncogene*, **1996**, *12*, 127-134.
69. Liu, J. J. *et al.* Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell Biol.*, **1995**, *15*, 3654-3663.

70. Gille, H. and Downward, J. Multiple ras effector pathways contribute to G(1) cell cycle progression. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 22033-22040.
71. Westwick, J. K. *et al.* Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple PAK-independent pathways. *Mol. Cell Biol.*, **1997**, 17, 1324-1335.
72. Takawa, N., Fukui, Y. & Takawa, Y. Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70(S6K)-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell Biol.*, **1999**, 19, 1346-1358.
73. Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J. & Wolfman, A. Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science*, **1993**, 260, 1658-1661.
74. Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F. & Sherr, C. J. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.*, **1998**, 12, 3499-3511.
75. Rivard, N., Boucher, M. J., Asselin, C. & L'Allemain, G. MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S. phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **1999**, 277, C652-C664.
76. Sa, G. & Stacey, D. W. P27 expression is regulated by separate signaling pathways, downstream of Ras, in each cell cycle phase. *Exp. Cell Res.*, **2004**, 300, 427-439.
77. Leone, G., DeGregori, J., Sears, R., Jakoi, L. & Nevins, J. R. Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature*, **1997**, 387, 422-426.
78. Pruitt, K., Pestell, R. G. & Der, C. J. Ras inactivation of the retinoblastoma pathway by distinct mechanisms in NIH 3T3 fibroblast and RIE-1 epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 40916-40924.
79. Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, **2006**, 444, 638-642.
80. Bartkova, J. *et al.* DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, **2005**, 434, 864-870.

81. Gorgoulis, V. G. *et al.* Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, **2005**, 434, 907–913.
82. Koorstra, J. B. *et al.* Widespread activation of the DNA damage response in human pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod. Pathol.*, **2009**, 22, 1439–1445.
83. Guerra, C. *et al.* Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell*, **2003**, 4, 111–120.
84. Hagag, N., Diamond, L., Palermo, R. & Lyubsky, S. High expression of ras p21 correlates with increased rate of abnormal mitosis in NIH3T3 cells. *Oncogene*, **1990**, 5, 1481–1489.
85. Denko, N., Stringer, J., Wani, M. & Stambrook, P. Mitotic and post mitotic consequences of genomic instability induced by oncogenic Ha-ras. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **1995**, 21, 241–253.
86. Denko, N. C., Giaccia, A. J., Stringer, J. R. & Stambrook, P. J. The human Ha-ras oncogene induces genomic instability in murine fibroblasts within one cell cycle. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **1994**, 91, 5124–5128.
87. Wani, M. A., Denko, N. C. & Stambrook, P. J. Expression of Rap 1 suppresses genomic instability of H-ras transformed mouse fibroblasts. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **1997**, 23, 123–133.
88. Cox, A. D. & Der, C. J. The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene*, **2003**, 22, 8999–9006.
89. Rosen, K. *et al.* Downregulation of the pro-apoptotic protein Bak is required for the ras-induced transformation of intestinal epithelial cells. *Curr. Biol.*, **1998**, 8, 1331–1334.
90. Sulciner, D. J. *et al.* rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF- κ B activation. *Mol. Cell Biol.*, **1996**, 16, 7115–7121.
91. Joneson, T. & Bar-Sagi, D. Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase. *Mol. Cell Biol.*, **1999**, 19, 5892–5901.

92. Mayo, M. W. & Baldwin, A. S. The transcription factor NF- κ B: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, 1470, M55–M62.
93. Nalca, A., Qiu, S. G., El-Guendy, N., Krishnan, S. & Rangnekar, V. M. Oncogenic Ras sensitizes cells to apoptosis by Par-4. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 29976–29983.
94. Ahmed, M. M. *et al.* Downregulation of PAR-4, a pro-apoptotic gene, in pancreatic tumors harboring K-ras mutation. *Int. J. Cancer*, **2008**, 122, 63–70.
95. Kinoshita, T., Yokota, T., Arai, K. & Miyajima, A. Regulation of Bcl-2 expression by oncogenic Ras protein in hematopoietic cells. *Oncogene*, **1995**, 10, 2207–2212.
96. Wu, L., Nam, Y. J., Kung, G., Crow, M. T. & Kitsis, R. N. Induction of the apoptosis inhibitor ARC by Ras in human cancers. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, 19235–19245.
97. Datta, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **1997**, 91, 231–241.
98. Fang, X. *et al.* Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene*, **1999**, 18, 6635–6640.
99. Peli, J. *et al.* Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas. *EMBO J.*, **1999**, 18, 1824–1831.
100. Gazin, C., Wajapeyee, N., Gobeil, S., Virbasius, C. M. & Green, M. R. An elaborate pathway required for Ras-mediated epigenetic silencing. *Nature*, **2007**, 449, 1073–1077.
101. Arber, N. Janus faces of ras: anti or pro-apoptotic? *Apoptosis*, **1999**, 4, 383–388.
102. Vermeulen, K., Berneman, Z. N. & Van Bockstaele, D. R. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.*, **2003**, 36, 165–175.
103. Folkman, J., Watson, K., Ingber, D. & Hanahan, D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*, **1989**, 339, 58–61.
104. Rak, J. *et al.* Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/ VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res.*, **1995**, 55, 4575–4580.

105. Rak, J. & Yu, J. L. Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular “supply” and vascular “demand”. *Semin. Cancer Biol.*, **2004**, 14, 93–104.
106. Kranenburg, O., Gebbink, M. F. & Voest, E. E. Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, 1654, 23–37.
107. Ancrile, B. B., O’Hayer, K. M. & Counter, C. M. Oncogenic ras-induced expression of cytokines: a new target of anti-cancer therapeutics. *Mol. Interv.* **2008**, 8, 22–27.
108. Tokunaga, T. *et al.* Ribozyme-mediated inactivation of mutant K-ras oncogene in a colon cancer cell line. *Br. J. Cancer*, **2000**, 83, 833–839.
109. Sparmann, A. & Bar-Sagi, D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*, **2004**, 6, 447–458.
110. Borrello, M. G., Degl’Innocenti, D. & Pierotti, M. A. Inflammation and cancer: the oncogene-driven connection. *Cancer Lett.*, **2008**, 267, 262–270.
111. Feng, Y., Santoriello, C., Mione, M., Hurlstone, A. & Martin, P. Live imaging of innate immune cell sensing of transformed cells in zebrafish larvae: parallels between tumor initiation and wound inflammation. *PLoS Biol.*, **2010**, 8, e1000562.
112. Testa, J. E., Medcalf, R. L., Cajot, J. F., Schleuning, W. D. & Sordat, B. Urokinase-type plasminogen activator biosynthesis is induced by the EJ-Ha-ras oncogene in CL26 mouse colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, **1989**, 43, 816–822.
113. Pepper, M. S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2001**, 21, 1104–1117.
114. Maudsley, D. J., Bateman, W. J. & Morris, A. G. Reduced stimulation of helper T cells by Ki-ras transformed cells. *Immunology*, **1991**, 72, 277–281.
115. Lohmann, S., Wollscheid, U., Huber, C. & Seliger, B. Multiple levels of MHC class I down-regulation by ras oncogenes. *Scand. J. Immunol.*, **1996**, 43, 537–544.

116. Seliger, B. *et al.* Suppression of MHC class I antigens in oncogenic transformants: association with decreased recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Exp. Hematol.*, **1996**, 24, 1275–1279.
117. Ehrlich, T. *et al.* The effect of H-ras expression on tumorigenicity and immunogenicity of Balb/c 3T3 fibroblasts. *Immunol. Lett.*, **1993**, 39, 3–8.
118. Testorelli, C. *et al.* Dacarbazine-induced immunogenicity of a murine leukemia is attenuated in cells transfected with mutated K-ras gene. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **1997**, 16, 15–22.
119. Weijzen, S., Velders, M. P. & Kast, W. M. Modulation of the immune response and tumor growth by activated Ras. *Leukemia*, **1999**, 13, 502–513.
120. Kubuschok, B. *et al.* Naturally occurring T-cell response against mutated p21 ras oncoprotein in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.*, **2006**, 12, 1365–1372.
121. Fossum, B., Olsen, A. C., Thorsby, E. & Gaudernack, G. CD8+ T cells from a patient with colon carcinoma, specific for a mutant p21-Ras-derived peptide (Gly13-->Asp), are cytotoxic towards a carcinoma cell line harbouring the same mutation. *Cancer Immunol. Immunother.*, **1995**, 40, 165–172.
122. Qin, H. *et al.* CD4+ T-cell immunity to mutated ras protein in pancreatic and colon cancer patients. *Cancer Res.*, **1995**, 55, 2984–2987.
123. Gjertsen, M. K. & Gaudernack, G. Mutated Ras peptides as vaccines in immunotherapy of cancer. *Vox Sang*, **1998**, 74 (Suppl. 2), 489–495.
124. Ji, H. *et al.* K-ras activation generates an inflammatory response in lung tumors. *Oncogene*, **2006**, 25, 2105–2112.
125. Soudja, S. M. *et al.* Tumor-initiated inflammation overrides protective adaptive immunity in an induced melanoma model in mice. *Cancer Res.*, **2010**, 70, 3515–3525.
126. Grunert, S., Jechlinger, M. & Beug, H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2003**, 4, 657–665.

127. Smakman, N., Borel Rinkes, I. H., Voest, E. E. & Kranenburg, O. Control of colorectal metastasis formation by K-Ras. *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, 1756, 103–114.
128. Muschel, R. J., Williams, J. E., Lowy, D. R. & Liotta, L. A. Harvey ras induction of metastatic potential depends upon oncogene activation and the type of recipient cell. *Am. J. Pathol.* **1985**, 121, 1–8.
129. Bondy, G. P., Wilson, S. & Chambers, A. F. Experimental metastatic ability of H-ras-transformed NIH3T3 cells. *Cancer Res.* **1985**, 45, 6005–6009.
130. Plantefaber, L. C. & Hynes, R. O. Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell*, **1989**, 56, 281–290.
131. Guo, W. & Giancotti, F. G. Integrin signalling during tumour progression. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2004**, 5, 816–826.
132. Schramm, K. *et al.* Activated K-ras is involved in regulation of integrin expression in human colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, **2000**, 87, 155–164.
133. Pollock, C. B., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Kolch, W. & Dhillon, A. S. Oncogenic K-RAS is required to maintain changes in cytoskeletal organization, adhesion, and motility in colon cancer cells. *Cancer Res.*, **2005**, 65, 1244–1250.
134. Campbell, P. M. & Der, C. J. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.*, **2004**, 14, 105–114.
135. Frisch, S. M. & Francis, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.*, **1994**, 124, 619–626.
136. Zhang, Y. A., Nemunaitis, J., Scanlon, K. J. & Tong, A. W. Anti-tumorigenic effect of a K-ras ribozyme against human lung cancer cell line heterotransplants in nude mice. *Gene Ther.*, **2000**, 7, 2041–2050.
137. Rosen, K. *et al.* Activated Ras prevents downregulation of Bcl-X(L) triggered by detachment from the extracellular matrix. A mechanism of Ras-induced resistance to anoikis in intestinal epithelial cells. *J. Cell Biol.*, **2000**, 149, 447–456.

138. Giehl, K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol. Chem.*, **2005**, 386, 193–205.
139. Jones, R. G. & Thompson, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.*, **2009**, 23, 537–548.
140. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science*, **1956**, 123, 309–314.
141. Mathupala, S. P., Heese, C. & Pedersen, P. L. Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272, 22776–22780.
142. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, **2009**, 324, 1029–1033.
143. Johannessen, C. M. *et al.* The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **2005**, 102, 8573–8578.
144. Foster, K. G. &ingar, D. C. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, 14071–14077.
145. Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F. & Maity, A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 9519–9525.
146. Blum, R., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Rechavi, G. & Kloog, Y. Ras inhibition in glioblastoma down-regulates hypoxia-inducible factor-1 α , causing glycolysis shutdown and cell death. *Cancer Res.*, **2005**, 65, 999–1006.
147. Semenza, G. L. Hypoxia and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, 26, 223–224.
148. Kole, H. K., Resnick, R. J., Van Doren, M. & Racker, E. Regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity in ras-transformed rat-1 fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1991**, 286, 586–590.

149. Yalcin, A., Telang, S., Clem, B. & Chesney, J. Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphatases in cancer. *Exp. Mol. Pathol.*, **2009**, 86, 174–179.
150. Lacal, J. C. and Carnero, A. regulation of Ras proteins and their involvement in signal transduction pathways. *Oncol. Rep.*, **1994**, 1, 677-693.
151. Pelech, S. L., and Vance, D. E. Signal transduction via phosphatidilcholine cycles. *Trends Biochem. Sci.*, **1989**, 14, 28-30.
152. Plevin, R.; Cook, S. J.; Palmer, S. and Wakelam, M. J. Multiple sources of sn-1,2-diacylglycerol in platelet-derived-growth-factor-stimulated Swiss 3T3 fibroblast. Evidence for activation of phosphoinositidase C and phosphatidilcholine specific phospholipase D. *Biochem. J.*, **1991**, 279, 559-565.
153. Nishizuka, Y. Intracellular signalling by hydrolisys of phospholipids and activation of protein kinase C (Review). *Science*, **1992**, 258, 607-614.
154. Carnero, A.; Cuadrado, A.; del Peso, L. and Lacal, J. C. Activation of type D phospholipase by serum stimulation and ras-induced transformation in NIH3T3 cells. *Oncogene*, **1994**, 9, 1387-1395.
155. Lacal, J.C. Choline Kinase: A novel target for antitumor drugs. *Indrugs*, **2001**, 4, 419-426.
156. Singer, W. D.; Brown, A. H.; Sterweis, P. C. Regulation of Eucaryotic Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C and Phospholipase D. *Annu. Rev. Biochem.*, **1997**, 66, 475-509.
157. Cook, S. J. and Wakelam, M. J. Hydrolisis of phosphatidilcholine by phospholipase D is a common response to mitogens which stimulate inositol lipid hydrolysis in Swiss 3T3 fibroblast. *Biochim. Biophys. Acta*, **1991**, 1092, 265-272.
158. Pelech, S. L. and Vance, D. E. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis (Review). *Biochim. Biophys. Acta*, **1984**, 779, 217-251.
159. A. Lykidis e S. Jackowski, "Regulation of mammalian cell membrane biosynthesis", *PROG NUCL A*, **2001**, 65, 361-393

160. Ramírez de Molina, A. *et al.* Choline kinase as a link connecting phospholipid metabolism and cell cycle regulation: Implication in cancer therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2008**, 40, 1753-1763.
161. Ramírez de Molina, A.; Rodríguez-González, A.; Penalva, V.; Lucas, L.; Lacal, J. C. Inhibition of ChoK Is an Efficient Antitumor Strategy for Harvey-, Kirsten-, and N-ras Transformed Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2001**, 285, 873-879.
162. 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 Res.*, **2005**, 65(13), 5647-5653.
163. Ackerstaff, E.; Glunde, K.; Bhujwalla, Z. M. Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells? *J. Cell Biochem.*, **2003**, 90(3), 525-533.
164. Kiss, Z. Regulation of mitogenesis by water-soluble phospholipid intermediates. *Cell Signal*, **1999**, 11(3), 149-157.
165. Kiss, Z.; Mukherjee, J. J.; Crilly, K.S.; Chung, T. Ethanolamine, but not phosphoethanolamine, potentiates the effects of insulin, phosphocholine, and ATP on DNA synthesis in NIH 3T3 cells--role of mitogen-activated protein-kinase-dependent and protein-kinase-independent mechanisms. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 250(2), 395-402.
166. Kolesnick, R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J. Clin. Invest.*, **2002**, 110, 3-8.
167. Aoyama , C.; Liao, H.; Ishidate, K. Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Prog. Lipid Res.*, **2004**, 43(3), 266-281.
168. Millington, W. R., Wurtman, R. J. Choline administration elevates brain phosphorilcholine concentrations. *J. Neurochem.*, **1982**, 38, 1748-1752.
169. Tadokoro, K.; Ishidate, K.; Nakazawa, Y. Evidence for the existence of isozymes of choline kinase and their selective induction in 3-methylcholanthrene- or carbon tetrachloride- treated rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, 835, 501-513.

170. Uchida, T. Regulation of choline kinase R: analyses of alternatively spliced choline kinases and the promoter region. *J. Biochem.*, **1994**, 116, 508-518.
171. Glunde, K.; Shah, T.; Winnard Jr, P. T.; Raman, V.; Takagi, T.; Vesuna, F. *et al.* Hypoxia regulates choline kinase expression through hypoxia-inducible factor-1 alpha signalins in a human prostate cancer model. *Cancer Res.*, **2008**, 68, 172-180.
172. Hundermark, S.; Lorenz, U.; Weitzel, H. K.; Ragosch, V. Effect of epidermal growth factor on enzymes of phospholipid biosynthesis in lung and liver of fetal rats in vivo and in vitro. *Horm. Metab. Res.*, **1999**, 31, 8-13.
173. 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. *J. Biol. Chem.*, **1986**, 261, 7846-7852.
174. Man, A. S.; Lee, E.; Choy, P. C. Biphasic modulation of choline uptake and phosphatidylcholine biosynthesis by vasopressin in rat cardiac myocytes. *Lipids*, **1994**, 29, 15-19.
175. Paddon, H. B.; Vigo, C.; Vance, D. E. Dietylstilbestrol treatment increase the amount of choline kinase in rooster liver. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1982**, 710, 112-115.
176. Uchida, T. Stimulation of phospholipid synthesis in HeLa cells by epidermal growth factor and insuline: activation of choline kinase and glycerophosphate acil transferase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1996**, 1304, 89-104.
177. Warden, C. H.; Friedkin, M. regulation of choline kinase activity and phosphatidylcholine biosynthesis by mitogenic growth factors in 3T3 fibroblats. *J. Biol. Chem.*, **1985**, 260, 6006-6011.
178. Gallego-Ortega, D, Ramírez de Molina, A.; Ramos, M. A.; Valdés-Morea, F.; Bardera, M. G.; Sarmentero-Estrada, J. *et al.* Differential role of human choline kinase alpha and beta enzymes in lipids metabolism: Implications in cancer onset and treatment. *PLoS One*, **2009**, 4, e7819.
179. Ramírez de Molina, A.; Penalva, V.; Lucas, L.; Lacal, J. C. regulation of choline kinase activity by ras proteins involves Ral-GDS and PI3K. *Oncogene 21*, (**2002b**), 937-946.

180. Carman, G. M.; Kersting, M. C. Phospholipid synthesis in yeast: regulation by phosphorilation. *Biochem. Cell Biol.*, **2004**, 82, 62-70.
181. Kim, K. H.; Carman, G.M. Phosphorilation and regulation of choline kinase from *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 9531-9538.
182. Choi, M. G.; Kurnov, V.; Karsting, M.C.; Sreenivas, A.; Carman, G. M. Phosphorilation of the yeast choline kinase by protein kinase C. Identification of Ser25 and Ser30 as major sites of phosphorilation. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280, 26105-26112.
183. Lacal, J. C. Diacylglycerol production in *Xenopus laevis* oocytes after microinjection of p21 ras proteins is a consequence of activation of phosphatidylcholine metabolism. *Mol. Cell Biol.*, **1990**, 10, 333-340.
184. Lacal, J. C.; Moscad, J.; Aaronson, S. A. Novel source of 1,2-dicylglycerol elevated in cell transformed by H-ras oncogene. *Nature*, **1987**, 330, 269-272.
185. Bhakoo, K. K.; Williams, S.R.; Flrian, C. L.; Land, H.; Noble, M.D. Immortalization and transformation are associated with specific alterations in choline metabolism. *Cancer Res.*, **1996**, 56, 4630-4635.
186. Macara, I. G. Elevated phosphocholine concentration in ras-transformed NIH3T3 cells arises from increased choline kinase activity, non from phosphatidylcholine breakdown. *Mol. Cell Biol.*, **1989**, 9, 325-328.
187. Ratnam, S.; Kent, C. Early increase in choline kinase activity upon induction of the H-ras oncogene in mouse fibroblast cells lines. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1995**, 323, 313-322.
188. Teegarden, D.; Taparowsky, E. J.; Kent, C. Altered phosphatidylcholine metabolism in C3H10T1-2 cells transfected with the Harvey-ras oncogene. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265, 6042-6047.
189. Hernández-Alcoceba, R.; Saniger, L.; Campos, J.; Nuñez, M. C.; Khaless, F.; Gallo, M. A. *et al.* Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drugs design. *Oncogene*, **1997**, 15, 2289-2301.

190. Cuadrado, A.; Carnero, A.; Dolfi, F.; Jiménez, B.; Iacal, J. C. Phosphorylcholine: A novel second messenger essential for mitogenic activity of growth factors. *Oncogene*, **1993**, 8, 2959-2968.
191. Jiménez, B.; del Peso, L.; Montaner, S.; Esteve, P.; Iacal, J. C. generation of phosphorylcholine as an Essential event in the activation of Raf-1 and MAP-kinases in growth factors induced mitogenic stimulation. *J. Cell Biochem.*, **1995**, 57, 141-149.
192. Kiss, Z.; Chung, T. Choline phosphate and phorbol ester potentiate the mitogenic effect of insulin by competitive mechanism in NIH3T3 fibroblast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1996**, 218, 505-509.
193. Ramírez de Molina, A.; Bañez-Coronel, M.; Gutierrez, R.; Rodríguez-González, A.; Olmeda, D.; Mejías, D. *et al.* Choline kinase activation is critical requirement for the proliferation of primary human mammary epithelial cells and breast tumor progression. *Cancer Res.*, **2004**, 64, 6732-6739.
194. Elyahu, G.; Kreizman, T.; Degani, H. Phosphocholine as a biomarker of breast cancer: molecular and biochemical studies. *Int. J. Cancer*, **2007**, 120, 1721-1730.
195. Iorio, E.; Mezzananza, D.; Alberti, P.; Spadaro, F.; Ramoni, C.; D'Ascenzo, S. *et al.* Alteration of choline phospholipid metabolism in ovarian tumor progression. *Cancer Res.*, **2005**, 65, 9369-9376.
196. Iorio, E.; Ricci, A.; Bagnoli, M.; Pisanu, M. E.; Castellano, G.; Vito, M. *et al.* Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res.*, **2010**, 70, 2126-2135.
197. Ramírez de Molina, A.; Gutiérrez, R.; Ramos, M. A.; Silva, J. M.; Silva, J.; Bonilla, F. *et al.* Increased Choline kinase activity in human breast carcinomas: Clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene*, **2002a**, 21, 4317-4322.
198. Ramírez de Molina, A.; Sarmentero-Estrada, J.; Belda-Iniesta, C.; Taron, M.; Ramírez de Molina, V.; Cejas, P. *et al.* Expression of choline kinase alpha to predict outcome in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol.*, **2007**, 8, 889-897.

199. Chung, T.; Huang, J. S.; Mukherjee, J. J.; Crilly, K. S.; Kiss, Z. Expression of human choline kinase in NIH3T3 fibroblast increases the mitogenic potential of insulin and insulin-like growth factor I. *Cell Signal*, **2000**, 12, 279-288.
200. Rodríguez-Gonzalez, A.; Ramírez de Molina, A.; Benítez-Rajal, J.; Lacal, J. C. Phospholipase D and choline kinase: their role in cancer development and their potential as drug targets. *Prog. Cell Cycle res.*, **2003a**, 5, 191-201.
201. All-Safar, N. M.; Troy, H.; Ramírez de Molina, A.; Jackson, L. E.; Madhu, B.; Griffiths, J. R. *et al.* Non invasive magnetic resonante espectroscopy pharmacodynamic markers of the choline kinase inhibitors MN58b in human carcinoma models. *Cancer Res.*, **2006**, 66, 427-434.
202. Kenny, L. M.; Contractor, K. B.; Hinz, R.; Stebbing, J.; Palmieri, C.; Jiang, J. *et al.* Reproducibility of [11c]choline-positron emission tomography and effect of trastuzumab. *Clin. Cancer Res.*, **2010**, 16, 4236-4245.
203. Hernando, E.; Sarmentero-Estrada, J.; Koppie, T.; Belda-Iniesta, C.; Ramírez de Molina, A.; Cejas, P. *et al.* A critical role for choline kinase- α in the aggressiveness of bladder carcinomas. *Oncogene*, **2009**, 28, 2425-2435.
204. Al-Saffar, N.M. *et al.* The phosphoinositide 3-kinase inhibitor PI-103 downregulates choline kinase α leading to phosphocholine and total choline decrease detected by magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Res.*, **2010**, 70, 5507-5517.
205. Rodríguez-González, A.; Ramírez de Molina, A.; Fernández, 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*, **2003**, 23, 8247-8259.
206. Bañez-Coronel, M.; Ramírez de Molina, A.; Rodríguez-González, A.; Sarmentero, J.; Ramos, M. A.; García-Cabezas, M. A.; García-Oroz, L.; Lacal, J. C. Choline Kinase α Depletion Selectively Kills Tumoral Cells. *Current Cancer Drug Target*, **2008**, 8, 709-719.
207. Cannon, J. G. Structure-activity aspects of hemicholinium-3 (HC-3) and its analogues and congeners. *Med. Res. Rev.*, **1994**, 14, 505-531.

208. Campos, J. Anticancer bisquaternary heterocyclic compounds: a rational design. *II Farmaco*, **2003**, 58, 221-229.
209. Khaless, F. Diseño y síntesis de compuestos antitumorales que interfieren con señales químicas inducidas por oncogenes. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada. **1998**.
210. Nuñez-Carretero, M. C. Variaciones moleculares del hemicolinio-3: estudios QSAR/QSPR de nuevos inhibidores de colina quinasa y su relación con la actividad antiproliferativa en células transformadas por oncogenes *ras*. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada. **1999**.
211. Díaz-Mochón, J. J. Nuevas moléculas que interaccionan con la ruta colina quinasa como posibles agentes antitumorales. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada. **2001**.
212. Sánchez Martín, R. M. Nuevos antitumorales específicos frente a células transformadas por el oncogén *ras*, con estructura bisquinolínica, dirigidos a la colina quinasa. *Tesis Doctoral*. **2002**.
213. Conejo-García, A. Piridofanos simétricos: nuevos inhibidores de colina quinasa con propiedades antiproliferativas. *Tesis Doctoral*. Universidad de Granada. **2002**.
214. Campos, J.; Nuñez, M. C.; Rodríguez, V.; Gallo, M. Á.; Espinosa, A. QSAR of 1,1'-(1,2-ethylenebisbenzyl)bis(4-substitutedpyridinium)dibromides as choline kinase inhibitors: a different approach for antiproliferative drug design. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2000**, 10, 767-770.
215. Campos, J.; Núñez, M. C.; Rodríguez, V.; Entrena, A.; Hernández-Alcoceba, R.; Fernández, F.; Lacal, J. C.; Gallo, M. Á.; Espinosa, A. LUMO energy of model compounds of bispyridinium compounds as an index for the inhibition of choline kinase. *Eur. J. Med. Chem.*, **2001**, 36, 215-225.
216. Campos, J.; Núñez, M. C.; Sánchez, R. M.; Gómez-Vidal, J. A.; Rodríguez-González, A.; Bañez, M.; Gallo, M. Á.; Lacal, J. C.; Espinosa, A. Quantitative structure-activity relationships for a series of symmetrical bisquaternary anticancer compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, 2215-2231.

217. Conejo-García, A.; Campos, J.; Sánchez, R. M.; Rodríguez-González, A.; Lacial, J. C.; Gallo, M. Á.; 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. *Eur. J. Med. Chem.*, **2003**, 38, 109-116.
218. Conejo-García, A.; Campos, J. M.; Sánchez-Martín, R. M.; Gallo, M. Á.; Espinosa, A. Bispyridinium Ciclophanes: Novel Templates for Human Choline Kinase Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 3754-3757.
219. Conejo-García, A.; Campos, J.; Eder, C.; Entrena, A.; Gallo, M. Á.; Espinosa, A. Synthesis and NMR Studies on a C3-Symmetrical Triquinolina Triscationic Bicyclophane. *J. Org. Chem.*, **2005**, 70, 5748-5751.
220. Conejo-García, A.; Bañez-Coronel, M.; Sánchez-Martín, R. M.; Rodríguez-González, A.; Ramos, A.; Ramírez de Molina, A.; Espinosa, A.; Gallo, M. Á.; Campos, J. M. Influence of the Linker in Bispyridium Compounds on the Inhibition of Human Choline Kinase. *J. Med. Chem.*, **2004**, 47 (22), 5433-5440.
221. Martín-Sánchez, R. M.; Campos, J. M.; Conejo-García, A.; Cruz-López, O.; Báñez-Coronel, M.; Rodríguez-González, A.; Gallo, M. Á.; Lacial, J. C.; Espinosa, A. Symmetrical Bis-Quinolinium Compounds: New Human Choline Kinase Inhibitors with Antiproliferative Activity against the HT-29 Cell Line. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48, 3354-3363.
222. Lacial, J. C.; Campos, J. M.; Gallo, M. Á.; Espinosa, A. CSIC and Universidad de Granada. *Eur. Pat. Appl. WO 2005/068429 A1 (C1. C07D 213/74)*; *Chem. Abstr.*, **2005**, 143, 172774.
223. Peisach, D.; Gee, P.; Kent, C. Xu, Z. The Crystal Structure of Choline Kinase Reveals a Eukaryotic Protein Kinase Fold. *Structure*, **2003**, 11, 703.
224. Yuan, C.; Kent, C. Identification of critical residues of choline kinase A2 from *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279 (17), 17801.
225. 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.

226. Malito, E.; Sekulic, S.; Too, W. C. S.; Konrad, M.; Lavie, A. Elucidation of Human Choline Kinase Crystal Structures in Complex with the Products ADP or Phosphocholine. *J. Mol. Biol.*, **2006**, *364*, 136.
227. Hong *et al.* Crystal Structures of Human Choline Kinase Isoforms in Complex with Hemicholinium-3. *The Journal of Biological Chemistry*, **2010**, *285* (21), 16330-16340.
228. Choubey, V. *et al.* Inhibition of Plasmodium falciparum Choline Kinase by Hexadecyltrimethylammonium Bromide: a Possible Antimalarial Mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2007**, 696-706.
229. Alberge, B. *et al.* Comparison of the cellular and biochemical properties of plasmodium falciparum choline and ethanolamine kinases. *Biochem J.*, **2009**, *425*(1), 149-58.
230. Choubey, V. *et al.* Molecular characterization and localization of Plasmodium falciparum choline kinase. *Biochimica et Biophysica*, **2006**, 1027-1038.
231. Ancelin, ML.; Calas, M.; Vidal-Sailhan, V.; Herbute, S.; Ringwald, P.; Vial, HJ. Potent inhibitors of Plasmodium phospholipid metabolism with a broad spectrum of *in vitro* antimalarial activities. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2003**, *47*(8), 2590–2597.
232. Wengelnik K, Vidal V, Ancelin ML *et al.* A class of potent antimalarials and their specific accumulation in infected erythrocytes. *Science*, **2002**, *295*(5558), 1311–1314.

3. AIMS

3. Objectives

The previously mentioned antecedents indicate that the selective inhibition of choline kinase (ChoK) could lead to the development of new antitumor drugs with minimized adverse effects that are present in other chemotherapy agents.

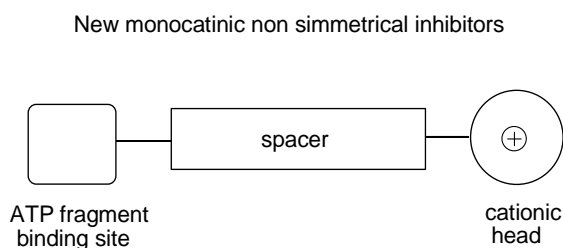
Our research group has developed several series of compounds that can act as choline kinase inhibitors and as antiproliferative agents, justifying the correlation between both types of biological activities. These series of compounds show a biscationic, cyclophanic or bicyclophanic structures, which include different linkers and cationic heads.

Docking studies performed with some of these compounds in a homology model of human choline kinase and the recent crystallization of this enzyme indicate that the inhibitors could be inserted simultaneously in both ATP and Cho binding sites.

Since the nature of both binding sites is different, the design, synthesis and analysis of new monocationic non-symmetrical inhibitors were considered. However, new biscationic structures have also been synthesized to study the influence of new linkers on the biological activity.

The objectives of this Thesis are:

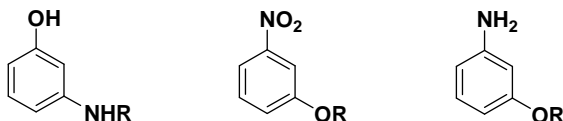
Objective 1.- The design and synthesis of new monocationic non-symmetric inhibitors (**SOS-1** to **SOS-29**) with the following structure:



The preparation of unsymmetrical monocationic inhibitors that could be inserted simultaneously in both ATP and choline binding sites is very interesting. Such inhibitors would retain a cationic head in order to be inserted into the binding site of Cho, while the second cationic head would be replaced by a molecular fragment that could mimic the ATP by means of functional groups that could form hydrogen bonds with residues of the ATP binding site.

The binding fragment that has been chosen from an ATP binding site was derived from phenol (3-nitrophenol or/and 3-aminophenol).

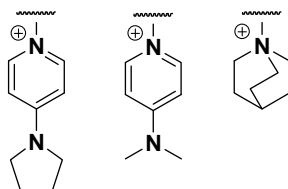
Objective 1a.- Study of the influence of some functional groups present in the fragment that can be inserted into the ATP binding site on the biological activity of these new inhibitors.



In two cases and ether bond is formed with the linker by the hydroxyl group, while the amino and nitro groups are free. In the other case, the amino bond releases the hydroxyl group.

Objective 1b.- Study of the influence of various cationic heads on the inhibition of ChoK.

Pyrrolidinopyridine and dimethylaminopyridine were initially chosen as cationic head due to the known biological activity of these cationic heads. A quinuclidine moiety was also introduced.

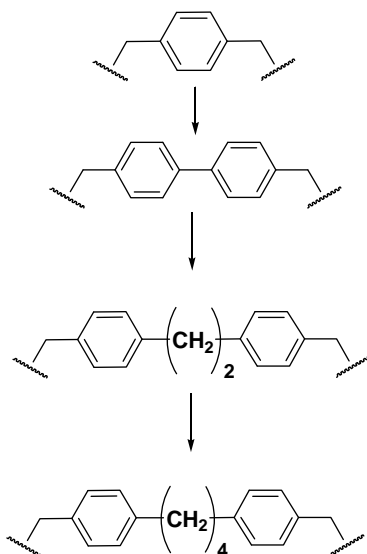


Trimethylammonium moiety is present in the choline, and this group is the best stabilized inside the choline binding site but it could interact with some acetylcholine receptors giving rise to cholinergic effects.

On the other hand, cholinergic receptors are very sensitive to N-substitutions and cholinergic activity can be reduced or eliminated with small increments of these N-substitutions volume. Therefore, we introduce a quinuclidine, a voluminous and lipophilic tertiary amine, in the docking studies over human crystallized ChoK. These results show that the choline binding site is big enough to quinuclidine, being a proper alternative.

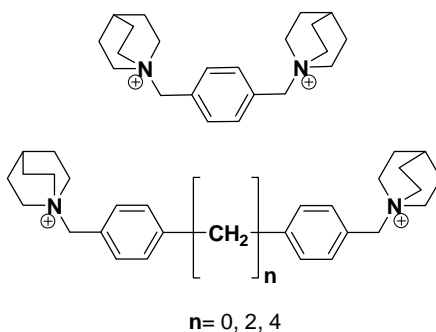
Objective 1c.- Study of the influence of different aryl alkyl linkers.

Since the structural variations of the molecules will be important, the previously described data about the known spacer cannot be extended to the novel compounds. Consequently it will be necessary to test different linkers in order to determine which ones are most appropriate. Thus four types of different spacers were chosen.

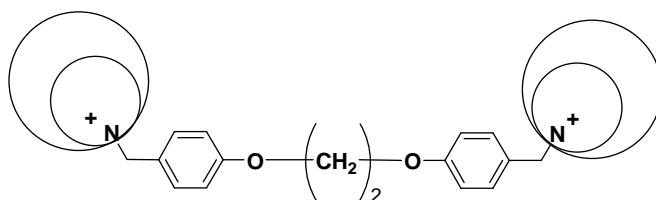


Objective 2.- Continuing the research line developed by our research group, and in order to further deep in the influence of both the cationic head and the polarity of the molecule, the desing and synthesis of new compounds with biscationic structure have been performed.

Objective 2a.- Introduction of a quinuclidine moiety as a cationic head and various aryl alkyl linkers (**SOS-30** to **33**).

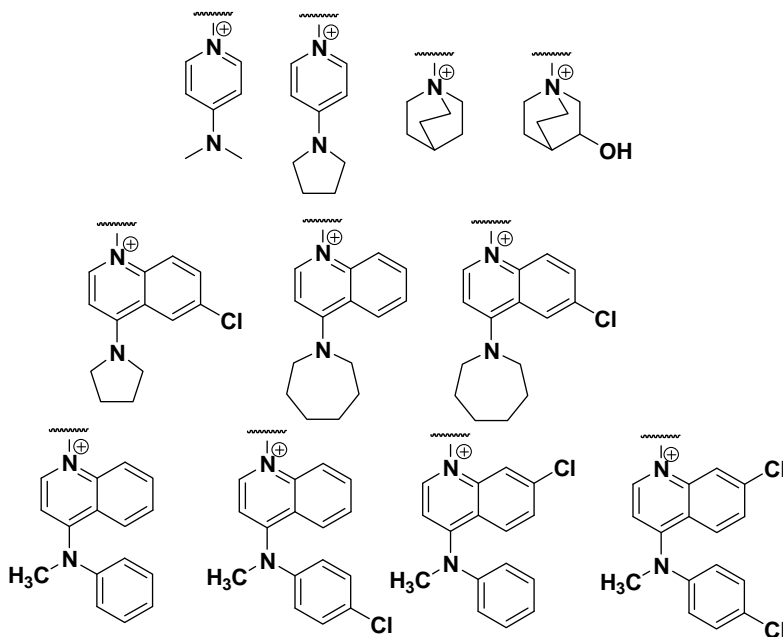


Objective 2b.- Introduction of two oxygen atoms in the linker in order to see the influence of these groups on the antiproliferative and inhibitory activity of ChoK (**SOS- 34** to **44**).



Introducing two oxygen atoms in the linker should increase the polarity of these compounds and the solubility. On the other hand the oxygen atoms will increase the affinity for the enzyme due to the formation of additional hydrogen bonds, as can be deduce from previous docking studies.

In these molecules the cationic heads that have shown better results in other compounds previously synthesized have been used: Pyridine, quinoline and quinuclidine rings conveniently substituted.



Objective 3.- Unambiguous identification of all synthesized compounds by means of nuclear magnetic resonance techniques ($^1\text{H-RMN}$, ^{13}C , HMBC y HSQC) and mass spectrometry.

Objective 4.- Study of the ChoK inhibition activity of these new inhibitors.

These studies will be performed on human ChoK and will allow to determine the possible selectivity of compounds against different forms of the enzyme.

Objective 5.- Study of the antiproliferative activity of the new designed and synthesized ChoK inhibitors.

For all compounds, further investigations are needed in order to determine the biological antiproliferative *in vitro* against the adequate line of cancerous cells.

Objective 6.- Study of the antimalarial activity of the designed and synthesized compounds.

In vitro growth inhibition assays will be performed using *Plasmodium falciparum* parasites that have been growth in human bloods cells.

Objective 7.- Molecular modelling techniques will be use in order to perform theoretical study of the viability or impracticality of various synthesized inhibitors.

Theoretical studies are not only used in the design phase, but also serve to justify biological results obtained in the later objectives. The obtained information will be useful for future modifications of the molecules to improve its potency, bioavailability, etc.

4. PARTE TEÓRICA

4. PARTE TEÓRICA

Resumen: En este apartado se detalla la metodología sintética empleada para la obtención de cuarenta y cuatro sales monocatiónicas y biscatiónicas de bromo usadas para el desarrollo de esta memoria. Además se detalla el análisis espectroscópico realizado para la inequívoca identificación de los mismos. También se presentan los resultados obtenidos de los ensayos biológicos realizados, *ex vivo* sobre ChoK humana aislada e *in vitro* sobre cultivos celulares de cáncer de hígado HepG2 que permiten establecer una serie de requisitos estructurales fundamentales tanto para la capacidad inhibitoria de la enzima ChoK como para su actividad antiproliferativa. Se realiza también un estudio de modelado molecular. Todo ello nos permite profundizar en el conocimiento de las relaciones estructura-actividad de los inhibidores de colina quinasa como posibles agentes antitumorales. También se presentan los resultados de los ensayos realizados sobre *P.falciparum*.

4.1. Síntesis química.

4.1.1. Consideraciones generales.

En este apartado se detallan los métodos sintéticos empleados en la preparación de las sales monocatiónicas asimétricas, biscatiónicas simétricas y de sus intermedios sintéticos.

Se han preparado cuarenta y cuatro compuestos finales, de los cuáles veintinueve son monocatiónicos asimétricos y 15 son biscatiónicos simétricos con distintos espaciadores semirrígidos englobados en dos familias, en función de si son estructuras monocatiónicas o biscatiónicas.

La estructura general de este tipo de compuestos corresponde a moléculas monocatiónicas no simétricas (**Figura 4.1**) y biscatiónicas simétricas (**Figura 4.2**), que presentan un espaciador arilalquílico.

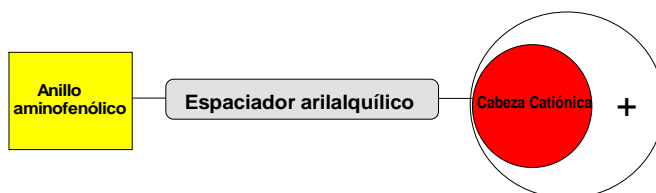


Figura 4.1.- Estructura general compuestos monocatiónicos no simétricos.

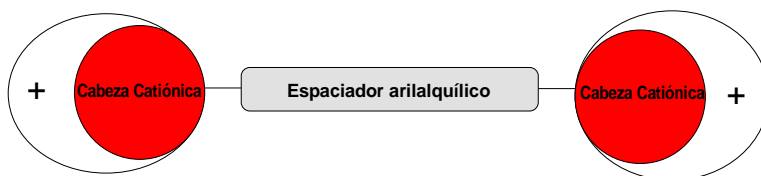
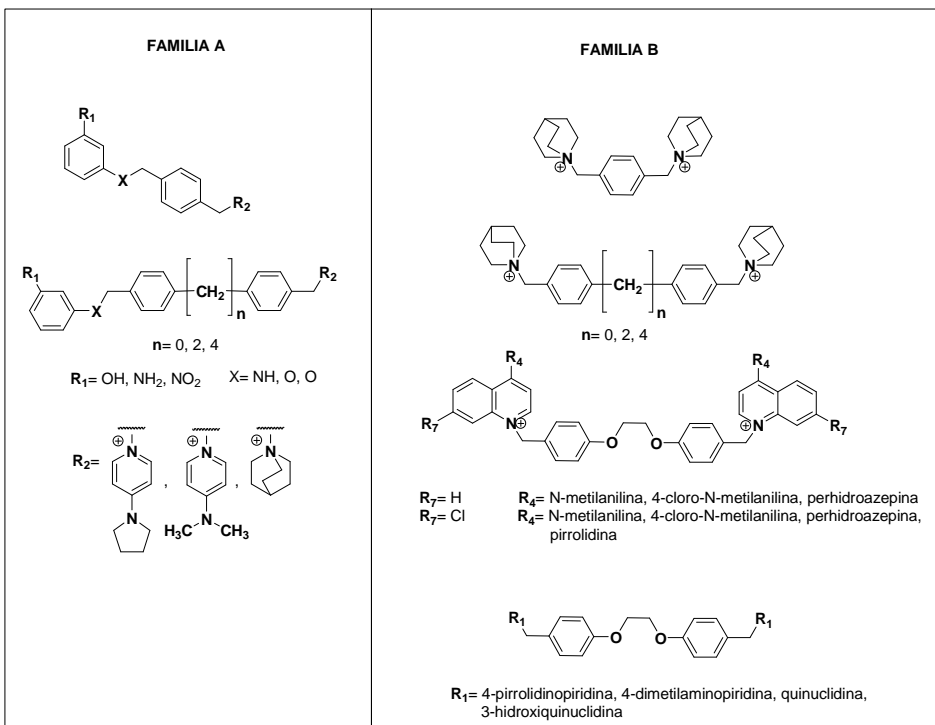


Figura 4.2.- Estructura general compuestos biscatiónicos simétricos.

A continuación, se detallan las estructuras de los compuestos finales denominados con las siglas **SOS-1** a **SOS-44**. Cada familia se divide, a su vez, en subfamilias que se diferencian por la naturaleza del sustituyente R_1 en el anillo aromático, en el caso de la **Familia A** (estructuras monocatiónicas no simétricas), y por la naturaleza de la cabezas cationicas y el espaciador en el caso de la **Familia B** (estructuras biscatiónicas simétricas).



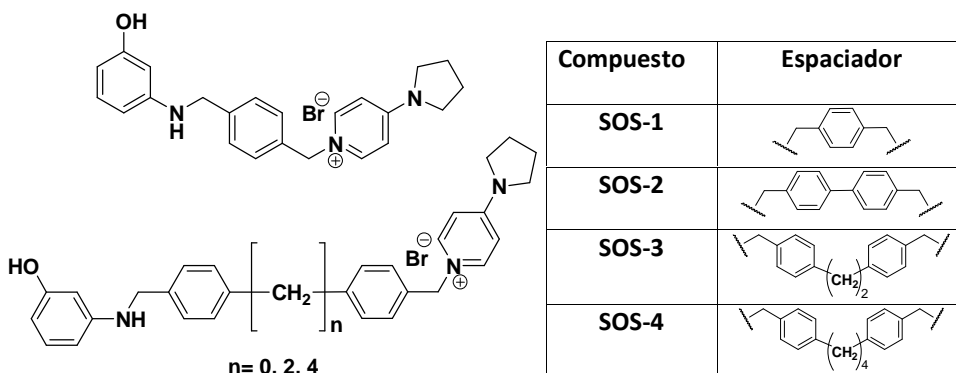
Familia A: Compuestos Monocatiónicos No Simétricos

Subfamilia A₁: Derivados Fenólicos

Esta subfamilia presenta un grupo hidroxilo como sustituyente R₁ unido en la posición meta del benceno que se enlaza con el correspondiente espaciador mediante un enlace amínico.

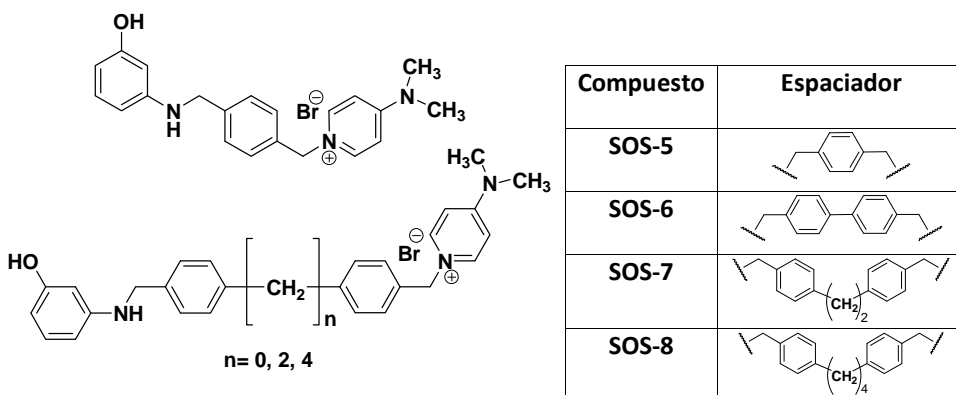
Serie 1: Derivados de sales de pirrolidinopiridinio

Dentro de esta serie se encuentran los compuestos cuya cabeza catiónica es la pirrolidinopiridina, habiéndose sintetizado cuatro compuestos que se diferencian entre sí en función del tipo de espaciador que presentan.



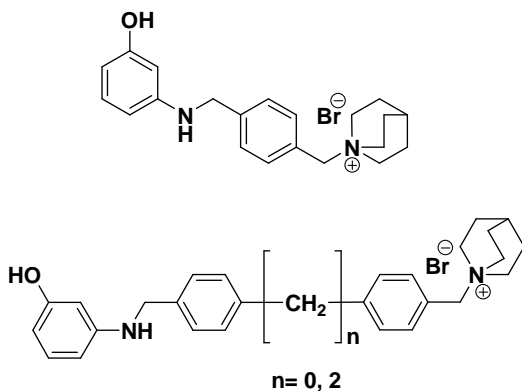
Serie 2: Derivados de sales de dimetilaminopiridinio

En esta segunda serie la cabeza catiónica es la dimetilaminopiridina y presenta cuatro compuestos que se diferencian también en función del tipo de espaciador que presentan.



Serie 3: Derivados de sales de quinuclidinio

Aquí se engloban los compuestos cuya cabeza catiónica es la quinuclidina y presenta tres compuestos que se diferencian entre sí en función del tipo de espaciador que presentan.



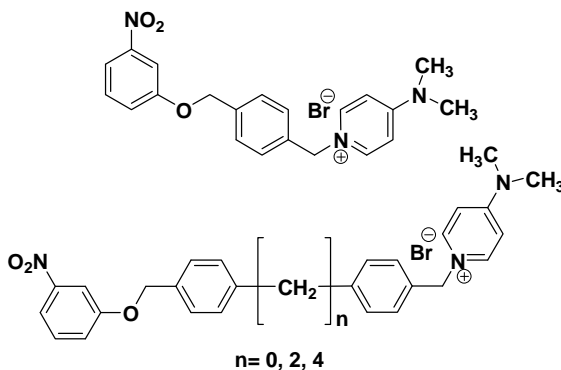
Compuesto	espaciador
SOS-9	
SOS-10	
SOS-11	

Subfamilia A₂: Derivados Nitrados

Esta subfamilia presenta un grupo nitro como sustituyente R₁ en la posición meta del benceno y está enlazada con el correspondiente espaciador mediante un enlace éter.

Serie 1: Derivados de sales de dimetilaminopiridinio

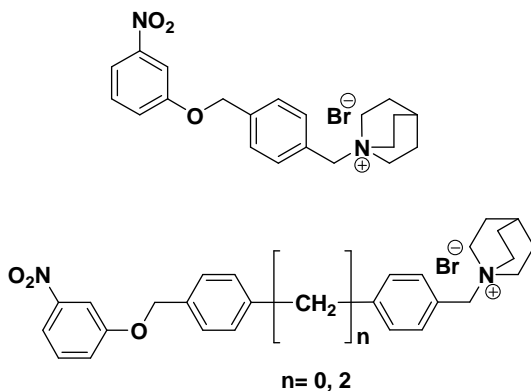
Como en la Subfamilia A₁ en esta serie se encuadran aquellos compuestos cuya cabeza catiónica es la dimetilaminopiridina y presenta cuatro compuestos que se diferencian entre sí en función del tipo de espaciador que presentan.



Compuesto	espaciador
SOS-12	
SOS-13	
SOS-14	
SOS-15	

Serie 2: Derivados de sales de quinuclidinio

Aquí son englobados los compuestos cuya cabeza catiónica es la quinuclidina y presenta tres compuestos que se diferencian entre sí en función del tipo de espaciador que presentan.



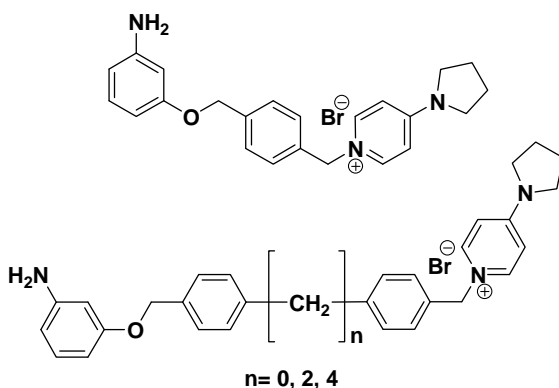
Compuesto	Espaciador
SOS-16	
SOS-17	
SOS-18	

Subfamilia A₃: Derivados Amínicos

La Subfamilia A₃ presenta un grupo amino como sustituyente R₁ en posición meta del benceno y esta enlazada con el correspondiente espaciador mediante un enlace éter.

Serie 1: Derivados de sales de pirrolidinopiridinio

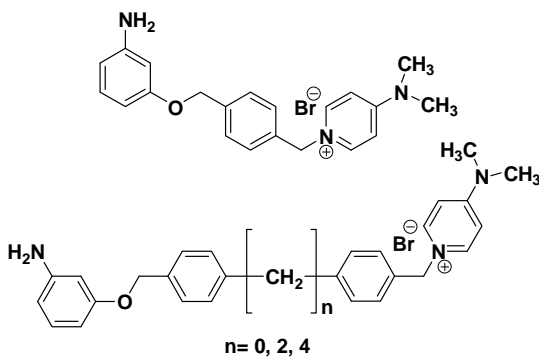
Dentro de esta serie se encuentran los compuestos cuya cabeza catiónica es la pirrolidinopiridina y presenta cuatro compuestos donde el espaciador es el resto diferenciador.



Compuesto	Espaciador
SOS-19	
SOS-20	
SOS-21	
SOS-22	

Serie 2: Derivados de sales de dimetilaminopiridinio

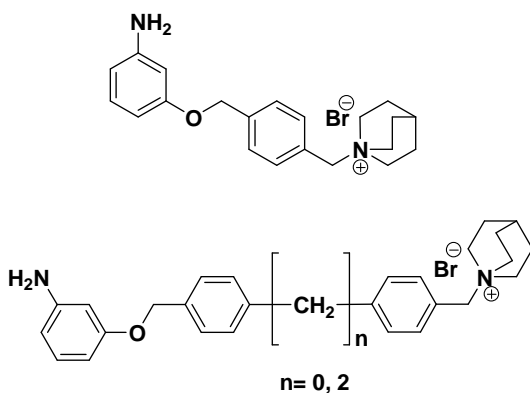
Aquí la cabeza catiónica es la dimetilaminopiridina y presenta cuatro compuestos con el mismo criterio de división que en los anteriores.



Compuesto	espaciador
SOS-23	
SOS-24	
SOS-25	
SOS-26	

Serie 3: Derivados de sales de quinuclidinio

Dentro de esta serie se encuentran los compuestos cuya cabeza catiónica es la quinuclidina, habiéndose sintetizado tres compuestos con diferentes espaciadores.

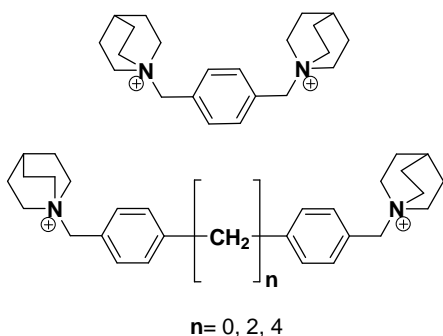


Compuesto	espaciador
SOS-27	
SOS-28	
SOS-29	

Familia B: Compuestos Biscatiónicos Simétricos

Subfamilia B₁: Derivados de sales de bisquinuclidinio

Dentro de esta subfamilia tenemos 4 compuestos que presentan como cabeza catiónica la quinuclidina y también aquí se diferencian por la naturaleza del espaciador.



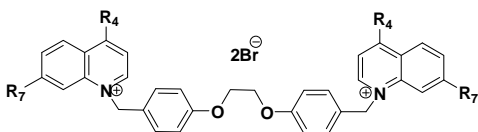
Compuesto	Espaciador
SOS-30	
SOS-31	
SOS-32	
SOS-33	

Subfamilia B₂: Derivados de sales de bisquinolinio

En esta familia se ha mantenido constante el espaciador que es el 1,2-bis(*p*-toliloxi)etano y se ha variado el sustituyente R₄ de la cabeza catiónica quinolinica.

Serie 1: sales de biquinolinio con sustituyente R₄ aromático

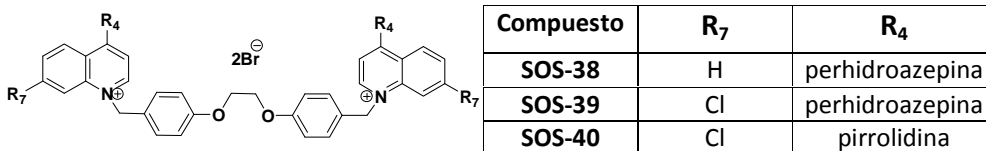
Dentro de esta serie hay 4 compuestos que presentan un resto de 1,2-bis(*p*-toliloxi)etano como espaciador y se diferencian entre sí por la naturaleza del sustituyente R₄ y R₇ de la estructura quinolinica.



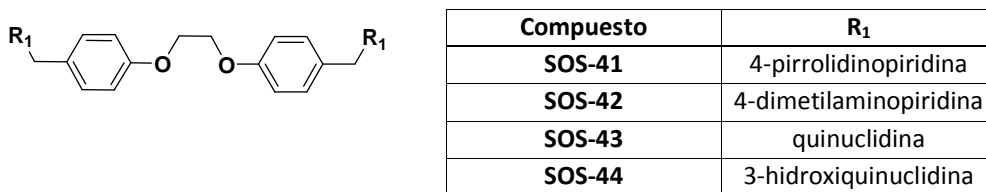
Compuesto	R ₇	R ₄
SOS-34	H	N-metilanilina
SOS-35	Cl	N-metilanilina
SOS-36	H	4-cloro-N-metilanilina
SOS-37	Cl	4-cloro-N-metilanilina

Serie 2: sales de bisquinolinio con sustituyente R₄ no aromático

Aquí están incluidos 3 compuestos que presentan un resto de 1,2-bis(*p*-toliloxi)etano como espaciador y se diferencian entre sí por la naturaleza del sustituyente R₄ y R₇ de la estructura quinolinica.

**Subfamilia B₃: Derivados de sales de aminas cíclicas aromáticas y no aromáticas.**

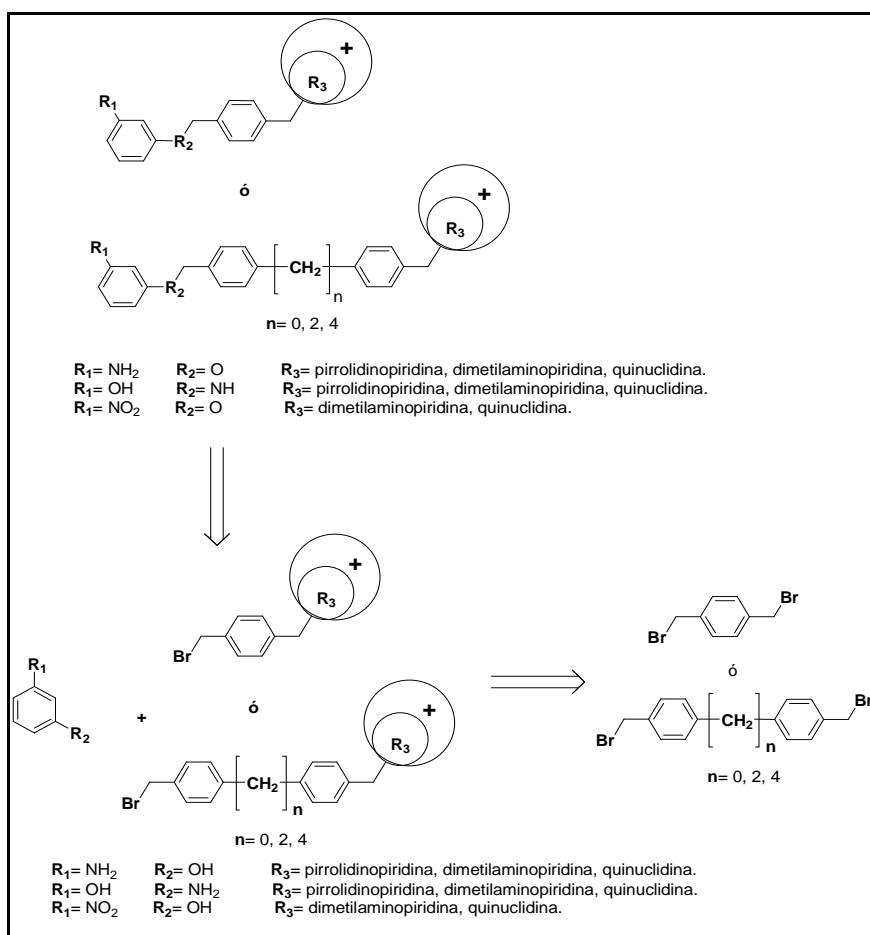
La Subfamilia B₃ está formada por 4 compuestos que presentan un resto de 1,2-bis(*p*-toliloxi)etano como espaciador y se diferencian entre sí por la naturaleza del sustituyente R₁.



4.1.2.- Análisis retrosintético.

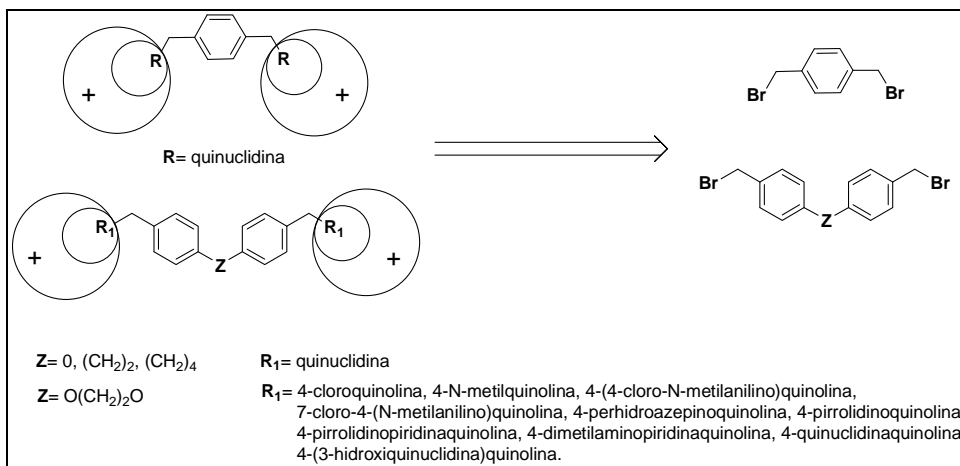
Como se ha mencionado en las consideraciones generales las moléculas sintetizadas en esta memoria constan, en el caso de los compuestos monocatiónicos no simétricos, de tres partes bien diferenciadas: a) el espaciador, b) la cabeza catiónica y c) el anillo aminofenólico.

Para la obtención de este tipo de derivados se sintetizan, en primer lugar, los espaciadores dibromados para, seguidamente, unirlos con la estructura nitrogenada correspondiente por uno de los dos restos bromados libres, en relación molar 2:1, usando el disolvente adecuado para cada caso (según la cabeza catiónica). Una vez formado el derivado intermedio monocatiónico se unirá al anillo aminofenólico o nitrofenólico correspondiente, a través del grupo amino o hidroxilo respectivamente, mediante una sustitución nucleofílica del segundo bromo libre, en medio básico y a temperatura de reflujo, para dar lugar a la estructura final monocatiónica correspondiente (**Esquema 4.3**), obteniéndose de esta manera las tres Subfamilias mencionadas anteriormente.



Esquema 4.3.- Análisis retrosintético de los compuestos monocatiónicos no simétricos.

La síntesis de los compuestos biscatiónicos simétricos, constituidos de dos partes bien diferenciadas: a) el espaciador y b) las cabezas catiónicas. Se lleva a cabo con el derivado dibromado y la estructura nitrogenada correspondiente, en relación molar 1:2, mediante una sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2), produciéndose de esta manera la cuaternización de los nitrógenos heterocíclicos con los agentes alquilantes (**Esquema 4.4**).



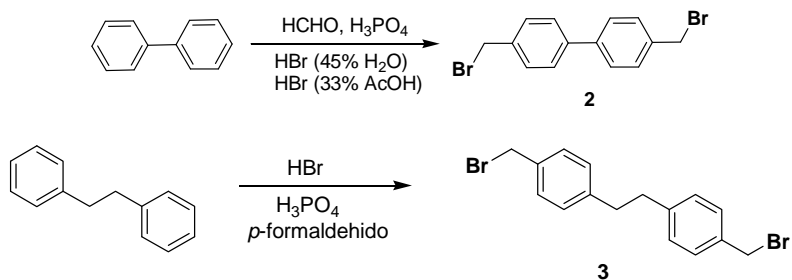
Esquema 4.4.- Análisis retrosintético de los compuestos biscatiónicos simétricos.

Para ello se deben sintetizar por separado algunos de estos fragmentos. La síntesis de cada uno de estos fragmentos se detalla a continuación.

4.1.3.- Síntesis química de los espaciadores (Familia A).

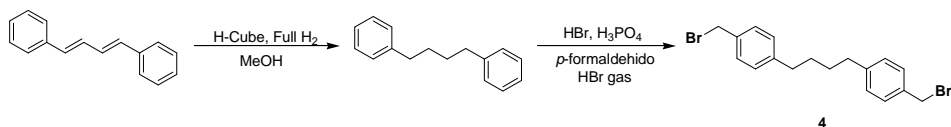
En esta Familia, se han empleado cuatro tipos de derivados dibromados de los espaciadores diferentes. Uno de ellos, el α,α' -dibromo-*p*-xileno, es asequible comercialmente. Los tres restantes se han preparado siguiendo la ruta sintética que se describe a continuación.

La síntesis de los derivados dibromados 4,4'-bis(bromometil)bifenilo (**2**), 1,2-bis(*p*-bromometilfenil)etano (**3**) se lleva a cabo modificando la reacción de Cram y Steinberg^{1, 2}, por reacción con formaldehído (o sus polímeros) y bromuro de hidrógeno en presencia de ácido o-fosfórico (**Esquema 4.5**).



Esquema 4.5.- Reacción de Cram y Steinberg para la preparación de los espaciadores dibromados 4,4'-bis(bromometil)bifenilo(2), 1,2-bis(*p*-bromometilfenil)etano(3).

Para la síntesis del 1,4-bis(*p*-bromometilfenil)butano se ha partido del 1,4-difenil-1,3-butadieno y tras una reducción de los enlaces olefinicos con el hidrogenador por electrólisis H-Cube a full H₂, dando lugar al 1,4-difenilbutano, se procede a la bromometilación del mismo, obteniéndose de esta manera el 1,4-bis(*p*-bromometilfenil)butano (**4**) (**Esquema 4.6**).



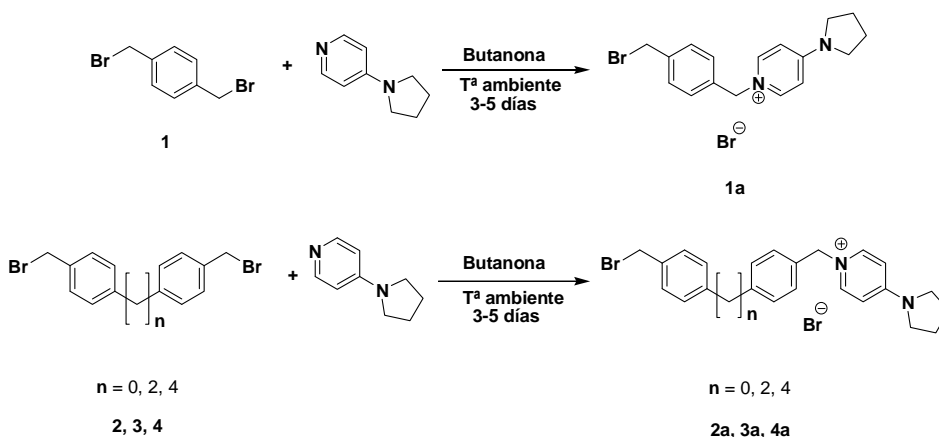
Esquema 4.6.-Obtención del espaciador dibromado1,1'-etano-1,2-diilbis[4-bromometil(benceno)].

4.1.4.- Síntesis química de los compuestos intermedios (Familia A).

En este apartado se detallan las rutas sintéticas utilizadas para la obtención de once productos intermedios.

4.1.4.1.- Síntesis de derivados de sales de pirrolidinopiridinio.

Dentro de este apartado se han obtenido cuatro tipos de productos intermedios (**Esquema 4.7**) que se diferencian entre sí por el tipo de espaciador que presenta cada uno.



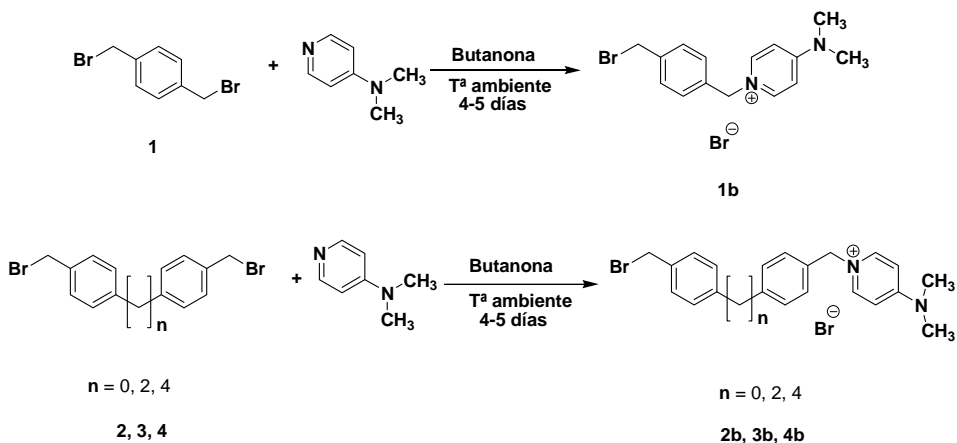
Esquema 4.7.-Esquema general para la reacción de formación de los productos intermedios derivados de sales de pirrolidinopiridinio.

La síntesis de Bromuro de 1-[4-(bromometil)benzil]-4-(1-pirrolidin-1-il)piridinio (**1a**), Bromuro de 1-[[4'-(bromometil)bifenil-4-il]metil]-4-(pirrolidin-1-il)piridinio (**2a**), Bromuro de 1-{4-[2-(4-bromometilfenil)-etil]-benzil-4-(pirrolidin-1-il)piridinio (**3a**) y Bromuro de 1-{4-[4-(4-bromometil-fenil)-butil]-benzil}-4-(pirrolidin-1-il)piridinio (**4a**) se produce por medio de un mecanismo S_N2 mediante la reacción entre la 4-pirrolidinapiridina y el espaciador correspondiente, en relación molar 1:2, usando butanona como disolvente a temperatura ambiente³.

En esta reacción el disolvente juega un papel fundamental ya que se parte de productos que son solubles en él, mientras que el producto que se obtiene es insoluble y va precipitando conforme va formándose, ayudando de esta forma a la purificación del mismo y a que no se de la bisustitución de los dos átomos de bromo.

4.1.4.2.- Síntesis de derivados de sales de dimetilaminopiridinio.

Se obtienen aquí otros cuatro productos intermedios (**Esquema 4.8**), los cuáles servirán para la obtención de doce productos finales.



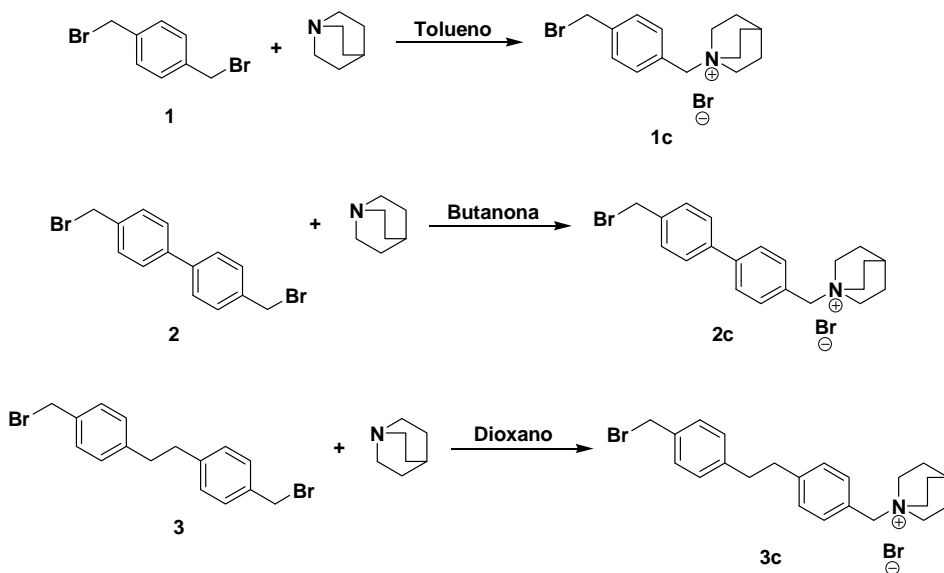
Esquema 4.8.-Esquema general para la formación de los productos intermedios derivados de sales de dimetilaminopiridinio.

La obtención de Bromuro de 1-[4-(bromometil)encil]-4-(dimetilamino)piridinio (**1b**), Bromuro de 1-[[4'-(bromometil)bifenil-4-il]metil]-4-(dimetilamino)piridinio (**2b**), Bromuro de 1-(4-{2-[4-(bromometil)fenil]etil}fenil)-4-(dimetilamino)piridinio (**3b**) y Bromuro de 1-(4-{4-[4-(bromometil)fenil]butil}encil)-4-(dimetilamino)piridinio (**4b**) se realiza mediante el procedimiento anteriormente descrito en el apartado 4.1.4.1.

4.1.4.3.- Síntesis de derivados de sales de quinuclidinio.

En este apartado se han obtenido tres productos intermedios (**Esquema 4.9**) que darán lugar a la obtención de nueve productos finales.

En este caso también se ha usado como disolvente la butanona, siguiendo los criterios establecidos con anterioridad por nuestro grupo de investigación³. Sin embargo los resultados obtenidos no han sido los deseados. Esto nos ha conducido a realizar la reacción en nuevas condiciones que se detallan a continuación.



Esquema 4.9.-Esquema general para la obtención de los productos intermedios derivados de sales de quinuclidina.

Para la síntesis de los compuestos intermedios derivados de sales de quinuclidinio se realizaron varias pruebas. El disolvente desarrolla un papel fundamental pues se observa que cuanto mayor lipofilia presentan los productos intermedios mayor es la polaridad del disolvente que debemos utilizar para que el producto deseado precipite.

Con objeto de dar una visión más global de lo sucedido se presenta la tabla siguiente (**Tabla 4.1**).

Tabla 4.1.- Condiciones de reacción para la obtención de derivados de sales de quinuclidina.

OBTENCIÓN DE COMPUESTO	CONDICIONES DE REACCIÓN				% DE PRODUCTOS OBTENIDOS	
	Disolvente	Constante dielectrica	Tiempo	Temperatura	Monocatiónico	Biscatiónico
1c	Butanona	2,7	6 días	ambiente	50	50
	Butanona	2,7	3 días	ambiente	70	30
	Butanona	2,7	6 horas	ambiente	70	30
	Butanona	2,7	15 min	0°C	80	20
	Butanona	2,7	1 hora	-30°C	80	20
	Acetonitrilo	37	4 días	ambiente	-----	30
	Tolueno	2,4	6 días	ambiente	100	----- -
2c	Butanona	2,7	6 días	ambiente	84	----- -
	Butanona	2,7	7 días	ambiente	88	----- -
3c	Butanona	2,7	6 días	ambiente	-----	40,36
	Tolueno	2,4	6 días	ambiente	-----	10
	Acetonitrilo	37	6 días	ambiente	-----	----- -
	1,4-Dioxano	2,3	6 días	ambiente	95	----- -

En la síntesis de Bromuro de 1-(4-bromometilbencil)-1-quinuclidina (**1c**) se observó que, al usar butanona como disolvente a Tª ambiente durante 6 días, se obtenía una mezcla de producto biscatiónico y monocatiónico con una relación 50:50%. Por ello, creyendo que el tiempo de reacción era la causa de esta mezcla, se decidió disminuirlo (3 días), obteniéndose de esta manera una mezcla de producto biscatiónico y monocatiónico en relación 30:70% respectivamente.

Posteriormente se varió el tiempo de reacción a un tiempo aún menor (6 horas), pero el resultado no varió. Viendo lo anteriormente observado se decidió hacer una adición gota a gota en frío durante 15 minutos y otra a -30°C durante 1 hora, obteniéndose de esta manera una mezcla de producto biscatiónico-monocatiónico 20:80% en ambos casos. Con los resultados obtenidos se procedió a cambiar a un disolvente algo más polar que el anterior, y se sustituyó este último por acetonitrilo, el cuál favoreció la introducción de la cabeza catiónica por ambos bromos, dando lugar al producto final biscatiónico (**SOS-30**) con un rendimiento del 30%. Se decidió entonces utilizar un disolvente algo más polar que la butanona pero menos polar que el acetonitrilo, eligiéndose el tolueno, el cuál favoreció la introducción de la cabeza catiónica tan solo por uno de los dos bromos, dando lugar al producto intermedio monocatiónico deseado con un rendimiento del 100%.

Para la síntesis de Bromuro de 1-(4''-bromometilbifenil-4-ilmetil)-1-quinuclidinio (**2c**), se utilizó en un primer momento butanona, obteniéndose el producto intermedio monocatiónico deseado con un rendimiento del 84%. Este resultado nos ofrecía un rendimiento que consideramos óptimo y por ello no se continuó con más pruebas.

Por último para la síntesis de Bromuro de 1-{4[2-(4-bromometilfenil)etil]bencil}-1-quinuclidina (**3c**) se observó que, al utilizar butanona como disolvente de la reacción durante 6 días y a Tº ambiente, se favorecía la introducción de la cabeza catiónica por ambos bromos dando lugar al producto final biscatiónico (**SOS-32**). Por tanto se cambió el disolvente anterior por tolueno dando lugar al mismo fenómeno y se decidió usar un disolvente más polar que el anterior, el acetonitrilo, el cuál no dio lugar a ninguno de los productos. Así, se cambió el disolvente por uno menos polar que el anterior pero más polar que la butanona y se optó por el dioxano, obteniéndose de esta manera el producto intermedio monocatiónico deseado con un rendimiento del 95%.

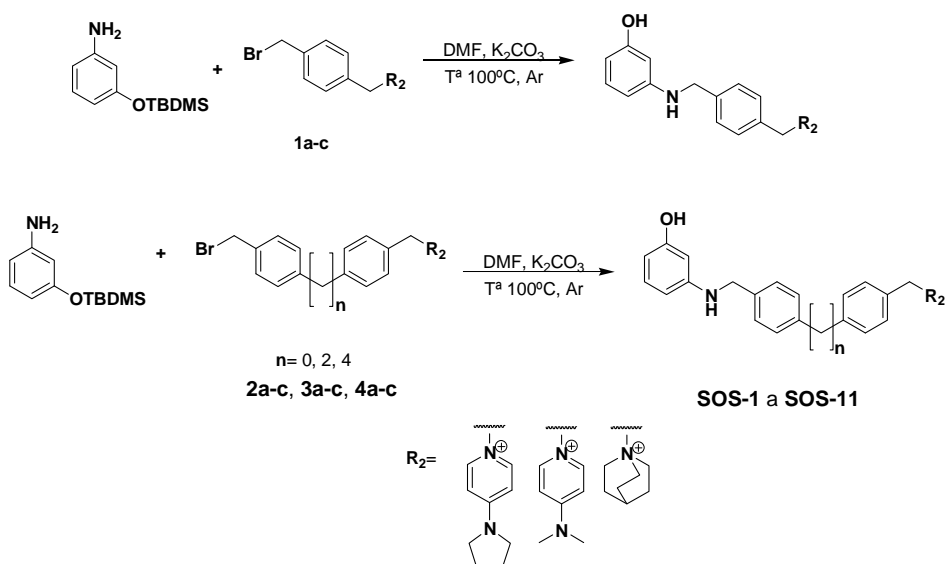
El intermedio de 4 carbonos se intentó en acetonitrilo, butanona y dioxano. La reacción no tuvo lugar, obteniéndose el espaciador sin reaccionar. Por ello no se pudo sintetizar este compuesto.

En resumen puede observarse como aquellos compuestos monocatiónicos que no presentan ninguna cadena alquílica en el espaciador y por tanto son los menos lipófilos, precipitan cuando el disolvente utilizado es no polar como es el tolueno (**1c**) y a medida que aumenta la lipofilia del compuesto, en este caso con la introducción de un grupo arilo y un grupo arilalquilo (**2c** y **3c**), es necesaria la utilización de disolventes polares apróticos como son la butanona y el 1,4-dioxano, para que el compuesto deseado precipite al ir formándose.

4.1.5. Síntesis química de los compuestos finales monocatiónicos (Familia A).

4.1.5.1. Síntesis de la Subfamilia A₁: Derivados Fenólicos.

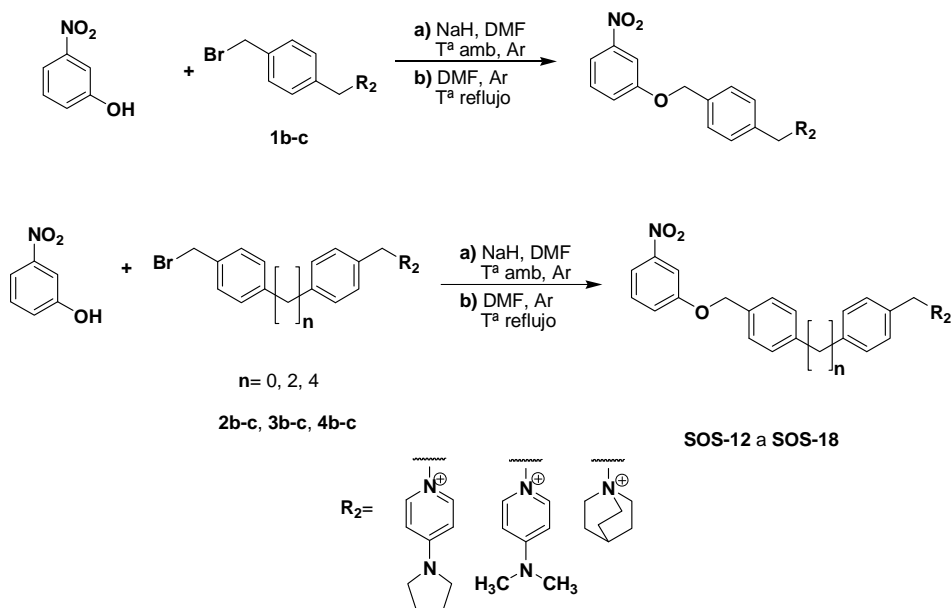
La síntesis de los derivados fenólicos de los compuestos monocatiónicos se lleva a cabo mediante la protección inicial del grupo hidroxilo del 3-aminofenol. Posteriormente se hace reaccionar éste con el producto intermedio correspondiente, en caliente y en presencia de carbonato potásico en relación 1,2:1:1, usando como disolvente dimetilformamida. La reacción se lleva a cabo a 110°C y bajo atmósfera de argón (**Esquema 4.10**). Es interesante destacar que en esta reacción se obtiene el producto final ya desprotegido, debido probablemente a la temperatura y la presencia de KHCO_3 formado por la reacción del grupo amino con el K_2CO_3 , que actúa en este caso de medio suficientemente ácido para facilitar la hidrólisis del grupo protector.



Esquema 4.10.- Síntesis de los compuestos monocatiónicos derivados fenólicos.

4.1.5.2. Síntesis de la Subfamilia A₂: Derivados Nitrados.

La obtención de los derivados nitrados de los compuestos monocatiónicos se lleva a cabo usando como disolvente dimetilformamida, mediante la adición de hidruro sódico al 3-nitrofenol bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente. Posteriormente se adiciona el intermedio monocatiónico correspondiente en caliente, en relación molar 2:1,2:1. La reacción se realiza bajo atmósfera de argón y a temperatura de reflujo (**Esquema 4.11**).

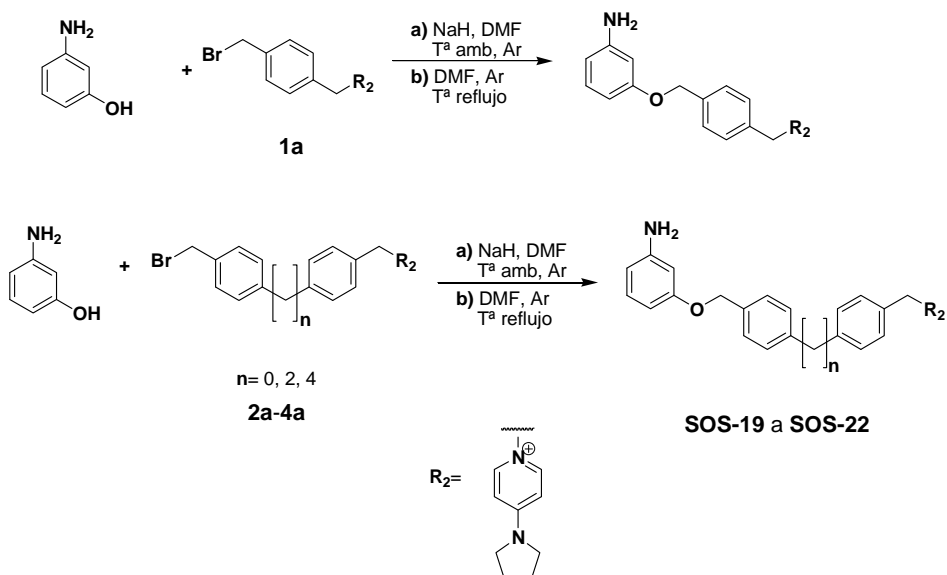


Esquema 4.11.-Síntesis de los compuestos monocatiónicos derivados nitrados.

4.1.5.3. Síntesis de la Subfamilia A₃: Derivados Amínicos.

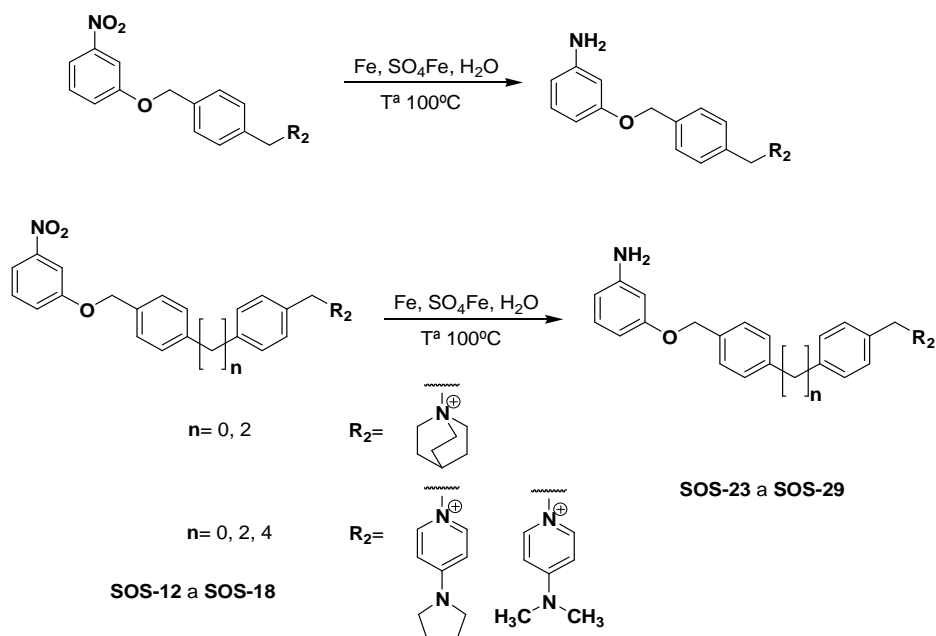
Para la síntesis de los derivados amínicos de los compuestos monocatiónicos se han realizado dos tipos de procedimientos diferentes, con el objetivo de conseguir una mejora en el rendimiento de los mismos.

Los productos derivados amínicos que presentan como cabeza catiónica pirrolidinopiridinio se han sintetizado tratando el 3-aminofenol con hidruro sódico en dimetilformamida a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón en relación molar 1:4. Una vez formado el fenóxido, se adiciona en caliente el correspondiente producto intermedio, en relación molar 1:1. Por último la mezcla de la reacción se calienta a reflujo y bajo atmósfera de argón durante 19 horas (**Esquema 4.12**).



Esquema 4.12.- Síntesis de los derivados amínicos de los compuestos monocatiónicos con cabeza catiónica pirrolidinapiridinio.

Los derivados amínicos con cabeza catiónica dimetilaminopiridinio y quinuclidinio se sintetizaron mediante la previa obtención del producto final monocatiónico nitrado y su posterior reducción en presencia de sulfato ferroso e hierro en polvo, usando agua como disolvente de reacción y fuente de protones (**Esquema 4.13**).



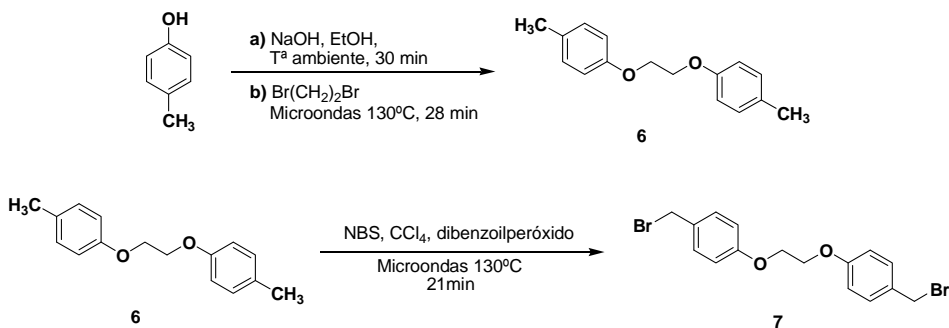
Esquema 4.13.- Síntesis de los derivados amínicos de los compuesto monocatiónicos con cabeza catiónica dimetilaminopiridinio y quinuclidinio.

El cambio de procedimiento realizado para los productos pertenecientes a la serie 2 y serie 3 de la Subfamilia A₃, donde se sustituye el 3-aminofenol por el 3 nitrofenol, se debió fundamentalmente a la observación de una mejoría, tanto en el rendimiento como en la purificación de los productos obtenidos.

4.1.6.- Síntesis química del espaciador (Familia B).

Dentro de esta familia se han empleado 5 tipos diferentes de espaciadores, de los cuáles, 4 de ellos han sido ya descritos en el apartado 4.1.3 (1, 2, 3 y 4).

La síntesis del 1,2-bis(*p*-bromometilfenoxi)etano (7) tiene lugar en dos pasos. En un primer paso se sintetiza el 1,2-bis(*p*-metilfenoxi)etano (6), utilizando para ello *p*-cresol, el cual se hace reaccionar con hidruro sódico en etanol a temperatura ambiente para generar el fenóxido correspondiente. Posteriormente se adiciona 1,2-dibromoetano y la mezcla se hace reaccionar en microondas a una temperatura de 30°C durante 28 minutos. Esta reacción ha sido previamente optimizada en nuestro laboratorio. En un segundo paso se realiza una halogenación bencílica de tipo radicalario del compuesto (6) con N-bromosuccinimida y peróxido de dibenzoilo como catalizador^{4,5} (Esquema 4.14).

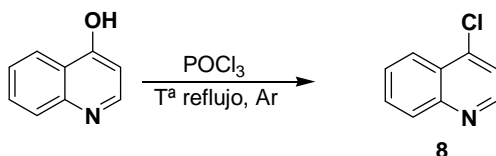


Esquema 4.14.- Preparación del 1,2-bis(*p*-bromometilfenoxi)etano (7).

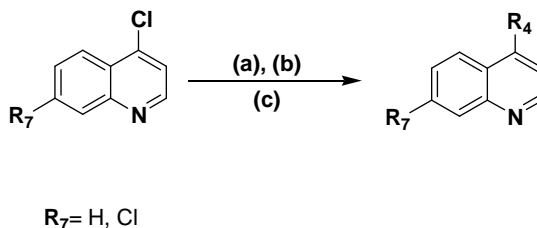
4.1.7.- Síntesis química de las cabezas catiónicas (Familia B).

Dentro de esta familia han sido empleadas 10 cabezas catiónicas, de las cuales, la 4-pirrolidinopiridina (9), la dimetilaminopiridina (10), la quinclidina (11) y 3-hidroxiquinclidina (12) son asequibles comercialmente. Para el grupo de las quinolinas, la ruta sintética seguida ya ha sido descrita⁶. Ésta se divide en dos pasos.

Paso 1: en primer lugar, la obtención de la 4-cloroquinolina (**8**) a partir de la 4-hidroxiquinolina comercial, mediante el tratamiento con POCl₃.



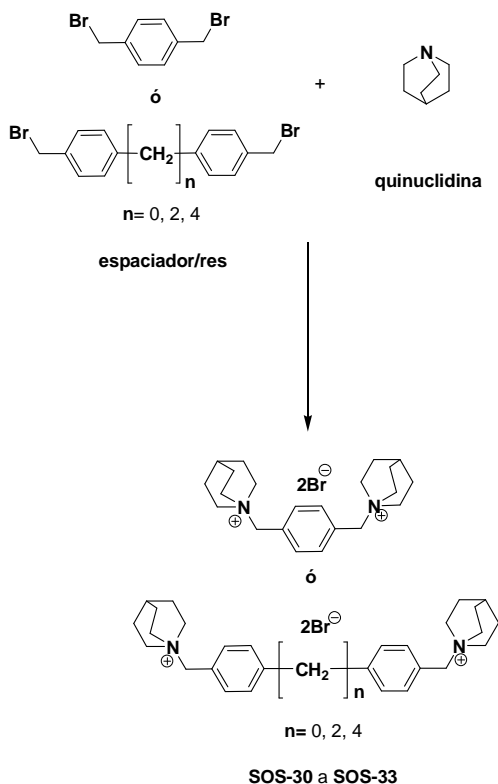
Paso 2: en segundo lugar, la introducción de las distintas aminas por diferentes procedimientos dependiendo de la naturaleza de éstas (a, b y c).



- (a) Perhidroazepina/reflujo/argón (compuesto **13**, R₄= perhidroazepino; R₇= H)
- (b) R₄MeNH/AcOH glacial/reflujo/argón (compuestos **14**, **15**, **16** y **17**, R₄= N-metilanilino y 4-cloro-N-metilanilino; R₇= H, Cl; respectivamente).
- (c) R₄NH/AcOH glacial/reflujo (compuestos **18** y **19**, R₄= pirrolidina, perhidroazepino ; R₇= Cl).

4.1.8.- Síntesis química de los compuestos finales biscatiónicos (Familia B).

La síntesis de los compuestos biscatiónicos finales de la Subfamilia B₂ y B₃ se lleva a cabo bajo atmósfera de argón por calentamiento del derivado dibromado con la estructura nitrogenada correspondiente (quinolinas, quinuclidinas y piridinas 4-sustituidas), en relación molar 1:2, usando como disolvente acetonitrilo. La reacción para la Subfamilia B₁ se realiza a temperatura ambiente durante 6 días (**Esquema 4.15, 4.16 y 4.17**).

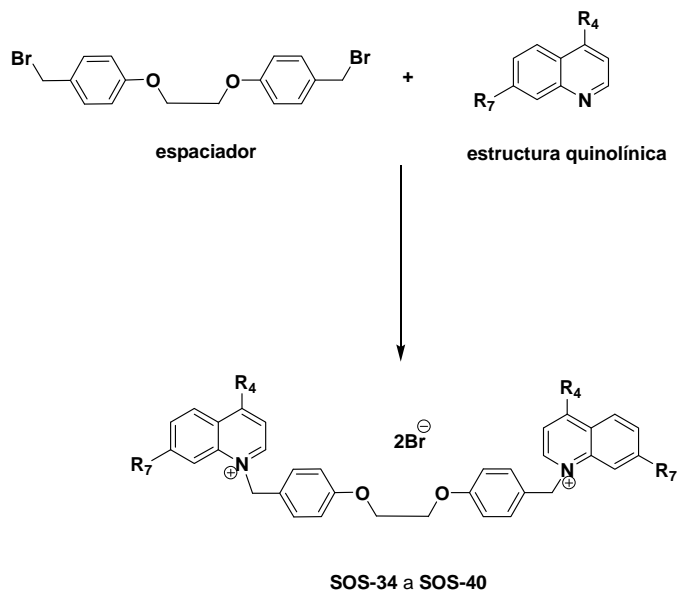


Esquema 4.15.- Síntesis de los compuestos biscatiónicos de la Subfamilia B₁.

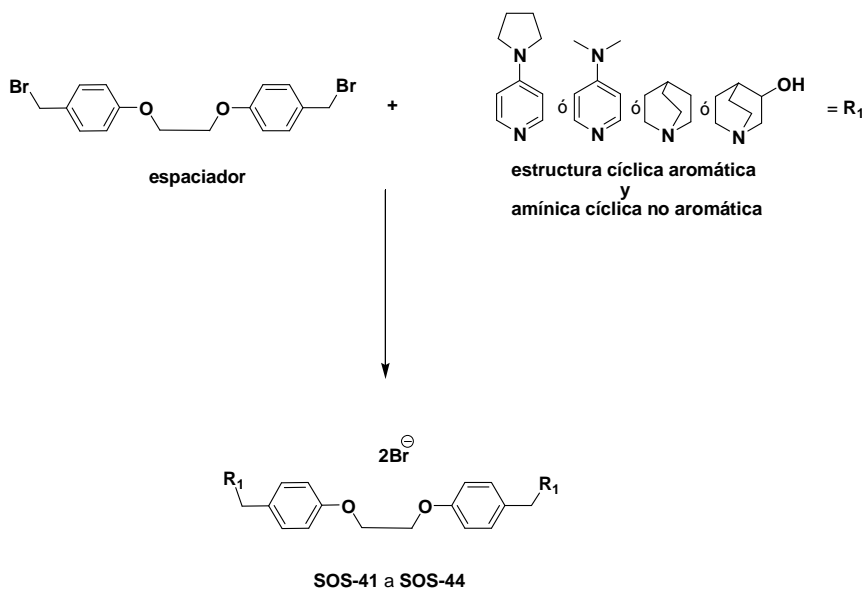
Como se puede observar, la Subfamilia B₁ presenta 4 tipos de espaciadores diferentes, lo que incrementa la distancia entre las cabezas catiónicas quinuclidínicas y la lipofilia. Las Subfamilias B₂ y B₃ presentan el mismo espaciador, siendo las diferencias entre las mismas la naturaleza de las cabezas catiónicas. En estas subfamilias el espaciador presenta 2 átomos de oxígeno en la cadena alquímica, lo cual hace que las estructuras sean más polares que las anteriores.

La síntesis de la Subfamilia B₁ ha sido realizada para completar la serie de compuestos biscatiónicos ya realizados con anterioridad por nuestro grupo de investigación⁷, con el fin de comprobar, corroborar y completar los resultados que en su día fueron puestos de manifiesto

por este tipo de compuestos y ver si con este tipo de cabeza catiónica existe una mejora en la actividad frente a ChoK.



Esquema 4.16.- Síntesis de los compuestos biscatiónicos de la Subfamilia B₂.



Esquema 4.17.- Síntesis de los compuestos biscatiónicos de la Subfamilia B₃.

4.2.- Análisis espectroscópico de los compuestos finales sintetizados.

Todos los compuestos finales sintetizados se han identificado mediante espectroscopía de RMN, tanto ^1H (300 MHz, 400 MHz, 500 MHz o 600 MHz) como ^{13}C (75 MHz, 100 MHz, 126 MHz y 151 MHz) y espectrometría de masas de alta resolución: HRMS (LSIMS, *acrónimo de Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry*). También se han realizado estudios de resonancia bidimensional $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN tipo HSQC (*Heteronuclear Single-Quantum Correlation*), en los que se asigna a cada carbono su protón correspondiente y viceversa, y HMBC (*Heteronuclear Multi-Bond Correlation*), que permiten establecer las correlaciones a larga distancia entre los distintos átomos de carbono e hidrógeno.

Para facilitar el análisis sistemático, la división de los productos es la que aparece descrita en las consideraciones generales (véase apartado 4.1.1). Así, los datos espectroscópicos de los 44 compuestos finales aparecen recogidos en las **Tablas 4.2 a 4.30**. En todas ellas, los valores descritos en la primera línea indican los desplazamientos químicos y la multiplicidad de las señales entre paréntesis mientras que en la segunda línea los valores en cursiva corresponden a las constantes de acoplamiento en Hz. El aspecto y la multiplicidad de las señales se indican mediante las siguientes abreviaturas: s, singlete; sa, singlete ancho; d, doblete; dd, doblete; ddd, doblete doblete; t, triplete; dt, doblete triplete y m, multiplete.

La estructura general de estos compuestos se divide, en el caso de los compuestos finales monocatiónicos, en tres fragmentos para facilitar el análisis de los mismos: a) el anillo aminofenólico, b) el espaciador y c) la cabeza catiónica. En el caso de los compuestos finales biscatiónicos se divide en dos: a) las cabezas catiónicas y b) el espaciador.

4.2.1.- Análisis espectroscópico de ^1H -RMN de los compuestos finales monocatiónicos no simétricos (Familia A).

El análisis espectroscópico de los veintinueve compuestos finales de esta familia se ha subdividido en cada una de las Subfamilias (A_1 , A_2 y A_3) y diferentes series (1, 2 y 3) que se han descrito en las consideraciones generales.

4.2.1.1.- Análisis espectroscópico de ^1H -RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A_1 .

Dentro de esta Subfamilia se presentan los compuestos finales **SOS-1 a SOS-11**, derivados fenólicos de los compuestos monocatiónicos no simétricos.

Los datos espectroscópicos de ^1H -RMN correspondientes a las series 1, 2 y 3 (derivados de sales de pirrolidinopiridinio, derivados de sales de dimetilaminopiridinio y derivados de sales de quinuclidinio), se muestran resumidos en las **Tablas 4.2, 4.3 y 4.4**. Todos estos espectros se han realizado utilizando como disolvente metanol o dimetilsulfóxido deuterado y son concordantes con las estructuras propuestas.

Como se puede observar en la **Tabla 4.2**, productos pertenecientes a la **serie 1** de la **Subfamilia A1 (SOS-1 a SOS-4)**, los protones pertenecientes al anillo aminofenólico aparecen a un desplazamiento químico que oscila entre 6.01-6.87 ppm. Es posible apreciar cómo debido al efecto mesomero +M del grupo hidroxilo (OH) y amino (NH), las señales de los átomos de hidrógeno correspondientes a H-2_{ph}, H-4_{ph} y H-6_{ph} aparecen a un campo ligeramente más alto que H-5_{ph}. La señal correspondiente al átomo H-2_{ph} resuena como un singlete, en los compuestos **SOS-1**, **SOS-3** y **SOS-4**, a un desplazamiento químico que oscila entre 6.02-6.08 ppm, mientras que en el compuesto **SOS-2** aparece como un triplete a un desplazamiento químico de 6.09 ppm con una constante de acoplamiento de 2.2 Hz.

Por otro lado, las señales correspondientes a los átomos H-4_{ph} y H-6_{ph}, podrían ser intercambiables ya que tras los estudios de HMBC y HSQC no se han podido identificar de manera inequívoca. Estas señales resuenan en todos los compuestos de la serie en torno a δ 6.01-6.15 ppm, siendo probablemente las correspondientes al átomo H-4_{ph} las que aparecen a un campo ligeramente más bajo debido a la mayor influencia del efecto inductivo -I del oxígeno del grupo hidroxilo, más próximo a este último. Estas señales aparecen como dobletes en **SOS-1** y **SOS-3** con una constante de acoplamiento de 10.0 Hz, doble doblete en **SOS-4** con unas constantes de acoplamiento de 1.8 y 8.0 Hz y doble doblete en **SOS-2** con unas constantes de 0.9, 2.2 y 8.1 Hz. En cuanto a los átomos H-5_{ph} aparecen en todos los compuestos como un triplete a un campo que oscila entre 6.80-6.87 ppm, teniendo en los compuestos **SOS-1**, **SOS-2**, **SOS-3** y **SOS-4** unas constantes de acoplamiento entre 8.3 y 8.0 Hz.

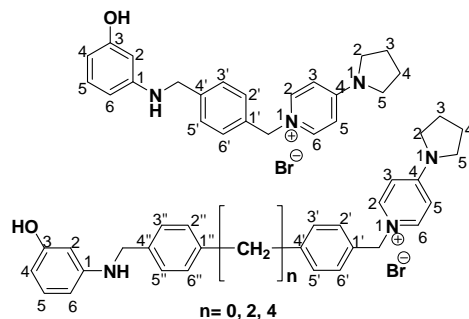
Los átomos de hidrógeno correspondientes a los diferentes espaciadores arilalquílicos (H-2',6'; H-3',5'; H-2'',6''; H-3'',5''), se puede observar como las señales correspondientes a los átomos de hidrógeno aromáticos resuenan a un campo que oscila entre 6.98-7.53 ppm. La mayoría de la señales aparecen como un doblete, concordante con los anillos *p*-sustituidos, en todos los compuestos excepto en **SOS-2**, donde las señales de H-3',5' y H-2'',6'' se solapan apareciendo como un multiplete.

Los átomos de hidrógeno de los metilenos correspondientes a los de unión con la cabeza catiónica y el anillo aminofenólico (CH₂-N⁺ y CH₂-NH) presentan un desplazamiento químico diferente según el átomo o grupo que enlaza con ellos; así los átomos de hidrógeno del metileno que enlazan el correspondiente espaciador con la cabeza catiónica (CH₂-N⁺) aparecen como un singlete a un campo que oscila entre 5.20-5.35 ppm, mientras que los átomos de hidrógeno del otro metileno que enlazan el anillo aminofenólico con el correspondiente espaciador mediante un enlace amínico (CH₂-NH) aparecen a un campo más alto que oscila entre 4.14-4.24 ppm. Las señales de los CH₂-N⁺ aparecen, como era previsible, a campo más bajo que los unidos al grupo NH, debido al efecto desapantallante del nitrógeno positivo.

Con respecto a los átomos de hidrógeno de la cabeza catiónica pirrolidinopiridinio, se observa que las señales de los átomos de hidrógeno de la piridina (H-2,6_{pyr} y H-3,5_{pyr}) aparecen como un doblete a un desplazamiento químico que oscila entre 6.71-8.18 ppm, siendo los átomos H-2,6_{pyr}, más próximos al nitrógeno positivo, los que aparecen más desapantallados (δ = 8.04-8.18 ppm), con una constante de acoplamiento con H-3,5_{pyr} de 7.6 Hz para **SOS-1** y **SOS-4** y de 7.8 Hz para **SOS-2** y **SOS-3**. Por otro lado, los átomos de hidrógeno H-3,5_{pyr} aparecen como un doblete a un campo más alto que oscila entre 6.71-6.81 ppm, en todos los compuestos. Por

último, los átomos de hidrógeno correspondientes a la pirrolidina (H-2,5_{pirr} y H-3,4_{pirr}) aparecen como un multiplete a campo más alto, siendo los átomos H-2,5_{pirr}, más próximos al átomo de nitrógeno, los que aparecen a campo ligeramente más bajo, que oscila entre 3.40-3.57 ppm, mientras que H-3,4_{pirr} aparecen a un desplazamiento químico que oscila entre 1.98-2.14 ppm.

Tabla 4.2.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J, Hz) de $^1\text{H-RMN}$ de los compuestos finales **SOS-1** a **SOS-4** (Subfamilia **A1- serie 1**).



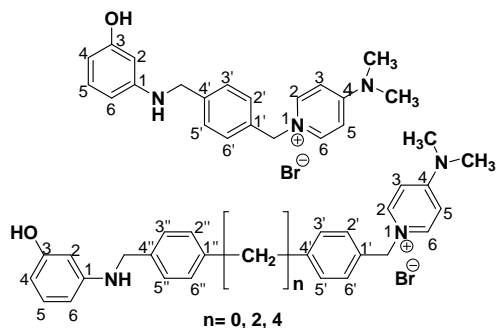
Cabeza catiónica				
Espaciador				
Compuesto	SOS-1(OH)	SOS-2(OH)	SOS-3(OH)	SOS-4(OH)
δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
H-5 _{ph}	6.81 (t) 8.3	6.87 (t) 8.0	6.80 (t) 8.3	6.86 (t) 8.0
H-2 _{ph}	6.03 (s)	6.09 (t) 2.2	6.02 (s)	6.08 (s)
H-4 _{ph} O 6 _{ph}	6.08 (d) 10.0	6.15 (ddd) 8.1, 2.2, 0.9	6.07 (d) 10.0	6.14 (dd) 8.0, 1.8
H-6 _{ph} O 4 _{ph}	6.02 (d) 10.0	6.06 (ddd) 8.1, 2.2, 0.9	6.01 (d) 10.0	6.06 (dd) 8.0, 1.8
H-2',6'	7.31 (d) 8.2	7.63 (d) 8.3	7.19 (d) 8.1	7.19 (d) 8.0
H-3',5'	7.39 (d) 8.2	7.48-7.38 (m)	7.11 (d) 8.1	7.25 (d) 8.0
H-2'',6''	-----		6.98 (d) 8.1	7.22 (d) 7.9
H-3'',5''	-----	7.53 (d) 8.4	7.15 (d) 8.1	7.05 (d) 7.9
H-2,6 _{pyr}	8.14 (d) 7.6	8.18 (d) 7.8	8.04 (d) 7.8	8.14 (d) 7.6
H-3,5 _{pyr}	6.76 (d) 7.6	6.81 (d) 7.8	6.71 (d) 7.8	6.80 (d) 7.6
H-2,5 _{pirr}	3.55-3.40 (m)	3.56-3.46 (m)	3.43 (m)	3.57-3.46 (m)
H-3,4 _{pirr}	2.12-2.02 (m)	2.13-2.03 (m)	2.03 (m)	2.14-1.98 (m)
CH ₂ -N ⁺	5.28 (s)	5.35 (s)	5.20 (s)	5.27 (s)
CH ₂ -NH	4.24 (s)	4.30 (s)	4.14 (s)	4.20 (s)
4H(2CH ₂)	-----	-----	2.80 (m)	2.67-2.52 (m)
4H(2CH ₂)	-----	-----	-----	1.67-1.47 (m)

Los datos espectroscópicos de ^1H -RMN recogidos en la **Tabla 4.3** son los correspondientes a los compuestos finales **SOS-5** a **SOS-8** (**serie 2**). Apenas presentan variación en las señales correspondientes al anillo aminofenólico y en las correspondientes a los espaciadores con respecto a los compuestos anteriormente comentados. Cabe destacar la aparición de las señales correspondientes al grupo OH del anillo aromático y al grupo NH que enlaza con el espaciador en el compuesto **SOS-6**, debido al cambio de disolvente utilizado en la caracterización de este compuesto (dimetilsulfóxido) con la consiguiente mejora en la resolución del espectro. Así la señal del hidrógeno correspondiente al grupo OH aparece como un singlete ancho en un desplazamiento químico de 8.87 ppm, mientras que la señal correspondiente al hidrógeno del enlace amínico (NH) aparece como un triplete a un campo de 6.16 ppm con una constante de acoplamiento de 6.0 Hz.

En cuanto a las señales correspondientes a la dimetilaminopiridina hay un ligero desplazamiento a campo más bajo de los átomos de hidrógeno H-3,5_{pyr}. Así los hidrógenos H-3,5_{pyr} aparecen como una señal doblete con un desplazamiento químico que oscila entre 6.90-7.06 ppm y una constante de acoplamiento de 7.9 Hz, excepto en el compuesto **SOS-6**, donde la constante de acoplamiento es de 7.8 Hz. Por otro lado, los grupos metilos (CH₃) de la dimetilamina, aparecen como un singlete a un campo alto que oscila entre 3.17-3.21 ppm.

En las señales de ^1H -RMN correspondientes a los derivados fenólicos **SOS-9** a **SOS-11** (**serie 3**) (**Tabla 4.4**), cabe destacar la variación que presentan algunas señales, debido a la falta de deslocalización de la carga positiva y el menor efecto desapantallante que presenta la carga positiva del nitrógeno cuaternario con respecto a los sistemas aromáticos. Así, la señal que corresponde a los hidrógenos que enlazan con la cabeza catiónica (CH₂-N⁺) aparece a un campo más alto (que en los compuestos con sistemas piridínicos) que oscila entre 4.34-4.47 ppm.

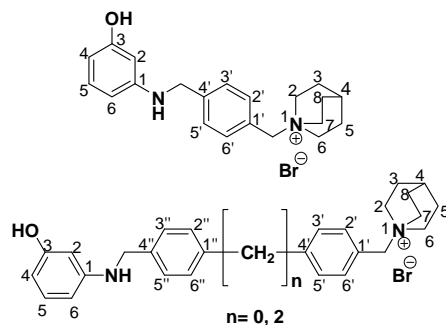
Por otro lado, las señales correspondientes a la quinuclidina, al ser un sistema completamente saturado, aparecen a un desplazamiento químico típico de alcanos y al ser completamente simétrico, aparecen iguales de tres en tres (H-2,6,7_q y H-3,5,8_q) exceptuando el protón H-4_q que aparece de forma aislada. Estas señales resuenan como multipletes, siendo los protones vecinos al nitrógeno, H-2,6,7_q, los que aparecen a un desplazamiento químico algo más bajo entre 3.34-3.53 ppm. Los átomos de hidrógeno H-3,5,8_q aparecen a un campo más alto que oscila entre 1.80-1.96 ppm. Por último el átomo de hidrógeno H-4_q aparece a un desplazamiento químico de 2.03-2.12 ppm.

Tabla 4.3.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J , Hz) de $^1\text{H-RMN}$ de los compuestos finales **SOS-5** a **SOS-8** (Subfamilia **A1- serie 2**).

Cabeza catiónica				
Espaciador				
Compuesto	SOS-5(OH) δ (ppm)	SOS-6 (OH) * δ (ppm)	SOS-7(OH) δ (ppm)	SOS-8(OH) δ (ppm)
OH	-----	8.87 (sa)	-----	-----
H-5 _{ph}	6.83 (t) 9.0	6.79 (t) 7.9	6.83 (t) 8.3	6.85 (t) 7.9
H-2 _{ph}	6.05 (s)	5.99 (t) 2.1	6.07 (s)	6.09 (t) 2.1
H-4 _{ph} O 6 _{ph}	6.10 (d) 7.2	6.04 (dd) 7.9, 1.8	6.11 (d) 2.2	6.13 (ddd) 8.0, 2.2, 0.8
H-6 _{ph} O 4 _{ph}	6.02 (d) 7.2	5.95 (dd) 8.0, 2.2	6.04 (d) 2.3	6.06 (ddd) 7.8, 2.3, 0.9
NH	-----	6.16 (t) 6.0	-----	-----
H-2',6'	7.32 (d) 8.4	7.47 (d) 8.2	7.19 (d) 8.1	7.21 (d) 8.2
H-3',5'	7.40 (d) 8.4	7.69 (d) 8.2	7.14 (d) 8.1	7.17 (d) 8.2
H-2'',6''	-----	7.60 (d) 8.3	7.01 (d) 8.2	7.03 (d) 8.1
H-3'',5''	-----	7.42 (d) 8.3	7.24 (d) 8.2	7.26 (d) 8.1
H-2,6 _{pyr}	8.19 (d) 7.9	8.45 (d) 7.8	8.11 (d) 7.9	8.14 (d) 7.9
H-3,5 _{pyr}	6.95 (d) 7.9	7.06 (d) 7.8	6.89 (d) 7.9	6.90 (d) 7.9
2CH ₃	3.21 (s)	3.18 (s)	3.17 (s)	3.18 (s)
CH ₂ -N ⁺	5.32 (s)	5.44 (s)	5.25 (s)	5.27 (s)
CH ₂ -NH	4.27 (s)	4.24 (s)	4.17 (s)	4.18 (s)
4H(2CH ₂)	-----	-----	2.83 (m)	2.57 (m)
4H(2CH ₂)	-----	-----	-----	1.57 (m)

(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

Tabla 4.4.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J, Hz) de ^1H -RMN de los compuestos finales **SOS-9** a **SOS-11** (Subfamilia A1- serie 3).



Cabeza catiónica			
Espaciador			
Compuesto	SOS-9 (OH) * δ (ppm)	SOS-10 (OH) * δ (ppm)	SOS-11(OH) δ (ppm)
OH	8.89 (sa)	8.88 (sa)	-----
H-5 _{ph}	6.80 (t) 7.9	6.80 (t) 7.6	6.88 (t) 8.2
H-2 _{ph}	5.98 (s)	6.01 (s)	6.04-6.19 (m)
H-4 _{ph} o 6 _{ph}	6.03 (d) 8.1	6.05 (d) 6.8	
H-6 _{ph} o 4 _{ph}	5.96 (d) 7.9	5.96 (d) 8.3	
NH	6.20 (t) 6.0	6.18 (t) 5.9	-----
H-2',6'	7.48-7.41 (m)	7.58 (d) 8.4	7.45-7.02 (m)
H-3',5'		7.77 (d) 8.4	
H-2'',6''	-----	7.66 (d) 8.2	
H-3'',5''	-----	7.45 (d) 8.2	
H-2,6,7 _q	3.41-3.34 (m)	3.45 (m)	3.53-3.38 (m)
H-3,5,8 _q	1.87-1.80 (m)	1.86 (m)	1.96 (m)
H-4 _q	2.03 (m)	2.04 (m)	2.12 (m)
CH ₂ -N ⁺	4.36 (s)	4.47 (s)	4.34 (d) 14.4
CH ₂ -NH	4.26 (d) 6.0	4.25 (d) 5.9	4.22 (s)
4H(2CH ₂)	-----	-----	2.92 (m)

(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

4.2.1.2.- Análisis espectroscópico de ^1H -RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A₂.

Dentro de esta Subfamilia se presentan los compuestos finales **SOS-12** a **SOS-18**, derivados nitrados de los compuestos monocatiónicos no simétricos.

Se incluyen aquí los datos espectroscópicos de ^1H -RMN correspondientes a la **serie 1** y **2**, derivados de sales de dimetilaminopiridinio y derivados de sales de quinuclidinio. Las **Tablas 4.5** y **4.6** recogen los desplazamientos químicos (δ , ppm) y las constantes de acoplamiento (J , Hz) de los espectros de estos compuestos en metanol deuterado y son concordantes con las estructuras propuestas.

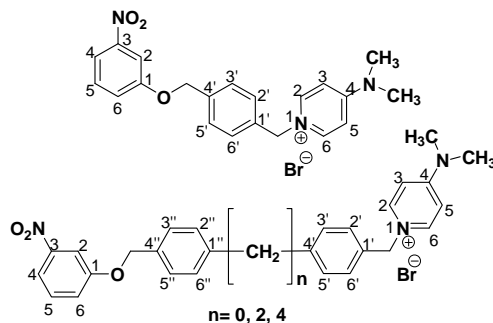
Tampoco se ha podido determinar de manera inequívoca, mediante estudios de HMBC y HSQC, las señales correspondientes a los átomos H-4_{ph} y H-6_{ph}. No obstante, la asignación realizada se basa en la influencia de los grupos vecinales que poseen dichos protones.

Como se puede observar en ambas tablas, el efecto mesómero -M del grupo nitro (NO₂) hace que todas las señales del anillo aromático se vean afectadas, sobre todo aquellas correspondientes a los átomos de hidrógeno H-2_{ph}, H-4_{ph} y H-6_{ph}, desplazándose a un campo más bajo que en el caso de la Subfamilia A₁. Así, los átomos de hidrógeno del anillo aromático (H-2_{ph}, H-5_{ph}, H-4_{ph} y H-6_{ph}) resuenan a un campo bajo que oscila entre 7.35-7.86 ppm. Los átomos de hidrógeno H-2_{ph} y H-4_{ph} aparecen a un campo más bajo que el resto debido a la mayor vecindad del grupo nitro (NO₂). El átomo de hidrógeno H-2_{ph} aparece como un singlete en **SOS-12**, **SOS-13** y **SOS-16**, con un desplazamiento químico que varía entre 7.80-7.85 ppm, mientras que en **SOS-14** y **SOS-18** aparece como un triplete a un campo de 7.74 y 7.80 ppm, respectivamente, y con unas constantes de acoplamiento de 2.3 y 2.2 Hz. En el compuesto **SOS-15** la señal de éste átomo se solapa con las de H-4_{ph}, dando lugar a un multiplete con un desplazamiento químico de 7.75-7.81 ppm, mientras que en el compuesto **SOS-17** aparece como un multiplete aislado a un campo entre 7.82-7.84 ppm.

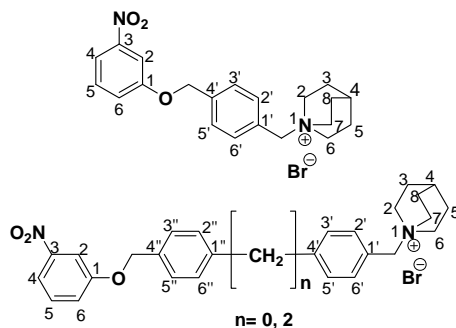
Por otro lado, el átomo de hidrógeno H-5_{ph} aparece en todos los compuestos como un triplete, excepto en **SOS-16** que aparece como un multiplete entre δ 7.51-7.57 ppm. En los compuestos **SOS-14** y **SOS-15** aparece a un desplazamiento químico de 7.48 ppm y con una constante de acoplamiento de 8.1 Hz. Resuena a un campo de 7.52 ppm y con una constante de acoplamiento de 8.1 Hz para **SOS-13**, **SOS-17** y **SOS-18** y a un campo de 7.51 ppm y con una constante de 8.2 Hz para el compuesto **SOS-12**.

La señal de los átomos de hidrógeno del grupo metileno que enlaza el anillo aromático con el espaciador mediante un puente éter (CH₂-O) aparece como un singlete en todos los compuestos con un desplazamiento químico que oscila entre 5.10-5.27 ppm, campo más bajo que en la Subfamilia A₁, ya que el oxígeno ejerce un efecto más despantallante que el grupo NH.

Con respecto a los átomos de hidrógeno correspondientes a las cabezas catiónicas derivados de la dimetilaminopiridina y la quinuclidina (**serie 1** y **serie 2**) hay que decir que resuenan a desplazamientos químicos similares a los de los compuestos precedentes.

Tabla 4.5.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J , Hz) de $^1\text{H-RMN}$ de los compuestos finales **SOS-12** a **SOS-15** (Subfamilia A2- serie 1).


Cabeza catiónica				
Espaciador				
Compuesto	SOS-12(NO₂) δ (ppm)	SOS-13(NO₂) δ (ppm)	SOS-14(NO₂) δ (ppm)	SOS-15(NO₂) δ (ppm)
H-5 _{ph}	7.51 (t) 8.2	7.52 (t) 8.1	7.48 (t) 8.1	7.48 (t) 8.1
H-2 _{ph}	7.80 (s)	7.85 (s)	7.74 (t) 2.3	7.81-7.75 (m)
H-4 _{ph} o 6 _{ph}	7.82 (d) 8.1	7.83 (d) 10.0	7.77 (ddd) 8.0, 2.1, 0.9	
H-6 _{ph} o 4 _{ph}	7.40 (dd) 8.7, 2.3	7.42 (dd) 8.2, 1.9	7.36 (ddd) 8.4, 2.5, 1.0	7.37 (d) 8.2
H-2',6'	7.42 (d) 8.1	7.47 (d) 8.1	7.27 (d) 8.2	7.28 (d) 7.7
H-3',5'	7.55 (d) 8.1	7.71 (d) 8.1	7.19 (d) 8.2	7.20 (d) 7.7
H-2'',6''	-----	7.66 (d) 8.1	7.15 (d) 8.1	7.16 (d) 7.6
H-3'',5''	-----	7.56 (d) 8.1	7.31 (d) 8.1	7.33 (d) 7.6
H-2,6 _{pyr}	8.23 (d) 7.7	8.26 (d) 7.6	8.20 (d) 7.8	8.20 (d) 6.9
H-3,5 _{pyr}	7.00 (d) 7.7	7.02 (d) 7.6	6.97 (d) 7.9	6.97 (d) 7.0
2CH ₃	3.25 (s)	3.25 (s)	3.22 (s)	3.22 (s)
CH ₂ -N ⁺	5.39 (s)	5.42 (s)	5.31 (s)	5.31 (s)
CH ₂ -O	5.23 (s)	5.25 (s)	5.10 (s)	5.12 (s)
4H(2CH ₂)	-----	-----	2.91-2.86 (m)	2.66-2.57 (m)
4H(2CH ₂)	-----	-----	-----	1.60 (m)

Tabla 4.6.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J, Hz) de ^1H -RMN de los compuestos finales **SOS-16** a **SOS-18** (Subfamilia A2- serie 2).

Cabeza catiónica			
Espaciador			
Compuesto	SOS-16(NO ₂) δ (ppm)	SOS-17(NO ₂) δ (ppm)	SOS-18(NO ₂) δ (ppm)
H-5 _{ph}	7.57-7.51 (m)	7.52 (t) 8.1	7.52 (t) 8.2
H-2 _{ph}	7.82 (s)	7.84-7.82 (m)	7.80 (t) 2.2
H-4 _{ph} o 6 _{ph}	7.84 (dd) 2.1, 1.0	7.81 (d) 1.5	7.82 (d) 8.1
H-6 _{ph} o 4 _{ph}	7.43 (ddd) 8.3, 2.3, 1.2	7.42 (dd) 8.3, 2.1	7.39 (dd) 8.3, 2.2
H-2',6'	7.61 (m)	7.61-7.56 (m)	7.36 (m)
H-3',5'		7.78 (d) 8.2	7.31 (d) 8.0
H-2'',6''	-----	7.70 (d) 8.2	7.20 (d) 8.0
H-3'',5''	-----	7.61-7.56 (m)	7.36 (m)
H-2,6,7 _q	3.58-3.48 (m)	3.55-3.48 (m)	3.48-3.39 (m)
H-3,5,8 _q	2.05-1.94 (m)	2.04-1.96 (m)	2.04-1.91 (m)
H-4 _q	2.15 (m)	2.16 (m)	2.15 (m)
CH ₂ -N ⁺	4.47 (s)	4.43 (s)	4.32 (s)
CH ₂ -O	5.27 (s)	5.24 (s)	5.16 (s)
4H(2CH ₂)	-----	-----	2.97 (m)

4.2.1.3.- Análisis espectroscópico de ^1H -RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A₃.

Dentro de esta Subfamilia se incluyen los compuestos finales **SOS-19** a **SOS-29**, derivados amínicos de los compuestos monocatiónicos no simétricos.

Los datos espectroscópicos de ^1H -RMN, tanto los desplazamientos químicos (δ , ppm) como las constantes de acoplamiento (J , Hz), se encuentran resumidos en la **Tabla 4.7** (derivados de sales de pirrolidinopiridinio), **Tabla 4.8** (derivados de sales de dimetilaminopiridinio) y **Tabla 4.9** (derivados de sales de quinuclidinio). Todos estos espectros se han realizado utilizando como disolventes metanol y dimetilsulfóxido deuterados y son concordantes con las estructuras propuestas.

Como puede observarse en las tablas, los átomos de hidrógeno correspondientes al anillo aromático (H-2_{ph}, H-4_{ph}, H-5_{ph} y H-6_{ph}) aparecen a un desplazamiento químico que oscila entre 6.10-7.35 ppm. La señal del átomo de hidrógeno H-5_{ph} aparece como un triplete en todos los compuestos, con un desplazamiento químico que varía entre 6.88-7.07 ppm y con una constante de acoplamiento de 8.0 Hz. Los compuestos **SOS-20**, **SOS-24** y **SOS-25** son una excepción, la señal de H-5_{ph} aparece como un multiplete, con un desplazamiento químico entre 6.93-7.35 ppm.

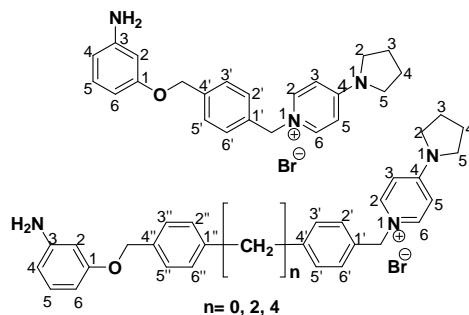
En los compuestos **SOS-20**, **SOS-24** y **SOS-27** la señal correspondiente al hidrógeno H-2_{ph} aparece como un singlete, a un campo que oscila entre 6.22-6.92 ppm, mientras que en el resto de compuestos aparece como un triplete a un desplazamiento químico que varía entre 6.18-6.43 ppm con una constante de acoplamiento de 2.0 Hz. En cuanto a las señales correspondientes a los protones H-4_{ph} y H-6_{ph}, aparecen solapadas en la mayoría de los compuestos, dando diferentes tipos de señales según la resolución del espectro y con un desplazamiento químico que varía entre 6.30-7.00 ppm cuando el disolvente utilizado es metanol y entre 6.10-6.17 ppm cuando el disolvente es dimetilsulfóxido.

Los átomos de hidrógeno de los espaciadores (H-2',6', H-3',5', H-2'',6'' y H-3'',5'') resuenan a un campo entre 7.12-7.77 ppm, apareciendo en la mayoría de los compuestos como dobletes, excepto en algunos compuestos donde las señales se solapan entre sí dando lugar a multipletes, lo que imposibilita su asignación.

Por otro lado, cabe destacar que las señales correspondientes a las diferentes cabezas catiónicas apenas sufren variación con respecto a los compuestos anteriormente descritos. Mostrando la misma variación para los átomos de hidrógeno del metileno que enlaza la cabeza catiónica derivada de la quinuclidina con el correspondiente espaciador (CH₂-N⁺). Éstos átomos de hidrógeno sufren un ligero desplazamiento a campo más alto (δ = 4.34-4.45 ppm) con respecto a aquellos átomos que presentan como cabeza catiónica la dimetilaminopiridina y la pirrolidinopiridina. El efecto desapantallante del nitrógeno de la quinuclidina es menor que el efecto ejercido por el nitrógeno cuaternario de la piridina.

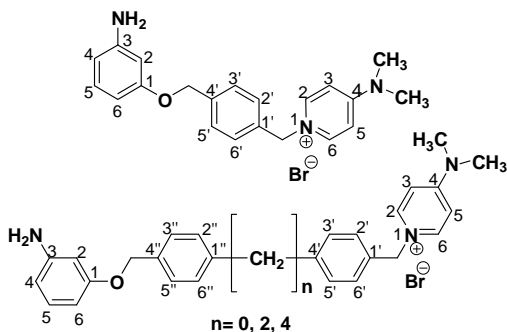
En resumen se puede concluir que:

- Los átomos de hidrógeno del anillo aromático varían su desplazamiento químico en función del sustituyente R_1 , el cual no afecta al resto de la molécula. Así a campo magnético más bajo se encuentran los átomos de hidrógeno del anillo aromático de la Subfamilia A_2 (derivados nitrados) seguidos de los de la Subfamilia A_3 (derivados amínicos) y por último a campo más alto los de la Subfamilia A_1 (derivados fenólicos).
- Los protones que más se ven afectados por el efecto mesómero +M/-M del sustituyente R_1 son $H-2_{ph}$, $H-4_{ph}$ y $H-6_{ph}$.
- Los átomos de hidrógeno del espaciador apenas sufren variación de una Subfamilia a otra, manteniéndose casi constantes.
- Las diferentes cabezas catiónicas empleadas no ejercen efecto alguno sobre los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno del resto de la molécula, salvo en el grupo metileno unido a la misma.
- Los desplazamientos químicos de los grupos metilenos que unen el anillo nitro- ó aminofenólico (CH_2-O ó CH_2-NH) con el espaciador presentan algunas variaciones en función del átomo o grupo de átomos que se encuentren a su alrededor. Así, CH_2-O aparece a campo más bajo que CH_2-NH .
- Los átomos de hidrógeno del grupo metileno (CH_2-N^+) unido a las cabezas catiónicas pirrolidinopiridina y dimetilaminopiridina aparece a un campo más bajo que el grupo CH_2N^+ unido a la quinuclidina.
- En la piridina, los átomos de hidrógeno $H-3,5_{pyr}$ aparecen a campo ligeramente más bajo cuando el sustituyente de la posición 4 es un grupo dimetilamino que cuando es un resto de pirrolidina.

Tabla 4.7.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J, Hz) de ^1H -RMN de los compuestos finales **SOS-19** a **SOS-22** (Subfamilia A3- serie 1).


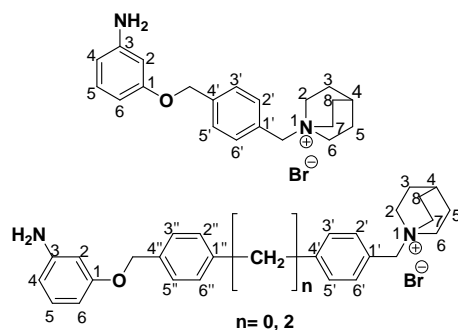
Cabeza catiónica				
Espaciador				
Compuesto	SOS-19(NH ₂) δ (ppm)	SOS-20 (NH ₂) * δ (ppm)	SOS-21(NH ₂) δ (ppm)	SOS-22(NH ₂) δ (ppm)
H-5 _{ph}	6.99 (t) 8.0	6.93 (m)	6.97 (t) 8.0	6.96 (t) 8.0
H-2 _{ph}	6.38 (t) 2.2	6.22 (m)	6.36 (t) 2.2	6.36 (t) 2.0
H-4 _{ph} O 6 _{ph}	6.34 (dt) 8.2, 2.1	6.17 (d) 5.9	6.31 (dt) 9.32, 1.77	6.30 (dt) 7.8, 1.6
H-6 _{ph} O 4 _{ph}				
H-2',6'	7.40 (d) 8.1	7.71 (m)	7.25 (d) 8.1	7.31-7.25 (m)
H-3',5'	7.52 (d) 8.1	7.50 (m)	7.20 (d) 8.1	7.21 (d) 8.0
H-2'',6''	-----	-----	7.12 (d) 8.0	7.12 (d) 7.9
H-3'',5''	-----	7.71 (m)	7.27 (d) 8.0	7.31-7.25 (m)
H-2,6 _{pyr}	8.22 (d) 7.7	8.44 (d) 7.1	8.14 (d) 7.6	8.16 (d) 7.5
H-3,5 _{pyr}	6.88 (d) 7.6	6.93 (m)	6.82 (d) 7.6	6.80 (d) 7.5
H-2,5 _{pirr}	3.57 (m)	3.51 (m)	3.52 (m)	3.50 (m)
H-3,4 _{pirr}	2.14 (m)	2.01 (m)	2.10 (m)	2.09 (m)
CH ₂ -N ⁺	5.38 (s)	5.45 (s)	5.28 (s)	5.29 (s)
CH ₂ -O	5.06 (s)	5.05 (s)	4.94 (s)	4.93 (s)
4H(2CH ₂)	-----	-----	2.91 (m)	2.62 (m)
4H(2CH ₂)	-----	-----	-----	1.61 (m)

(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

Tabla 4.8.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J , Hz) de ^1H -RMN de los compuestos finales **SOS-23** a **SOS-26** (Subfamilia A3- serie 2).

Cabeza catiónica				
Espaciador				
Compuesto	SOS-23 (NH ₂) *	SOS-24(NH ₂)	SOS-25(NH ₂)	SOS-26 (NH ₂) *
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
H-5 _{ph}	6.88 (t) 8.0	7.35 (m)	6.97 (m)	6.88(t) 8.0
H-2 _{ph}	6.18 (t) 2.1	6.92 (s)	6.39 (t) 2.1	6.19(t) 2.1
H-4 _{ph} O 6 _{ph}	6.16-6.10 (m)	7.00 (m)	6.33 (m)	6.14 (td) 7.9, 1.9
H-6 _{ph} O 4 _{ph}		6.86 (d) 8.0		
H-2',6'	7.40 (d) 8.2	7.66 (d) 7.8	7.27 (m)	7.29 (m)
H-3',5'	7.45 (d) 8.2	7.50 (d) 7.8	7.19 (d) 8.1	7.22 (d) 8.0
H-2'',6''	-----	7.45 (d) 7.9	7.11 (d) 8.1	7.16 (d) 8.0
H-3'',5''	-----	7.61 (d) 7.9	7.27 (m)	7.29 (m)
H-2,6 _{pyr}	8.40 (d) 7.8	8.23 (d) 5.8	8.19 (d) 7.8	8.37 (d) 7.8
H-3,5 _{pyr}	7.04 (d) 7.8	7.00 (m)	6.97 (m)	7.03 (d) 7.7
2CH ₃	2.08 (s)	3.22 (s)	3.21 (s)	3.17 (s)
CH ₂ -N ⁺	5.39 (s)	5.39 (s)	5.31 (s)	5.33 (s)
CH ₂ -O	4.98 (s)	5.15 (s)	4.93 (s)	4.92 (s)
4H(2CH ₂)	-----	-----	2.89 (m)	2.58 (m)
4H(2CH ₂)	-----	-----	-----	1.55 (m)

(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

Tabla 4.9.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J , Hz) de ^1H -RMN de los compuestos finales SOS-27 a SOS-29 (Subfamilia A3- serie 3).


Cabeza catiónica			
Espaciador			
Compuesto	SOS-27(NH ₂) δ (ppm)	SOS-28(NH ₂) δ (ppm)	SOS-29(NH ₂) δ (ppm)
H-5 _{ph}	7.07 (t) 8.0	7.00 (t) 8.0	6.99 (t) 8.0
H-2 _{ph}	6.50 (s)	6.43 (t) 2.2	6.40 (t) 2.2
H-4 _{ph} o 6 _{ph}	6.49-6.43 (t) 8.0	6.40-6.32 (dt) 9.45, 1.89	6.38-6.31 (m)
H-6 _{ph} o 4 _{ph}			
H-2',6'	7.59 (d) 8.0	7.77 (d) 8.2	7.38 (d) 8.1
H-3',5'	7.52 (d) 8.0	7.60 (d) 8.2	7.27 (m)
H-2'',6''	-----	7.53 (d) 8.2	7.14 (d) 8.1
H-3'',5''	-----	7.67 (d) 8.2	7.27 (m)
H-2,6,7 _q	3.48 (m)	3.52 (m)	3.49-3.39 (m)
H-3,5,8 _q	1.99 (m)	2.00 (m)	1.95 (m)
H-4 _q	2.15 (m)	2.15 (m)	2.11 (m)
CH ₂ -N ⁺	4.39 (s)	4.45 (s)	4.34 (s)
CH ₂ -O	5.11 (s)	5.08 (s)	4.95 (s)
4H(2CH ₂)	-----	-----	2.93 (m)

4.2.2.- Análisis espectroscópico de ^{13}C -RMN de los compuestos finales monocatónicos no simétricos (Familia A).

Los datos espectroscópicos de ^{13}C -RMN de los compuestos **SOS-1** a **SOS-29** están recogidos en diferentes tablas (**Tabla 4.10** a **Tabla 4.20**). Para su asignación se llevaron a cabo estudios de resonancia bidimensional tipo HSQC y HMBC ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -RMN). En general, los espectros han sido realizados en CD_3OD , excepto en aquellos casos en los que se indique el uso de otro disolvente.

Dentro de este análisis se han realiza tres subdivisiones en función del fragmento de la molécula a analizar:

- 1) Análisis de los compuestos en función del sustituyente R_1 del anillo nitro/aminofenólico.
- 2) Análisis en función de la cabeza catiónica introducida.
- 3) Análisis en función del espaciador existente en la molécula.

1) El **anillo aminofenólico**: como viene recogido en las **Tablas 4.10** a **4.17** los carbonos pertenecientes al anillo aromático (C-1_{ph} , C-2_{ph} , C-3_{ph} , C-4_{ph} , C-5_{ph} y C-6_{ph}) aparecen a un desplazamiento químico que oscila entre 99 y 161 ppm, dependiendo del efecto apantallante-desapantallante de los grupos adyacentes a los mismos.

En los derivados fenólicos, el átomo C-1_{ph} está unido al enlace amínico (grupo NH) y resuena entre δ 149 y 151 ppm. En los derivados amínicos y nitrados, este carbono está unido a un oxígeno (enlace éter) y aparece a un campo más bajo que oscila entre 159 y 162 ppm.

Por el contrario, el C-3_{ph} , es el carbono cuaternario al que está unido el grupo funcional R_1 . En los derivados fenólicos, dicho átomo está unido a un grupo hidroxilo (OH) con efecto desapantallante (efecto inductivo -I) y aparece a un campo bajo que oscila entre 157 y 159 ppm. En los derivados nitrados, se encuentra unido a un grupo nitro (NO_2), con menor efecto desapantallante que el grupo anterior, aparece a un campo más alto que oscila entre 149 y 151 ppm. Lo mismo sucede en los derivados amínicos, en los que se encuentra unido a un grupo amino (NH_2), con un efecto desapantallante aún menor o similar al anterior, donde se puede apreciar como aparece a un campo que oscila entre 146 y 150 ppm.

Los carbonos C-2_{ph} , C-4_{ph} y C-6_{ph} están influidos por los efectos electrónicos que ejercen tanto el sustituyente R_1 : NO_2 (-I, -M), OH (-I, +M) y NH_2 (-I, +M), como el átomo o grupo de átomos que enlazan con el espaciador: O-R (-I, +M) o NH-R (-I, +M).

El C-2_{ph} aparece a un desplazamiento químico que oscila entre 99-111 ppm. En la Subfamilia A_1 (derivados fenólicos) resuena a un campo de 99-100 ppm, en la Subfamilia A_2 (derivados nitrados) a un campo que varía entre 109 y 111 ppm y en la Subfamilia A_3 (derivados amínicos) entre δ 100 y 103 ppm. La suma de los diferentes efectos electrónicos ejercidos sobre este carbono hacen que resuene desde un campo más alto en los derivados fenólicos hasta un campo más bajo en los derivados nitrados.

Para los carbonos aromáticos C-4_{ph} y C-6_{ph} parece cumplirse lo mismo que para el C-2_{ph}, pero con la salvedad de que el carbono C-4_{ph} se encuentra algo más influido por el sustituyente R₁ o grupo funcional (OH, NO₂ o NH₂) al estar más cerca. Por otro lado, el C-6_{ph} se encuentra algo más influido por el átomo o grupo de unión con el espaciador (oxígeno o grupo amínico, según el caso). Así en los derivados fenólicos, C-6_{ph} resuena a un campo que oscila entre 103-106 ppm y C-4_{ph} a un desplazamiento químico que varía entre 104-108 ppm. En los derivados nitrados C-4_{ph} aparece a un campo que oscila entre 121-124 ppm y C-6_{ph} entre δ 115-118 ppm.

Sin embargo estas asignaciones no han podido confirmarse tras la realización de estudios bidimensionales de HMBC y HSQC, no clarificándose con estos experimentos su determinación inequívoca.

El C-5_{ph} tiene sus desplazamientos químicos en todos los compuestos a un campo que oscila entre 128 y 132 ppm, pareciendo indiferente a la influencia de estos grupos con efectos apantallantes-desapantallantes, ya que es el carbono que se encuentra a mayor distancia de todos ellos y donde apenas hay efectos mesómeros e inductivos de ningún tipo.

Tabla 4.10.- Desplazamientos químicos (δ ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A₁ (serie 1).

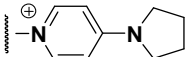
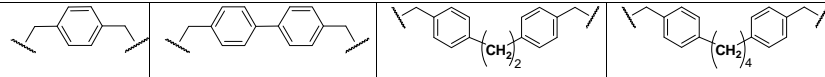
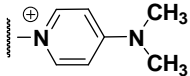
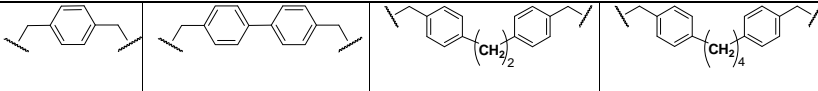

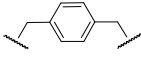
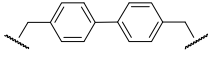
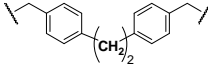
Cabeza catiónica				
Espaciador				
Compuesto	SOS-1(OH) δ (ppm)	SOS-2(OH) δ (ppm)	SOS-3(OH) δ (ppm)	SOS-4(OH) δ (ppm)
C-1 _{ph}	149.86	150.07	150.19	151.64
C-2 _{ph}	99.44	99.52	99.55	100.92
C-3 _{ph}	157.77	157.75	157.77	159.16
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	104.81	104.95	105.00	106.40
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	103.72	103.75	103.67	105.11
C-5 _{ph}	129.32	129.27	129.29	130.66
C-1'	133.16	133.54	132.17	133.47
C-4'	141.78	138.35	142.88	145.21
C-2',6'	128.05	128.41	127.97	129.33
C-3',5'	127.78	127.34	129.23	130.45
C-1''	-----	141.78	139.62	142.12
C-4''	-----	140.11	137.73	138.84
C-2'',6''	-----	127.46	128.22	129.44
C-3'',5''	-----	126.56	126.89	128.33
C-2,6 _{pir}	141.48	141.56	141.38	142.88
C-3,5 _{pir}	108.25	108.28	108.22	109.63
C-4 _{pir}	153.63	153.74	153.62	155.12
C-2,5 _{pirr}	48.29	48.29	48.46	49.68
C-3,4 _{pirr}	24.69	24.69	24.69	26.10
C-N ⁺	60.15	60.10	60.21	61.66
C-NH	46.62	48.42	48.27	47.95
CH ₂	-----	-----	37.07	36.25
CH ₂	-----	-----	36.87	36.22
CH ₂	-----	-----	-----	32.00
CH ₂	-----	-----	-----	31.87

Tabla 4.11.- Desplazamientos químicos (δ ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A₁ (serie 2).

Cabeza catiónica				
Espaciador				
Compuesto	SOS-5(OH) δ (ppm)	SOS-6(OH) * δ (ppm)	SOS-7(OH) δ (ppm)	SOS-8(OH) δ (ppm)
C-1 _{ph}	149.78	150.64	150.46	150.48
C-2 _{ph}	99.21	99.99	99.84	99.79
C-3 _{ph}	158.04	158.83	158.03	158.02
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	103.85	104.66	105.30	105.26
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	103.36	104.08	103.96	103.98
C-5 _{ph}	129.34	130.10	129.59	129.59
C-1'	133.95	135.39	132.37	132.23
C-4'	141.32	138.35	143.15	144.05
C-2',6'	127.92	129.30	128.34	128.32
C-3',5'	127.62	128.39	129.50	129.31
C-1''	-----	141.01	139.91	141.00
C-4''	-----	141.15	138.01	137.70
C-2'',6''	-----	127.32	128.49	128.32
C-3'',5''	-----	127.85	127.19	127.23
C-2,6 _{pir}	141.93	142.76	141.76	141.80
C-3,5 _{pir}	107.97	108.76	107.93	107.93
C-4 _{pir}	155.85	156.64	156.70	156.73
C-N ⁺	59.11	59.77	60.44	60.48
C-NH	45.99	46.79	47.29	53.70
2C, N(CH ₃) ₂	39.75	40.50	39.29	39.25
CH ₂	-----	-----	37.34	35.14
CH ₂	-----	-----	37.13	35.10
CH ₂	-----	-----	-----	30.89
CH ₂	-----	-----	-----	30.74

(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

Tabla 4.12.- Desplazamientos químicos (δ ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A₁ (serie 3).

Cabeza catiónica			
Espaciador			
Compuesto	SOS-9(OH) * δ (ppm)	SOS-10(OH) * δ (ppm)	SOS-11(OH) * δ (ppm)
C-1 _{ph}	150.28	150.39	150.46
C-2 _{ph}	99.69	99.73	99.72
C-3 _{ph}	158.57	158.58	158.54
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	104.28	104.37	104.39
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	103.92	103.84	103.72
C-5 _{ph}	129.90	128.20	129.75
C-1'	126.29	126.92	126.92
C-4'	143.40	142.04	144.19
C-2',6'	133.38	134.05	133.38
C-3',5'	127.87	127.34	129.32
C-1''	-----	137.83	139.90
C-4''	-----	141.05	138.69
C-2'',6''	-----	127.13	128.66
C-3'',5''	-----	127.04	127.49
C-2,6,7 _q	54.13	54.15	54.07
C-3,5,8 _q	23.77	23.82	23.79
C-4 _q	19.96	19.99	20.00
C-N ⁺	66.56	66.34	66.55
C-NH	46.47	46.53	46.70
CH ₂	-----	-----	37.24
CH ₂	-----	-----	36.84

(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

Tabla 4.13.- Desplazamientos químicos (δ ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A₂ (serie 1).

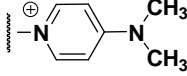
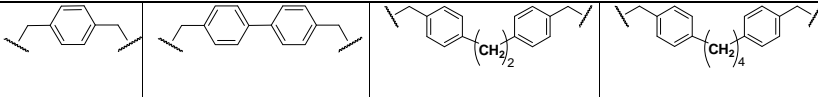
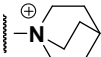
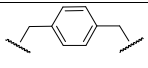
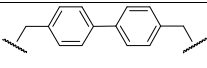
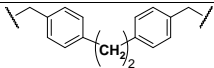
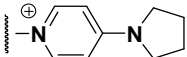
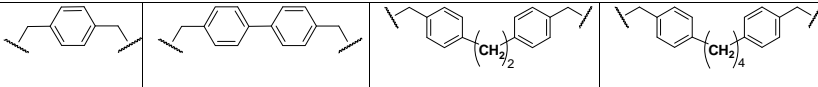
Cabeza catiónica				
Espaciador				
Compuesto	SOS-12(NO ₂) δ (ppm)	SOS-13(NO ₂) δ (ppm)	SOS-14(NO ₂) δ (ppm)	SOS-15(NO ₂) δ (ppm)
C-1 _{ph}	159.14	161.95	159.59	162.03
C-2 _{ph}	109.02	111.71	109.37	111.75
C-3 _{ph}	149.18	151.84	149.36	151.79
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	121.43	124.07	121.79	124.11
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	115.43	117.99	115.52	117.87
C-5 _{ph}	130.04	132.67	130.30	132.63
C-1'	134.67	136.52	132.51	134.67
C-4'	137.62	144.10	143.07	146.46
C-2',6'	128.16	131.17	129.48	131.68
C-3',5'	128.16	130.15	128.28	130.65
C-1''	-----	142.45	141.66	145.10
C-4''	-----	138.65	134.12	136.26
C-2'',6''	-----	129.47	127.73	130.14
C-3'',5''	-----	130.59	128.72	130.94
C-2,6 _{pir}	141.69	144.34	141.89	144.26
C-3,5 _{pir}	107.72	110.37	107.96	110.32
C-4 _{pir}	156.61	159.26	156.79	159.22
2C,N(CH ₃) ₂	38.93	41.59	39.27	41.59
C-O	69.54	72.46	70.42	72.85
C-N ⁺	59.99	62.67	60.43	62.87
CH ₂	-----	-----	37.20	37.56
CH ₂	-----	-----	37.20	37.54
CH ₂	-----	-----	-----	33.25
CH ₂	-----	-----	-----	33.22

Tabla 4.14.- Desplazamientos químicos (δ ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A₂ (serie 2).

Cabeza catiónica			
Espaciador			
Compuesto	SOS-16(NO ₂) * δ (ppm)	SOS-17(NO ₂) δ (ppm)	SOS-18(NO ₂) δ (ppm)
C-1 _{ph}	158.74	161.95	160.77
C-2 _{ph}	108.98	111.77	110.52
C-3 _{ph}	148.75	151.85	150.54
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	122.28	124.10	122.94
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	115.87	118.02	116.69
C-5 _{ph}	130.80	132.69	131.45
C-1'	127.47	128.78	126.04
C-4'	138.24	142.15	142.74
C-2',6'	133.22	135.96	134.12
C-3',5'	128.12	129.96	130.51
C-1''	-----	145.37	145.83
C-4''	-----	138.97	135.37
C-2'',6''	-----	129.57	129.88
C-3'',5''	-----	130.63	128.89
C-2,6,7 _q	53.72	57.04	55.69
C-3,5,8 _q	23.25	26.20	24.96
C-4 _q	19.48	22.64	21.43
C-O	69.41	72.47	71.57
C-N ⁺	65.88	69.93	68.76
CH ₂	-----	-----	38.43
CH ₂	-----	-----	38.22

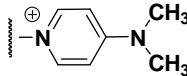
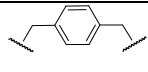
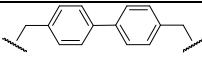
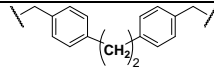
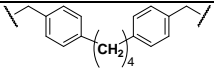
(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

Tabla 4.15.- Desplazamientos químicos (δ ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A₃ (serie 1).

Cabeza catiónica				
Espaciador				
Compuesto	SOS-19(NH ₂) δ (ppm)	SOS-20(NH ₂) * δ (ppm)	SOS-21(NH ₂) δ (ppm)	SOS-22(NH ₂) δ (ppm)
C-1 _{ph}	161.04	159.26	161.30	161.31
C-2 _{ph}	103.28	100.33	103.34	103.28
C-3 _{ph}	150.17	149.96	150.08	150.12
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	109.78	107.08	109.63	109.61
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	105.61	102.18	105.78	105.72
C-5 _{ph}	130.83	129.50	130.80	130.81
C-1'	135.59	134.95	133.66	133.51
C-4'	140.44	140.18	144.29	145.19
C-2',6'	129.37	128.52	129.30	129.35
C-3',5'	129.33	127.22	130.67	130.45
C-1''	-----	138.63	142.18	143.28
C-4''	-----	137.14	136.60	136.30
C-2'',6''	-----	126.68	129.66	129.48
C-3'',5''	-----	128.06	128.59	128.64
C-2,6 _{pir}	143.01	141.99	142.90	142.90
C-3,5 _{pir}	109.70	108.60	109.63	109.64
C-4 _{pir}	155.20	153.05	155.15	155.12
C-2,5 _{pirr}	49.72	48.31	49.69	49.68
C-3,4 _{pirr}	26.12	24.63	26.11	26.10
C-O	70.03	68.27	70.68	70.70
C-N ⁺	61.54	59.14	61.64	61.66
CH ₂	-----	-----	38.36	36.30
CH ₂	-----	-----	38.36	36.27
CH ₂	-----	-----	-----	31.99
CH ₂	-----	-----	-----	31.91

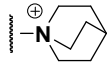
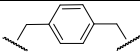
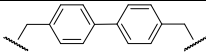
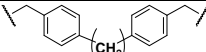
(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

Tabla 4.16.- Desplazamientos químicos (δ ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A₃ (serie 2).

Cabeza catiónica				
Espaciador				
Compuesto	SOS-23(NH ₂)* δ (ppm)	SOS-24(NH ₂) δ (ppm)	SOS-25(NH ₂)* δ (ppm)	SOS-26(NH ₂)* δ (ppm)
C-1 _{ph}	159.15	161.10	159.34	159.34
C-2 _{ph}	100.27	99.99	100.16	100.26
C-3 _{ph}	147.73	148.83	149.74	149.87
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	107.11	109.96	106.87	106.96
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	102.11	105.06	102.05	102.16
C-5 _{ph}	129.50	131.86	129.31	129.45
C-1'	135.07	135.11	133.05	133.00
C-4'	138.14	142.73	141.98	142.83
C-2',6'	128.06	129.93	127.79	127.89
C-3',5'	128.00	128.77	128.84	128.88
C-1''	-----	140.98	140.56	141.52
C-4''	-----	137.60	134.81	134.72
C-2'',6''	-----	128.08	128.13	128.18
C-3'',5''	-----	129.10	127.39	127.56
C-2,6 _{pir}	141.96	143.15	141.78	141.90
C-3,5 _{pir}	107.98	109.17	107.79	107.91
C-4 _{pir}	155.87	157.92	155.70	155.82
2C,N(CH ₃) ₂	30.65	40.49	39.35	39.46
C-O	68.14	70.88	68.41	68.57
C-N ⁺	59.12	61.50	59.04	59.19
CH ₂	-----	-----	36.28	34.52
CH ₂	-----	-----	36.28	34.48
CH ₂	-----	-----	-----	30.45
CH ₂	-----	-----	-----	30.40

(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

Tabla 4.17.- Desplazamientos químicos (δ ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia A₃ (serie 3).

Cabeza Catiónica			
Espaciador			
Compuesto	SOS-27(NH ₂) δ (ppm)	SOS-28(NH ₂) δ (ppm)	SOS-29(NH ₂) δ (ppm)
C-1 _{ph}	159.98	159.78	159.86
C-2 _{ph}	103.48	102.11	102.00
C-3 _{ph}	146.14	148.39	148.59
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	109.81	108.46	108.26
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	106.26	104.59	104.44
C-5 _{ph}	129.89	129.45	129.44
C-1'	126.71	126.00	124.58
C-4'	140.66	142.88	144.39
C-2',6'	133.14	133.29	132.68
C-3',5'	127.96	127.70	129.10
C-1''	-----	139.02	140.72
C-4''	-----	137.67	135.24
C-2'',6''	-----	127.25	128.28
C-3'',5''	-----	126.72	127.19
C-2,6,7 _q	54.63	54.38	54.25
C-3,5,8 _q	23.78	23.54	23.53
C-4 _q	20.22	19.98	19.99
C-O	68.89	68.95	69.26
C-N ⁺	67.51	67.24	67.32
CH ₂	-----	-----	37.06
CH ₂	-----	-----	36.81

2) Las **cabezas catiónicas**: se han utilizado 3 tipos diferentes de cabezas catiónicas para este tipo de compuestos: pirrolidinopiridina, dimetilaminopiridina y quinuclidina.

Al introducir la pirrolidinopiridina como cabeza catiónica (**Tabla 4.18**), los carbonos pertenecientes al anillo piridínico son los que aparecen a un desplazamiento químico más bajo. El carbono cuaternario de la piridina C-4_{pyr} oscila entre δ 153 y 155 ppm, seguido por los carbonos aromáticos terciarios C-2,6_{pyr}, entre δ 141 y 143 ppm, y C-3,5_{pyr} entre δ 108 y 109 ppm. Por el contrario, los carbonos pertenecientes al anillo pirrolidínico son los que aparecen a un campo más alto, debido a las saturaciones que lo conforman. Los carbonos C-3,4_{pirr} oscilan entre δ 24 y 26 ppm, mientras que C-2,5_{pirr} aparecen a un campo más bajo que oscila entre 48 y 49 ppm debido al efecto desapantallante del nitrógeno.

Cuando la cabeza catiónica introducida es la dimetilaminopiridina (**Tabla 4.19**), apenas hay variaciones en los desplazamientos químicos de los carbonos terciarios perteneciente al anillo piridínico (C-2,6_{pyr} y C-3,5_{pyr}) con respecto a la cabeza catiónica anterior. Los carbonos terciarios C-2,6_{pyr} resuenan a un campo que oscila entre 141 y 144 ppm y los carbonos C-3,5_{pyr} entre δ 107 y 110 ppm. El carbono cuaternario perteneciente al anillo piridínico C-4_{pyr} aparece a un campo ligeramente más bajo que en la cabeza catiónica anterior, entre 156 y 159 ppm.

Por otro lado, cuando los productos tienen como cabeza catiónica la quinuclidina (**Tabla 4.20**), los carbonos pertenecientes a la misma (C-2,6,7_q, C-3,5,8_q y C-4_q) aparecen a desplazamientos químicos más altos, existiendo diferencia entre aquellos que se encuentran directamente unidos al nitrógeno quinuclidínico y los que no. Así, los carbonos C-2,6,7_q, directamente unidos al nitrógeno aparecen a un campo más bajo que aquellos que no lo están (δ = 54 y 57 ppm) mientras que C-3,5,8_q aparecen a un desplazamiento químico que oscila entre 23 y 26 ppm y C-4_q entre δ 19-22 ppm.

Los carbonos secundarios no aromáticos que unen los espaciadores con la correspondiente cabeza catiónica (C-N⁺) y el anillo aminofenólico (C-O y C-NH) aparecen a un desplazamiento químico que oscila entre 46 y 72 ppm, dependiendo del átomo o grupo de átomos a los que estén unidos. Así, entre los carbonos que unen el espaciador con el anillo aminofenólico, el carbono alquílico unido al grupo amino (C-NH) está más apantallado y por tanto aparece a un desplazamiento químico más alto que oscila entre 46 y 48 ppm. El carbono unido al átomo de oxígeno (C-O) aparece a un desplazamiento químico más bajo que oscila entre 68 y 72 ppm, debido al mayor efecto desapantallante del oxígeno (-I). Por otro lado, el carbono alquílico que une el espaciador con la correspondiente cabeza catiónica (C-N⁺), cuando la cabeza catiónica es la dimetilaminopiridina y la pirrolidinopiridina aparece a un desplazamiento químico entre 59-62 ppm, mientras que cuando la cabeza catiónica es la quinuclidina aparece a un campo más bajo que oscila entre 65-69 ppm. Esto puede deberse a que la carga positiva del nitrógeno en los anillos piridínicos está más deslocalizada a lo largo de todo el anillo, ejerciendo así un menor efecto desapantallante sobre este carbono que el nitrógeno del resto de quinuclidinio.

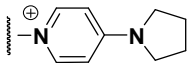
Cabeza catiónica								
Compuesto	1 (OH) δ (ppm)	19(NH ₂) δ (ppm)	2(OH) δ (ppm)	20(NH ₂)* Δ (ppm)	3(OH) δ (ppm)	21(NH ₂) δ (ppm)	4(OH) δ (ppm)	22(NH ₂) δ (ppm)
C-1 _{ph}	149.86	161.04	150.07	159.26	150.19	161.30	151.64	161.31
C-2 _{ph}	99.44	103.28	99.52	100.33	99.55	103.34	100.92	103.28
C-3 _{ph}	157.77	150.17	157.75	149.96	157.77	150.08	159.16	150.12
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	104.81	109.78	104.95	107.08	105.00	109.63	106.40	109.61
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	103.72	105.61	103.75	102.18	103.67	105.78	105.11	105.72
C-5 _{ph}	129.32	130.83	129.27	129.50	129.29	130.80	130.66	130.81
C-1'	133.16	135.59	133.54	134.95	132.17	133.66	133.47	133.51
C-4'	141.78	140.44	138.35	140.18	142.88	144.29	145.21	145.19
C-2',6'	128.05	129.37	128.41	128.52	127.97	129.30	129.33	129.35
C-3',5'	127.78	129.33	127.34	127.22	129.23	130.67	130.45	130.45
C-1''	-----	-----	141.78	138.63	139.62	142.18	142.12	143.28
C-4''	-----	-----	140.11	137.14	137.73	136.60	138.84	136.30
C-2'',6''	-----	-----	127.46	126.68	128.22	129.66	129.44	129.48
C-3'',5''	-----	-----	126.56	128.06	126.89	128.59	128.33	128.64
C-2,6 _{pir}	141.48	143.01	141.56	141.99	141.38	142.90	142.88	142.90
C-3,5 _{pir}	108.25	109.70	108.28	108.60	108.22	109.63	109.63	109.64
C-4 _{pir}	153.63	155.20	153.74	153.05	153.62	155.15	155.12	155.12
C-2,5 _{pirr}	48.29	49.72	48.29	48.31	48.46	49.69	49.68	49.68
C-3,4 _{pirr}	24.69	26.12	24.69	24.63	24.69	26.11	26.10	26.10
C-N ⁺	60.15	61.54	60.10	59.14	60.21	61.64	61.66	61.66
C-NH	46.62	-----	48.42	-----	48.27	-----	47.95	-----
C-O	-----	70.03	-----	68.27	-----	70.68	-----	70.70
CH ₂	-----	-----	-----	-----	37.07	38.36	36.25	36.30
CH ₂	-----	-----	-----	-----	36.87	38.36	36.22	36.27
CH ₂	-----	-----	-----	-----	-----	-----	32.00	31.99
CH ₂	-----	-----	-----	-----	-----	-----	31.87	31.91

Tabla 4.18.- Desplazamientos químicos (δ, ppm) de ¹³C-RMN de los compuestos finales con pirrolidinopiridina como cabeza catiónica.

(*) El disolvente utilizado es DMSO-d₆.

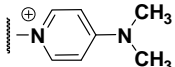
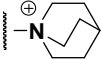
												
	5(OH)* δ (ppm)	12(NO ₂) δ (ppm)	23(NH ₂)* δ (ppm)	6(OH)* δ (ppm)	13(NO ₂) δ (ppm)	24(NH ₂) δ (ppm)	7(OH) δ (ppm)	14(NO ₂) δ (ppm)	25(NH ₂)* δ (ppm)	8(OH) δ (ppm)	15(NO ₂) δ (ppm)	26(NH ₂)* δ (ppm)
C-1 _{ph}	149.78	159.14	159.15	150.64	161.95	161.10	150.46	159.59	159.34	150.48	162.03	159.34
C-2 _{ph}	99.21	109.02	100.27	99.99	111.71	99.99	99.84	109.37	100.16	99.79	111.75	100.26
C-3 _{ph}	158.04	149.18	147.73	158.83	151.84	148.83	158.03	149.36	149.74	158.02	151.79	149.87
C-4 _{ph} O 6 _{ph}	103.85	121.43	107.11	104.66	124.07	109.96	105.30	121.79	106.87	105.26	124.11	106.96
C-6 _{ph} O 4 _{ph}	103.36	115.43	102.11	104.08	117.99	105.06	103.96	115.52	102.05	103.98	117.87	102.16
C-5 _{ph}	129.34	130.04	129.50	130.10	132.67	131.86	129.59	130.30	129.31	129.59	132.63	129.45
C-1'	133.95	134.67	135.07	135.39	136.52	135.11	132.37	132.51	133.05	132.23	134.67	133.00
C-4'	141.32	137.62	138.14	138.35	144.10	142.73	143.15	143.07	141.98	144.05	146.46	142.83
C-2',6'	127.92	128.16	128.06	129.30	131.17	129.93	128.34	129.48	127.79	128.32	131.68	127.89
C-3',5'	127.62	128.16	128.00	128.39	130.15	128.77	129.50	128.28	128.84	129.31	130.65	128.88
C-1''	-----	-----	-----	141.01	142.45	140.98	139.91	141.66	140.56	141.00	145.10	141.52
C-4''	-----	-----	-----	141.15	138.65	137.60	138.01	134.12	134.81	137.70	136.26	134.72
C-2'',6''	-----	-----	-----	127.32	129.47	128.08	128.49	127.73	128.13	128.32	130.14	128.18
C-3'',5''	-----	-----	-----	127.85	130.59	129.10	127.19	128.72	127.39	127.23	130.94	127.56
C-2,6 _{pir}	141.93	141.69	141.96	142.76	144.34	143.15	141.76	141.89	141.78	141.80	144.26	141.90
C-3,5 _{pir}	107.97	107.72	107.98	108.76	110.37	109.17	107.93	107.96	107.79	107.93	110.32	107.91
C-4 _{pir}	155.85	156.61	155.87	156.64	159.26	157.92	156.70	156.79	155.70	156.73	159.22	155.82
C-N ⁺	59.11	59.99	59.12	59.77	62.67	61.50	60.44	60.43	59.04	60.48	62.87	59.19
C-NH	45.99	-----	-----	46.79	-----	-----	47.29	-----	-----	53.70	-----	-----
C-O	-----	69.54	68.14	-----	72.46	70.88	-----	70.42	68.41	-----	72.85	68.57
2C, N(CH ₃) ₂	39.75	38.93	30.65	40.50	41.59	40.49	39.29	39.27	39.35	39.25	41.59	39.46
CH ₂	-----	-----	-----	-----	-----	-----	37.34	37.20	36.28	35.14	37.56	34.52
CH ₂	-----	-----	-----	-----	-----	-----	37.13	37.20	36.28	35.10	37.54	34.48
CH ₂	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	30.89	33.25	30.45
CH ₂	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	30.74	33.22	30.40

Tabla 4.19.- Desplazamientos químicos (δ, ppm) de ¹³C-RMN de los compuestos finales con dimetilaminopiridina como cabeza catiónica.

(*) El disolvente utilizado es DMSO-d₆.

Cabeza Catiónica									
	Compuesto	9(OH)* δ (ppm)	16(NO ₂)* δ (ppm)	27(NH ₂) δ (ppm)	10(OH)* δ (ppm)	17(NO ₂) δ (ppm)	28(NH ₂) δ (ppm)	11(OH)* Δ (ppm)	18(NO ₂) δ (ppm)
C-1 _{ph}	150.28	158.74	159.98	150.39	161.95	159.78	150.46	160.77	159.86
C-2 _{ph}	99.69	108.98	103.48	99.73	111.77	102.11	99.72	110.52	102.00
C-3 _{ph}	158.57	148.75	146.14	158.58	151.85	148.39	158.54	150.54	148.59
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	104.28	122.28	109.81	104.37	124.10	108.46	104.39	122.94	108.26
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	103.92	115.87	106.26	103.84	118.02	104.59	103.72	116.69	104.44
C-5 _{ph}	129.90	130.80	129.89	128.20	132.69	129.45	129.75	131.45	129.44
C-1'	126.29	127.47	126.71	126.92	128.78	126.00	126.92	126.04	124.58
C-4'	143.40	138.24	140.66	142.04	142.15	142.88	144.19	142.74	144.39
C-2',6'	133.38	133.22	133.14	134.05	135.96	133.29	133.38	134.12	132.68
C-3',5'	127.87	128.12	127.96	127.34	129.96	127.70	129.32	130.51	129.10
C-1''	-----	-----	-----	137.83	145.37	139.02	139.90	145.83	140.72
C-4''	-----	-----	-----	141.05	138.97	137.67	138.69	135.37	135.24
C-2'',6''	-----	-----	-----	127.13	129.57	127.25	128.66	129.88	128.28
C-3'',5''	-----	-----	-----	127.04	130.63	126.72	127.49	128.89	127.19
C-2,6,7 _q	54.13	53.72	54.63	54.15	57.04	54.38	54.07	55.69	54.25
C-3,5,8 _q	23.77	23.25	23.78	23.82	26.20	23.54	23.79	24.96	23.53
C-4 _q	19.96	19.48	20.22	19.99	22.64	19.98	20.00	21.43	19.99
C-N'	66.56	65.88	67.51	66.34	69.93	67.24	66.55	68.76	67.32
C-NH	46.47	-----	-----	46.53	-----	-----	46.70	-----	-----
C-O	-----	69.41	68.89	-----	72.47	68.95	-----	71.57	69.26
CH ₂	-----	-----	-----	-----	-----	-----	37.24	38.43	37.06
CH ₂	-----	-----	-----	-----	-----	-----	36.84	38.22	36.81

(*) El disolvente utilizado es DMSO-d₆.

Tabla 4.20.- Desplazamientos químicos (δ, ppm) de ¹³C-RMN de los compuestos finales con quinclidina como cabeza catiónica.

El espaciador: los carbonos aromáticos que corresponden a los espaciadores (**Tablas 4.21, 4.22, 4.23 y 4.24**) aparecen a un desplazamiento químico que oscila entre 124 y 146 ppm. Así, el C-1', carbono cuaternario común a todos los espaciadores, aparece a un campo más bajo en aquellos compuestos que presentan un sistema aromático piridínico (pirrolidinopiridina y dimetilaminopiridina) que oscila entre 130-136 ppm; mientras que cuando éste es sustituido por un azabicyclo (quinuclidina) se produce un ligero desplazamiento a campo más alto que varía entre 124-128 ppm. Por otro lado, el carbono cuaternario C-4' en el espaciador fenilo, o C-4'' en el resto de espaciadores, parece verse más influido por el efecto que ejerce el grupo funcional presente en el anillo aromático (OH, NO₂ y NH₂) y no tanto por el átomo o grupo al cuál está enlazado el metilo más próximo (H₂C-O y H₂C-NH). Así, cuando el grupo funcional libre es un grupo hidroxilo (OH) este carbono aparece a un desplazamiento químico ligeramente más bajo que oscila entre 141-143 ppm en el espaciador fenilo, entre 140-141 ppm en el espaciador bifenilo y entre 137-138 ppm en el resto de espaciadores. Mientras que cuando el grupo funcional libre es el grupo nitro (NO₂), este carbono aparece a un campo ligeramente más alto: entre 137-138 ppm para el espaciador fenilo y bifenilo y entre 134-136 ppm para el resto de espaciadores. Por último, cuando el grupo funcional libre es el grupo amino (NH₂) este carbono aparece entre δ 138-140 ppm en el espaciador fenilo, a δ 137 ppm en el bifenilo y entre δ 134-136 ppm en el resto de espaciadores.

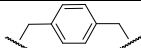
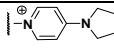
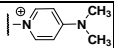

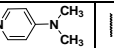

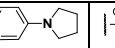
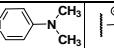
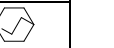
Las señales del resto de carbono aromáticos (C-2',6', C-3',5', C-2'',6'' y C-3'',5'') resuenan a un desplazamiento químico típico de los sistemas aromáticos *p*-sustituidos, sin verse afectados directa o indirectamente por ningún efecto (δ = 126-135 ppm).

Podemos concluir que:

- En el anillo aromático (nitro/aminofenólico) los carbonos C-2_{ph}, C-4_{ph} y C-6_{ph} son los que se encuentran más influidos por el efecto mesómero +M/-M que ejerce el el sustituyente R₁ (OH, NH₂ Y NO₂).
- Los carbonos C-6_{ph} y sobre todo C-2_{ph} se encuentran algo más influidos por el átomo o grupo de enlace con el espaciador (enlace éter o amino) que el carbono C-4_{ph}. En orden de campo decreciente : grupo NO₂ (enlace éter)> grupo NH₂ (enlace éter)> grupo OH (enlace amino).
- El carbono C-5_{ph} apenas se ve influido por el efecto de estos grupos, resonando a un campo magnético casi constante (δ = 128-132 ppm) en todos los compuestos de la Familia A.
- Los carbonos pertenecientes al anillo de piridina son los que aparecen a un campo más bajo, mientras que los carbonos pertenecientes a la quinuclidina son los que aparecen a un campo más alto.
- En la pirrolidinopiridina el carbono cuaternario C-4_{pyr} aparece a un campo ligeramente más alto que en la dimetilaminopiridina, probablemente debido a que esta última no tiene el efecto apantallante que ejerce el anillo pirrolidínico.

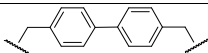
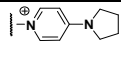
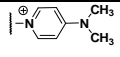

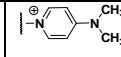

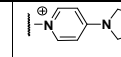
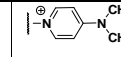

- Los carbonos de los grupos metilenos que unen el anillo aromático con el espaciador ($\text{CH}_2\text{-O}$ o $\text{CH}_2\text{-NH}$), aparecen más desapantallados cuando están unidos a un oxígeno que cuando están unidos a un grupo amino.
- El carbono del grupo metileno unido a la cabeza catiónica ($\text{CH}_2\text{-N}^+$) se encuentra a campo más bajo cuando está unido a un resto de quinuclidina que cuando lo está a las piridinas sustituidas en posición 4. Probablemente esto es debido a que la carga positiva del nitrógeno en los anillos piridínicos está más repartida a lo largo de todo el anillo ejerciendo un menor efecto desapantallante.
- En el espaciador, el carbono C-1' aparece a campo más bajo cuando hay un anillo piridínico que cuando hay un azabicyclo.
- Los carbonos C-4' del espaciador fenilo y C-4'' del resto de espaciadores, parecen estar más influidos por el grupo funcional (OH , NO_2 o NH_2) que por el átomo o grupo de átomos al cual enlaza directamente (O y/o NH).

Tabla 4.21.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales con *p*-xileno como espaciador.

Espaciador								
Cabeza catiónica								
Compuesto	1(OH) δ (ppm)	5(OH)* δ (ppm)	9(OH)* δ (ppm)	12(NO₂) δ (ppm)	16(NO₂)* δ (ppm)	19(NH₂) δ (ppm)	23(NH₂) δ (ppm)	27(NH₂)* δ (ppm)
C-1 _{ph}	149.86	149.78	150.28	159.14	158.74	161.04	159.15	159.98
C-2 _{ph}	99.44	99.21	99.69	109.02	108.98	103.28	100.27	103.48
C-3 _{ph}	157.77	158.04	158.57	149.18	148.75	150.17	147.73	146.14
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	104.81	103.85	104.28	121.43	122.28	109.78	107.11	109.81
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	103.72	103.36	103.92	115.43	115.87	105.61	102.11	106.26
C-5 _{ph}	129.32	129.34	129.90	130.04	130.80	130.83	129.50	129.89
C-1'	133.16	133.95	126.29	134.67	127.47	135.59	135.07	126.71
C-4'	141.78	141.32	143.40	137.62	138.24	140.44	138.14	140.66
C-2',6'	128.05	127.92	133.38	128.16	133.22	129.37	128.06	133.14
C-3',5'	127.78	127.62	127.87	128.16	128.12	129.33	128.00	127.96
C-2,6 _{pir}	141.48	141.93	-----	141.69	-----	143.01	141.96	-----
C-3,5 _{pir}	108.25	107.97	-----	107.72	-----	109.70	107.98	-----
C-4 _{pir}	153.63	155.85	-----	156.61	-----	155.20	155.87	-----
C-2,5 _{pirr}	48.29	-----	-----	-----	-----	49.72	-----	-----
C-3,4 _{pirr}	24.69	-----	-----	-----	-----	26.12	-----	-----
C-N ⁺	60.15	59.11	66.56	59.99	65.88	61.54	59.12	67.51
C-NH	46.62	45.99	46.47	-----	-----	-----	-----	-----
C-O	-----	-----	-----	69.54	69.41	70.03	68.14	68.89
C-2,6,7 _q	-----	-----	54.13	-----	53.72	-----	-----	54.63
C-3,5,8 _q	-----	-----	23.77	-----	23.25	-----	-----	23.78
C-4 _q	-----	-----	19.96	-----	19.48	-----	-----	20.22
2C,N(CH ₃) ₂	-----	39.75	-----	38.93	-----	-----	30.65	-----

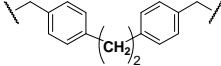
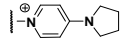
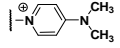

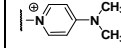

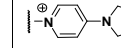
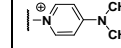

(*) El disolvente utilizado es DMSO-d₆.

Tabla 4.22.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales con bibencilo.

Espaciador								
Cabeza Catiónica								
Compuesto	2(OH) δ (ppm)	6(OH)* δ (ppm)	10(OH)* δ (ppm)	13(NO ₂) δ (ppm)	17(NO ₂) δ (ppm)	20(NH ₂)* δ (ppm)	24(NH ₂) δ (ppm)	28(NH ₂) δ (ppm)
C-1 _{ph}	150.07	150.64	150.39	161.95	161.95	159.26	161.10	159.78
C-2 _{ph}	99.52	99.99	99.73	111.71	111.77	100.33	99.99	102.11
C-3 _{ph}	157.75	158.83	158.58	151.84	151.85	149.96	148.83	148.39
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	104.95	104.66	104.37	124.07	124.10	107.08	109.96	108.46
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	103.75	104.08	103.84	117.99	118.02	102.18	105.06	104.59
C-5 _{ph}	129.27	130.10	128.20	132.67	132.69	129.50	131.86	129.45
C-1'	133.54	135.39	126.92	136.52	128.78	134.95	135.11	126.00
C-4'	138.35	138.35	142.04	144.10	142.15	140.18	142.73	142.88
C-2',6'	128.41	129.30	134.05	131.17	135.96	128.52	129.93	133.29
C-3',5'	127.34	128.39	127.34	130.15	129.96	127.22	128.77	127.70
C-1''	141.78	141.01	137.83	142.45	145.37	138.63	140.98	139.02
C-4''	140.11	141.15	141.05	138.65	138.97	137.14	137.60	137.67
C-2'',6''	127.46	127.32	127.13	129.47	129.57	126.68	128.08	127.25
C-3'',5''	126.56	127.85	127.04	130.59	130.63	128.06	129.10	126.72
C-2,6 _{pir}	141.56	142.76	-----	144.34	-----	141.99	143.15	-----
C-3,5 _{pir}	108.28	108.76	-----	110.37	-----	108.60	109.17	-----
C-4 _{pir}	153.74	156.64	-----	159.26	-----	153.05	157.92	-----
C-2,5 _{pirr}	48.29	-----	-----	-----	-----	48.31	-----	-----
C-3,4 _{pirr}	24.69	-----	-----	-----	-----	24.63	-----	-----
C-N ⁺	60.10	59.77	66.34	62.67	69.93	59.14	61.50	67.24
C-NH	48.42	46.79	46.53	-----	-----	-----	-----	-----
C-O	-----	-----	-----	72.46	72.47	68.27	70.88	68.95
C-2,6,7 _q	-----	-----	54.15	-----	57.04	-----	-----	54.38
C-3,5,8 _q	-----	-----	23.82	-----	26.20	-----	-----	23.54
C-4 _q	-----	-----	19.99	-----	22.64	-----	-----	19.98
2C,N(CH ₃) ₂	-----	40.50	-----	41.59	-----	-----	40.49	-----

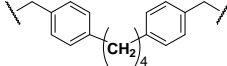
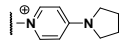
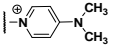
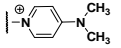
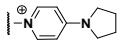
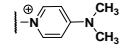
 (*) El disolvente utilizado es DMSO-d₆.

Tabla 4.23.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales con 1,4-bis(p -tolil)etano.

Espaciador								
Cabeza catiónica								
Compuesto	3(OH) δ (ppm)	7(OH) δ (ppm)	11(OH)* δ (ppm)	14(NO₂) δ (ppm)	18(NO₂) δ (ppm)	21(NH₂) δ (ppm)	25(NH₂)* δ (ppm)	29(NH₂) δ (ppm)
C-1 _{ph}	150.19	150.46	150.46	159.59	160.77	161.30	159.18	159.86
C-2 _{ph}	99.55	99.84	99.72	109.37	110.52	103.34	100.16	102.00
C-3 _{ph}	157.77	158.03	158.54	149.36	150.54	150.08	149.74	148.59
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	105.00	105.30	104.39	121.79	122.94	109.63	106.87	108.26
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	103.67	103.96	103.72	115.52	116.69	105.78	102.05	104.44
C-5 _{ph}	129.29	129.59	129.75	130.30	131.45	130.80	129.31	129.44
C-1'	132.17	132.37	126.92	132.51	126.04	133.66	133.05	124.58
C-4'	142.88	143.15	144.19	143.07	142.74	144.29	141.98	144.39
C-2',6'	127.97	128.34	133.38	129.48	134.12	129.30	127.79	132.68
C-3',5'	129.23	129.50	129.32	128.28	130.51	130.67	128.84	129.10
C-1''	139.62	139.91	139.90	141.66	145.83	142.18	140.56	140.72
C-4''	137.73	138.01	138.69	134.12	135.37	136.60	134.81	135.24
C-2'',6''	128.22	128.49	128.66	127.73	129.88	129.66	128.13	128.28
C-3'',5''	126.89	127.19	127.49	128.72	128.89	128.59	127.39	127.19
C-2,6 _{pir}	141.38	141.76	-----	141.89	-----	142.90	141.78	-----
C-3,5 _{pir}	108.22	107.93	-----	107.96	-----	109.63	107.79	-----
C-4 _{pir}	153.62	156.70	-----	156.79	-----	155.15	155.70	-----
C-2,5 _{pirr}	48.46	-----	-----	-----	-----	49.69	-----	-----
C-3,4 _{pirr}	24.69	-----	-----	-----	-----	26.11	-----	-----
C-N ⁺	60.21	60.44	66.55	60.43	68.76	61.64	59.04	67.32
C-NH	48.27	47.29	46.70	-----	-----	-----	-----	-----
C-O	-----	-----	-----	70.42	71.57	70.68	68.41	69.26
C-2,6,7 _q	-----	-----	54.07	-----	55.69	-----	-----	54.25
C-3,5,8 _q	-----	-----	23.79	-----	24.96	-----	-----	23.53
C-4 _q	-----	-----	20.00	-----	21.43	-----	-----	19.99
N(CH ₃) ₂	-----	39.29	-----	39.27	-----	-----	39.35	-----
CH ₂	37.07	37.34	37.24	37.20	38.43	38.36	36.28	37.06
CH ₂	36.87	37.13	36.84	37.20	38.22	38.36	36.28	36.81

(*) El disolvente utilizado es DMSO-d₆.

Tabla 4.24.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales con 1,4-bis(ρ -tolil)butano.

Espaciador					
Cabeza catiónica					
compuesto	4(OH)	8(OH)	15(NO ₂)	22(NH ₂)	26(NH ₂)*
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1 _{ph}	151.64	150.48	162.03	161.31	159.34
C-2 _{ph}	100.92	99.79	111.75	103.28	100.26
C-3 _{ph}	159.16	158.02	151.79	150.12	149.87
C-4 _{ph} o 6 _{ph}	106.40	105.26	124.11	109.61	106.96
C-6 _{ph} o 4 _{ph}	105.11	103.98	117.87	105.72	102.16
C-5 _{ph}	130.66	129.59	132.63	130.81	129.45
C-1'	133.47	132.23	134.67	133.51	133.00
C-4'	145.21	144.05	146.46	145.19	142.83
C-2',6'	129.33	128.32	131.68	129.35	127.89
C-3',5'	130.45	129.31	130.65	130.45	128.88
C-1''	142.12	141.00	145.10	143.28	141.52
C-4''	138.84	137.70	136.26	136.30	134.72
C-2'',6''	129.44	128.32	130.14	129.48	128.18
C-3'',5''	128.33	127.23	130.94	128.64	127.56
C-2,6 _{pir}	142.88	141.80	144.26	142.90	141.90
C-3,5 _{pir}	109.63	107.93	110.32	109.64	107.91
C-4 _{pir}	155.12	156.73	159.22	155.12	155.82
C-2,5 _{pirr}	49.68	-----	-----	49.68	-----
C-3,4 _{pirr}	26.10	-----	-----	26.10	-----
C-N ⁺	61.66	60.48	62.87	61.66	59.19
C-NH	47.95	53.70	-----	-----	-----
C-O	-----	-----	72.85	70.70	68.57
C-2,6,7 _q	-----	-----	-----	-----	-----
C-3,5,8 _q	-----	-----	-----	-----	-----
C-4 _q	-----	-----	-----	-----	-----
N(CH ₃) ₂	-----	39.25	41.59	-----	39.46
CH ₂	36.25	35.14	37.56	36.30	34.52
CH ₂	36.22	35.10	37.54	36.27	34.48
CH ₂	32.00	30.89	33.25	31.99	30.45
CH ₂	31.87	30.74	33.22	31.91	30.40

 (*) El disolvente utilizado es DMSO-d₆.

4.2.3.- Análisis espectroscópico de los compuestos finales biscatiónicos simétricos (Familia B).

El análisis espectroscópico de los quince compuestos finales de esta familia se ha subdividido en cada una de las subfamilias que se han descrito en las consideraciones generales.

4.2.3.1.- Análisis espectroscópico de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia B₁.

Esta Subfamilia incluye los compuestos finales biscatiónicos **SOS-30** a **SOS-33**, los cuales presentan como cabeza catiónica la quinucidina. Han sido clasificados en orden creciente de la longitud del espaciador, pasando del *p*-xileno al 1,4-bis(*p*-tolil)butano.

Los datos espectroscópicos de ¹H-RMN, tanto los desplazamientos químicos (δ , ppm) como las constantes de acoplamiento (J , Hz), se encuentran resumidos en la **Tabla 4.25**, mientras que los datos espectroscópicos de ¹³C-RMN se encuentran recogidos en la **Tabla 4.26**. Todos estos espectros se han realizado utilizando como disolventes metanol y dimetilsulfóxido deuterados y son concordantes con las estructuras propuestas.

Los hidrógenos y los carbonos han sido asignados de manera inequívoca mediante los estudios de HMBC y HSQC realizados sobre los compuestos **SOS-30** y **SOS-32**. Las señales correspondientes al resto de compuestos han sido extrapoladas a partir de estos estudios.

Las estructuras de los siguientes compuestos han sido numeradas y nombradas siguiendo los principios de numeración y nomenclatura de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (**Figura 4.3**).

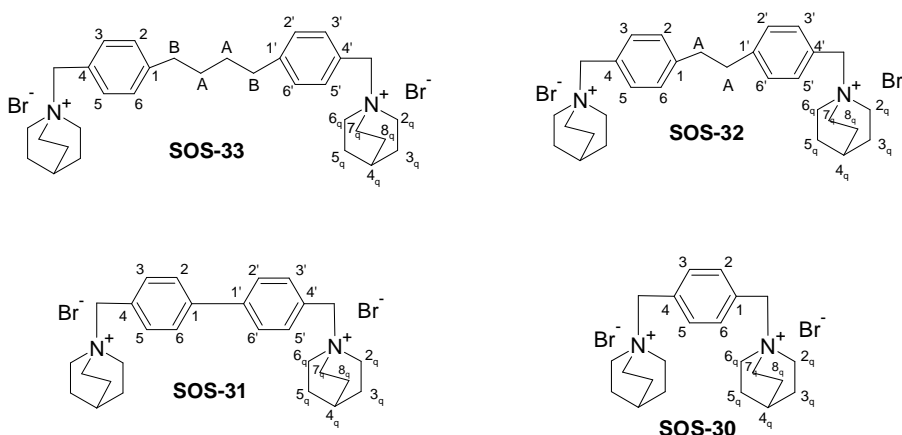


Figura 4.3.- Esquema de los compuestos de la Subfamilia B₁ con numeración relativa.

Tabla 4.25.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J, Hz) de ^1H -RMN de los compuestos finales **SOS-30** a **SOS-33** (Subfamilia B1).

Estructura				
Compuesto	SOS-30*	SOS-31	SOS-32*	SOS-33
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
H-2,6 y H-2',6'	7.66 (s)	7.86 (d) 8.34	7.46 (m)	7.44 (d) 7.93
H-3,5 y H-3',5'	7.66 (s)	7.68 (d) 8.34	7.46 (m)	7.36 (d) 7.93
CH _{2A}	-----	-----	2.98 (s)	1.72 (m)
CH _{2B}	-----	-----	-----	2.73 (m)
$^1\text{N-CH}_2$	4.52 (s)	4.49 (s)	4.44 (s)	4.38 (s)
H-2,6,7q	3.49 (m)	3.56 (m)	3.43 (m)	3.49 (m)
H-3,5,8q	1.90 (m)	2.04 (m)	1.89 (m)	2.01 (m)
H-4q	2.09 (dt) 6.1, 3.0	2.20 (dt) 6.4, 3.2	2.08 (m)	2.17 (dd) 6.8, 3.6

(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

Como se puede observar en la **Tabla 4.25**, podemos dividir el espectro de ^1H en tres zonas: La zona situada a campo más bajo, donde aparecen las señales de los protones aromáticos del espaciador; una intermedia, donde resuenan los protones de los metilenos unidos a la cabeza catiónica y, por último, una zona donde resuenan los protones de la quinuclidina y los metilenos de la cadena alifática (compuestos **SOS-32** y **SOS-33**).

Los espectros de ^1H de los compuestos **SOS-30** y **SOS-32** han sido realizados usando como disolvente dimetilsulfóxido deuterado, por ello, las señales de los desplazamientos químicos de ambos compuestos serán comentadas independientemente las señales de los compuestos **SOS-31** y **SOS-33**.

El compuesto **SOS-30** tiene un espaciador formado exclusivamente por un anillo aromático sustituido en *para*, por ello todos sus protones son iguales y resuenan como singlete a un desplazamiento químico de 7.66 ppm. Estos protones aparecen a frecuencias más altas que los protones del espaciador del compuesto **SOS-32**, que resuenan como multiplete a δ 7.46 ppm. También es posible apreciar este desplazamiento en el metileno unido a la cabeza catiónica ($\text{CH}_2\text{-N}^+$), que resuena a δ 4.52 ppm, campo ligeramente más bajo con respecto al metileno del compuesto **SOS-32**. Solamente las señales espectroscópicas de los protones de la quinuclidina se mantienen casi constantes entre ambos productos.

En el compuesto **SOS-31** no existe una cadena alifática en el espaciador, los dos fenilos están unidos directamente entre sí, lo que hace aumentar el fenómeno de resonancia, que estabiliza los dos anillos, haciendo resonar a los propios protones a un desplazamiento químico más alto con respecto a los compuestos **SOS-32** y **SOS-33**.

Así, las señales de los protones H-2,6 y H-2',6' resuenan a δ 7.86 ppm como doblete y se acoplan con H-3,5 y H-3',5' a δ 7.68 ppm, con una constante de acoplamiento de 8.34 Hz.

La señal del metileno unido a la cabeza catiónica ($\text{CH}_2\text{-N}^+$) aparece como singlete, con un desplazamiento químico de 4.49 ppm.

Los protones de la quinuclidina resuenan a un desplazamiento químico bajo: H-2,6,7_q aparece a δ 3.56 ppm, H-3,5,8_q a δ 2.04 ppm y H-4_q a δ 2.20 ppm.

El compuesto **SOS-33**, en donde en el espaciador existe una cadena alquílica entre los dos fenilos, sustituidos en posición *para*, presentan los protones iguales dos a dos. Así H-2,6 y H-2',6' aparece como un doblete a δ 7.44 ppm acoplándose con H-3,5 y H-3',5' a δ 7.36 ppm con una constante de acoplamiento de 7.93 Hz.

El grupo metileno unido a la quinuclidina ($\text{CH}_2\text{-N}^+$) resuena como singlete a δ 4.38 ppm y es el más desapantallado, con respecto a todos los CH_2 presentes en la molécula, por la influencia de la carga positiva del nitrógeno de la cabeza.

Por otro lado, en la cadena alquílica del espaciador, $\text{CH}_{2\text{B}}$ resuena como un multiplete a δ 2.73 ppm y está más desapantallado que $\text{CH}_{2\text{A}}$, que aparece a δ 1.72 ppm también como multiplete. Esto es debido a que se encuentra directamente unido al anillo aromático del espaciador, lo que incrementa el desplazamiento químico del metileno por efecto de la resonancia.

A campo más alto aparecen las señales de los protones de la quinuclidina, que al tener una estructura simétrica, aparecen de tres en tres. Así, los hidrógenos H-2,6,7_q son iguales y dan un multiplete a δ 3.49 ppm y H-3,5,8_q dan lugar a otro mutiplete a δ 2.01 ppm mientras que el protón de unión de los dos ciclos, H-4_q, aparece como doble doblete a δ 2.17 ppm, siendo las constantes de acoplamiento con H-3,5,8_q y H-2,6,7_q de 3.6 Hz y 6.8 Hz, respectivamente.

Tabla 4.26.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales **SOS-30** a **SOS-33** (Subfamilia **B₁**).

Estructura				
Compuesto	SOS-30	SOS-31	SOS-32*	SOS-33
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1,1'	138.96	144.16	143.96	147.62
C-2,6 y C-2',6'	142.87	129.76	129.34	131.22
C-3,5 y C-3',5'	142.87	135.77	133.45	135.01
C-4,4'	138.96	129.13	125.77	126.72
CH_{2A}	-----	-----	36.87	32.89
CH_{2B}	-----	-----	-----	37.25
⁺N-CH₂	74.99	69.39	66.49	69.70
C-2,6,7q	63.22	56.71	54.09	56.55
C-3,5,8q	32.82	25.82	23.80	25.80
C-4q	28-94	22.25	20.00	22.27

(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

El estudio espectroscópico de ^{13}C -RMN de los compuestos finales **SOS-30** a **SOS-33** se encuentra recogido en la **Tabla 4.26**. Los datos espectroscópicos de ^{13}C y DEPT han permitido determinar los carbonos cuaternarios y secundarios.

En estos espectros se distinguen dos zonas: una aromática a campo bajo donde resuenan los carbonos aromáticos del espaciador y otra a campo alto donde aparecen las señales de los grupos metilenos del espaciador y de la quinclidina.

En el compuesto **SOS-30** el espaciador está constituido solamente de un anillo aromático y por tanto los carbonos cuaternarios C-1 y C-4 son iguales y resuenan a un desplazamiento químico de 138.96 ppm. El carbono C-1 aparece a campo más alto con respecto a los carbonos C-1,1' del resto de compuestos mientras que C-4 está más desapantallado que C-4,4'. Los protones del benceno resuenan a campo más bajo, 142.87 ppm, que en el resto de compuestos. Lo mismo sucede en el grupo metileno unido a la quinclidina $\text{CH}_2\text{-N}^+$ ($\delta = 74.99$ ppm) y los protones de la quinclidina, que resuena a desplazamiento químico mayor.

El espectro de ^{13}C del compuesto **SOS-32** ha sido realizado utilizando como disolvente dimetilsulfóxido y por tanto, resulta difícil hacer una comparación con el resto de productos de esta Familia. Aún así, los valores son muy similares a los de los compuestos **SOS-33**.

En los compuestos **SOS-31** y **SOS-33**, los carbonos pertenecientes al anillo de quinclidina se mantienen constantes resonando sin apenas variación en su desplazamiento químico (ppm).

En el compuesto **SOS-33**, los carbonos del espaciador, C-3,5 y C-3',5' y C-2,6 y C-2',6' resuenan a valores de campo bastante similares, apareciendo a δ 135.01 ppm y δ 131.22 ppm respectivamente.

El grupo CH_{2B} resuena a δ 37.25 ppm, un campo más bajo con respecto a CH_{2A} que resuena a δ 32.89 ppm, debido a la mayor proximidad con el benceno aromático que tiene efecto desapantallante. Por otro lado el grupo directamente unido a la cabeza catiónica (CH₂-N⁺) aparece a un campo más bajo (δ = 69.70 ppm), debido a la suma de dos efectos, el del nitrógeno positivo y el resonante del benceno.

En cuanto a la cabeza catiónica, podemos observar como C-2,6,7_q aparecen a un desplazamiento químico de 56.55 ppm, más desapantallados que C-3,5,8_q que aparecen a un campo de δ 25.80 ppm, debido a la mayor proximidad del nitrógeno positivo. Por último C-4_q aparece a un desplazamiento químico de 22.27 ppm.

Se puede concluir que:

- La mayor longitud y presencia de dos sistemas aromáticos en el espaciador no influye sobre la resonancia de los carbonos de la quinuclidina.
- Un solo anillo aromático en el espaciador si influye sobre los carbonos de la quinuclidina, desapantallándolos. Aumentado además la resonancia de los protones del anillo aromático.
- Con la reducción de las dimensiones del espaciador se reduce la resonancia de carbono C-1,1' y se aumenta la de C-4,4'.

4.2.3.2.- Análisis espectroscópico de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia B₂.

Dentro de esta Subfamilia se encuentran los compuestos finales biscatiónicos **SOS-34** a **SOS-40**. Presentan como cabeza catiónica una quinolina sustituida en posición 4 con derivados amínicos aromáticos (**serie 1**) o derivados amínicos no aromáticos saturados (**serie 2**). Cuatro de estos compuestos poseen un átomo de cloro en la posición 7 de la quinolina. Todos los compuestos presentan como espaciador el 1,2-bis(*p*-toliloxi)etano.

Los datos espectroscópicos de ¹H-RMN, desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J , Hz), se encuentran resumidos en la **Tabla 4.27**. Los datos espectroscópicos de ¹³C-RMN se encuentran recogidos en la **Tabla 4.28**. Todos estos espectros se han realizado utilizando como disolventes metanol deuterado y son concordantes con las estructuras propuestas.

Los hidrógenos y los carbonos han sido asignados de manera inequívoca mediante los estudios de HMBC y HSQC realizados sobre los compuestos **SOS-35** y **SOS-38**. Las señales correspondientes al resto de compuestos han sido extrapoladas a partir de estos estudios.

Las estructuras de los siguientes compuestos han sido numeradas y nombradas siguiendo los principios de numeración y nomenclatura de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (**Figura 4.4**).

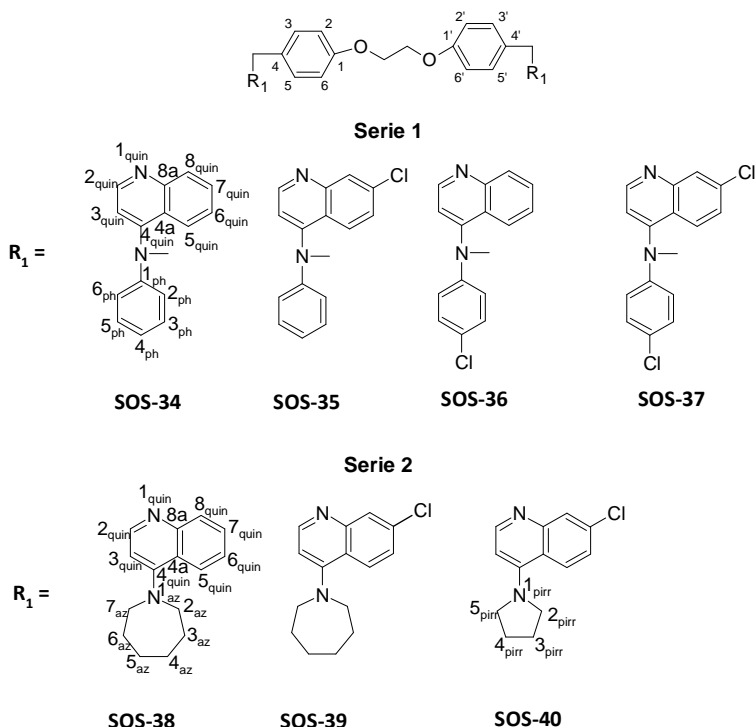


Figura 4.4.- Esquema de los compuestos de la Subfamilia B₂ con numeración relativa.

Tabla 4.27.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J, Hz) de ^1H -RMN de los compuestos finales **SOS-34** a **SOS-40** (Subfamilia B2).

Cabeza catiónica							
Compuesto	SOS-34	SOS-35	SOS-36	SOS-37	SOS-38	SOS-39	SOS-40
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
H-2,6 e H-2',6'	7.03 (d) 8.76	7.06 (d) 8.70	7.03 (d) 8.77	7.06 (d) 8.73	7.00 (d) 8.80	7.03 (d) 8.64	7.01 (d) 8.75
H-3,5 e H-3',5'	7.40-7.29 (m)	7.35-7.32 (m)	7.33 (d) 8.77	7.35 (d) 8.73	7.27 (d) 8.80	7.29 (d) 8.64	7.27 (d) 8.75
O-CH ₂	4.33 (s)	4.35 (s)	4.33 (s)	4.35 (s)	4.31 (s)	4.33 (s)	4.32 (s)
¹ N-CH ₂	5.89 (s)	5.86 (s)	5.91 (s)	5.88 (s)	5.74 (s)	5.72 (s)	5.71 (s)
H-2quin	8.86 (d) 7.44	8.84 (d) 7.50	8.90 (d) 7.40	8.87 (d) 7.46	8.54 (d) 7.73	8.51 (d) 7.75	8.63 (d) 9.23
H-3quin	7.40-7.29 (m)	7.35-7.32 (m)	7.41-7.37 (m)	7.38 (d) 7.47	7.10 (d) 7.74	7.11 (d) 7.78	6.90 (d) 7.69
H-5quin	7.62 (dd) 8.8, 1.3	7.57-7.54 (m)	7.67 (dd) 8.8, 1.2	7.63 (d) 9.31	8.05 (dd) 8.83, 1.05	8.07 (d) 1.82	8.04 (d) 2.02
H-6quin	7.46 (t) 7.36	7.49 (t) 7.4	7.41-7.37 (m)	7.40 (d) 1.96	7.66 (dt) 5.77, 1.15	7.65 (dd) 9.2, 1.9	7.66 (dd) 9.2, 2.0
H-7quin	7.81 (dt) 5.57, 1.43	-----	7.84 (dt) 5.46, 1.36	-----	7.90 (dt) 5.67, 1.33	-----	-----
H-8quin	8.13 (d) 8.37	8.16 (d) 1.89	8.16 (dd) 8.9, 0.6	8.20 (d) 1.93	8.42 (dd) 8.62, 1.28	8.40 (d) 9.21	8.51 (d) 7.69
H-2,7az	-----	-----	-----	-----	4.09 (m)	4.08 (m)	-----
H-3,6az	-----	-----	-----	-----	2.09 (m)	2.08 (m)	-----
H-4,5az	-----	-----	-----	-----	1.75 (dt) 5.40, 2.54	1.74 (m)	-----
H-2,5pirr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4.02 (m)
H-3,4pirr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2.20 (m)
H-2,6ph	7.53 (m)	7.57-7.54 (m)	7.52 (d) 8.91	7.55 (d) 8.78	-----	-----	-----
H-3,5ph	7.40-7.29 (m)	7.42 (d) 7.48	7.41-7.37 (m)	7.42 (d) 8.78	-----	-----	-----
H-4ph	7.40-7.29 (m)	7.30 (dd) 9.3, 1.9	-	-	-----	-----	-----
N-CH ₃	3.84 (s)	3.84 (s)	3.82 (s)	3.82 (s)	-----	-----	-----

En la **Tabla 4.27**, se muestran los desplazamientos químicos de los compuestos **SOS-34** a **SOS-40**. Se pueden distinguir tres zonas. Una primera zona aromática donde resuenan las señales correspondientes a los protones de la quinolina, los protones aromáticos del espaciador y aquellos protones procedentes de los sustituyentes de naturaleza aromática. Una zona central donde recaen las señales correspondientes a los grupos metílenos, uno de ellos unido al nitrógeno cuaternario y el otro al oxígeno. Finalmente, una última zona correspondiente a los protones CH_3 del grupo N-metilnilino y CH_2 de la azepina y la pirrolidina.

Las últimas dos zonas mantienen casi los mismos desplazamientos químicos para todos los compuestos mientras que la zona aromática presenta variaciones más intensas a causa de los diferentes sustituyentes que se une a la quinolina en posición 4.

Para analizar los espectros comenzaremos siempre por los hidrógenos de la quinolina, considerando en primer lugar los compuestos de la **serie 2** (sales de bisquinolinio con sustituyente R_4 no aromático) sin cloro en posición 7 (**SOS-38**), seguidos de aquellos con cloro en la misma posición (**SOS-39** y **SOS-40**), para valorar como influye el halógeno en los desplazamientos químicos de las señales de protones. La misma valoración será efectuada para los compuestos de la **serie 1** (sales de bisquinolinio con sustituyente R_4 aromático) (compuestos **SOS-34** a **SOS-37**) con un grupo N-metilnilino, con o sin cloro en posición 4 del fenilo y con o sin un átomo de cloro en la posición 7 de la quinolina.

Serie 2

En el compuesto **SOS-38**, las señales de los protones de la quinolina sustituida en posición 4 por una azepina, resuenan en orden de campo creciente de la siguiente manera: H-2_{quin} , H-8_{quin} , H-5_{quin} , H-7_{quin} , H-6_{quin} , H-3_{quin} . 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 8.54 ppm como un doblete acoplado con H-3_{quin} con una constante de acoplamiento de 7.73 Hz. H-3_{quin} es el protón más apantallado del sistema quinolinico, apareciendo como un doblete a un desplazamiento químico de 7.10 ppm. H-8_{quin} aparece como un doblete, se acopla con H-7_{quin} y resuena a δ 8.42 ppm; al igual que H-5_{quin} que aparece como un doblete cuando se acopla con H-6_{quin} pero situado a un campo ligeramente más alto, ya que no parece verse influido por la carga positiva de nitrógeno cuaternario pero si por una pequeña influencia del sustituyente en posición 4. Por otro lado H-7_{quin} aparece como un doblete triplete, acoplándose con H-6_{quin} y H-8_{quin} en posición orto del anillo, presentando diferentes constantes de acoplamiento.

El espaciador es un sistema *p*-sustituido (sistema AB), así que los protones son iguales dos a dos y resuenan como dobletes: H-3,5 y H-3',5' aparecen a un desplazamiento químico de 7.27 ppm, acoplados con H-2,6 y H-2',6' que resuenan a δ 7.04 ppm con una constante de acoplamiento de 8.80 Hz.

El metileno unido al oxígeno resuena a δ 4.31 ppm como singlete, a un campo más alto con respecto al metileno unido a la cabeza catiónica (CH_2N^+), que aparece como singlete a δ 5.74 ppm, influido por el efecto que ejerce el nitrógeno positivo, con mayor efecto desapantallante.

En los compuestos **SOS-39** y **SOS-40** casi todas las señales se mantienen prácticamente invariables. Solamente H-2_{quin} y H-8_{quin}, en el compuesto **SOS-40**, aparecen a un desplazamiento químico ligeramente más bajo ($\delta = 8.63$ y 8.51 ppm, respectivamente) debido probablemente al efecto inductivo $-I$ que ejerce el cloro en posición 7.

Serie 1

El compuesto **SOS-34** presenta el grupo N-metilnilino como sustituyente en posición 4 de la quinolina. Las señales de los átomos de hidrógeno H-2_{quin} aparecen como un doblete a un desplazamiento químico de 8.86 ppm, acoplándose con H-3_{quin} con una constante de acoplamiento de 7.44 Hz, encontrándose a campo más bajo con respecto a los compuestos de la **serie 2**.

Las señales del resto de átomos de hidrogeno de la quinolina resuenan en el siguiente orden de campo creciente: H-8_{quin}, H-7_{quin}, H-5_{quin} y H-6_{quin}, a campo más alto con respecto a los compuestos de la serie 2, pareciendo evidente que la introducción de un grupo aromático en posición 4 de la quinolina disminuye el desplazamiento químico (desplaza las señales de los protones a campo más alto) de estos protones. Esta afirmación es válida para todos los compuestos de la **serie 1**.

El protón H-8_{quin} resuena a $\delta 8.13$ ppm como doblete y se acopla con H-7_{quin} que resuena a $\delta 7.81$ ppm como doble triplete. También H-5_{quin} resuena a campo más alto ($\delta = 7.62$ ppm) con respecto a los compuestos pertenecientes a la **serie 2**. Este fenómeno se debe a un impedimento estérico causado por el sustituyente N-metilnilino, donde el grupo metileno, electrón-donante, apantalla a los protones vecinos aumentando la intensidad de su nube electrónica, haciéndolos resonar a campo más alto.

Con respecto a los protones de la anilina, estos aparecen en el siguiente orden de campo creciente: H-2,6_{ph} aparecen a un campo más bajo ($\delta = 7.53$ ppm), debido probablemente a la mayor proximidad del nitrógeno mientras que H-3,5_{ph} aparecen a un intervalo de campo que oscila entre 7.29 - 7.40 , junto con H-4_{ph}. Así, H-3_{quin}, H-4_{ph} y H-3,5_{ph} son asignados mediante un único intervalo de frecuencias, porque en la zona en la que resuenan hay una acumulación de señales que hace muy difícil la inequívoca identificación de los mismos.

En cuanto a los protones del espaciador, estos permanecen prácticamente invariables exceptuando la señal correspondiente al metileno unido a la cabeza catiónica (CH₂N⁺) que aparece a campo más bajo ($\delta = 5.89$ ppm) con respecto a los productos precedentes, debido a la influencia más desapantallante de la quinolina cuando presenta un sustituyente aromático en posición 4.

El compuesto **SOS-36** se diferencia del anterior porque presenta un cloro en la posición 4 de la anilina. En este caso, los desplazamientos químicos de la señales de los protones quinolinicos (excepto H-6_{quin}) se muestran similares a los del compuesto precedente, aunque se puede apreciar un ligero desplazamiento de las señales a campo más bajo, debido probablemente al efecto despantallante del cloro (electrón-atrayente) introducido en posición 4 de la anilina.

La señal del átomo de hidrógeno H-8_{quin} aparece como un doble doblete a un desplazamiento químico de 8.16 y se acopla con H-7_{quin} en posición orto y con H-6_{quin} en posición meta con unas constantes de acoplamiento de 8.9 y 0.6 Hz.

También H-5_{quin} aparece, en este caso, como doble doblete a δ 7.67 ppm y acopla con H-6_{quin} y H-7_{quin} con unas constantes de acoplamiento de 8.8 y 1.2 Hz. Por otro lado, H-7_{quin} resuena como doble triplete, aunque no es posible determinar la señal correspondiente al átomo de hidrógeno H-6_{quin}, ya que aparece en una zona donde se acumulan varias señales de protones, las correspondientes al anillo aromático anilina y H-3_{quin} (δ = 7.41-7.37 ppm).

Los hidrógenos de la anilina resuenan a frecuencias similares a la de los protones de **SOS-34**, lo que significa que el efecto desapantallante del átomo de cloro apenas influye en los protones de la anilina mientras que si que lo hace sobre los protones vecinos, como H-2_{quin}, H-3_{quin} o el metileno unido a la cabeza catiónica (CH₂N⁺), en función de la conformación espacial que la molécula asuma (**Figura 4.5**).

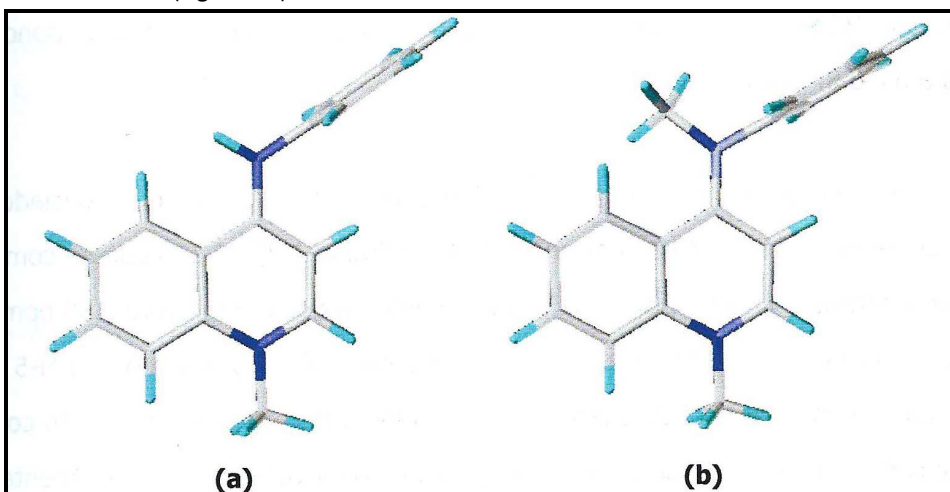


Figura 4.5.- Estudio del efecto de impedimento estérico provocado por el sustituyente N-metilanilino (**b**) confrontado con solo el grupo anilino (**a**).

Estas conformaciones fueron optimizadas con anterioridad por nuestro grupo de investigación mediante cálculos *ab initio* empleando el programa Gaussian98. Los análisis conformacionales se efectuaron sobre modelos simplificados del 1-metilquinolinio⁸.

Los protones del espaciador resuenan a campo similar a los protones del compuesto **SOS-34**, excepto el grupo metileno (CH₂N⁺), que resuena a δ 5.91 ppm, ligeramente más desapantallado.

El compuesto **SOS-35**, la quinolina presenta un átomo de cloro en posición 7 y un grupo N-metilanilino en posición 4. Para poder asignar cada protón se han realizado estudios de HMBC y HSQC sobre este compuesto, necesarios dada la complejidad de esta molécula.

El protón que esta mayormente influido por el efecto desapantallante del halógeno, aunque no de manera muy significativa, es H-6_{quin}, que resuena a δ 7.49 ppm como triplete y acopla con H-5_{quin} con una constante de acoplamiento de 7.40 Hz. Las señales de los protones H-2_{quin} y H-5_{quin}, por el contrario, resuenan a un campo más bajo así como el metileno CH₂-N⁺ que resuena a δ 5.86 ppm. También H-2,6_{ph} experimentan una ligera disminución de frecuencia a δ 7.54-7.57 ppm. Por otro lado, H-8_{quin} resuena a δ 8.16 ppm como un doblete acoplándose en posición meta con H-6_{quin} con una constante de acoplamiento de 1.89 Hz.

Por último **SOS-37**, que está constituido de una quinolina sustituida en posición 7 con cloro y en posición 4 con 4-cloro-N-metilnilina. El orden de resonancia es siempre el mismo que el descrito para los compuestos anteriores : H-2_{quin}, H-8_{quin}, H-5_{quin}, H-6_{quin} y H-3_{quin}. Así, H-8_{quin} resuena como un doblete a δ 8.20 ppm, la frecuencia de resonancia más baja con respecto a los compuestos de esta serie, acoplándose con H-6_{quin} ($J= 1.93$ Hz) que resuena a δ 7.40 ppm.

Los protones de la anilina no parecen verse particularmente influidos por la presencia del átomo de cloro en posición 4, manteniéndose constantes a los del compuesto **SOS-35**.

Los protones del espaciador H-3,5 y H-3',5' resuenan a un desplazamiento químico de 7.35 ppm, mientras que H-2,6 y H-2',6' aparecen a δ 7.06 ppm, resonando ambos como dobletes con una constante de acoplamiento de 8.73 Hz. Por otro lado, los grupos metilenos unidos al oxígeno (CH₂-O) aparecen a un campo de 7.35 ppm y los metilenos unidos a la cabeza catiónica (CH₂-N⁺) a δ 5.88 ppm.

Según los resultados obtenidos podemos concluir que:

- Todos los hidrógenos del espaciador, los aromáticos y los grupos metilenos resuenan a campo más bajo cuando está presente un sustituyente aromático en posición 4 de la quinolina.
- H-2,3_{quin} resuenan a frecuencias más bajas en la **serie 1** con respecto a la **serie 2**, pues el sustituyente aromático en posición 4 despantalla estos protones haciéndolos resonar a campo más bajo.
- H-8,7,6,5_{quin} resuenan a un campo más bajo en la **serie 2** con respecto a la **serie 1**, debido a la influencia del sustituyente aromático sobre el desplazamiento químico de los protones quinolínicos, pues los apantalla como resultado del impedimento estérico generado por la anilina.
- El cloro en posición 7 de la quinolina apenas tiene influencia sobre el desplazamiento químico de los protones vecinos.
- El átomo de cloro en posición 4 de la anilina tiene mayor influencia sobre los protones de la quinolina próximos a él que sobre los protones del anillo de anilina: H-2_{quin}, H-3_{quin} y CH₂-N⁺ resuenan a campo más bajo cuando está presente el halógeno. Se supone que la disposición espacial del anillo da lugar al acercamiento del átomo de cloro a éstos protones produciendo un efecto desapantallante sobre los mismos.

Tabla 4.28.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) de ^{13}C -RMN de los compuestos finales **SOS-34** a **SOS-40** (Subfamilia B₂)

Cabeza Catiónica							
Compuesto	SOS-34	SOS-35	SOS-36	SOS-37	SOS-38	SOS-39	SOS-40
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1,1'	161.47	161.58	161.48	161.59	161.34	161.44	157.92
C-2,6 e C-2',6'	117.30	117.41	117.30	117.40	117.22	117.32	117.29
C-3,5 e C-3',5'	130.63	130.77	130.69	130.85	130.48	130.59	130.45
C-4,4'	128.64	128.24	128.52	128.15	128.98	128.57	128.68
CH ₂	68.85	68.86	68.84	68.85	68.84	68.85	68.83
¹ N-CH ₂	59.94	59.91	60.09	60.05	58.99	59.00	59.06
C-2quin	148.54	148.95	148.77	149.22	146.48	146.77	146.91
C-3quin	107.73	107.93	108.36	108.57	104.55	105.00	104.64
C-4quin	160.80	160.51	160.92	160.65	161.91	161.56	161.37
C-4a quin	122.29	120.68	122.41	120.82	121.41	119.88	120.16
C-5quin	120.97	131.80	121.13	131.68	120.33	119.78	119.73
C-6quin	127.85	130.59	128.20	128.71	127.04	127.45	127.71
C-7quin	135.51	141.90	135.68	142.06	135.52	141.82	141.76
C-8quin	130.15	120.45	130.00	120.61	130.44	132.31	131.76
C-8a quin	141.68	142.51	141.68	142.50	142.10	142.95	142.45
C-2,7az	-----	-----	-----	-----	56.06	56.12	-----
C-3,6az	-----	-----	-----	-----	29.37	29.28	-----
C-4,5az	-----	-----	-----	-----	29.23	29.16	-----
C-2,5pirr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	55.43
C-3,4pirr	-----	-----	-----	-----	-----	-----	24.64
C-1ph	150.14	149.76	148.81	148.45	-----	-----	-----
C-2,6ph	132.75	132.92	132.72	132.88	-----	-----	-----
C-3,5ph	127.73	127.72	129.28	129.33	-----	-----	-----
C-4ph	130.28	128.35	135.58	135.92	-----	-----	-----
N-CH ₃	46.75	46.87	46.53	46.69	-----	-----	-----

El estudio espectroscópico de ^{13}C -RMN de los compuestos finales **SOS-34** a **SOS-40** se encuentra recogido en la **Tabla 4.28**. Los espectros de ^{13}C y DEPT han permitido determinar los carbonos cuaternarios y secundarios, mientras que los estudios de HMBC y HSQC realizados sobre los compuestos **SOS-35** y **SOS-38** han posibilitado la asignación inequívoca de cada protón con su carbono correspondiente en cada molécula.

En estos espectros existen dos zonas: una aromática, en donde resuenan los carbonos de la quinolina, los carbonos aromáticos del espaciador y aquellos correspondientes a los sustituyentes de naturaleza aromática; y otra zona a campo más bajo, en donde aparecen las señales correspondientes a los grupos metilenos del espaciador y los carbonos de los sustituyentes de naturaleza saturada no aromática (azepina, pirrolidina o CH_3 del grupo N-metilanilino).

En las señales del espectro de ^{13}C del compuesto **SOS-38** se puede apreciar que las señales de los carbonos cuaternarios C-4_{quin} ($\delta = 161.91$ ppm) y C-1,1' del espaciador ($\delta = 161.34$ ppm) aparecen a campo más bajo. Tanto en el espectro de ^1H como en el de ^{13}C , se observa que la posición 2 de la quinclidina es siempre la más desapantallada: el carbono terciario C-2_{quin} aparece a $\delta 146.48$ ppm, seguido, en orden de campo creciente, por C-7,8,6,5,3_{quin}. Así como C-3_{quin} es el carbono más apantallado, apareciendo a un desplazamiento químico de 104.55 ppm.

Por otro lado, los carbonos pertenecientes al espaciador C-3,5 y C-3',5' resuenan a $\delta 130.48$ ppm y C-2,6 y C-2',6' a $\delta 117.22$ ppm. Mientras que el carbono perteneciente al metileno unido al oxígeno ($\text{CH}_2\text{-O}$) aparece a $\delta 68.84$ ppm, más desapantallado que el metileno unido a la cabeza catiónica ($\text{CH}_2\text{-N}^+$) que resuena a $\delta 58.99$ ppm.

Los desplazamientos químicos de las señales de carbonos de los compuestos **SOS-39** y **SOS-40** se mantienen prácticamente invariables con respecto al compuesto **SOS-38**. La única diferencia aparece en C-7_{quin} y C-8_{quin}. C-7_{quin} aparece a un campo más bajo ($\delta = 141.82$ ppm), debido a la introducción de un átomo de cloro, con efecto inductivo $-\text{I}$, sobre este carbono. Y la señal del carbono C-8_{quin} resuena a un campo ligeramente más bajo, 131.31 ppm, también debido al efecto que ejerce el átomo de cloro.

Serie 1

En el compuesto **SOS-34** se verifica una disminución de frecuencia para los carbonos C-2_{quin} ($\delta = 148.54$ ppm), C-3_{quin} ($\delta = 107.73$ ppm) y C-4_{aquin} ($\delta = 122.29$ ppm). Sin embargo, el carbono cuaternario C-4_{quin} resuena a una frecuencia ligeramente más baja que los carbonos C-1,1', sucediendo lo contrario que en los compuestos precedentes. Los valores de los otros carbonos quinolínicos se mantienen constantes respecto a la **serie 2**, lo que significa que el sustituyente aromático en posición 4 de la quinolina desapantalla sólo aquellos carbonos situados en la posiciones 2, 3 y 4 de la quinolina.

En cuanto a la señal del carbono C-1_{ph} ($\delta = 150.14$ ppm), resuena a campo más bajo cuando no hay un átomo de cloro en la posición 4 del anillo de anilina. El metileno unido a la anilina se muestra a $\delta 46.75$ ppm y se mantiene constante en todos los productos de la **serie 1**.

Los valores de las señales de los carbonos del espaciador, aromáticos y metilenos vecinos al oxígeno, permanecen invariables en todos los compuestos de la Subfamilia B₂, indicando que los sustituyentes no influyen sobre los carbonos de esta parte de la molécula. Sin embargo, se desplaza ligeramente hacia campo más bajo el carbono del grupo metileno que se une a la

cabeza catiónica (CH_2N^+) en los compuestos de la serie 1 (con sustituyente aromático en posición 4 de la quinolina), resonando alrededor de δ 60 ppm.

Los desplazamientos químicos del compuesto **SOS-36** son prácticamente iguales que los del compuesto **SOS-34**. Sólo los carbonos C-3,₅ph ($\delta = 129.28$ ppm) y C-4_{ph} ($\delta = 135.58$ ppm) aparecen a campo más bajo, debido a la presencia de un átomo de cloro en la posición 4 de la anilina.

El compuesto **SOS-35** muestra las mismas señales que los productos apenas descritos. C-2,₃quin están más desapantallados y C-4_{quin} más apantallado con respecto a los compuestos de la **serie 2**. La introducción de un átomo de cloro en posición 7 de la quinolina da lugar a que los carbonos C-5_{quin}, C-6_{quin} y C-7_{quin} resuenen a un campo magnético más bajo. Así, C-5_{quin} resuena a δ 131.80 ppm, C-6_{quin} a δ 130.59 ppm y C-7_{quin}, que pasa a ser carbono cuaternario, a δ 141.90 ppm. El único carbono que aparece a campo más alto es C-8_{quin} ($\delta = 120.45$ ppm).

Los carbonos aromáticos del sustituyente N-metilnilino permanecen invariables, excepto C-4_{ph} que aparece a un campo más alto, 128.35 ppm, pues en este caso es un carbono terciario.

Las señales del compuesto **SOS-37** se mantienen constantes con respecto al producto anterior con alguna variación: los carbonos C-2,₃quin están más desapantallados, resonando a δ 149.22 y δ 108.57 ppm, respectivamente, seguramente debido a la influencia del sustituyente 4-cloro-N-metilnilino, al igual que C-5,₇quin que resuenan a δ 131.68 y δ 142.06 ppm.

En cuanto a las señales correspondientes a la anilina, la presencia de un átomo de cloro en posición 4 hace que C-3,₅ph y C-4_{ph} aparezcan desplazados a campo más bajo: 129.33 ppm y 135.92 ppm, respectivamente.

Con los datos aquí recogidos podemos concluir:

- La presencia de cloro en posición 4 de la anilina ejerce un efecto desapantallante sobre C-3,₅ph y C-4_{ph}.
- En la **serie 1** un átomo de cloro en posición 7 de la quinolina influye sobre el desplazamiento químico de C-5,₆quin y del mismo C-7_{quin}, llevándolos a un campo magnético más bajo.
- En la **serie 2**, un átomo de cloro en la posición 7 de la quinolina sólo ejerce efecto desapantallante sobre el C-7_{quin}.
- Un sustituyente aromático en posición 4 de la quinolina reduce el desplazamiento químico (campo más alto) del C-4_{quin} con respecto a los compuestos de la **serie 2** e influye solamente sobre el desplazamiento químico de C-2,₃quin y $\text{CH}_2\text{-N}^+$.
- Los carbonos del espaciador, aromáticos y metilenos vecinos al oxígeno, no están influidos por los diferentes sustituyentes introducidos en la quinolina.

4.2.3.3.- Análisis espectroscópico de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia B₃.

Dentro de esta Subfamilia se encuentran los compuestos finales biscatiónicos **SOS-40** a **SOS-44**, que presentan como cabeza catiónica una piridina sustituida en posición 4 (**SOS-40** y **SOS-41**), un resto de quinuclidina (**SOS-42**) o de quinuclidinol (**SOS-44**). Todos los compuestos presentan como espaciador el 1,2-bis(*p*-toliloxi)etano.

Los datos espectroscópicos de ¹H-RMN, tanto los desplazamientos químicos (δ , ppm) como las constantes de acoplamiento (J , Hz), se encuentran resumidos en la **Tabla 4.29** y los datos espectroscópicos de ¹³C-RMN se encuentran recogidos en la **Tabla 4.30**. Todos estos espectros se han realizado utilizando como disolventes metanol y dimetilsulfóxido deuterados y son concordantes con las estructuras propuestas.

Las señales de los carbonos y los hidrógenos han sido asignados de manera inequívoca mediante los experimentos de HMBC y HSQC realizados sobre el compuesto **SOS-41**, habiendo sido extrapolados para los demás compuestos de esta Subfamilia.

Las estructuras de los siguientes compuestos han sido numeradas y nombradas siguiendo los principios de numeración y nomenclatura de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

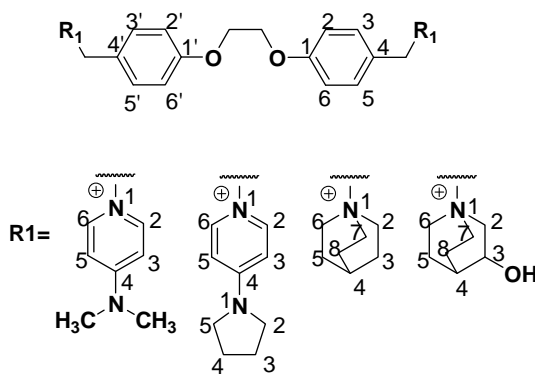
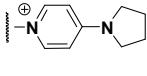
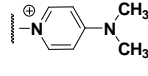

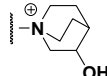


Figura 4.6.- Esquema de los compuestos de la Subfamilia B₃ con numeración relativa.

Tabla 4.29.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J, Hz) de ^1H -RMN de los compuestos finales **SOS-41** a **SOS-44** (Subfamilia B3).

Cabeza catiónica				
Compuesto	SOS-41 δ (ppm)	SOS-42 δ (ppm)	SOS-43 δ (ppm)	SOS-44* δ (ppm)
H-3,5 y H-3',5'	7.34 (d) 8.73	7.35 (d) 8.73	7.47 (d) 8.78	7.48 (d) 8.66
H-2,6 y H-2',6'	7.01 (d) 8.73	7.02 (d) 8.73	7.13 (d) 8.78	7.13 (d) 8.66
O-CH ₂	4.32 (s)	4.33 (s)	4.35 (s)	4.41 (s)
¹ N-CH ₂	5.28 (s)	5.30 (s)	4.43 (s)	4.43 (s)
H-2,6pyr	8.17 (d) 7.77	8.20 (d) 7.86	-----	-----
H-3,5pyr	6.84 (d) 7.77	6.99 (d) 7.86	-----	-----
H-2,5pirr	3.54 (t) 6.84	-----	-----	-----
H-3,4pirr	2.11 (t) 6.86	-----	-----	-----
N(CH ₃) ₂	-----	3.24 (s)	-----	-----
H-2q	-----	-----	3.48 (m)	3.64 (m)
H-6,7q	-----	-----	3.48 (m)	3.35 (m)
H-3q	-----	-----	2.01 (dt) 8.23, 3.23	4.08 (m)
H-5,8q	-----	-----	2.01 (dt) 8.23, 3.23	2.10 (m)
H-4q	-----	-----	2.18 (dt) 6.44, 3.23	3.04 (d) 13.0
OH-	-----	-----	-----	2.27 (s)

(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

En la **Tabla 4.29** se observan los datos espectroscópicos correspondientes a las señales de los átomos de hidrógeno de los compuestos **SOS-41** a **SOS-44**. Presentan una zona aromática bien definida donde resuenan los protones aromáticos del espaciador y la piridina (para los compuestos **SOS-41** y **SOS-42**), una zona a campo magnético más alto donde se encuentran las señales correspondientes a los grupos metilenos, unidos al nitrógeno cuaternario ($\text{CH}_2\text{-N}^+$) y al

oxígeno (CH₂-O) y finalmente es posible apreciar una zona donde resuenan los protones de la pirrolidina y la quinuclidina.

En el compuesto **SOS-41**, la señales de los átomos de hidrógeno H-2,6_{pyr} y H-3,5_{pyr} aparecen como dos dobletes a δ 8.17 y 6.84 ppm, respectivamente, con unas constantes de acoplamiento de 7.7 Hz. De nuevo, las señales de los protones más cercanos al nitrógeno positivo de la piridina H-2,6_{pyr} aparecen a un campo más bajo, debido al efecto desapantallante del anillo sumado al efecto inductivo -I del nitrógeno positivo, que aquellos que se encuentran más alejados.

Las señales de los átomos de hidrógeno del espaciador H-2,6 y H-2',6' aparecen como un doblete, sistema AB típico de los sistemas aromáticos *p*-sustituidos, a un campo de 7.01 ppm y se acoplan con H-3,5 y H-3',5' (δ = 7.34 ppm) con una constante de acoplamiento de 8.73 Hz.

El metileno directamente unido a la cabeza catiónica (CH₂-N⁺) aparece como un singlete a δ 5.28 ppm, mientras que el metileno unido al oxígeno (CH₂-O) aparece como un singlete a un campo más alto (δ = 4.32 ppm).

En el compuesto **SOS-42**, las señales de los átomos de hidrógeno de la piridina (H-2,6_{pyr} y H-3,5_{pyr}) resuenan a ppm ligeramente más altos, δ 8.20 y 6.99 ppm respectivamente, gracias a la contribución del grupo dimetilamino, que a diferencia de la pirrolidina no tiene efecto apantallante. También el metileno vecino a la cabeza catiónica (CH₂-N⁺) siente la influencia del anillo de piridina y resuena a δ 5.30 ppm.

Sin embargo las señales del espaciador se mantienen constantes en sus valores y, debido a la distancia que hay entre el anillo de piridina y los bencilos del espaciador, no siente la influencia del efecto resonante de la cabeza catiónica.

Dos son los factores que ejercen influencia en el desplazamiento químico de los protones del anillo de piridina: En principio, está la pequeña contribución de la carga positiva; pero, sobre todo, el fenómeno de resonancia del anillo aromático que influye de manera más relevante sobre los mismos protones, desapantallándolos y haciéndolos resonar a frecuencias más elevadas. Por otro lado, la amina terciaria en posición 4 del anillo de piridina modifica la resonancia de los protones piridínicos, siendo ésta un grupo electrón-donante que estabiliza la carga positiva y atenúa en cierto grado la laguna electrónica.

El segundo tipo de cabeza catiónica utilizada es la quinuclidina (compuestos **SOS-43** y **SOS-44**, un azabiciclo, que lleva un sustituyente en posición 3 en el compuesto **SOS-44**). Al ser un compuesto completamente saturado, las señales de la quinuclidina aparecen en el rango de los alcanos (δ 2 a 4 ppm), dando multipletes como señales.

En el compuesto **SOS-43** la quinuclidina presenta una estructura simétrica y por tanto los protones son iguales tres a tres (H-2,6,7_q y H-3,5,8_q), exceptuando el protón donde se unen los dos ciclos saturados, H-4_q. Las señales de los átomos de hidrógeno correspondientes a H-2,6,7_q

aparecen como un multiplete a δ 3.48 ppm y se acoplan con H-3,5,8_q (δ = 2.01) y con H-4_q (δ = 2.18 ppm).

Cuando se introduce un grupo OH en la posición 3 del anillo (compuesto **SOS-44**) se pierde la simetría en el biciclo y esto da lugar a un mayor número de señales, no tan nítidas ni iguales como en el compuesto precedente, donde no es posible determinar las constantes de acoplamiento.

En el compuesto **SOS-44**, las señales de los átomos de hidrógeno no han podido ser determinadas con exactitud debido a la presencia de dos diastéromeros (**RR/SS** y **RS**) que no han podido separarse por métodos convencionales, lo que ha dificultado la asignación inequívoca de las señales pertenecientes al resto de quinuclidinol. Es evidente que el desplazamiento químico de todos los protones de la quinuclidina se ve modificado y trasladado a campo magnético más bajo por la presencia del grupo OH.

Las señales espectroscópicas de esta cabeza catiónica son de compleja lectura ya que cada protón se acopla de manera diferente con los otros protones del biciclo, dando lugar a unas constantes de acoplamiento diferentes entre ellos y, por tanto, a unas señales no bien definidas.

La quinuclidina de los compuesto **SOS-43** y **SOS-44** tiene una clara influencia sobre las señales de los átomos de hidrógeno aromáticos del espaciador, haciendo aparecer las señales a campo más bajo. Así H-3,5 y H-3',5' resuenan como un doblete a δ 7.48 ppm mientras que H-2,6 y H-2',6' resuenan como doblete a δ 7.13 ppm, siendo la constante de acoplamiento de 8.66 Hz. Incluso los grupos metilos unidos al oxígeno (CH₂-O) resuenan a campo ligeramente más bajo (δ = 4.35 y 4.32 ppm, respectivamente).

Esto puede deberse a que la quinuclidina no es un sistema aromático y por tanto no puede deslocalizar la carga electrónica sobre el ciclo, así que para estabilizar la carga positiva esta produce un efecto desapantallante sobre los protones de los dos fenilos y los protones de los CH₂ unidos al oxígeno. Por el contrario, el metileno unido a la cabeza catiónica resuena a campo más alto (δ = 4.43 ppm) con respecto a los primeros dos compuestos, ya que la cabeza catiónica actúa de manera opuesta, apantallando el grupo.

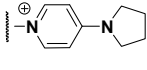
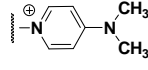

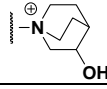
El estudio espectroscópico de ¹³C-RMN de los compuestos finales **SOS-41** a **SOS-44** se encuentra recogido en la **Tabla 4.30**. Gracias a los espectros de ¹³C, DEPT y a la extrapolación de los estudios de HMBC y HSQC del compuesto **SOS-41**, ha sido posible determinar los carbonos cuaternarios y secundarios, a la vez que asignar de manera inequívoca cada carbono con su protón correspondiente en todos los compuestos.

Las zonas que constituyen el espectro son dos: una aromática a baja frecuencia y una situada en la zona de los alcanos, a mayores frecuencias.

Las señales situadas a valores de campo más bajo pertenecen a los carbonos cuaternarios C-1,1' (δ = 161.79-169.86 ppm) y C-4,4' (δ = 121.54-129.97 ppm), a las cuales le siguen, en orden

creciente de campo magnético, los picos de las señales pertenecientes a la piridina C-2,6_{pyr} (δ = 143.68-143.76 ppm), C-3,5 y C-3',5' (δ = 131.92-131.98 ppm), C-2,6 y C-2',6' (δ = 117.14-125.11 ppm) y, finalmente, C-3,5_{pyr} (δ = 109.93-110.51ppm) como última señal del grupo aromático.

Tabla 4.30.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) de ¹³C-RMN de los compuestos finales **SOS-41** a **SOS-44** (Subfamilia B₃)

Cabeza catiónica				
Compuesto	SOS-41	SOS-42	SOS-43	SOS-44*
	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
C-1,1'	161.79	161.80	162.80	159.52
C-2,6 y C-2',6'	117.29	117.30	117.14	114.77
C-3,5 y C-3',5'	131.92	131.98	136.48	134.43
C-4,4'	129.31	129.20	121.54	119.63
C-O	68.86	68.86	69.52	65.61
¹ N-	62.26	62.22	68.87	62.26
C-2,6 _{pyr}	143.68	143.76	-----	-----
C-3,5 _{pyr}	110.51	109.93	-----	-----
C-4 _{pyr}	156.05	158.87	-----	-----
C-2,5 _{pirr}	50.28	-----	-----	-----
C-3,4 _{pirr}	26.98	-----	-----	-----
N(CH ₃) ₂	-----	41.20	-----	-----
C-2q	-----	-----	56.39	66.37
C-6,7q	-----	-----	56.39	63.27
C-3q	-----	-----	25.81	53.46
C-5,8q	-----	-----	25.81	52.52
C-4q	-----	-----	22.33	26.83
				20.87
				17.29

(*) El disolvente utilizado es DMSO deuterado.

En los productos **SOS-41** y **SOS-42** las frecuencias de los protones aparecen prácticamente idénticas, presentando un ligero desplazamiento a campo más bajo el carbono cuaternario C-4_{pyr} del compuesto **SOS-42**, probablemente debido al mayor efecto desapantallante del grupo dimetilamino.

Los desplazamientos químicos de los carbonos de los productos **SOS-43** y **SOS-44** son diferentes con respecto a los compuestos descritos anteriormente, sobre todo para el

compuesto **SOS-44**, donde los carbonos están notablemente más desapantallados, apareciendo a un campo más bajo a causa de la presencia del grupo OH.

Por otro lado, con la introducción del sustituyente en posición 3 se pierde la simetría del biciclo, dando lugar a dos productos (**RR/SS** y **RS**), como ya se comentó anteriormente, obteniendo un mayor número de señales a diferentes valores de ppm.

4.2.4.- Análisis espectroscópico bidimensional.

Se han realizado estudios de resonancia bidimensional en todos los compuestos finales sintetizados, para determinar la estructura exacta del compuesto y permitir la inequívoca asignación de los protones y carbonos con sus correspondientes desplazamientos químicos.

- **HSQC** (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) es un experimento en dos dimensiones en el cual se relaciona el desplazamiento químico de un protón con el del carbono al cual esta directamente unido. Se basa en enlaces directos y evidencia los acoplamientos C-H.
- **HMBC** (Heteronuclear Multi-Bond Correlation) es un experimento en dos dimensiones, diferente del HSQC en cuanto que no evidencia los acoplamientos C-H directos, pero que relaciona a larga distancia distintos átomos de hidrógeno y carbono. Se basa en enlaces a dos y tres átomos de distancia, permitiendo ver qué átomos de hidrógeno se encuentran en la vecindad de un protón en concreto. Esta técnica permite identificar de manera inequívoca los carbonos cuaternarios.

A modo de ejemplo, se recogen a continuación los estudios bidimensionales efectuados sobre un compuesto de cada Subfamilia. El espectro de cada experimento HSQC y HMBC (**Figura 4.6** a **Figura 4.17**) ha sido dividido en dos zonas para su mejor comprensión:

- Zona 1: hace referencia a los grupos metileno del espaciador y a los sustituyentes saturados y no saturados ligados a la cabeza catiónica.
- Zona 2: a la parte que contiene la porción aromática de la molécula.

El eje de abscisas está asociada al espectro de ^1H mientras que el eje de ordenadas se encuentra referido el espectro de ^{13}C .

4.2.4.1.-Análisis bidimensional del compuesto SOS-3 (Subfamilia A₁).

Dentro de la **Subfamilia A₁** (derivados fenólicos), **serie 1** (derivados de sales de pirrolidino piridina), hemos recogido a modo de ejemplo el estudio bidimensional de HSQC (**Figura 4.6**) y HMBC (**Figura 4.7**) del compuesto **SOS-3**. Este estudio se realizó utilizando espectroscopía de ¹H-RMN (500 MHz) y de ¹³C-RMN (126 MHz), usando como disolvente metanol deuterado, y es concordante con la estructura propuesta.

En el estudio de HSQC (**Figura 4.6**) podemos observar como cada carbono se correlaciona directamente con su protón correspondiente, lo que nos permite identificarlo y determinar su desplazamiento químico exacto. Se obtienen de este estudio los datos de los desplazamientos químicos y la asignación inequívoca de los carbonos terciarios y secundarios. Para complementarlo el estudio de HMBC (**Figura 4.7**) permite la identificación y asignación tanto de los carbonos anteriores como de los carbonos cuaternarios de manera inequívoca gracias a su correlación no directa a dos y tres enlaces.

Zona 1:

En el HSQC los carbonos secundarios C-3,4_{pirr} (δ= 24.69 ppm) se correlaciona directamente con H-3,4_{pirr} (δ= 2.03 ppm). C-2,5_{pirr} aparece a δ 48.46 ppm y esta directamente unido a H-2,5_{pirr} (δ= 3.43 ppm).

Los dos carbonos de los grupos metilos del espaciador $-(CH_2)_2-$ aparecen a δ 37.07 y 36.87 ppm, respectivamente, y se correlacionan directamente con sus protones correspondientes, a un campo magnético de 2.80 ppm.

La señal del átomo de hidrógeno del grupo metilo directamente unido al anillo aminofenólico (CH₂-NH), con un desplazamiento de 4.14 ppm, se correlaciona directamente con la señal del carbono secundario correspondiente al C-NH a δ 48.27 ppm. El átomo de carbono del grupo metilo unido a la cabeza catiónica (C-N⁺) aparece a δ 60.20 ppm y esta directamente relacionada con los átomo de hidrógeno (CH₂-N⁺) con desplazamiento químico 5.20 ppm.

En el HMBC se puede observar como H-3,4_{pirr} se correlaciona a dos enlaces con los carbonos C-2,5_{pirr} a δ 48.46 ppm. Lo mismo sucede con H-2,5_{pirr}, que se correlaciona a dos enlaces con C-3,4_{pirr} a δ 24.69 ppm.

Los átomos de hidrógeno correspondientes a los grupo metilos del espaciador $-(CH_2)_2$ se correlacionan a tres enlaces a C-3',5' (δ= 129.23 ppm) y C-2'',6'' (δ= 128.22 ppm).

Por otro lado, los átomos de hidrógeno del grupo metileno unido al anillo aminofenólico (CH₂-NH) se correlacionan a tres enlaces con C-3'',5'' (δ= 126.89 ppm) y a dos enlaces con los carbonos cuaternarios C-4'' (δ= 137.73 ppm) y C-1_{ph} (δ= 150.19 ppm). Los átomos de hidrógeno del grupo metileno unido a la cabeza catiónica (CH₂-N⁺) se correlacionan a tres enlaces con C-2',6' (δ= 127.97 ppm) y C-2,6_{pyr} (δ= 141.38 ppm) y a dos enlaces con el carbono cuaternario del espaciador C-1' (δ= 132.17 ppm).

Zona 2:

En el HSQC las señales correspondientes a los átomos de hidrógeno de la piridina (H-2,₆_{pyr} y H-3,₅_{pyr}), con un desplazamiento químico de 8.04 ppm y 6.71 ppm, respectivamente, permiten la asignación inequívoca de sus correspondientes átomos de carbono. Así, C-2,₆_{pyr} se encuentra a un campo de 141.38 ppm, mientras que los carbonos C-3,₅_{pyr} se encuentran a δ 108.22 ppm.

En las señales correspondientes al espaciador, H-2',6' (δ = 7.19 ppm) se correlacionan directamente con C-2',6' a δ 127.97 ppm; H-3',5' (δ = 7.11 ppm) se correlaciona con C-3',5' que se muestra a δ 129.23 ppm; H-2'',6'' está correlacionado con C-2'',6'' a δ 128.22 ppm; y, por último, H-3'',5'' (δ = 7.15 ppm) se correlaciona con C-3'',5'' a δ 126.89 ppm.

En el anillo aminofenólico, los únicos carbonos que son de difícil asignación son C-4_{ph} y C-6_{ph} que podrían ser intercambiables. Por este motivo se han designado como C-4 o 6_{ph} y C-6 o 4_{ph}. C-2_{ph} (δ = 99.55 ppm) está correlacionado con su correspondiente protón H-2_{ph} (δ = 6.02 ppm). El átomo de hidrógeno H-5_{ph} (δ = 6.80 ppm) se correlaciona con su correspondiente carbono que se encuentra a un desplazamiento químico de 129.29 ppm.

En el HMBC observamos como las señales de los átomos de hidrógeno de la piridina H-2,₆_{pyr} se correlacionan a tres enlaces con el carbono cuaternario de la piridina C-4_{pyr} (δ = 153.62 ppm) y el carbono del metilo unido al nitrógeno positivo C-N⁺ (δ = 60.21 ppm) y a dos enlaces con C-3,₅_{pyr} (δ = 108.22 ppm). Los hidrógenos H-3,₅_{pyr} están correlacionados a dos enlaces a C-2,₆_{pyr} (δ = 141.38 ppm).

Las señales de los átomos de hidrógeno del espaciador permiten la identificación y asignación inequívoca de los carbonos cuaternarios C-1' (δ = 132.17 ppm), C-4' (δ = 142.88 ppm), C-1'' (δ = 139.62 ppm) y C-4'' (δ = 137.73 ppm), además de corroborar los ya asignados C-N⁺ y C-NH. Las señales de H-2',6' se correlacionan a tres enlaces con el carbono C-N⁺ (δ = 60.21 ppm) y el carbono cuaternario C-4'. Los átomos de H-3',5' se correlacionan a tres enlaces con el carbono cuaternario C-1'' y el carbono de un grupo metilo del espaciador (2C(CH₂)). Los hidrógenos H-2'',6'' se correlacionan a tres enlaces con el carbono cuaternario C-4'' y con un carbono del otro grupo metilo del espaciador (2C(CH)₂). Por último, las señales de los átomos de hidrógeno H-3'',5'' están correlacionadas a tres enlaces con el carbono cuaternario C-1'' y el carbono del grupo metileno unido al anillo aminofenólico C-NH (δ = 48.27 ppm).

En el anillo aminofenólico las señales H-2_{ph}, H-4_{ph} y H-6_{ph} se correlacionan entre sí. Gracias a H-5_{ph} y H-2_{ph} podemos asignar de manera inequívoca los carbonos cuaternarios C-1_{ph} (δ = 150.19 ppm) y C-3_{ph} (δ = 157.77 ppm), ya que se correlacionan, a tres y dos enlaces respectivamente, con los mismos. Además sabemos que C-1_{ph} aparece a este desplazamiento químico gracias a que los átomos de hidrógeno de CH₂-NH también se correlacionan a dos enlaces con este carbono, como ya se comentó anteriormente.

Figura 4.6.- Espectro de HSQC del compuesto SOS-3 (Subfamilia A₁).

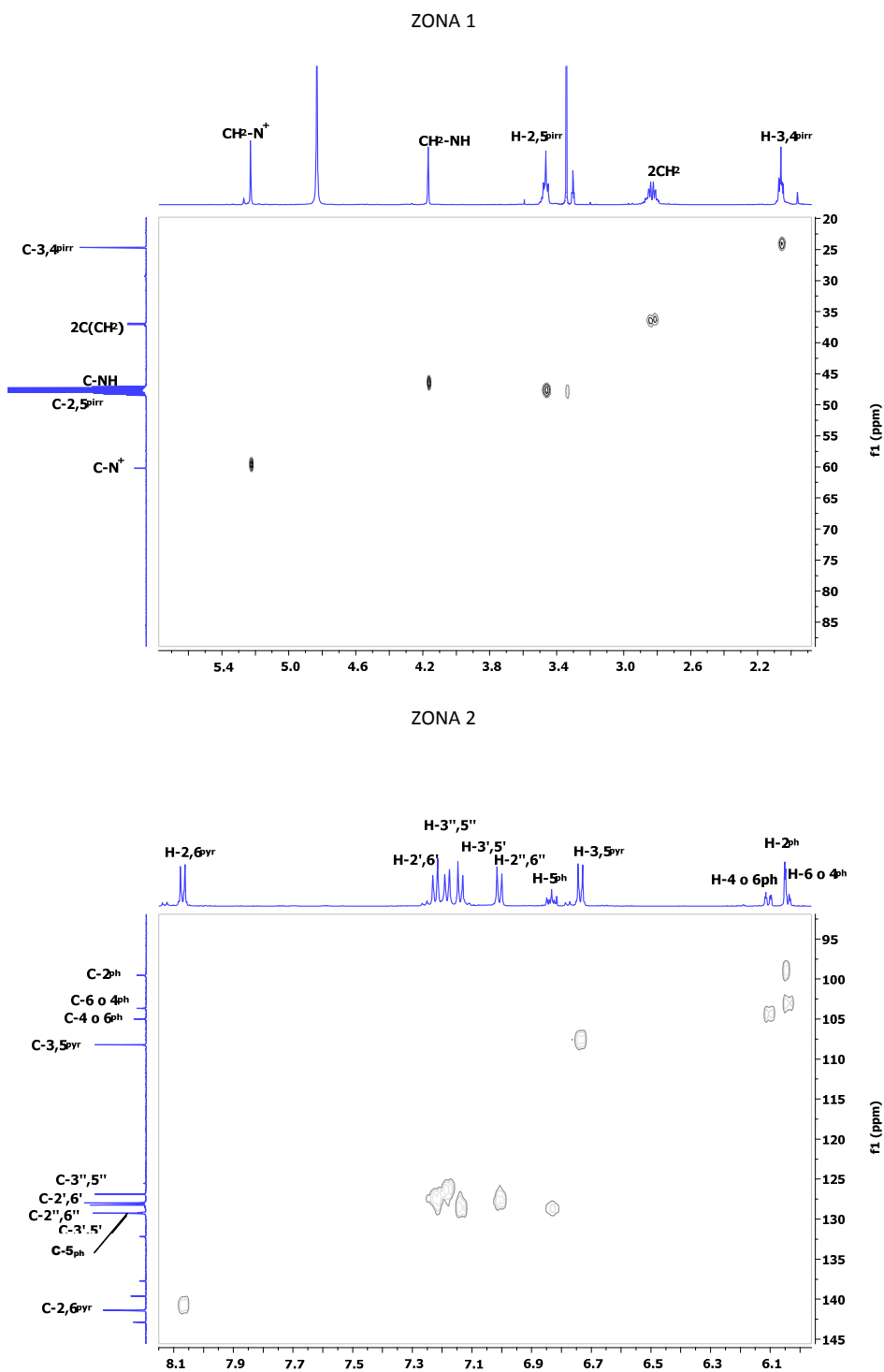
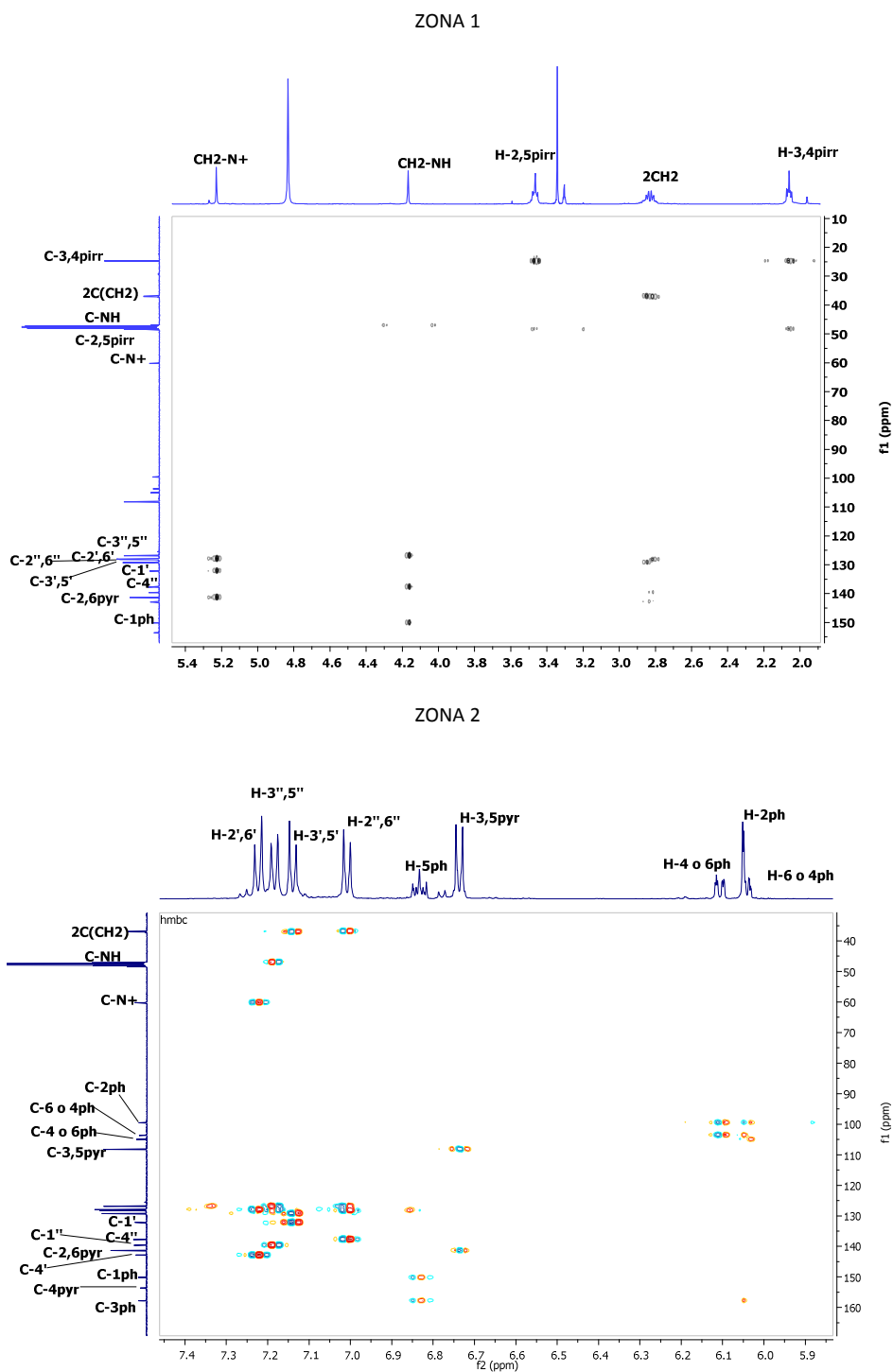


Figura 4.7.- Espectro de HMBC del compuesto SOS-3 (Subfamilia A₁).



4.2.4.2.-Análisis bidimensional del compuesto SOS-13 (Subfamilia A₂).

Para la **Subfamilia A₂** (derivados nitrados), **serie 1** (derivados de sales de dimetilamino piridina), se ha incluido como ejemplo el estudio de HSQC (**Figura 4.8**) y de HMBC (**Figura 4.9**) del compuesto **SOS-13**. Este estudio se realizó utilizando espectroscopía de ¹H-RMN (600 MHz) y de ¹³C-RMN (151 MHz), usando como disolvente metanol deuterado y es concordante con la estructura propuesta.

En este compuesto la determinación y asignación de los protones y carbonos se realizó de la misma forma que en el compuesto anterior y prácticamente las correlaciones de las señales no varían, con la salvedad de que este compuesto presenta como grupo funcional un grupo nitro (NO₂) y como cabeza catiónica la dimetilaminopiridina.

La incorporación de un grupo nitro hace que el grupo de unión con el espaciador sea un oxígeno (grupo éter) en lugar del enlace amínico presente en el compuesto anterior y que las señales correspondientes al anillo nitrofenólico (C-1_{ph}, C-2_{ph}, C-3_{ph}, C-4_{ph}, C-5_{ph} y C-6_{ph}) se desplacen a campo más bajo entremezclándose con aquellas señales correspondientes a los bencenos del espaciador. Sin embargo, presentan la misma correlación de señales que en el compuesto anterior. De este modo, las señales de los hidrógenos H-2_{ph}, H-4_{ph}, H-5_{ph} y H-6_{ph} se correlacionan con sus carbonos correspondientes. En el HMBC (zona 2) H-5_{ph} se correlaciona a tres enlaces con los carbonos cuaternarios C-3_{ph} (δ= 151.84 ppm) y C-1_{ph} (δ= 161.95 ppm). Además, la asignación de éste último es confirmada en el HMBC (zona 1) por la correlación a dos enlaces de este carbono con los átomos de hidrógeno del grupo metileno unido al anillo (CH₂-O).

En cuanto a la incorporación de la dimetilaminopiridina como cabeza catiónica, al tener dos grupos metilos en posición 4 de la piridina en lugar de la pirrolidina, da lugar a una diferencia en las señales.

Así podemos observar en el HSQC (zona 1) como las señales de los átomos de hidrógeno de los dos metilos de esta posición (2CH₃) aparecen a un desplazamiento químico de 3.25 ppm como un singlete y se correlacionan directamente con sus carbonos correspondientes (2C(CH₃)) que aparecen como una señal única a un desplazamiento de 41.59 ppm.

Por otro lado, en el HMBC (zona 1) se observa como esta señal se correlaciona a tres enlaces con el carbono cuaternario de la piridina C-4_{pyr}, que aparece a un campo de 159.26 ppm.

Figura 4.8.- Espectro de HSQC del compuesto **SOS-13** (Subfamilia A₂).

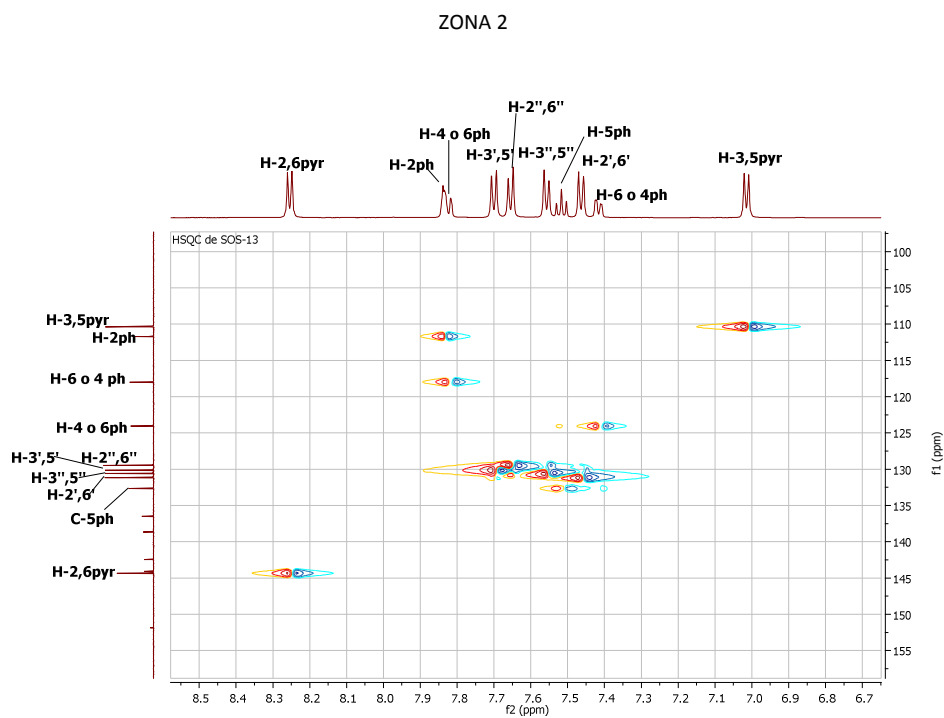
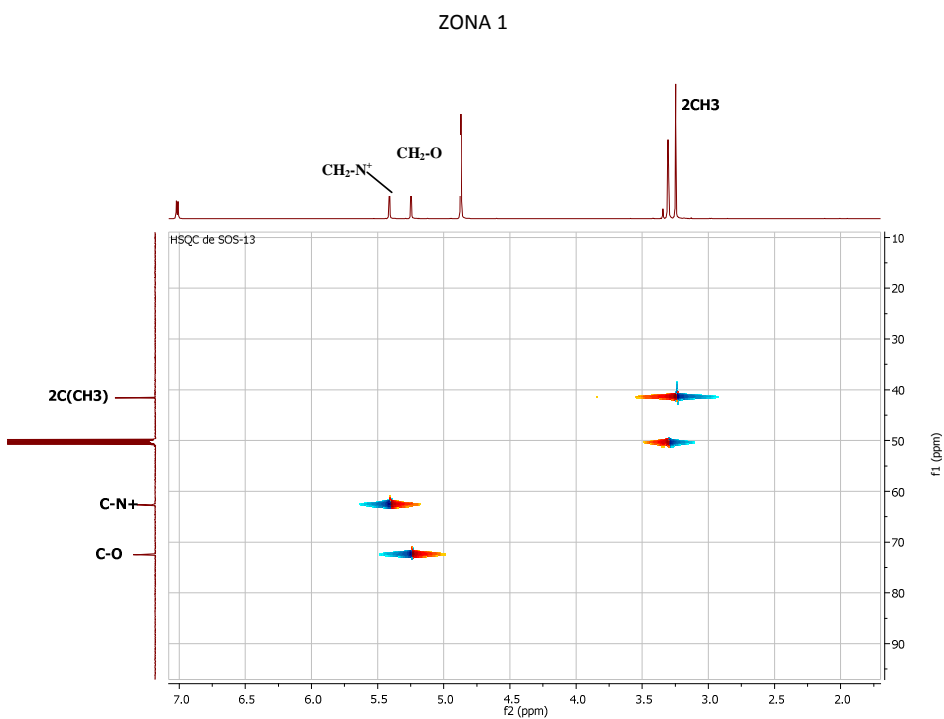
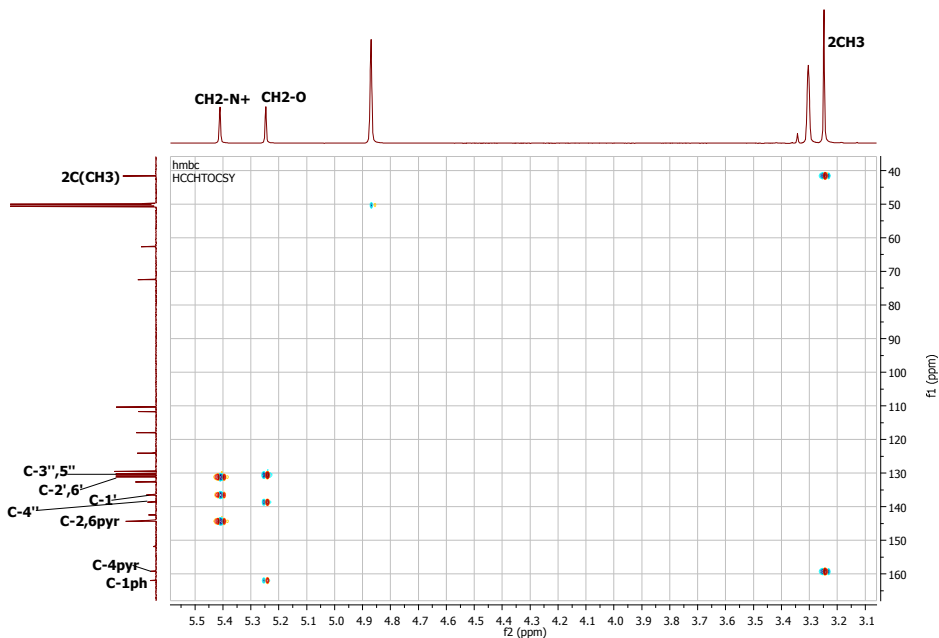
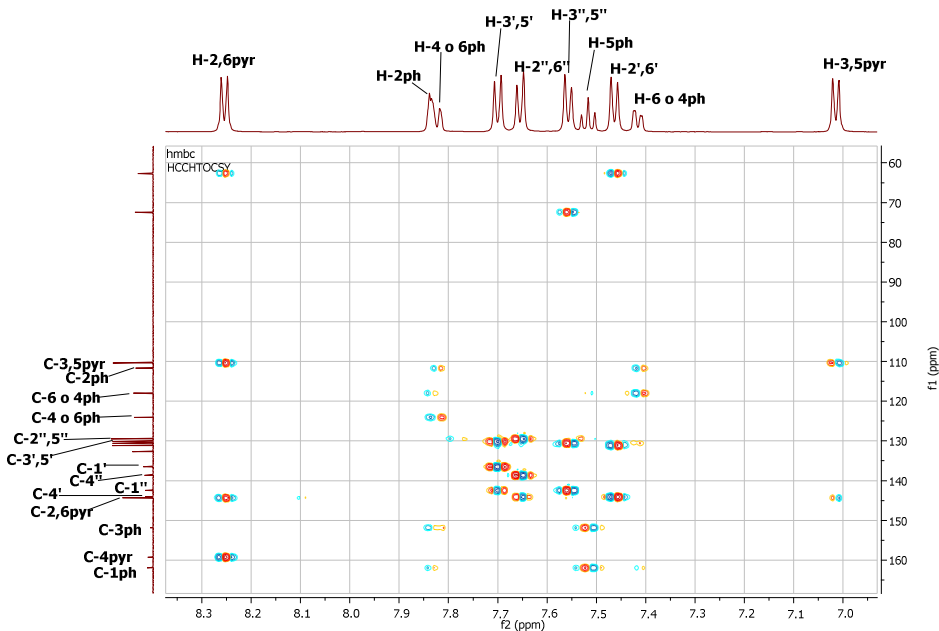


Figura 4.9.- Espectro de HMBC del compuesto **SOS-13** (Subfamilia A₂).

ZONA 1



ZONA 2



4.2.4.3.-Análisis bidimensional del compuesto SOS-29 (Subfamilia A₃).

En la **Subfamilia A₃** (derivados amínicos), **serie 3** (derivados de sales de quinuclidina), se ha recogido como ejemplo el estudio de HSQC (**Figura 4.10**) y de HMBC (**Figura 4.11**) del compuesto **SOS-29**. Este estudio se realizó utilizando espectroscopía de ¹H-RMN (300 MHz) y de ¹³C-RMN (126 MHz), usando como disolvente metanol deuterado y es concordante con la estructura propuesta.

Al igual que los compuestos precedentes las correlaciones entre las señales apenas varían. Cabe destacar la incorporación en este compuesto de un grupo funcional amínico (NH₂) y la cabeza catiónica quinuclidina, que al ser completamente diferente a las anteriores da lugar a otro tipo de señales diferentes.

Como se puede observar en la zona 1 de la **Figura 4.10** (HMBC), las señales de los átomos de hidrógeno de la quinuclidina aparecen a un campo magnético alto que oscila entre 3.49 y 1.95 ppm, presentando una correlación directa con las señales de sus carbonos correspondientes. Así, H-3,5,8_q se correlaciona directamente con los carbonos C-3,5,8_q, que aparecen como una única señal a δ 23.53 ppm. H-2,6,7_q se correlaciona con C-2,6,7_q que se encuentra a una frecuencia más alta (δ = 54.25 ppm) debido a la proximidad al nitrógeno positivo del azabicyclo. Por último, el hidrógeno H-4_q se correlaciona con su carbono C-4_q que aparece a un campo de 2.11 ppm.

También se puede ver como las señales de los átomos de hidrógeno de los 2CH₂ del espaciador tiene una correlación directa con sus carbonos correspondientes que aparecen a δ 37.06 y 36.81 ppm respectivamente.

Por otro lado, las señales de los grupos metilenos que se unen a la cabeza catiónica (CH₂-N⁺) y al anillo aminofenólico(CH₂-O) se correlacionan con sus carbonos C-N⁺ y C-O (δ = 69.26 y 67.32 ppm). Al contrario que en los casos anteriores y como era de esperar, el carbono unido al átomo de oxígeno está más desapantallado que el carbono unido al nitrógeno positivo de la quinuclidina.

De la zona correspondiente a la porción aromática de la molécula (zona 2) se determinan y asignan cada uno de los protones correspondientes a la misma y su correlación de carbonos correspondientes, pero no es posible asignar y determinar los carbonos cuaternarios.

Los carbonos cuaternarios se determinan gracias a las correlaciones a larga distancia por estudio de HMBC (**Figura 4.11**).

En el espaciador, C-1' se determina y asigna gracias a su correlación a dos enlaces con el metileno CH₂-N⁺ y a tres enlaces con H-3',5'. C-4' se correlaciona a dos enlaces con un metilo (CH₂) del espaciador, y a tres enlaces con H-2',6'. La señal del carbono C-1'' se deduce por su correlación a dos enlaces con un CH₂ del espaciador y a tres enlaces con H-3'',5''. Por último, C-4'' se correlaciona a dos enlaces con CH₂-O y a tres enlaces con los hidrógenos H-2'',6''. Finalmente, en el anillo aminofenólico, C-1_{ph} se determina por su correlación a dos enlaces con el grupo metileno unido al mismo (CH₂-O); mientras que C-3_{ph} se asigna por su correlación a tres enlaces con H-5_{ph}, lo que confirma también que ese metileno corresponde al grupo CH₂-O y no al CH₂-N⁺.

Figura 4.10.- Espectro de HSQC del compuesto SOS-29 (Subfamilia A₃).

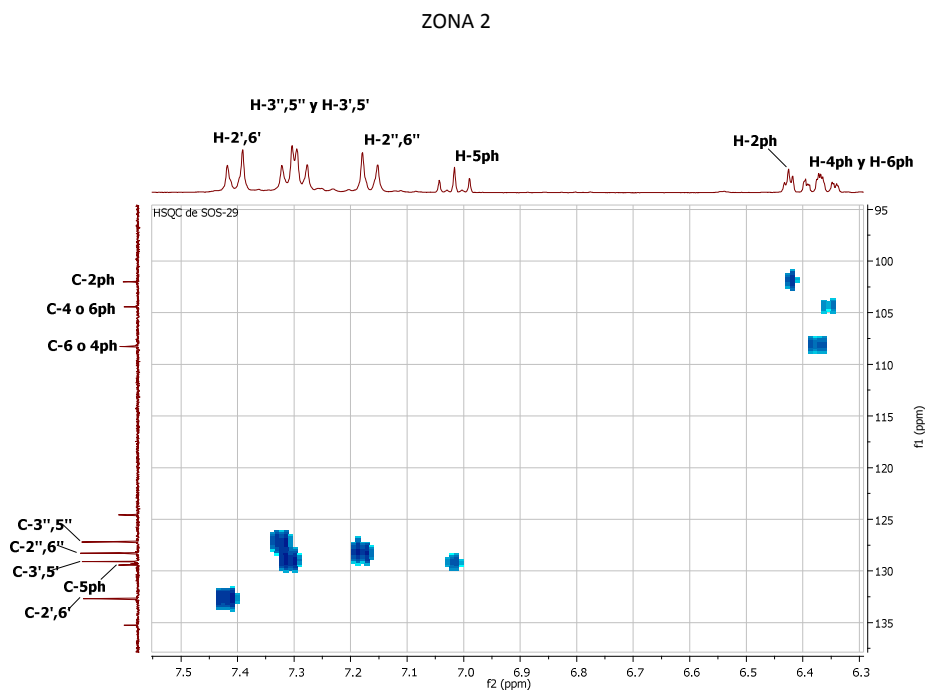
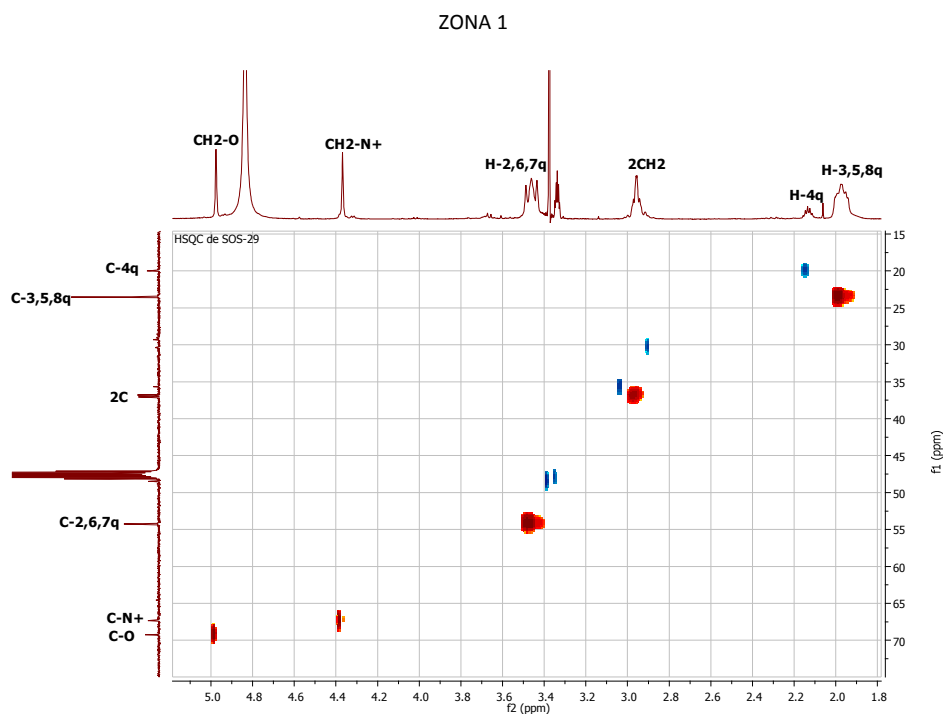
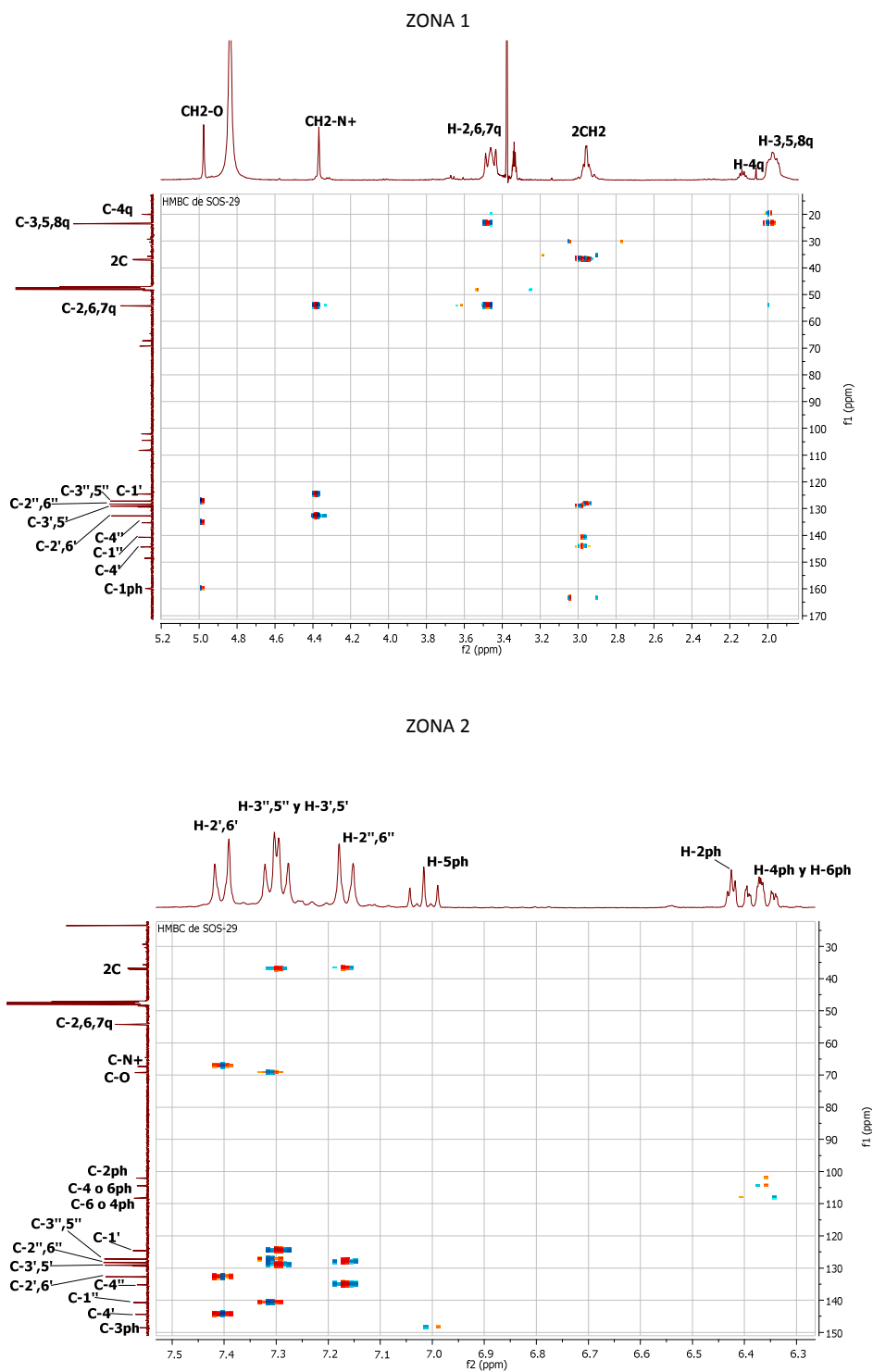


Figura 4.11.- Espectro de HMBC del compuesto SOS-29 (Subfamilia A₃).



4.2.4.4.-Análisis bidimensional del compuesto SOS-32 (Subfamilia B₁).

Dentro de esta Subfamilia hemos recogido como ejemplo el estudio de HSQC (Figura 4.12) y de HMBC (Figura 4.13) del compuesto **SOS-32**. Este estudio se realizó utilizando espectroscopía de ¹H-RMN (300 MHz) y de ¹³C-RMN (75 MHz), usando como disolvente dimetilsulfóxido deuterado y es concordante con la estructura propuesta.

ZONA 1

En el estudio de HSQC podemos observar que existe una correlación directa de todas las señales de protones con sus carbonos correspondientes. Se puede ver que, a campo más alto, aparecen las señales correspondientes a los átomos de hidrógeno de la quinuclidina (H-3,5,8_q, H-2,6,7_q y H-4_q) e, intercalada entre éstas, la señal correspondiente a los átomos de hidrógeno de los metilenos (2CH₂) del espaciador. Por último, a campo ligeramente más bajo aparece la señal correspondiente a los grupos metilenos unidos a las cabezas catiónicas. Debido a la simetría de la molécula todos los átomos dan lugar a señales muy simples y de fácil identificación.

En el estudio de HMBC, la señales de hidrógeno H-3,5,8_q se correlacionan a dos enlaces con C-4_q (δ= 20.02 ppm), mientras que H-2,6,7_q se correlaciona a dos enlaces con C-3,5,8_q (δ= 23.80 ppm).

Las señales de los átomos de hidrógeno de los grupos metilenos del espaciador se correlacionan con sus carbonos correspondientes (δ= 36.87 ppm) y a tres enlaces con los carbonos del espaciador C-2,6 y C-2',6' que se encuentran a un desplazamiento químico de 129.34 ppm.

Por último, las señales de los grupos metilenos unidos a los nitrógenos positivos de la cabezas catiónicas (CH₂-N⁺) se correlacionan a tres enlaces con los carbonos del espaciador C-3,5 y C-3',5' (δ= 133.45 ppm) y con los carbonos de la quinuclidina C-2,6,7_q; y a dos enlaces con los carbonos cuaternarios del espaciador C-4,4' que aparecen a δ 125.77 ppm.

ZONA 2

Mediante el estudio de HSQC de la zona aromática se confirman y corroboran las señales de los átomos de hidrógeno y carbono del espaciador.

Del estudio de HMBC se pueden asignar los carbonos cuaternarios C-1,1' gracias a que se correlacionan a tres enlaces con los átomos de hidrógeno H-3,5 y H-3',5'. Además, se reafirma la asignación de los protones del espaciador (H-2,6 y H-2',6' y H-3,5 y H-3',5') a un desplazamiento de 7.41 y 7.44 ppm, respectivamente.

Figura 4.12.- Espectro de HSQC del compuesto SOS-32 (Subfamilia B₁).

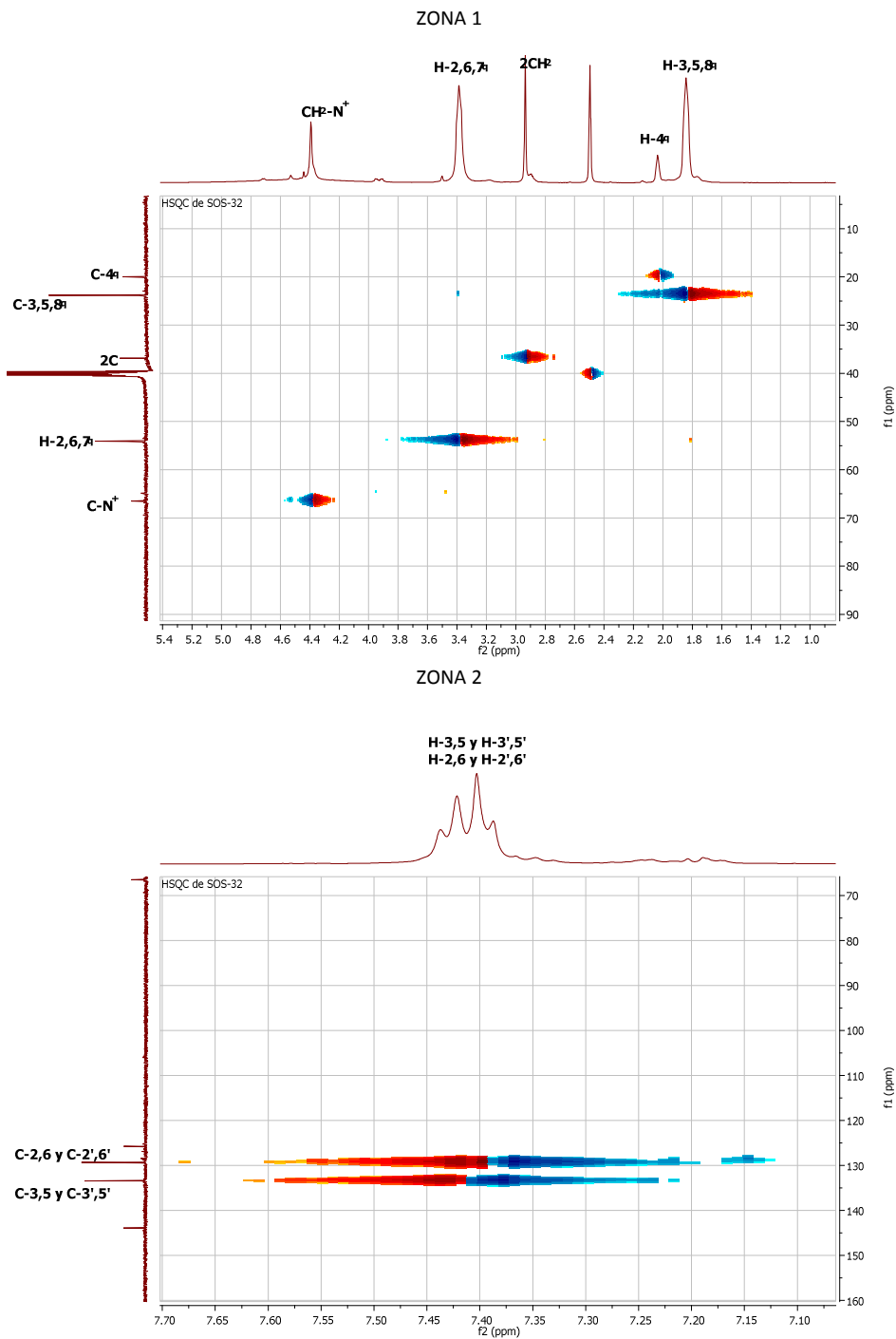
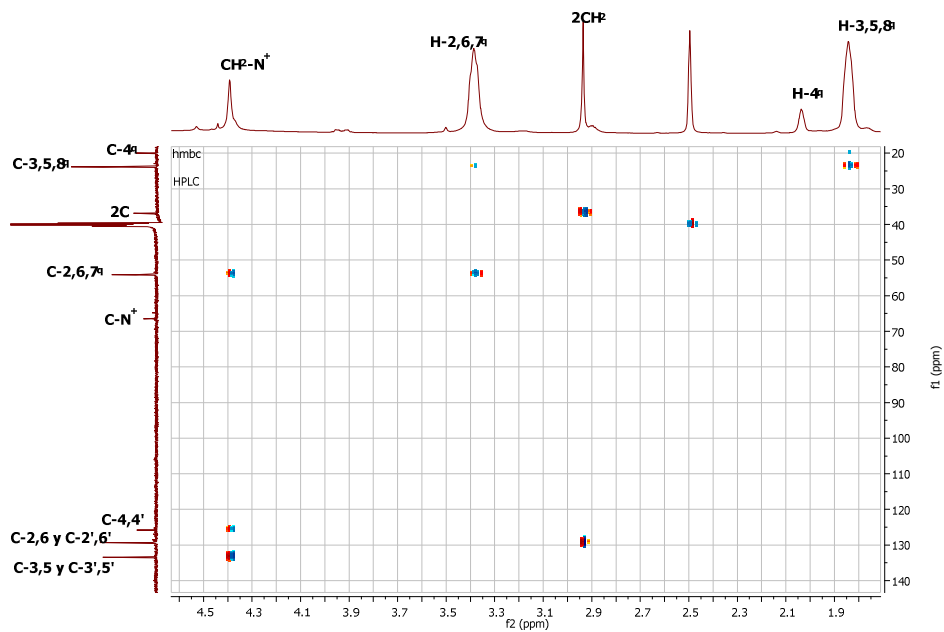
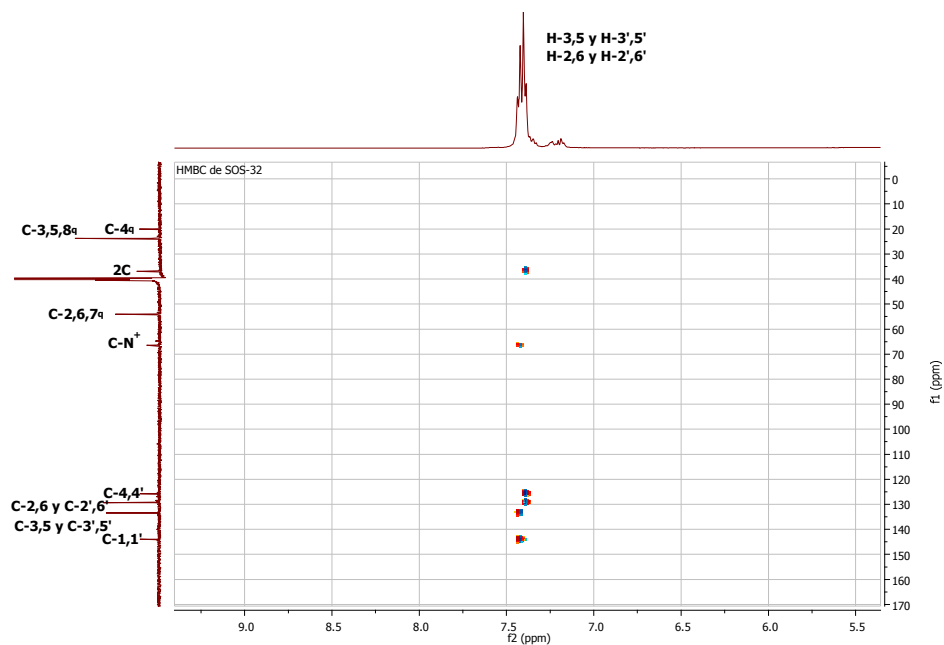


Figura 4.13.- Espectro de HMBC del compuesto SOS-32 (Subfamilia B₁).

ZONA 1



ZONA 2



4.2.4.5.-Análisis bidimensional del compuesto SOS-38 (Subfamilia B₂).

En la Subfamilia B₂ se ha elegido como ejemplo el estudio de HSQC (Figura 4.14) y de HMBC (Figura 4.15) del compuesto SOS-38. Este estudio se realizó utilizando espectroscopía de ¹H-RMN (300 MHz) y de ¹³C-RMN (75 MHz), usando como disolvente dimetilsulfóxido deuterado y es concordante con la estructura propuesta.

Como se ha venido describiendo en los compuestos de la familia anterior, primero se realizará un análisis de los grupos metilenos del espaciador y los sustituyentes saturados de las cabezas catiónicas (zona 1) y posteriormente se analizará la porción relativa a la parte aromática de la molécula (zona 2).

ZONA 1

En el estudio de HSQC se puede observar que todos los átomos de hidrógeno de la azepina sustituida en posición 4 de la quinolina y los grupos metilenos de la molécula presentan una correlación directa con sus correspondientes átomos de carbono.

Las señales de los hidrógenos H-3,6_{az} y H-4,5_{az} se correlacionan con los carbonos C-3,6_{az} ($\delta = 29.37$ ppm) y C-4,5_{az} ($\delta = 29.23$ ppm), respectivamente. Los átomos de hidrógeno H-2,7_{az} se correlaciona con los carbonos C-2,7_{az} a un campo más bajo ($\delta = 56.06$ ppm).

En los grupos metilenos del espaciador, los átomos de hidrógeno CH₂-O se correlacionan directamente con los carbonos C-O, a un desplazamiento químico de 68.84 ppm; mientras que el carbono unido directamente a la cabeza catiónica C-N⁺ aparece a un campo de 58.99 ppm y se correlaciona con los protones CH₂-N⁺.

Por otro lado, en el estudio de HMBC, los protones H-3,6_{az} se correlacionan a dos enlaces con los carbonos C-4,5_{az} y los protones H-4,5_{az} se correlacionan con los carbonos C-3,6_{az}. Los átomos de hidrógeno H-2,7_{az} se correlacionan con los carbonos anteriores y, además, a tres enlaces con el carbono cuaternario de la quinuclidina C-4_{quin}, que aparece a un desplazamiento químico de 161.91 ppm.

Los carbonos cuaternarios del espaciador C-1,1' ($\delta = 161.34$ ppm) se correlacionan a tres enlaces con los protones de los grupos metilenos del mismo (CH₂-O).

Los protones de los grupos metilenos unidos a las cabezas catiónicas (CH₂-N⁺) tienen una correlación a dos enlaces con el carbono cuaternario del espaciador C-4,4' ($\delta = 128.98$ ppm) y, a tres enlaces, con los carbonos C-3,5 y C-3',5' ($\delta = 130.48$ ppm), los carbonos de la quinolina C-2_{quin} ($\delta = 146.48$ ppm) y los carbonos cuaternarios C-8a_{quin} ($\delta = 142.10$ ppm).

ZONA 2

Nuevamente en el estudio de HSQC se aprecia la correlación directa que existe entre los átomos de hidrógeno de los fenilos del espaciador y de los anillos quinolínicos con sus correspondientes carbonos.

Los átomos de hidrógeno del espaciador H-2,6 y H-2',6' se correlaciona con los carbonos C-2,6 y C-2',6' ($\delta = 117.22$ ppm) y los átomos H-3,5 y H-3',5' con los carbonos C-3,5 y C-3',5' ($\delta = 130.48$ ppm).

En la quinolina H-3_{quin}, que aparece intercalado entre las señales de los protones del espaciador, se correlaciona con C-3_{quin} a un desplazamiento químico de 104.55 ppm. En orden creciente de frecuencia aparecen: H-6_{quin} que se correlaciona con C-6_{quin} ($\delta = 127.04$ ppm); H-7_{quin} correlacionado con C-7_{quin} ($\delta = 135.52$ ppm); H-5_{quin} que se correlaciona con C-5_{quin} ($\delta = 120.33$ ppm); H-8_{quin} que tiene correlación con el carbono C-8_{quin} ($\delta = 130.44$ ppm); y, por último, el átomo de hidrógeno H-2_{quin} que se correlaciona directamente con el carbono C-2_{quin} a un desplazamiento químico de 146.48 ppm.

En el estudio de HMBC se asignan y determinan los átomos anteriormente descritos además de los carbonos cuaternarios que faltaban por asignar.

Comenzando por los carbonos cuaternarios de la quinuclidina: C-8a_{quin} ($\delta = 142.10$ ppm) que, como anteriormente se comentó tiene una correlación a larga distancia con CH₂-N⁺, también se correlaciona a tres enlaces con H-2_{quin} y a dos enlaces con H-7_{quin}; el carbono cuaternario C-4a_{quin} ($\delta = 121.41$ ppm) se correlaciona a dos enlaces con H-5_{quin} y a tres enlaces con H-3_{quin}; por último, el carbono cuaternario C-4_{quin} ($\delta = 161.91$ ppm), además de correlacionarse con H-2,7_{az}, tiene una correlación a tres enlaces con H-2_{quin}.

Los carbonos cuaternarios del espaciador: C-1,1' ($\delta = 161.34$ ppm), además de tener una correlación con los protones de los grupos metilenos del espaciador (CH₂-O), también se correlacionan a tres enlaces con los protones del espaciador H-3,5 y H-3',5' y a dos enlaces con H-2,6 y H-2',6'; C-4,4' ($\delta = 128.98$ ppm), además de correlacionarse a dos enlaces con CH₂-N⁺, también se correlacionan a tres enlaces con los protones del espaciador H-2,6 y H-2',6'.

Figura 4.14.- Espectro de HSQC del compuesto SOS-38 (Subfamilia B₂).

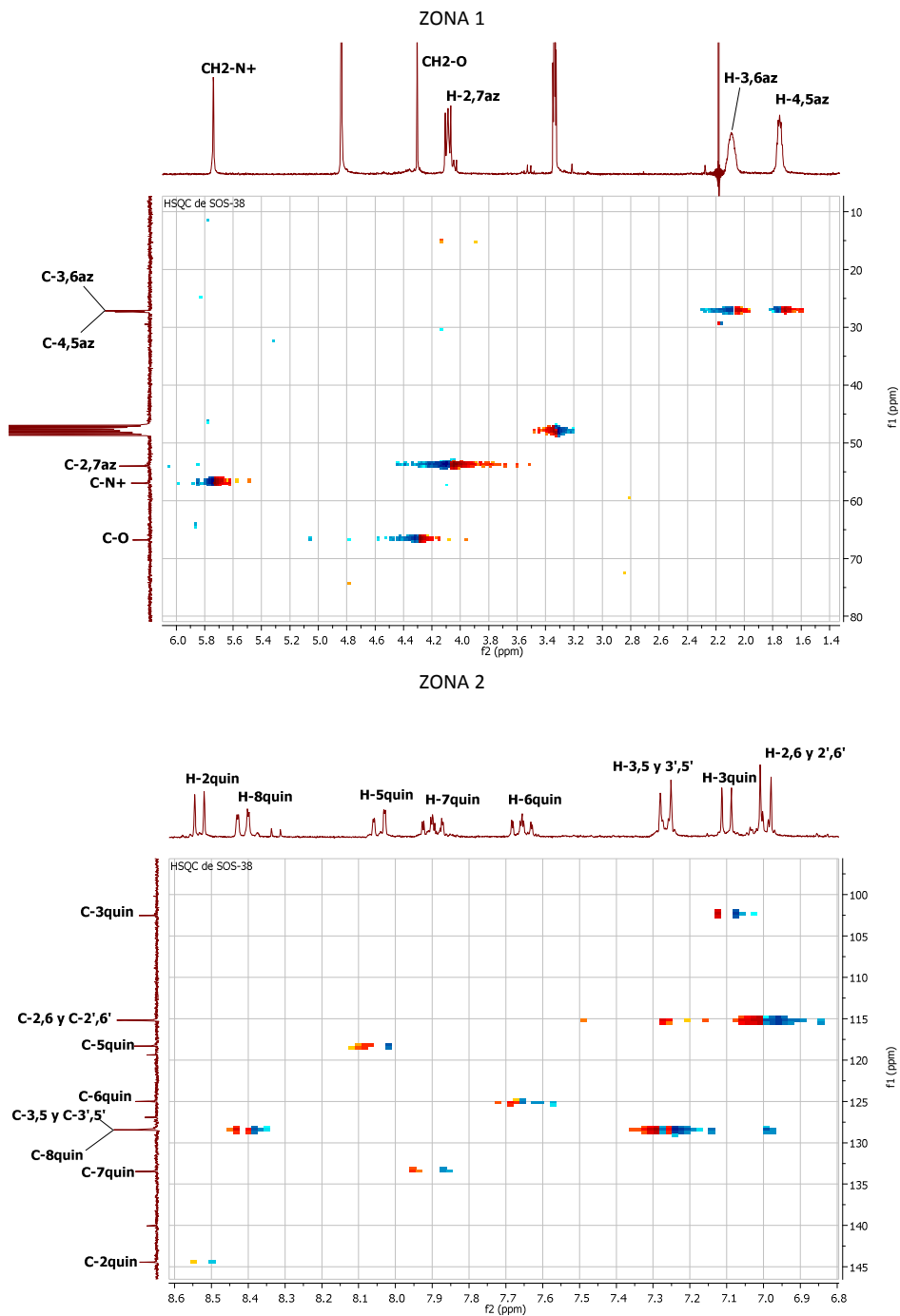
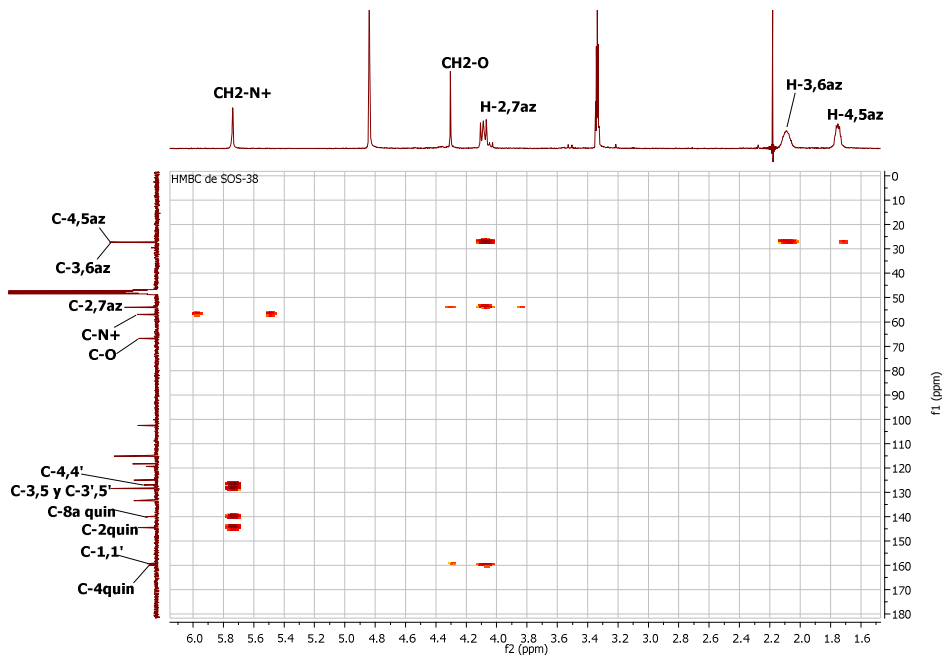
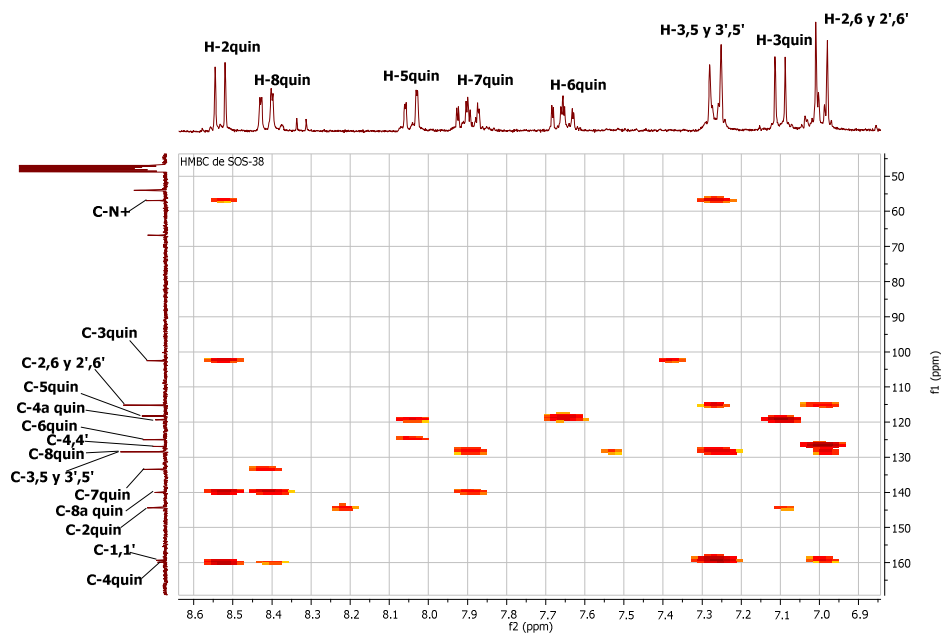


Figura 4.15.- Espectro de HMBC del compuesto SOS-38 (Subfamilia B₂).

ZONA 1



ZONA 2



4.2.4.6.- Análisis bidimensional del compuesto SOS-41 (Subfamilia B₃).

En esta Subfamilia se presenta como ejemplo el estudio de HSQC (**Figura 4.16**) y de HMBC (**Figura 4.17**) del compuesto **SOS-41**. Este estudio se realizó utilizando espectroscopía de ¹H-RMN (300 MHz) y de ¹³C-RMN (75 MHz), usando como disolvente metanol deuterado y es concordante con la estructura propuesta.

ZONA 1

En el estudio de HSQC se puede observar la correlación directa entre todas las señales pertenecientes a los átomos de hidrógeno de las cabezas catiónicas y de los grupos metileno del espaciador con sus correspondientes carbonos.

Las señales de los átomos de hidrógeno de la pirrolidina aparecen a un campo magnético alto. H-3,5_{pirr} se correlaciona con C-3,4_{pirr} que aparece a un desplazamiento químico de 26.98 ppm y H-2,5_{pirr} se correlaciona con C-2,5_{pirr} a δ 50.28 ppm.

Por otro lado las señales de hidrógeno de los grupos metileno del espaciador (CH₂-O) se correlacionan con sus carbonos C-O a un campo de 68.86 ppm. Mientras que las señales de carbono del grupo metileno unido a la cabeza catiónica (C-N⁺) aparecen a δ 62.26 ppm y se correlacionan directamente con sus protones correspondientes CH₂-N⁺.

En el HMBC observamos como las señales de la pirrolidina se correlacionan entre sí: H-3,4_{pirr} se correlaciona a dos enlaces con C-2,6_{pirr}; y, H-2,5_{pirr} se correlaciona a dos enlaces con C-3,4_{pirr}.

Las señales de los hidrógenos del grupo CH₂-O del espaciador se correlacionan a tres enlaces con el carbono cuaternario del espaciador C-1-1', a un desplazamiento de 161.79 ppm, lo que permite deducir que son estos los carbonos cuaternarios interiores del espaciador y no C-4,4'.

El grupo metileno unido a la cabeza catiónica (CH₂-N⁺) se correlaciona a tres enlaces con los carbonos de la piridina C-2,6_{pyr} (δ = 143.68 ppm) y con los carbonos del espaciador C-3,5 y C-3',5' (δ = 131.92 ppm), y a dos enlaces se correlaciona con el carbono cuaternario del espaciador C-4,4' (δ = 129.31 ppm).

ZONA 2

En el estudio de HSQC podemos ver como todas las señales de protones aromáticos de la molécula tienen su correlación directa con sus carbonos correspondientes.

En el HMBC reafirmamos las asignaciones de los protones y carbonos de la molécula. Aquí podemos observar como el carbono cuaternario del espaciador C-4,4' se correlaciona, además, con los átomos de hidrógeno H-2,6 y H-2',6' a tres enlaces. El carbono cuaternario C-1,1' se correlaciona a tres enlaces con los hidrógenos del espaciador H-3,5 y H-3',5'.

Por último, podemos determinar y asignar el carbono cuaternario de la piridina (C-4_{pyr}) ya que se correlaciona con H-2,6_{pyr} a tres enlaces, confirmando así su desplazamiento químico de 156.05 ppm.

Figura 4.16.- Espectro de HSQC del compuesto SOS-41 (Subfamilia B₃).

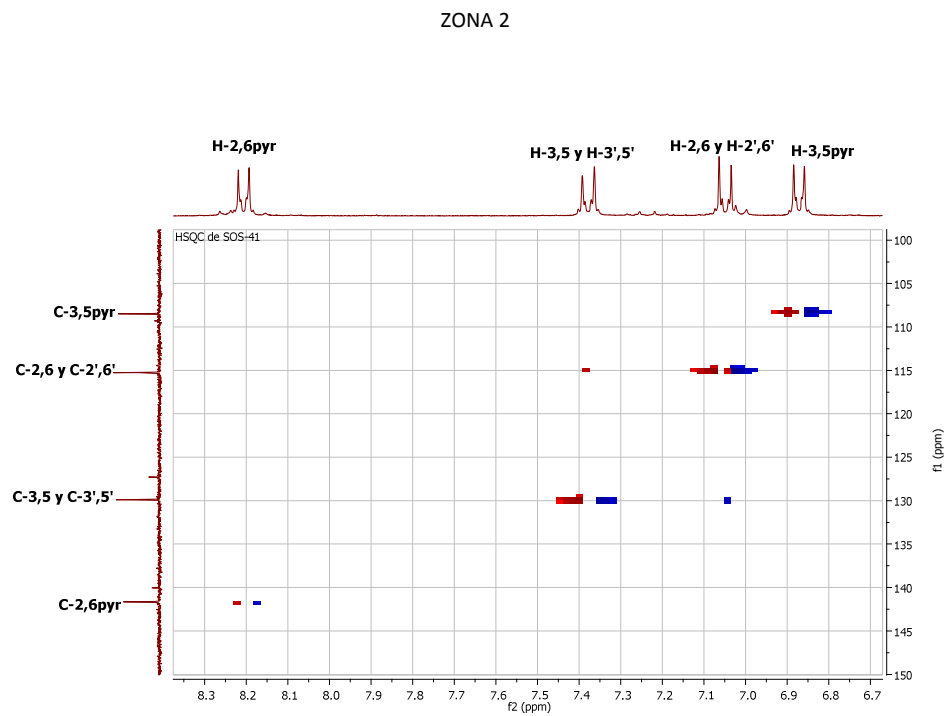
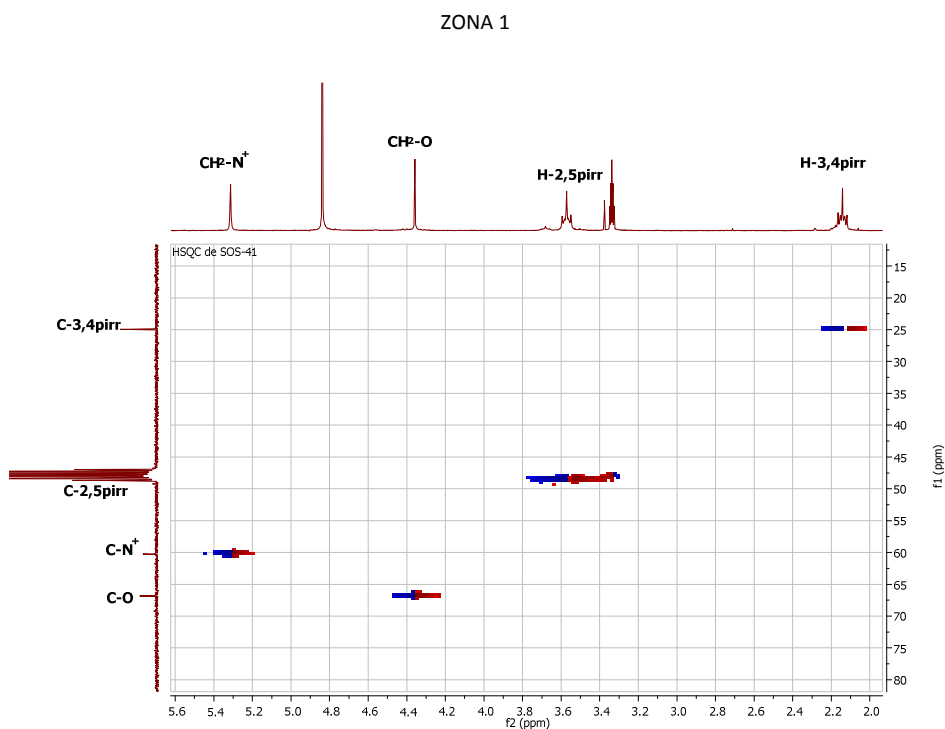
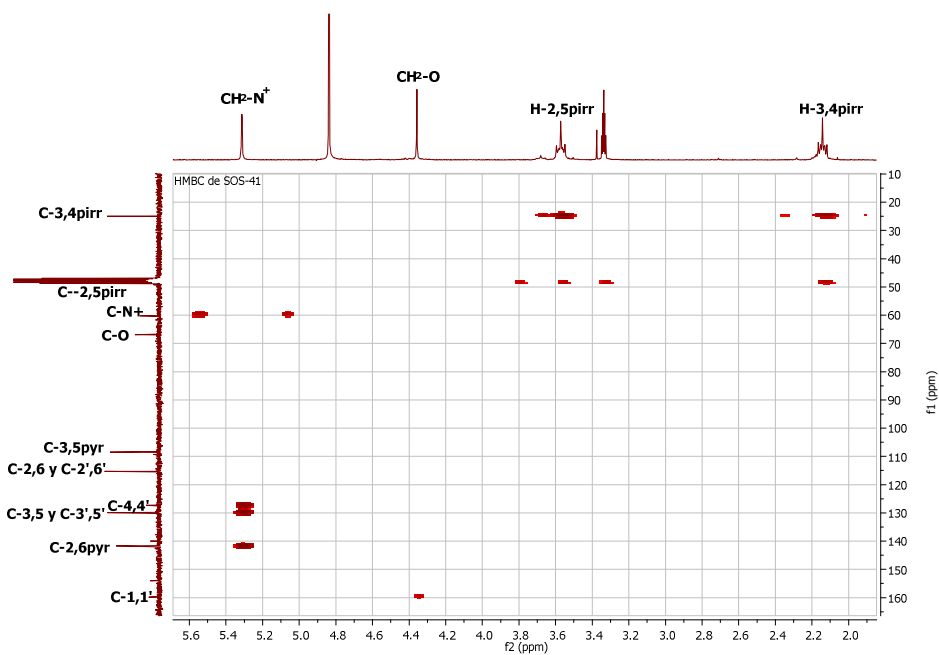
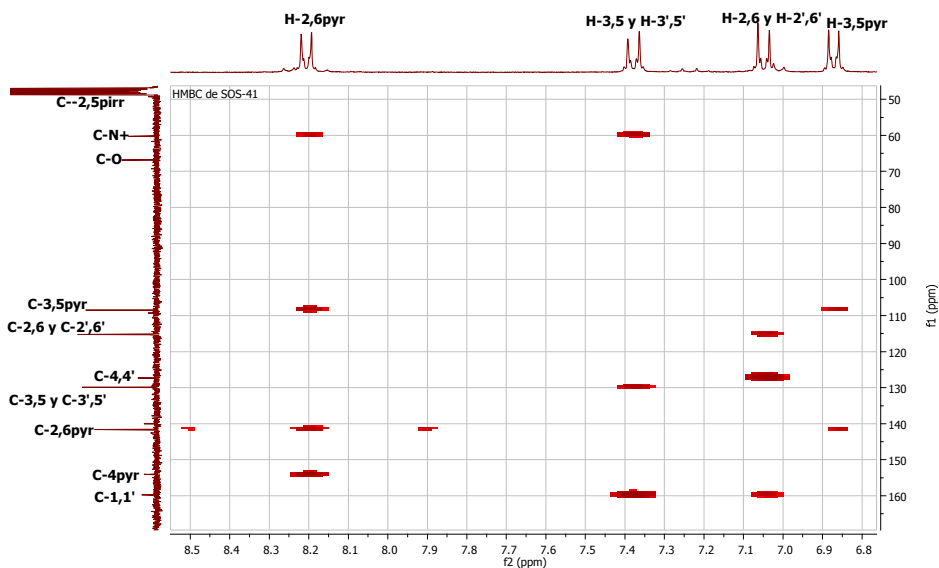


Figura 4.16.- Espectro de HMBC del compuesto SOS-41 (Subfamilia B₃).

ZONA 1



ZONA 2



4.3. Diseño y Modelado Molecular.

Las estructuras 3D de ambas isoformas ChoK α 1 (PDB id: 3G15) y ChoK β (PDB id: 3FEG) complejadas con el primer inhibidor conocido (**HC-3**) han sido recientemente publicadas⁹. En la estructura cristalina de ChoK α 1 están presentes tanto el HC-3 como el ADP, mientras que durante la cristalización de ChoK- β el HC-3 ha sufrido una fosforilación, encontrándose presente en el complejo en forma fosforilada (PHC-3).

La colina quinasa humana ChoK α 1 (PDB id: 3G15) ha sido elegida para los estudios de docking debido a la presencia en la misma estructura cristalina tanto del HC-3 como de ADP. Los estudios de modelado molecular fueron realizados usando el programa Sybil-X¹⁰.

En un artículo publicado recientemente, se ha descrito una familia de inhibidores monocatiónicos no-simétricos de colina quinasa¹¹ que contienen una sal de piridinio y un fragmento de adenina unidos mediante diferentes espaciadores. Los estudios de docking descritos para esta familia indican que los compuestos más potentes pueden insertar el resto de adenina dentro del sitio de unión del ATP y el resto de piridinio en el sitio de unión de la colina (**Figura 4.17**)¹¹.

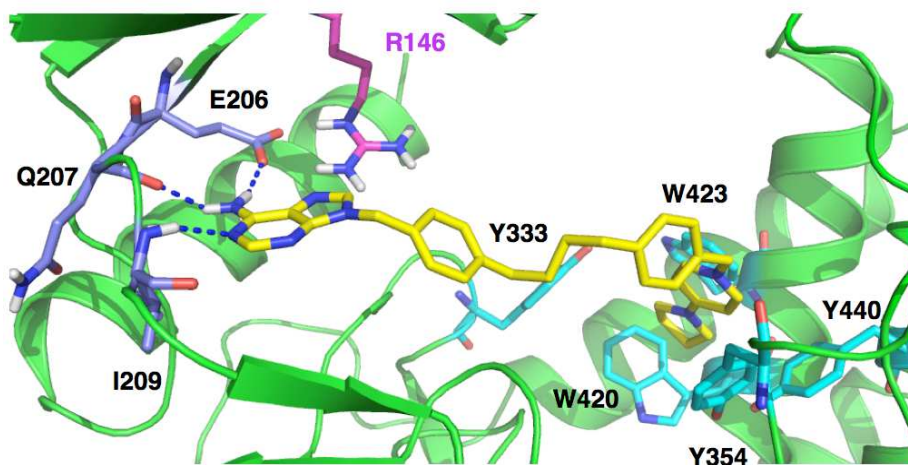


Figura 4.17.- La disposición más estable obtenida del compuesto 15 de la primera familia de inhibidores monocatiónicos no simétricos en estudios de docking (B. Rubio-Ruiz, et al Eur. J. Med. Chem. 50 (2012) 154-162). El resto de adenina de esta molécula se inserta dentro del sitio de unión del ATP de manera similar al fragmento de adenina del ATP, siendo estabilizado por enlaces de hidrógeno con Asp209, Glu207 e Ile209. El fragmento de pirrolidinopiridinio se introduce dentro del sitio de unión de la Cho y se estabiliza por interacciones π -catión con Trp423.

Los estudios de docking iniciales realizados en esta tesis se han hecho sobre algunos compuestos de la **Familia A** (inhibidores monocatiónicos no-simétricos), sobre todo de la **Subfamilia A₁** y **A₃**. Los espaciadores y las cabezas catiónicas usadas para esta familia son las mismas que para la primera familia de compuestos ya publicada, mientras que el resto de adenina es sustituido por un resto de *m*-aminofenol.

Estos estudios de docking iniciales realizados sobre ChoKα1 con los compuestos de la **Familia A** de esta memoria, muestran que el resto de *m*-aminofenol puede mimetizar al resto de adenina presente en la primera familia de compuestos previamente publicada, pudiendo insertarse en el sitio de unión del ATP y estabilizarse mediante enlaces de hidrógeno con Arg146, Asp206, Gln207 o Ile209 (**Figura 4.18**). Estos resultados fueron la razón para el diseño, síntesis y evaluación biológica de los compuestos monocatiónicos no simétricos (**Familia A**) descritos en esta tesis.

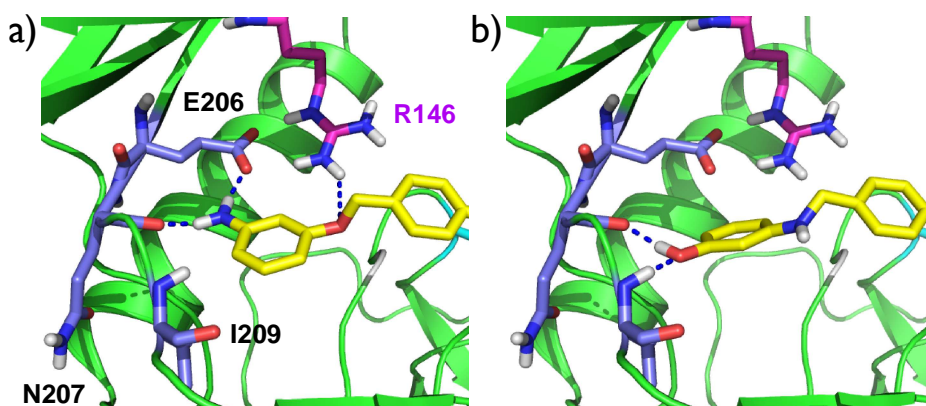


Figura 4.18.- Posibles interacciones entre el resto de *m*-aminofenol y los residuos de unión del sitio del ATP. **a)** El grupo NH₂ libre puede formar enlaces de hidrógeno con Asp206 y Gln207, mientras que el átomo de O del enlace éter puede formar un puente de hidrógeno con Arg146. **b)** El grupo OH libre forma puentes de hidrógeno con Gln207 e Ile209.

Por otro lado, los estudios de docking indican que existen diferentes modos para la unión de los inhibidores dentro de la enzima. La longitud del espaciador en los compuestos **SOS-1**, **SOS-5**, **SOS-19** y **SOS-23** es demasiado corta para permitir que estas moléculas estén localizadas en ambos sitios de unión, ATP y Cho, simultáneamente. Las disposiciones o poses más estables obtenidas para estos compuestos muestran que se pueden insertar dentro del sitio de unión de la Cho o dentro del sitio de unión del ATP.

La disposición más estable obtenida para el compuesto **SOS-23** indica que éste podría insertarse dentro del sitio de unión del ATP (**Figura 4.19**). Se ha podido observar como el grupo NH₂ es estabilizado mediante dos enlaces de hidrógeno con Glu206 y Gln207, siendo similares a los enlaces de hidrógeno observados entre el grupo NH₂ del resto de adenina del ADP y Glu206 y Gln207 en la estructura cristalina de ChoKα1.

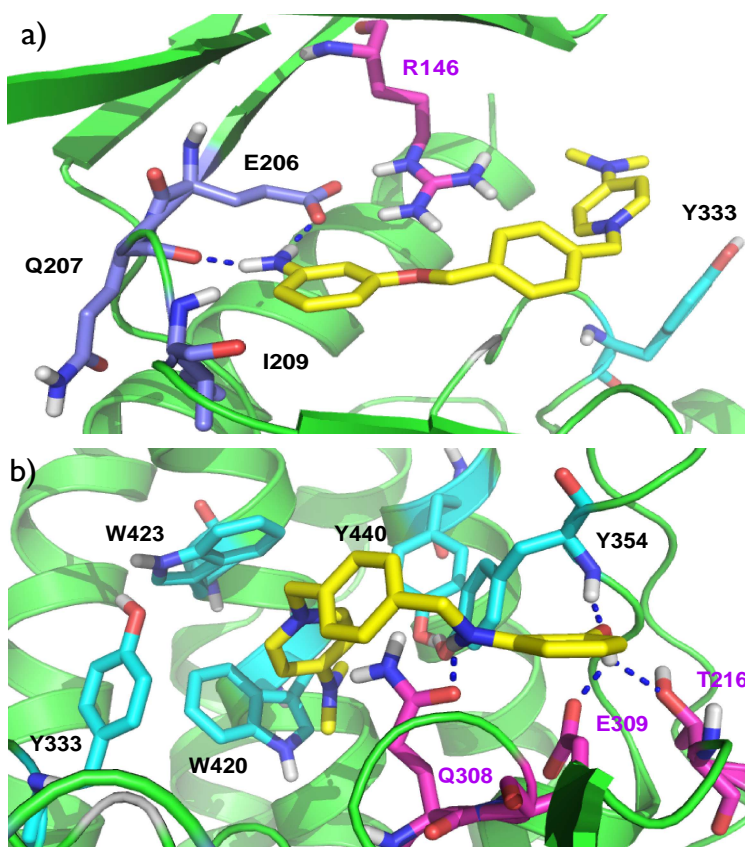


Figura 4.19.- a) La disposición más estable obtenida para el compuesto **SOS-23** (átomos de carbono en color amarillo) unido dentro del sitio de unión del ATP. El grupo NH₂ se estabiliza mediante dos puentes de hidrógeno con Glu206 y Gln207. El resto de dimetilaminopiridinio se inserta dentro de la proteína. **b)** La disposición más estable obtenida para el compuesto **SOS-5** (átomos de carbono en color blanco). La cabeza catiónica se inserta dentro del sitio de unión de la colina y se estabiliza mediante interacciones π -catión, y el grupo aminofenil forma puentes de hidrógeno con Tyr354, Glu309, Thr206 y Gln308.

La **Figura 4.19** también muestra la pose o disposición más estable obtenida, en estos estudios de docking iniciales, para el compuesto **SOS-5**. La cabeza catiónica de este compuesto se introduce dentro del bolsillo hidrofóbico del sitio de unión de la Cho y es estabilizado mediante interacciones de tipo π -catión. Con esta disposición, el grupo OH del anillo de *m*-aminofenol se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno con Tyr354, Glu309 y Thr206, mientras que el grupo NH del espaciador forma otro enlace de hidrógeno con Gln308. Una disposición similar se obtuvo para el compuesto **SOS-1**, pero el mayor volumen del resto de pirrolidinopiridinio impide una inserción profunda dentro del sitio de unión de la Cho y el enlace de hidrógeno entre el grupo NH y Gln308 (**Figura 4.20**).

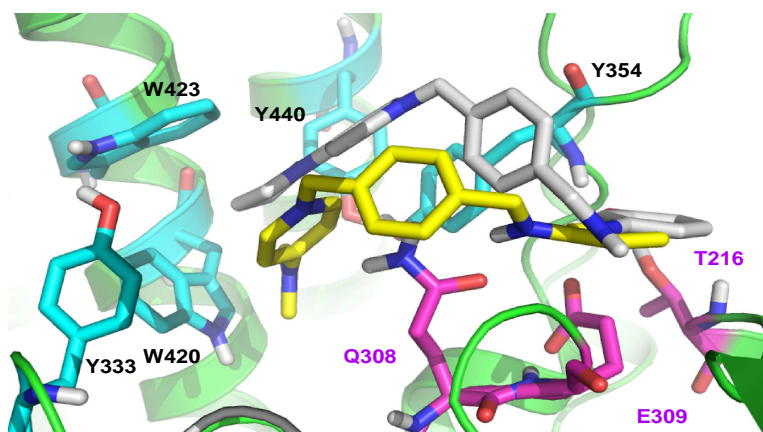


Figura 4.20.- La disposición más estable obtenida para los compuestos **SOS-1** (átomos de carbono en color blanco) y **SOS-5** (átomos de carbono en color amarillo). El mayor volumen del resto pirrolidinopiridinio del compuesto **SOS-1** impide una inserción profunda dentro del sitio de unión de la Cho y la formación de un puente de hidrógeno entre el grupo NH y Gln308.

La disposición más estable para el compuesto **SOS-19** se asemeja a aquella del compuesto **SOS-23**, indicando que esta molécula también podría introducirse dentro del sitio de unión del ATP. La principal diferencia entre las poses de ambos compuestos es la orientación del fragmento de dimetilamino- o pirrolidinopiridinio. En el compuesto **SOS-23**, el fragmento de dimetilaminopiridinio está orientado hacia el interior de la proteína, mientras que el resto de pirrolidinopiridinio del compuesto **SOS-19** está orientado hacia fuera, probablemente debido al mayor volumen que presenta (**Figura 4.21**).

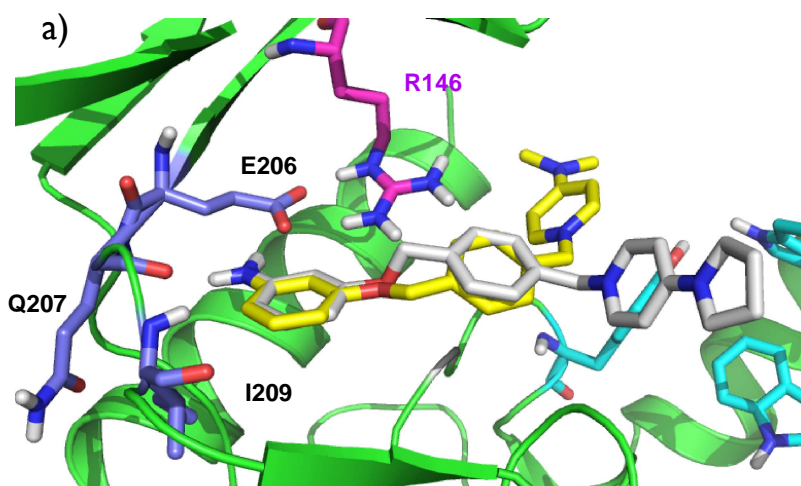


Figura 4.21.- La disposición más estable obtenida para los compuestos **SOS-19** (átomos de carbono en color blanco) y **SOS-23** (átomos de carbono en color amarillo). El mayor volumen del resto de pirrolidinopiridinio del compuesto **SOS-19** impide la inserción de este fragmento dentro de la proteína, orientándose hacia la superficie de la misma.

Finalmente, en los otros compuestos de esta familia, la longitud del espaciador es suficiente para permitir a estas moléculas insertarse simultáneamente en ambos sitios de unión, tanto del ATP como de la Cho. En la **Figura 4.22** se muestra un ejemplo de las disposiciones posibles obtenidas para los compuestos **SOS-20**, **SOS-21** y **SOS-8**. El primer compuesto tiene un grupo bifenilo como espaciador, mientras que **SOS-21** y **SOS-8** tienen el 1,2-difeniletano y el 1,4-difenilbutano, respectivamente. En todos los compuestos, el resto de *m*-aminofenol se inserta dentro del sitio de unión del ATP y se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno. La cabeza catiónica se inserta dentro del sitio de unión de la colina, siendo el espaciador 1,4-difenilbutano del compuesto **SOS-8** el que permite una inserción más profunda (**Figura 4.22**).

Consecuentemente, sería de esperar una mayor actividad para aquellos compuestos que presenten los espaciadores de mayor longitud, como en las primeras series de inhibidores monocatiónicos no simétricos previamente descritos.

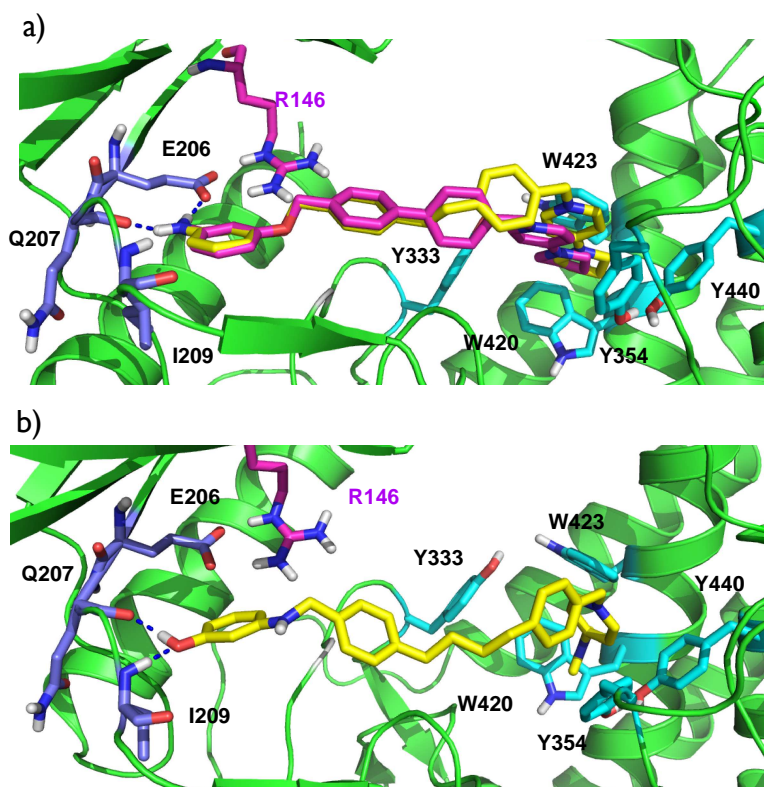


Figura 4.22.- a) La disposición más estable obtenida para los compuestos **SOS-20** (átomos de carbono en color magenta) y **SOS-21** (átomos de carbono en color amarillo). **b)** La disposición más estable obtenida para el compuesto **SOS-8**. En todos los casos, el fragmento de *m*-aminofenol mimetiza al resto de adenine del ATP y se estabiliza por puentes de hidrógeno. La cabeza catiónica se inserta en el sitio de unión de la colina.

4.4.- ChoK humana: Resultados biológicos y discusión.

4.4.1.- Generalidades.

La PCho forma parte de una transmisión de señales esencial para la regulación del crecimiento celular. Está demostrado que los altos niveles de PCho presentes en ciertos tejidos tumorales se deben a la sobreexpresión y activación de la ChoK provocadas por la activación del oncogén *ras* y otros oncogenes. Por ello, se puede concluir que la inhibición de ChoK daría lugar a la inhibición de la proliferación celular en líneas tumorales que tengan altos niveles de PCho, como por ejemplo en las células transformadas por el oncogén *ras*.

Para estudiar la posible interacción de los productos descritos en esta Memoria con alguna de estas rutas se realizan dos tipos de ensayos biológicos:

- a) **Ensayos *ex vivo*.** Para este tipo de estudios se utiliza colina quinasa humana aislada. Al realizarse sobre la enzima aislada, la actividad inhibitoria no se ve influida por factores biológicos tales como el paso a través de las membranas celulares, la posible inactivación en el entorno biológico o una probable compartimentación de la célula. Por todo esto, el proceso depende únicamente del reconocimiento molecular entre la enzima y el ligando.

Los ensayos biológicos se realizaron usando colina (Cho) marcada con ^{14}C , con lo que se puede medir la cantidad de ^{14}C -PCho producida por el control y compararla con la producida por la enzima en presencia de los inhibidores.

- b) **Ensayos *in vitro*.** Se mide la actividad antiproliferativa frente a cultivos celulares. La línea tumoral elegida para la realización de los ensayos biológicos de estos compuestos es la HepG2 (células de hepatoma humano), que muestran una gran resistencia a fármacos y presentan el oncogén *ras* activo^{12,13}.

La técnica utilizada para medir la citotoxicidad desarrollada por los compuestos está basada en la colorimetría, de forma que se tiñen las células vivas presentes en los pocillos con cristal violeta. Posteriormente se mide en un lector de placas la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda determinada y se compara la proliferación de los pocillos control con la de aquellos que tienen los compuestos sintetizados. Estos ensayos constituyen una primera evaluación que permite descartar aquellas estructuras que son menos potentes.

En este tipo de estudios se mide el efecto global que produce un cierto compuesto sobre la población celular que se encuentra en fase de crecimiento, algo que es muy similar a lo que sucede en los tumores *in vivo*. Además, el uso de una línea celular transformada por el oncogén *ras* es otro punto que acerca el experimento a la realidad clínica¹³.

Las pruebas biológicas de los compuestos finales sintetizados y descritos en esta Memoria han sido realizadas por la Dra. Carmen Marco y sus colaboradores del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

Los resultados obtenidos, tanto en ensayos *ex vivo* como *in vitro*, se dan en forma de Concentración Inhibitoria 50 (IC_{50}). Los datos de IC_{50} reflejan la concentración (μM) a la que el

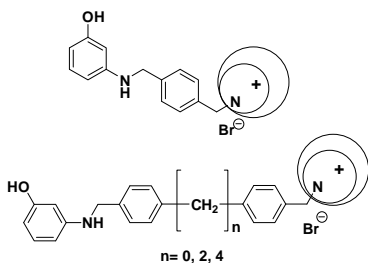
inhibidor ejerce un 50% de su efecto máximo. De esta forma los compuestos más activos son los que presentan los valores más bajos.

4.4.2. Resultados biológicos de los compuestos monocatiónicos no simétricos (Familia A).

Los resultados biológicos de los compuestos finales pertenecientes a la Familia A (**SOS-1** a **SOS-29**) se detallan en las **Tablas 4.31** a **4.33**, distinguiendo tres subfamilias dependiendo del sustituyente R_1 .

4.4.2.1. Derivados Fenólicos de los compuestos monocatiónicos (Subfamilia A_1).

Dentro de este apartado se describen los valores de inhibición producidos por cada compuesto de la Subfamilia A_1 , donde se encuentran los compuestos finales **SOS-1** a **SOS-11** (**Tabla 4.31**).



De los resultados de inhibición de ChoK obtenidos para esta Subfamilia (**Tabla 4.31**) puede observarse como la cabeza catiónica juega un papel fundamental. Siendo aquellos compuestos que presentan un anillo aromático los más interesantes, debido probablemente a la deslocalización de la carga positiva del nitrógeno. La aromaticidad del anillo pirimidínico le permite establecer por un lado interacciones de tipo π -catión y

también interacciones tipo π - π , necesarias para la interacción con el sitio activo de la enzima. Mientras que el anillo de quinuclidina solo puede formar interacciones tipo π -catión^{7,11}.

Otro aspecto a considerar es la influencia del espaciador sobre la actividad enzimática. En este sentido se observa que existe una relación directa entre la longitud del espaciador y los mejores valores de inhibición de la enzima. Así, los compuestos que ofrecen los mejores datos son los que presentan un espaciador de fenilo o bifenilo (**SOS-1**- **SOS-2** y **SOS-5**- **SOS-6**), siendo los compuestos **SOS-5** y **SOS-6** los más activos.

Si comparamos la serie de la pirrolidinopiridina y la dimetilaminopiridina, se observa que los compuestos **SOS-1** y **SOS-6** son los más activos. De esta forma, parece que al introducir un resto de pirrolidinopiridina como cabeza catiónica la longitud del espaciador debe ser menor que cuando el resto introducido es dimetilaminopiridina. Debido probablemente a que el volumen que ocupan ambas moléculas sea similar, adquiriendo la misma conformación.

El compuesto **SOS-6** es el que presenta los mejores datos de inhibición frente a ChoK, presentando una IC_{50} de $6.37 \pm 0.53 \mu\text{M}$. Lo que parece indicar que la introducción de un resto de dimetilaminopiridina favorece la actividad inhibitoria.

Tabla 4.31.- Resultados biológicos de la Subfamilia A₁.

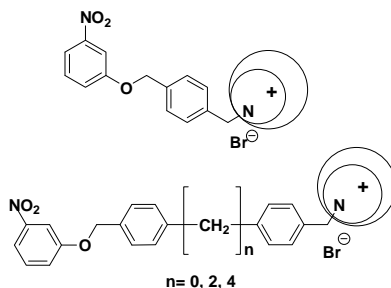
Compuesto	Cabeza catiónica	Espaciador	Inhibición ChoK 10 μ M	Inhibición ChoK 50 μ M	Inhibición Proliferación 1 μ M	Inhibición Proliferación 5 μ M	Inhibición Proliferación 10 μ M	Inhibición Proliferación 50 μ M	IC ₅₀ (μ M)
SOS-1			--	41.28 \pm 2.89 (P=0.0021)	2.91 \pm 10.7	13.43 \pm 3.36	9.54 \pm 2.36	8.53 \pm 1.45	--
SOS-2			--	28.20 \pm 5.05 (P=0.0168)	48.52 \pm 6.23	52.99 \pm 7.43	Tóxico	tóxico	--
SOS-3			--	13.60 \pm 8.00 (nds)	11.19 \pm 1.57	67.39 \pm 4.70	Tóxico	tóxico	--
SOS-4			--	18.04 \pm 1.83 (P=0.0378)	--	48.96 \pm 3.72	Tóxico	tóxico	--
SOS-5			27.54 \pm 5.91 (nds)	52.46 \pm 1.67 (P=0.0063)	7.74 \pm 2.14 (nds)	13.01 \pm 3.36 (nds)	24.38 \pm 3.58	54.51 \pm 2.26 (P=0.004)	60.83 \pm 14.8
SOS-6			54.16 \pm 2.81 (P=0.0060)	66.25 \pm 1.39 (P=0.0020)	--	--	9.86 \pm 2.47	24.40 \pm 2.92	No se puede
SOS-7			--	39.49 \pm 0.54 (p=0.0444)	5.56 \pm 4.46 (nds)	18.43 \pm 3.82 (nds)	34.13 \pm 2.65	73.40 \pm 3.06	24.80 \pm 2.99
SOS-8			NO INHIBE	NO INHIBE	4.58 \pm 4.30 (nds)	13.09 \pm 2.39 (nds)	30.86 \pm 2.33	71.10 \pm 1.51	--
SOS-9			Ins	Ins	ins	ins	Ins	ins	--
SOS-10			17.45 \pm 2.56 (nds)	10.27 \pm 2.97 (nds)	--	--	5.27 \pm 1.89 (nds)	21.84 \pm 3.20 (P=0.034)	--
SOS-11			--	39.09 \pm 2.75 (P=0.0001)	--	--	13.71 \pm 0.34 (P=0.0077)	25.43 \pm 2.48 (P=0.0023)	--

En cuanto a la inhibición de la proliferación celular (**Tabla 4.31**), es posible apreciar como al aumentar el tamaño del espaciador disminuye la proliferación celular. Algo lógico, ya que al ir aumentando el tamaño del espaciador, con la introducción de grupos alquílicos, aumenta la lipofilia de las moléculas lo que facilita su paso a través de la membrana. Los compuestos **SOS-3**, **SOS-7** y **SOS-8**, que presentan como espaciador el 1,2-difeniletano y 1,4-difenilbutano, son los que ofrecen mejores valores de actividad antiproliferativa. Parece, por tanto, que dichos espaciadores poseen las características óptimas para el ejercicio de la actividad antiproliferativa.

De esta Subfamilia, se puede deducir que no hay una relación clara entre aquellas estructuras con mejores datos de inhibición enzimática y las que ofrecen mejores datos antiproliferativos. Así, **SOS-1**, **SOS-5** y **SOS-6** (que presentan mejor actividad enzimática) muestran valores bajos de actividad antiproliferativa, debido probablemente a la falta de lipofilia, a excepción del compuesto **SOS-5**. Mientras que **SOS-2**, **SOS-3**, **SOS-7** y **SOS-8** que apenas inhiben a la enzima son los que tienen un mayor efecto antiproliferativo, lo que hace intuir la posibilidad de que actúen a otro nivel que influya sobre la proliferación celular.

4.4.2.2. Derivados Nitrados de los compuestos monocatiónicos (Subfamilia A₂).

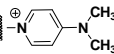
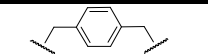
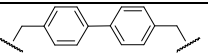
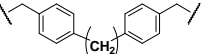
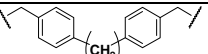

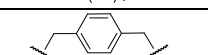
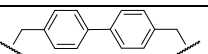
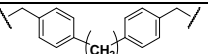
En la **Tabla 4.32** están incluidos los resultados biológicos de los compuestos **SOS-12** a **SOS-18**.



El grupo nitro, como era previsible influye de forma negativa en la actividad biológica. Por una parte, muchos de estos compuestos no son tolerados por la célula, siendo tóxicos a las concentraciones más altas. Por otro lado, en cuanto a inhibición enzimática los resultados son poco o nada relevantes.

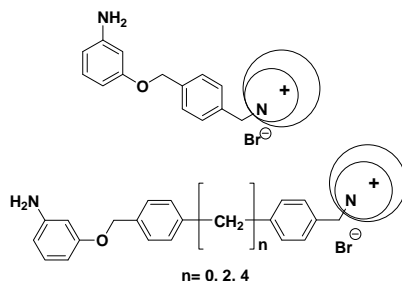
No obstante, algunos de ellos han mostrado valores de IC_{50} *in vitro* interesantes, lo que nos ha ayudado a establecer mejor las relaciones estructura-actividad (**SOS-14**, **SOS-15**, **SOS-17** y **SOS-18**).

Tabla 4.32.- Resultados biológicos de los compuestos pertenecientes a la Subfamilia A₂.

Compuesto	Cabeza catiónica	Espaciador	Inhibición ChoK 1 μ M	Inhibición ChoK 5 μ M	Inhibición ChoK 10 μ M	Inhibición ChoK 50 μ M	Inhibición Proliferación 1 μ M	Inhibición Proliferación 5 μ M	Inhibición Proliferación 10 μ M	Inhibición Proliferación 50 μ M	IC ₅₀ (μ M)
SOS-12			--	16.01 \pm 1.42 (nds)	15.61 \pm 7.94 (nds)	40.69 \pm 2.26 (P=0.0181)	4.32 \pm 4.50 (nds)	6.00 \pm 2.50 (nds)	9.98 \pm 3.29	32.33 \pm 1.20	No se puede
SOS-13			--	--	--	--	18.10 \pm 1.01 (nds)	41.95 \pm 4.00 (P=0.0140)	43.02 \pm 3.68	tóxico	14.34 \pm 2.15
SOS-14			14.07 \pm 3.82 (nds)	22.99 \pm 8.99 (nds)	--	--	17.12 \pm 4.45 (nds)	46.56 \pm 3.15 (P=0.0120)	70.23 \pm 3.04	tóxico	6.53 \pm 1.21
SOS-15			--	--	--	--	41.33 \pm 2.47 (P=0.0080)	68.48 \pm 1.57 (P=0.0010)	Tóxico	tóxico	2.25 \pm 0.22
SOS-16				--	--	9.53 \pm 1.90 (nds)	38.88 \pm 3.48 (P=0.030)	--	--	9.90 \pm 5.58 (nds)	7.31 \pm 0.11 (nds)
SOS-17			--	--	9.41 \pm 0.69	38.57 \pm 2.75 (P=0.0025)	--	--	11.43 \pm 1.20 (nds)	56.71 \pm 2.59 (P=0.01)	41.179 \pm 4.896
SOS-18			--	--	--	--	--	--	20.67 \pm 1.22 (P=0.023)	70.38 \pm 1.97 (P=0.001)	22.442 \pm 1.29

4.4.2.3. Derivados Amínicos de los compuestos monocatiónicos (Subfamilia A₃).

Al igual que en la Subfamilia A₁, los resultados biológicos obtenidos para la Subfamilia A₃ (**SOS-19** a **SOS-29**), indicados en la **Tabla 4.33**, confirman que el espaciador más idóneo para la actividad enzimática es el bifenílico y que los mejores resultados se obtienen cuando la cabeza catiónica es la dimetilaminopiridina. De este modo, el compuesto **SOS-24** (homólogo de **SOS-6** ($IC_{50}=6.37 \pm 0.53 \mu M$)), presenta una $IC_{50}=7.89 \pm 0.05 \mu M$.



Por otro lado, se observa un ligero aumento de actividad con respecto a los productos de Subfamilia A₁ cuando es introducido un resto de quinuclidina. Esto podría sugerir dos hipótesis:

- El comportamiento de estos compuestos (con quinuclidinio) al unirse al sitio activo de la enzima es diferente con respecto a sus homólogos, que podría justificarse debido a una diferencia de estabilidad conformacional.
- El grupo 3'-NH₂ de esta serie de compuestos estabiliza la unión a la enzima mucho más que cuando este grupo es sustituido por un 3'-OH.

Un comportamiento similar se observa en relación a la actividad antiproliferativa. De nuevo, es posible apreciar como el aumento de lipofilia afecta positivamente a la actividad antiproliferativa. Siendo, en este caso, los compuestos más relevantes: **SOS-21**, **SOS-22**, **SOS-25**, **SOS-26** y **SOS-29**, que presentan una cadena alquílica en el espaciador.

Finalmente, en cuanto a la relación entre la actividad inhibitoria frente a ChoK y HepG2, podemos concluir diciendo que la actividad antiproliferativa aumenta en aquellos compuestos que no inhibían significativamente a la enzima, siendo esto probablemente debido a un mecanismo de acción antitumoral diferente al descrito en esta memoria.

No obstante, es preciso destacar que muchos de estos compuestos han presentado problemas de solubilidad, dificultando la realización de los ensayos biológicos y por tanto los resultados obtenidos pueden no ser del todo concluyentes.

Tabla 4.33.- resultados biológicos de los compuestos pertenecientes a la Subfamilia A₃.

Compuesto	Cabeza catiónica	Espaciador	Inhibición ChoK 1 μM	Inhibición ChoK 5 μM	Inhibición ChoK 10 μM	Inhibición ChoK 50 μM	Inhibición Proliferación 1 μM	Inhibición Proliferación 5 μM	Inhibición Proliferación 10 μM	Inhibición Proliferación 50 μM	IC ₅₀ (μM)
SOS-19			--	--	3.81 ± 1.54 (nds)	12.93 ± 5.34 (nds)	--	--	--	--	
SOS-20			--	--	--	20.79 ± 4.11 (P=0.0329)	40.52 ± 6.64	57.24 ± 4.40	tóxico	tóxico	
SOS-21			--	--	ins	ins	55.37 ± 6.48	76.04 ± 1.17	tóxico	tóxico	
SOS-22			--	--	--	21.62 ± 7.75 (nds)	57.69 ± 3.55	83.21 ± 2.55	tóxico	tóxico	
SOS-23			--	27.20 ± 0.56 (P=0.063)	14.78 ± 6.95 (nds)	37.71 ± 3.76 (nds)	--	--	--	22.48 ± 1.34	>100 μM
SOS-24			16.60 ± 1.41 (nds)	35.94 ± 1.36 (P=0.0002)	54.44 ± 4.75 (p=0.0019)	79.82 ± 0.81 (p=0.002)	8.50 ± 2.23 (nds)	16.23 ± 0.95 (nds)	24.40 ± 2.13	tóxico	No se puede
SOS-25			13.96 ± 1.30 (nds)	19.87 ± 3.64 (nds)	--	21.95 ± 10.41 (nds)	7.42 ± 2.18 (nds)	6.98 ± 3.43 (nds)	30.53 ± 4.26	59.54 ± 1.61	48.96 ± 4.60
SOS-26			--	--	--	--	10.14 ± 2.83 (nds)	18.32 ± 3.59 (nds)	22.68 ± 5.36	46.67 ± 10.80	
SOS-27			--	--	34.00 ± 0.73 (P=0.0025)	49.56 ± 2.56 (P=0.0009)			2.51 ± 0.25 (nds)	19.46 ± 3.68 (nds)	
SOS-28			--	--	27.16 ± 1.93 (P=0.0071)	44.37 ± 0.69 (P=0.0009)			9.73 ± 1.81 (nds)	6,16 ± 1.33 (nds)	
SOS-29			--	--	12.1 ± 2.75 (nds)	26.85 ± 2.57 (nds)			3.76 ± 1.29 (nds)	27.90 ± 2.00 (P=0.0007)	

En consecuencia, las principales conclusiones con respecto a la actividad biológica de la familia de los derivados monocatiónicos son:

1. Los derivados que producen mayor inhibición enzimática son **SOS-1, SOS-5, SOS-6, SOS-24, SOS-27 y SOS-28**. Estos compuestos pertenecen a la Subfamilia A₁ y A₃, lo que significa que el grupo amino o el hidroxilo confieren a las moléculas el mismo grado de poder inhibitorio.
2. Todos ellos contienen como espaciador fenilo o bifenilo, lo que nos muestra cual sería la distancia idónea entre la cabeza catiónica y el anillo aromático para que se unan más eficazmente al sitio activo de la enzima ChoK.
3. Los resultados de inhibición enzimática parecen indicar que la cabeza catiónica introducida no influye demasiado en la actividad, aunque si sugieren que quizás aquellas cabezas aromáticas se comporten de un modo más efectivo. De estos datos se puede considerar un modo de unión diferente cuando la cabeza catiónica es aromática con respecto a cuando es un resto de quinclidina.
4. Los compuestos con mejores valores de inhibición de la proliferación frente a HepG2 son **SOS-2, SOS-3, SOS-7, SOS-8, SOS-14, SOS-17, SOS-18, SOS-21, SOS-22, SOS-25 y SOS-26**. Todos estas moléculas contienen restos que les aportan mayor lipofilia, bien sean las cadenas alquílicas en el espaciador o bien la cabeza catiónica.

Desafortunadamente, los resultados biológicos obtenidos no confirman los estudios de docking iniciales llevados a cabo para estos inhibidores, ni tampoco los resultados previamente publicados en relación a la influencia del espaciador sobre la actividad inhibitoria de ChoK de la primera familia de inhibidores no simétricos¹¹.

La idea original para el diseño de estas moléculas fue la posibilidad de que se pudieran insertar simultaneamente en ambos sitios de unión, el del ATP y la Cho, como se propuso para la primera familia de inhibidores no simétricos. Esta familia estaba caracterizada por la presencia de un fragmento de adenina que puede claramente acomodarse dentro del sitio de unión del ATP, un espaciador y una cabeza catiónica. En los estudios de docking llevados a cabo en esta familia de compuestos, aquellas moléculas con espaciadores más largos (1,4-difenilbutano) son los más apropiados para insertarse en ambos sitios de unión, mostrando también las mejores propiedades inhibitorias de colina quinasa (**Figura 4.17**)¹¹. De hecho, los compuestos más activos llevan un fragmento de adenina, el 1,4-difenilbutano como espaciador y un fragmento de dimetilaminopiridinio como cabeza catiónica.

En los estudios de docking iniciales llevados a cabo con los compuestos no simétricos de esta memoria (**Familia A**), se observó como el fragmento de *m*-aminofenol se podría acomodar dentro del sitio de unión del ATP, de forma similar a como lo hacía el fragmento de adenina. Esta observación sugirió el uso de este fragmento en la nueva familia de compuestos (**Familia A**). También, en los estudios de docking iniciales, se observó que aquellos compuestos con

espaciadores más largos podrían acomodarse simultáneamente en ambos sitios de unión, ATP y Cho, por lo que se esperaban buenas actividades inhibitorias para estos compuestos.

El hecho de que todas las moléculas con espaciadores más largos son inctivas o muestran un bajo porcentaje de inhibición indica que las conclusiones obtenidas a partir de los estudios de docking iniciales no son correctas. Sólo hay una razón para este comportamiento: aún cuando los estudios de docking han indicado que el fragmento de *m*-aminofenol podría unirse dentro del sitio de unión del ATP, la afinidad del fragmento de adenina del ATP por su sitio de unión en la colina quinasa podría ser mayor que para el *m*-aminofenol. En consecuencia, en los ensayos biológicos, todos estos compuestos no simétricos no competirían con el fragmento de adenina del ATP y no se unirían simultáneamente en ambos sitios de unión.

Con el objeto de justificar los resultados biológicos obtenidos, nuevos estudios de docking se han llevado a cabo usando sólo el sitio de unión de la Cho como la posible zona de inserción de los ligandos. Como en general todos los compuestos muestran un mayor volumen que el HC-3, se incrementa el tamaño de Protomol y de la cuadrícula con respecto a los estudios de docking iniciales. Sin embargo, sólo aquellos compuestos que tienen un espaciador pequeño (**SOS-5**, **SOS-23**: benceno; **SOS-6**, **SOS-24**: bifenilo) originan disposiciones que pueden ser consideradas factibles.

La **Figura 4.23** se muestra como ejemplo de la disposición más estable obtenida para los compuestos **SOS-5** y **SOS-24**. Ambas moléculas presentan un fragmento de dimetilaminopiridino como cabeza catiónica, y el menor volumen de este fragmento les permite que puedan ser insertadas con profundidad dentro del sitio de unión de la Cho. El fragmento de dimetilaminopiridinio puede ser superpuesto con el fragmento de morfolinio del HC-3 que es insertado dentro del sitio de unión de la Cho en la estructura cristalina del complejo ChoK α 1/HC-3 (PDB: 3G15) usada en los estudios de docking (**Figura 4.24**). Además, el fragmento de fenilo conectado a la cabeza catiónica es estabilizado por interacciones π - π con Phe435, un residuo que interacciona de manera similar con el fragmento de fenilo del HC-3. El compuesto **SOS-24** forma un enlace de hidrógeno adicional con Asn122, que está situado en el loop de unión del ATP de la enzima colina quinasa, mientras **SOS-5** forma otro enlace de hidrógeno con Glu434. Estos hechos podrían justificar el alto porcentaje de inhibición de éstas moléculas. Disposiciones similares han sido obtenidas para los compuestos **SOS-6** y **SOS-23**, las cuáles muestran también un buen porcentaje de inhibición.

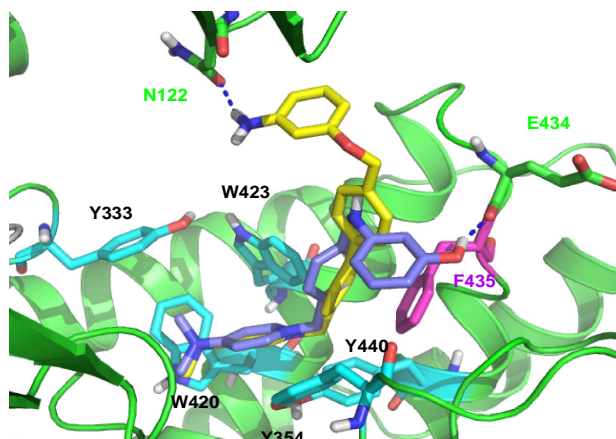


Figura 4.23.- La disposición más estable obtenida para los compuestos **SOS-24** (átomos de carbono en color amarillo) y **SOS-5** (átomos de carbono en color azul marino), usando el sitio de unión de la Cho como la posible diana de acción. En ambos compuestos, el resto de dimetilaminopiridinio es profundamente insertado dentro del sitio de unión de la Cho, y el primer grupo fenilo es estabilizado mediante interacciones π - π con Phe435. El compuesto **SOS-24** forma un enlace de hidrógeno adicional con Asn122 y **SOS-5** con Glu434.

Por otro lado, el mayor volumen del fragmento de pirrolidinopiridinio no permite una profunda inserción dentro del sitio de unión de la Cho, y es por esta razón, que los compuestos **SOS-1**, **SOS-2** y **SOS-19**, **SOS-20**, muestran un porcentaje de inhibición más bajo que los compuestos **SOS-5**, **SOS-6** y **SOS-23**, **SOS-24**, respectivamente. La **Figura 4.24** muestra un ejemplo de la disposición principal del compuesto **SOS-19**.

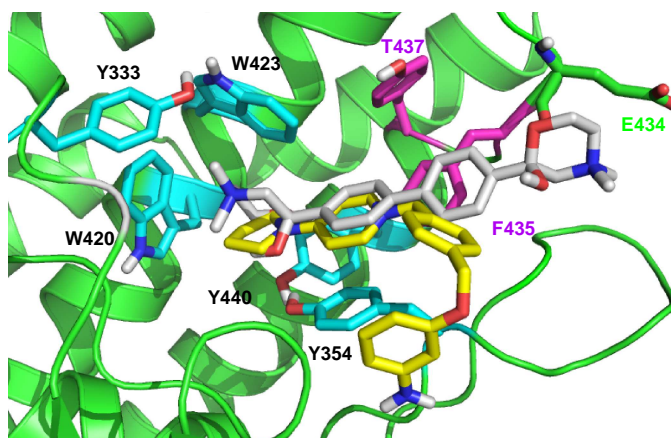


Figura 4.24.- Superposición de la disposición más estable obtenida para el compuesto **SOS-19** (átomos de carbono en color amarillo) usando el sitio de unión de la Cho como posible diana con el HC-3 (átomos de carbono en color blanco) presente en la estructura cristalina del complejo ChoK α 1/HC-3 (PDB: 3G15). El mayor volumen del fragmento de pirrolidinopiridinio no permite una profunda inserción dentro del sitio de unión de la Cho.

Finalmente, cuando las moléculas tienen un espaciador más largo (bibencilo o 1,4-difenilbutano), la disposición obtenida parece no ser posible. La **Figura 4.25** muestra como ejemplo la disposición obtenida para el compuesto **SOS-26**. La cabeza catiónica se inserta dentro del sitio de unión de la Cho de modo similar, pero el espaciador está mucho más plegado debido a la limitación del volumen de Protomol. Pudiéndose concluir que estas moléculas podrían insertar la cabeza catiónica dentro del sitio de unión de la Cho, pero el resto de la molécula quedaría fuera de la proteína y, en consecuencia, la inhibición de la colina quinasa sería realmente pequeña.

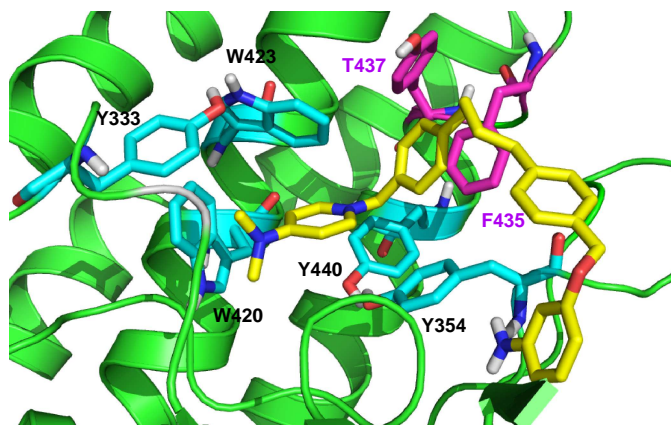


Figura 4.25.- La disposición más estable obtenida para el compuesto **SOS-26** (átomos de carbono en color amarillo) usando el sitio de unión de la Cho como posible diana. La cabeza catiónica se introduce dentro del sitio de unión de la Cho, pero el espaciador está mucho más plegado debido a la limitación de volumen de Protomol. Este hecho indica que esta disposición parece no ser factible y en consecuencia este compuesto no presenta actividad inhibitoria.

4.4.3. Resultados biológicos de los compuestos biscatiónicos simétricos (Familia B).

Los resultados biológicos de los compuestos finales pertenecientes a la Familia B (**SOS-30** a **SOS-44**) se detallan en la **Tablas 4.34** a **4.35**, distinguiendo tres subfamilias en función de la naturaleza del espaciador o de la cabeza catiónica.

4.4.3.1. Derivados de sales de bisquinuclidinio (Subfamilia B₁).


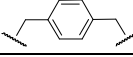
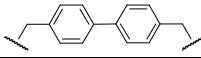
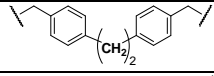
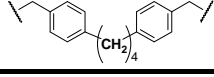
Los resultados biológicos de los compuestos finales pertenecientes a la Subfamilia B₁, **SOS-30** a **SOS-33** se detallan en la **Tabla 4.34**.

De los datos obtenidos en esta subfamilia se puede deducir que, en general, son compuestos que poseen buenos valores de IC₅₀ de inhibición enzimática, sin embargo son demasiado polares, lo que supone un detrimento para la actividad antiproliferativa.

No obstante, al poseer índices de IC₅₀ de inhibición de ChoK bastante interesantes **SOS-32** (IC₅₀= 4.83 ± 0.41 μM) y **SOS-33** (IC₅₀= 0.66 ± 0.11 μM), estas moléculas nos ayudarán en el

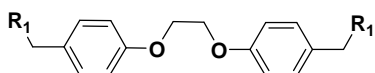
futuro diseño de nuevos compuestos donde sea el aumento de lipofilia el objetivo principal permitiendo su mejor paso a través de la membrana celular.

Tabla 4.34.- Resultados biológicos de los compuestos pertenecientes a la Subfamilia B₁.

Compuesto	Cabeza catiónica	Espaciador	Inhibición ChoK 10 μ M	Inhibición ChoK 50 μ M	IC ₅₀	Proliferación IC ₅₀ (μ M)
SOS-30			--	--	--	--
SOS-31			35.72 \pm 2.89 (P=0.0114)	52.53 \pm 2.60 (P=0.0028)	--	No Inhibe
SOS-32			61.60 \pm 2.66 (P=0.0001)	73.11 \pm 1.37 (P=0.0001)	4.83 \pm 0.41	No Inhibe
SOS-33			81.77 \pm 1.83 (P=0.0005)	84.88 \pm 2.40 (P=0.0004)	0.66 \pm 0.11	No Inhibe

4.4.3.2. Compuestos pertenecientes a la Subfamilia B₂ y B₃.

En este apartado se han agrupado los resultados de inhibición de los compuestos **SOS-34** a **SOS-44** (Subfamilia B₂ y B₃). Todos ellos presenta como espaciador el 1,2-bis(*p*-toliloxi)etano y se diferencian por la naturaleza de la cabeza catiónica.



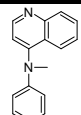
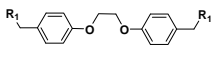
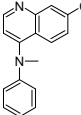
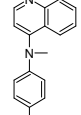
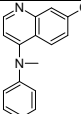
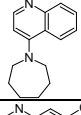
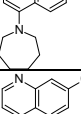
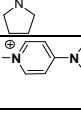
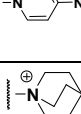
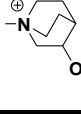


En la **Tabla 4.35** se muestran los resultados obtenidos tanto en ensayos *ex vivo* como *in vitro* de la Subfamilia B₂ y B₃.

Las estructuras de la Subfamilia B₂ que contienen una quinolina con una cicloalquilamina en posición 4 son los que mejores resultados de inhibición de ChoK presentan (**SOS-38**, **SOS-39** y **SOS-40**), además de una actividad antiproliferativa relativamente buena.

Por otro lado, aquellos compuestos de la Subfamilia B₃ que presentan una amina aromática sustituida en posición 4 como cabeza catiónica (**SOS-41** y **SOS-42**) también presentan una buena actividad inhibitoria frente a ChoK, de hecho **SOS-42** tiene un valor de IC₅₀ = 2.20 \pm 0.10 μ M. Sin embargo apenas tienen actividad antiproliferativa. Esto hace indicar que, en general, son estructuras demasiado polares como para atravesar la membrana celular.

Con respecto a los productos sintetizados con anterioridad por nuestro grupo de investigación⁷, donde la cabeza catiónica era una quinolina sustituida y el espaciador era el 3,3'-bifenilo, 4,4'-bifenilo o el 4,4'-bibencilo, se puede concluir que, en general, el espaciador utilizado (1,2-bis(*p*-toliloxi)etano) hace que disminuya la actividad inhibitoria, tanto *in vivo* como *in vitro*, de todos los compuestos.

Tabla 4.35.- Resultados biológicos de los compuestos pertenecientes a la Subfamilia B₂ y B₃.

Compuesto	Cabeza catiónica (R ₁)	Espaciador	Inhibición ChoK 10 μM	Inhibición ChoK 50 μM	IC ₅₀	Proliferación IC ₅₀ (μM)
SOS-34			53.42 ± 6.44 (nds)	73.24 ± 1.68 (P=0.0019)	55.39 ± 10.85	11.92 ± 0.97
SOS-35			26.32 ± 5.66 (nds)	64.42 ± 0.53 (P=0.0030)		25.13 ± 6.34
SOS-36			23.05 ± 2.71 (nds)	52.88 ± 2.13 (P=0.0066)		16.31 ± 3.33
SOS-37			6.67 ± 0.33 (nds)	45.97 ± 4.57 (P=0.0135)		76.81 ± 12.37
SOS-38			41.57 ± 3.83 (P=0.0179)	71.14 ± 2.09 (P=0.0022)	26.33 ± 4.09	3.85 ± 0.23
SOS-39			--	71.60 ± 0.10 (P=0.0022)		12.64 ± 0.70
SOS-40			27.44 ± 7.63 (nds)	76.70 ± 2.81 (P=0.0007)		2.38 ± 0.71
SOS-41			27.97 ± 3.33 (P=0.0275)	61.54 ± 2.75 (P=0.0016)		24.57 ± 0.648
SOS-42			71.46 ± 2.47 (P=0.0002)	82.37 ± 0.48 (P=0.0001)	2.20 ± 0.10	No se puede
SOS-43			36.06 ± 3.37	¿	45.49 ± 12.47	NO INHIBE
SOS-44		44.82 ± 1.32 (P=0.0378)	40.22 ± 5.03 (P=0.0047)		NO INHIBE	

4.5.- *Plasmodium falciparum*: Resultados biológicos y discusión.

4.5.1.- Ensayos *in vitro* de la actividad antimalárica.

Los parásitos de la cepa *Plasmodium falciparum* 3D7 se hicieron crecer sobre eritrocitos humanos frescos del grupo 0 positivo, los cuales se obtuvieron del Centro Regional de Transfusión Sanguínea-SAS (Granada, España). Se suspendieron al 5% de hematocritos en RPMI 1640 conteniendo 2% de serum humano, 0.2% de NaHCO₃, 0.5% de Albumax II, 150 μM de hipoxantina, y 12.5 μg/mL de gentamicina. Las placas se incubaron a 37°C, bajo una mezcla de 5% de CO₂ y 95% de aire.

El cultivo stock fue sincronizado con un 5% de sorbitol, y aproximadamente 96 horas más tarde, se determinaron los parásitos en los estadios de anillo tardíos y trofozooides tempranos. Posteriormente el cultivo stock se diluyó con medio completo y eritrocitos no parasitados para llegar a un hematocrito del 5% y una parasitemia del 0.5%.

Las soluciones Stock de los fármacos ensayados se prepararon a una concentración de 100mg/mL en DMSO al 99.9% (Merck) y fueron serialmente diluidos en medio completo, y dispensados en un ensayo por triplicado llegando a una concentraciones finales del rango de 0.0002 a 30μM. El volumen final fue de 100 μL para los ensayos de fluorescencia con una concentración final de DMSO ≤ 0.001%.

Los compuestos en DMSO fueron evaluados por triplicado en placas de 96 pocillos. Cada placa también contenía controles negativos por triplicado (sin compuesto), y controles positivos con cloroquina 80 nM (IC₅₀ = 0.010 μM).

Los ensayos de inhibición de crecimiento del parásito y la determinación del 50% de concentración inhibitoria (IC₅₀) se llevó a cabo siguiendo el método SYBR Green I nucleic acid staining dye (Smilkstein M et al. 2004 Antimicrob. Agents Chemother., 48: 1803-1806).

Después de 72 h de crecimiento, las placas se congelaron a -20°C. Para el ensayo de fluorescencia, se añadió a cada pocillo 100 μL de SYBR Green I en tampon de lisis, y el contenido fue mezclado hasta que no se observaba ningún sedimento eritrocítico. Después de una hora de incubación en oscuridad y a temperatura ambiente, se midió la fluorescencia con un lector de placas multipocillo (SpectraMax Gemini EM) de Molecular Devices, con unas bandas de excitación y emisión de longitud de onda centradas en 485 y 530 nm, respectivamente mediante el uso de el software SOFTmaxPro.

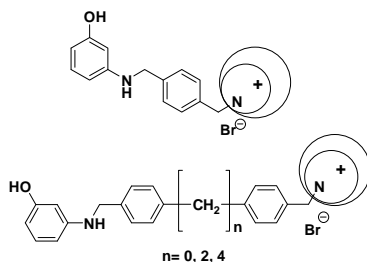
Los cálculos fueron trazados frente al logaritmo de la concentración de compuesto y el ajuste de la curva se realizó mediante regresión no-lineal usando Sigma Plot para obtener la concentración del compuesto que produce el 50% de la disminución observada a partir de los cálculos máximos obtenidos en los pocillos control libres de compuesto.

4.5.2. Actividad antimalárica de los compuestos monocatiónicos no simétricos (Familia A).

Los resultados *in vitro* de la actividad frente a *P.falciparum* de los compuestos finales pertenecientes a la Familia A (**SOS-1** a **SOS-29**) se detallan en la **tablas 4.36** a **4.38**, distinguiendo tres subfamilias dependiendo del sustituyente R_1 ($R_1 = \text{OH}, \text{NO}_2, \text{NH}_2$).

4.5.2.1. Derivados Fenólicos de los compuestos monocatiónicos (Subfamilia A_1).

En la **Tabla 4.36** se incluyen los valores de la actividad antimalárica de los compuestos **SOS-1** a **SOS-11** (Subfamilia A_1).



Los compuestos pertenecientes a esta subfamilia presentan, en general, una muy buena actividad antimalárica. Siendo **SOS-2**, **SOS-6** y **SOS-10** los que han mostrado tener mejores valores de IC_{50} . La actividad antimalárica del compuesto **SOS-2** es la mejor de esta subfamilia de compuestos, presentando valores del orden nanomolar, con una $IC_{50} = 0,0157 \pm 0,0012 \mu\text{M}$.

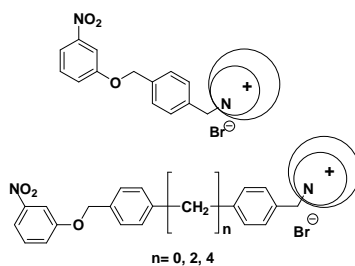
En general, podemos concluir que en las estructuras donde está presente el espaciador bifenilo y una amina aromática como cabeza catiónica son las que muestran los mejores valores. Siendo este espaciador el más adecuado en este tipo de estructuras monocatiónicas y cuando un resto de pirrolidina es introducido se incrementa la actividad antipalúdica, lo que podría indicar que hay una correlación directa entre la lipofilia idónea de los compuestos más activos y la distancia del espaciador para una inhibición de ChoK de *P.falciparum*.

Tabla 4.36.- Datos de actividad antimalárica de los compuestos de la Subfamilia A₁.

Compuesto	Cabeza catiónica	Espaciador	Actividad Antimalárica IC ₅₀ (μM)	Ajuste
SOS-1			0,1090 ± 0,0045	Hyperbolica
SOS-2			0,0157 ± 0,0012	Sigmoidal
SOS-3			0,1212 ± 0,0018	Hyperbolic
SOS-4			0,3668 ± 0,0349	Hyperbolica
SOS-5			1,110 ± 0,068	Hyperbolica
SOS-6			0,102 ± 0,020	Hyperbolica
SOS-7			0,463 ± 0,096	Hyperbolica
SOS-8			2,196 ± 0,548	Hyperbolica
SOS-9			2,9750 ± 1,983	Hyperbolica
SOS-10			0,1626 ± 0,004	Hyperbolica
SOS-11			0,7113 ± 0,015	Hyperbolica

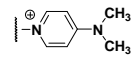
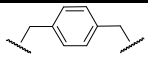
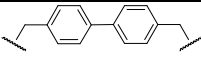
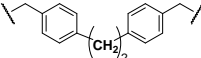
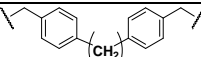

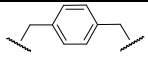
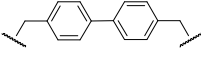
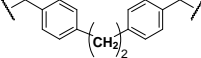
4.5.2.2. Derivados Nitrados de los compuestos monocatiónicos (Subfamilia A₂).

Los resultados de actividad antimalárica de los compuestos pertenecientes a la Subfamilia A₂, SOS-12 a SOS-18, se muestran en la **Tabla 4.37**.



En esta subfamilia, las estructuras que presentan una amina aromática como cabeza catiónica son, de nuevo, las que presentan los mejores valores. Al igual que en la subfamilia anterior, se observa que la actividad antimalárica aumenta cuando en la estructura hay un bifenilo como espaciador. De este modo el compuesto que presenta la mejor actividad antimalárica dentro de esta subfamilia es **SOS-13**, que presenta una $IC_{50} = 0,085 \pm 0,007 \mu M$.

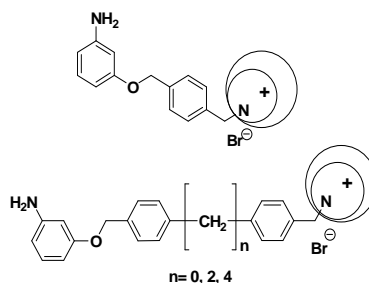
Tabla 4.37.- Datos de actividad antimalárica de los compuestos de la Subfamilia A₂.

Compuesto	Cabeza catiónica	Espaciador	Actividad Antimalárica IC_{50} (μM)	Ajuste
SOS-12			$0,450 \pm 0,045$	Hyperbolica
SOS-13			$0,085 \pm 0,007$	Hyperbolica
SOS-14			$0,328 \pm 0,054$	Hyperbolica
SOS-15			$1,041 \pm 0,346$	Sigmoidal
SOS-16			$2,9999 \pm 0,138$	Hyperbolica
SOS-17			$1,3937 \pm 0,078$	Hyperbolica
SOS-18			---	---

4.5.2.3. Derivados Amínicos de los compuestos monocatiónicos (Subfamilia A₃).

Los datos biológicos de los compuestos pertenecientes a esta subfamilia, **SOS-19** a **SOS-29**, se encuentran resumidos en la **Tabla 4.38**.

En esta subfamilia son los compuestos **SOS-20**, **SOS-21**, **SOS-22**, **SOS-26** y **SOS-28** los que muestran mejor actividad frente a *Plasmodium falciparum*. Siendo, en este caso, las estructuras que presentan la pirrolidinopiridina como cabeza catiónica las que ofrecen los mejores valores (**SOS-20**, **SOS-21** y **SOS-22**).



Sin embargo, en esta subfamilia son los espaciadores que tienen una cadena alquílica los que hacen que se produzca un incremento de la actividad frente al parásito. Esto parece indicar que cuando está presente un grupo amino en la estructura, ésta adquiriría una disposición diferente o incluso podría actuar mediante un mecanismo de acción diferente al resto de compuestos.

El compuesto de esta subfamilia que muestra los mejores datos de actividad antimalárica es **SOS-21**, que tiene una $IC_{50} = 0,0587 \pm 0,001 \mu M$.

Tabla 4.38.- Datos de actividad antimalárica de los compuestos de la Subfamilia A₃.

Compuesto	Cabeza catiónica	Espaciador	Actividad Antimalárica IC_{50} (μM)	Ajuste
SOS-19			1,0218 \pm 0,181	Hyperbolica
SOS-20			0,4840 \pm 0,135	Hyperbolica
SOS-21			0,0587 \pm 0,001	Hyperbolica
SOS-22			0,2794 \pm 0,034	Hyperbolica
SOS-23			8,689 \pm 1,930	Hyperbolica
SOS-24			1,937 \pm 0,101	Sigmoidal
SOS-25			4,243 \pm 0,578	Hyperbolica
SOS-26			0,403 \pm 0,128	Hyperbolica
SOS-27			11,6522 \pm 1,239	Hyperbolica
SOS-28			0,3754 \pm 0,020	Hyperbolica
SOS-29			1,3004 \pm 0,019	Hyperbolica

4.5.3. Actividad antimalárica de los compuestos biscatiónicos simétricos (Familia B).

Los resultados obtenidos para la actividad antimalárica de los compuestos finales biscatiónicos simétricos pertenecientes a la Familia B, **SOS-30** a **SOS-44**, se resumen en las **Tablas 4.39** y **4.40**.


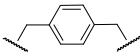
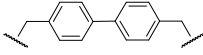
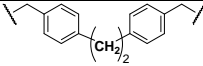
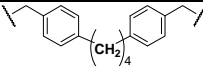
4.5.3.1. Derivados de sales de bisquinuclidinio (Subfamilia B₁).

Dentro de este apartado se incluyen los datos de actividad frente a *P.falciparum* de los compuestos pertenecientes a la Subfamilia B₁, **SOS-30** a **SOS-33**, que se resumen en la **Tabla 4.39**.

Como puede observarse en esta tabla, los compuestos derivados de sales de bisquinuclidinio que presentan los mejores datos antimaláricos son **SOS-32** ($IC_{50} = 0,088 \pm 0,008 \mu M$) y **SOS-33** ($IC_{50} = 0,015 \pm 0,001 \mu M$).

Estos datos corroboran lo anteriormente observado para los datos de inhibición frente a ChoK humana, lo que podría validar la hipótesis de que estos compuestos actúen a nivel enzimático de la ChoK de *P.falciparum*. Sin embargo, parece que el mecanismo de entrada en las células eritrocíticas humanas y en las células de hepatoma humano (HepG2) es completamente diferente, ya que estos compuestos no muestran actividad antiproliferativa frente a HepG2.

Tabla 4.39.- Datos de actividad antimalárica de los compuestos de la Subfamilia B₁.

Compuesto	Cabeza catiónica	Espaciador	Actividad Antimalárica IC_{50} (μM)	Ajuste
SOS-30			>20	---
SOS-31			$2,142 \pm 0,36$	Sigmoidal
SOS-32			$0,088 \pm 0,008$	Hyperbolica
SOS-33			$0,015 \pm 0,001$	Hyperbolica

4.5.3.2. Compuestos pertenecientes a la Subfamilia B₂ y B₃.

En la **Tabla 4.40** se agrupan los resultados obtenidos para la actividad antimalárica de los compuestos pertenecientes a Subfamilia B₂ y B₃, **SOS-34** a **SOS-44**.

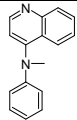
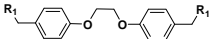
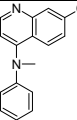
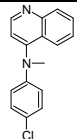
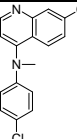
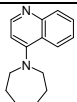
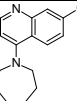
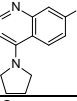




En general, todos los compuestos presentan una actividad muy buena frente a *P.falciparum*. Dentro de la Subfamilia B₂, de modo general, en los compuestos con N-metilnilina, el cloro en posición 7 de la quinolina disminuye la actividad antimalárica mientras que el cloro en posición 4 de la anilina mejora dicha actividad dentro de esta Subfamilia. No obstante, son los compuestos con un sustituyente cicloalquilamino en la posición 4 de la quinolina los que presentan los mejores datos de actividad. Entre estos compuestos cabe destacar **SOS-39** (IC₅₀=0,035 ± 0,004 μM) y **SOS-40** (IC₅₀=0,059 ± 0,001 μM), con una azepina y una pirrolina, respectivamente.

Sin embargo, los compuestos pertenecientes a la Subfamilia B₃ son los que mejores datos de actividad antimalárica muestran, siendo aquellos que tienen una amina aromática sustituida en posición 4 como cabeza catiónica (**SOS-41** y **SOS-42**) los más potentes compuestos antimaláricos, con una IC₅₀= 0,016 ± 0,001 μM.

Si comparamos el compuesto **SOS-33** con el compuesto **SOS-43**, se puede observar una disminución en la actividad antimalárica. Esto probablemente es debido a la diferencia de espaciador que al contener átomos de oxígeno hace que dicha actividad empeore.

Nuevamente se corrobora aquí lo observado para este tipo de compuestos con actividad frente a ChoK humana, de lo que prodría deducirse que todos estos compuestos actúan a nivel de la ChoK de *P.falciparum*. Aunque son necesarios la realización de ensayos de inhibición enzimática sobre la ChoK de Plasmodium para afirmar dicha hipótesis.

Tabla 4.40.- Datos de actividad antimalárica de los compuestos de la Subfamilia B₂ y B₃.

Compuesto	Cabeza catiónica	Espaciador	Actividad Antimalárica IC ₅₀ (μM)	Ajuste
SOS-34			0,162 ± 0,046	Hyperbolica
SOS-35			0,177 ± 0,009	Hyperbolica
SOS-36			0,149 ± 0,001	Hyperbolica
SOS-37			0,369 ± 0,06	Hyperbolica
SOS-38			0,142 ± 0,009	Hyperbolica
SOS-39			0,035 ± 0,004	Hyperbolica
SOS-40			0,059 ± 0,001	Hyperbolica
SOS-41			0,016 ± 0,001	Hyperbolica
SOS-42			0,016 ± 0,001	Hyperbolica
SOS-43			0,177 ± 0,009	Hyperbolica
SOS-44			1,687 ± 0,153	Hyperbolica

Bibliografía

1. H. A. Staab; M. Haenel. 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.
2. D. J. Cram; H. Steinberg. Macro rings. I. Preparation and spectra of the paracyclophanes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 5691-5704.
3. J. M. Campos; M. C. Núñez; R. M. Sánchez; J. A. Gómez-Vidal; A. Rodríguez-González; M. Báñez; M. A. Gallo; J. C. Lacal; A. Espinosa. Quantitative structure-activity relationships for a series of symmetrical bisquaternary anticancer compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, 2215-2231.
4. X. Xiao et al. Binuclear titanocenes linked by the bridge combination of rigid and flexible segment: Synthesis and their use as catalysts for ethylene polymerization. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2007**, 267, 86-91.
5. John McMurry ; Química orgánica, **2008**, 7° edición, pág. 655.
6. Sánchez Martín, R. M. Nuevos antitumorales específicos frente a células transformadas por el oncogén *ras*, con estructura bisquinolínica, dirigidos a la colina quinasa. *Tesis Doctoral*. **2002**.
7. Rosario Sánchez-Martín; Joaquín M. Campos; Ana Conejo-García; Olga Cruz-López; Mónica Báñez-Coronel; Agustín Rodríguez-González; Miguel A. Gallo; Juan C. Lacal; Antonio Espinosa. Symmetrical Bis-Quinolinium Compounds: New Human Choline Kinase Inhibitors with Antiproliferative Activity against the HT-29 Cell Line. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, 48, 3354-3363.
8. Joaquín M. Campos; Rosario M. Sánchez-Martín; Olga Cruz-López; Ana Conejo-García; Miguel A. Gallo; Antonio Espinosa. ^1H and ^{13}C spectral assignment of symmetrical bis[4-aminosubstituted]quinolinium]derivatives. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **2005**, 43, 1066-1071.
9. B. S Hong; A. Allali-Hassani; W. Tempel; P. J. Jr. Finerty; F. MacKenzie; S. Dimov; M. Vedadi; H-W. Park. Crystal Structures of Human Choline Kinase Isoforms in Complex with Hemicholinium-3. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285, 16330-16340.
10. SYBYL-X 1.2, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA. <http://www.tripos.com>
11. Belén Rubio-Ruiz; Ana Conejo-García; Pablo Ríos-Marco; María Paz Carrasco-Jiménez; Josefa Segovia; Carmen Marco; Miguel A. Gallo; Antonio Espinosa; Antonio

- Entrena. Design, síntesis, theoretical calculations and biological evaluation of new non symmetrical choline kinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2012**, 50, 154-162.
12. Meng Zhao; Hong-wei He; Huan-xing Sun; Kai-huan Ren; Rong-guang Shao. Dual knockdown of N-ras and epiregulin synergistically suppressed the growth of human hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **2009**, 387, 239-244.
13. Jiménez-López, J.M.; Carrasco, M.P.; Segovia, J.L.; Marco, C. Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of HepG2 cells. *Eur. J. Biochem.*, **2002**, 269, 4649-4655.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1.- Condiciones generales.

Las reacciones se han llevado a cabo bajo atmósfera inerte de argón, a menos que se especifique de otra forma. Los disolventes anhidros se han obtenido como sigue: etanol, por destilación sobre Mg y I₂ y recogida sobre tamiz molecular de 4 Å; diclorometano, por destilación con P₂O₅ y recogida sobre tamiz molecular de 4 Å; acetonitrilo, por destilación con P₂O₅ y recogida sobre tamiz molecular de 3 Å; éter dietílico, por destilación con Na y benzofenona y recogida sobre tamiz molecular de 4 Å.

Todos los reactivos adquiridos comercialmente se han usado 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 gel de sílice 60 F₂₅₄. Como revelador se han utilizado habitualmente la observación en lámpara de rayos ultravioleta; también se ha revelado con solución de ninhidrina y permanganato potásico.

La purificación mediante cromatografía en columna flash se ha realizado utilizando gel de sílice Merck 60 (230-400 mesh ASMT).

Los espectros de ¹H-RMN, ¹³C-RMN y masas 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 VarianInovaUnity (300MHz), VarianDirect Drive (400MHz) y VarianDirect Drive (500MHz). Los datos se expresan en desplazamientos químicos δ (ppm). Las constantes de acoplamiento *J* se expresan en Hz. El aspecto y la multiplicidad de señales se indican mediante las siguientes abreviaturas: **s**, singlete; **sa**, singlete ancho; **d**, doblete; **dd**, doble doblete; **ddd**, doble doblete; **t**, triplete; **dt**, doble triplete; **pt**, pseudotriplete; **c**, cuadruplete; **m**, multiplete. Los espectros de ¹³C-RMN se han realizado en un aparato VarianDirect Drive (400MHz) y VarianDirect Drive (500MHz).

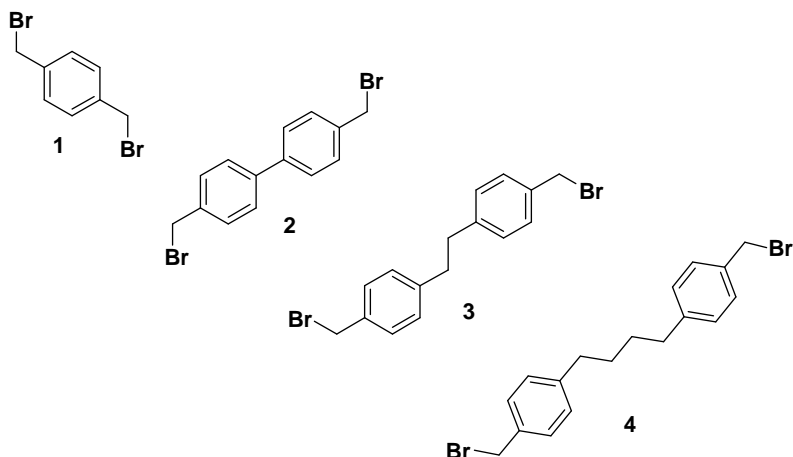
Los espectros de masas de alta resolución (HRMS) se han realizado en un Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (TOF) **BRUKER modelo AUTOFLEX**, rango de medida hasta 500.000 uma.

Los puntos de fusión se han medido en un aparato ElectrothermalMelting Point Apparatus y están sin corregir.

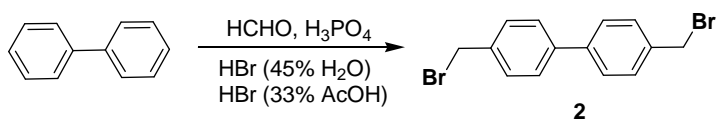
5.2.- Síntesis química de la Familia A.

5.2.1.- Síntesis de materias primas.

En el desarrollo de este trabajo se han empleado 4 tipos de espaciadores diferentes, el α,α' -dibromo-*p*-xileno(1), el 4,4'-bis(bromometil)bifenilo (2), el 1,2-bis(4-bromometilfenil)etano (3) y el 1,4-bis(4-bromometilfenil)butano (4), que se preparan siguiendo la metodología sintética que se describe a continuación.

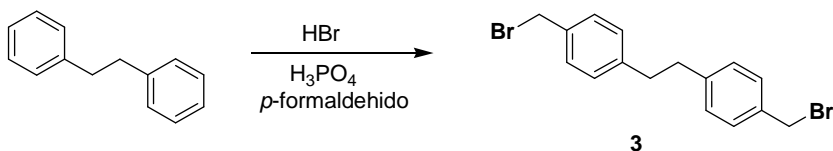


5.2.1.1.- Síntesis de 4,4'-bis(bromometil)bifenilo (2).



Se prepara una suspensión constituida por 15,4 gr de bifenilo, 12 gr de paraformaldehído, 31 ml de ácido bromhídrico al 48% y 23 ml de ácido fosfórico en 40 ml de una solución de ácido bromhídrico 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 recristaliza de acetona obteniéndose un sólido blanco. Rendimiento 33,81%.

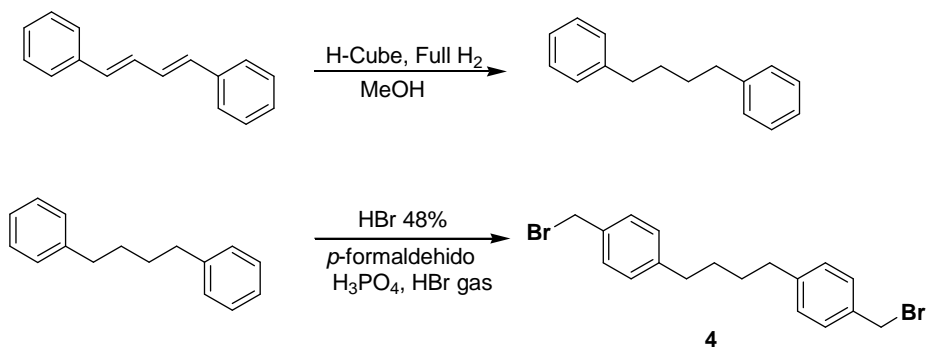
5.2.1.2.- Síntesis de 1,2-bis(4-bromometilfenil)etano (3).



Se prepara una suspensión de bibencilo (18,14 g), paraformaldehido (12 g), ácido hidrobromico 48% (31 ml) y ácido fosfórico (23 ml). Se calienta a 100°C durante 10 horas. Pasadas las 10 horas se añaden a la reacción 400 ml de agua helada y se agita. Se forma un precipitado sólido en el fondo. Se decanta, se tritura el sólido con acetona fría y se le añade hexano, que se calienta hasta 70°C durante 15 minutos hasta disolver por completo el sólido. Una vez disuelto, se enfría, formándose unos cristales^{1, 2}. Se filtra y se obtiene 8,432 g de un sólido blanco. Rendimiento 22,67%.

5.2.1.3.- Síntesis de 1,4-bis(4-bromometilfenil)butano (4).

Para la síntesis del 1,1'-etano-1,2-diilbis[4-bromometil(benceno)] es necesario reducir los dobles enlaces del 1,4-difenil-1,4-butadieno, que es el comercialmente disponible, dando lugar al 1,4-difenilbutano y posteriormente se lleva a cabo la bromometilación del mismo.



Se reducen los dobles enlaces del 1,4-difenil-1,3-butadiene usando el aparato H-cube hidrogenation reactor a full H₂. Se añaden 300 mg de este compuesto en 50 ml de metanol y se mantiene a T^a ambiente hasta que finalice la reacción. Posteriormente se evapora el disolvente y se obtienen unos cristales blancos identificados como 1,4-difenilbutano. Rendimiento 100 %.

Se procede a la bromometilación del producto obtenido en la reacción anterior (1,4-difenilbutano), para ello se prepara una suspensión de 1,035 g de 1,4-difenilbutano, 588 mg de paraformaldehído, 1,52 ml de HBr 48%, 1,45 ml de ácido fosfórico y 2,22 ml de HBr gas en ácido acético glacial al 33%. Se agita a 100°C durante 12 horas. Pasado este tiempo, se introduce la reacción en 100 ml de H₂O helada. Se decanta el líquido sobrenadante de la parte semisólida, la cual es triturada con acetona fría para dar un sólido blanco. Se filtra y seca obteniéndose 500 mg de un producto identificado como **4**. Rendimiento 35%.

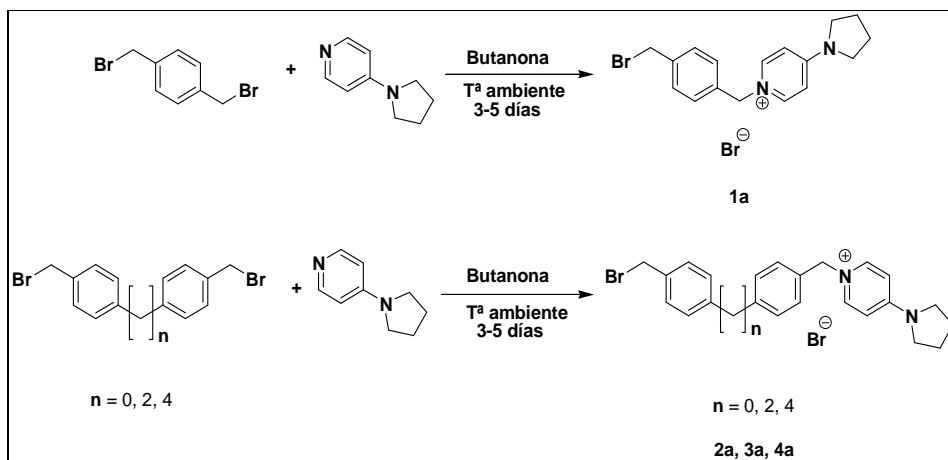
5.2.2.- Síntesis de productos intermedios de la Familia A.

5.2.2.1.- Síntesis de derivados de sales de piridinio.

Procedimiento general de síntesis.

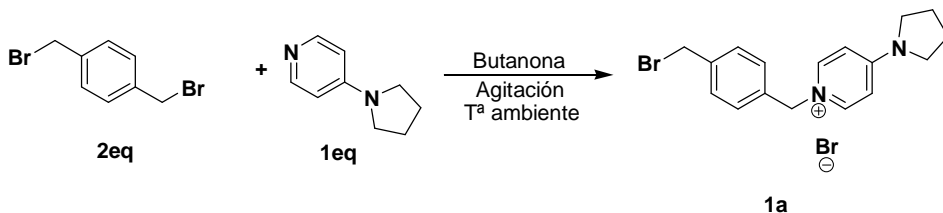
En un matraz se disuelven 2 eq de los productos anteriormente sintetizados en el apartado 5.2. (**1**, **2**, **3**, **4**) con 1 eq de 4-pirrolidino piridina o 1 eq de dimetilamino piridina en butanona³ (se utilizan 40 ml de butanona por cada 500 mg de producto de partida) y se mantiene en agitación a T^a ambiente de 3 a 5 días (3 días para los compuestos **1a**, **2a** y **3a**; 4 días para los compuestos **4a** y **4b**; 5 días para los compuestos **1b**, **2b** y **3b**), tras los cuáles aparece un precipitado blanco, el cuál se filtra y se lava con butanona, acetato de etilo y éter.

5.2.2.1.1.- Sales de 4-pirrolidinopiridinio.



5.2.2.1.1.1.- Síntesis de Bromuro de 1-[4-(bromometil)benzyl]-4-(1-pirrolidin-1-il)-piridinio (1a).

Seguindo el procedimiento 5.2.2.1 anteriormente descrito, se obtienen 333 mg de un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento 85,26%. P.f: 201-203°C.



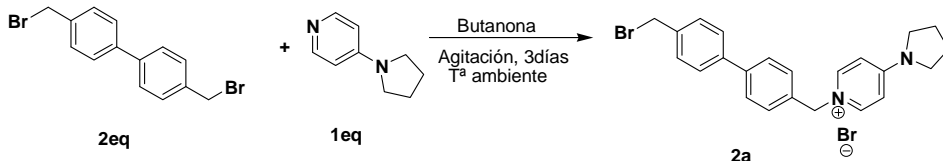
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.23 (d, $J = 7.8$, 2H), 7.53 – 7.36 (m, 4H), 6.89 (d, $J = 7.8$, 2H), 5.39 (s, 2H), 4.90 – 4.86 (m, 2H), 4.59 (s, 2H), 3.58 (s, 4H), 3.33 (dt, $J = 3.3$, 1.6, H), 2.14 (t, $J = 6.9$, 4H).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 155.18, 143.04 x 2, 140.87, 136.35, 131.11 x 2, 129.64 x 2, 109.76 x 2, 61.32, 49.74 x 2, 33.079, 26.129 x 2.

HRMS- m/z [$\text{M} - \text{Br}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{Br}^+$: 331.0810; encontrado: 331.0811.

5.2.2.1.1.2.- Síntesis de Bromuro de 1-[4'-(bromometil)bifenil-4-il]metil]-4-(pirrolidin-1-il)piridinio (2a).

Seguindo el procedimiento 5.2.2.1 anteriormente descrito se obtienen 252,8 mg de un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento 85,66%. P.f: 106-107°C.



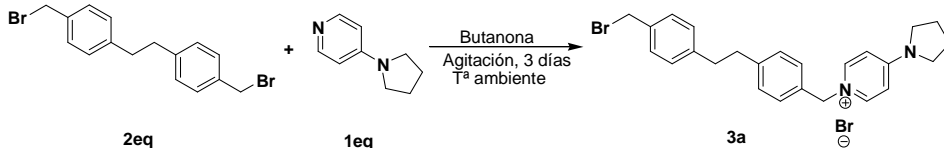
$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 8.22 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.45 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 6.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 5.40 (s, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.56 (t, $J = 6.6$ Hz, 4H), 2.12 (q, $J = 6.6$ Hz, 4H).

$^{13}\text{C RMN}$ (125 MHz, CD_3OD): δ 155.03, 142.99 x 2, 142.34, 141.13, 139.25, 135.52, 130.83 x 2, 130.04 x 2, 128.78 x 2, 128.24 x 2, 109.73 x 2, 61.36, 49.86 x 2, 33.81, 26.07 x 2.

HRMS- m/z [$\text{M} - \text{Br}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{Br}^+$: 407.1123; encontrado: 407.1109.

5.2.2.1.1.3.- Síntesis de Bromuro de 1-{4-[2-(4-bromometilfenil)-etil]-bencil-4-pirrolidin-1-il-piridinio (3a).

Seguindo el procedimiento 5.2.2.1 anteriormente descrito, se obtienen 485 mg de un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento 81,81%. P.f: 242-244°C.



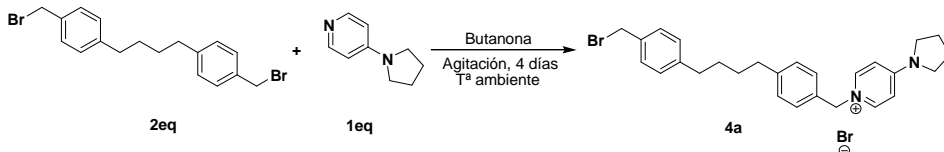
¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8.16 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.28 – 7.19 (m, 6H), 7.11 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.55 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H), 2.91 (m, 4H), 2.12 (q, *J* = 6.3 Hz, 4H).

¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 155.20, 144.18, 143.01, 142.96 x 2, 137.25, 133.87, 130.60 x 2, 130.15 x 2, 129.91 x 2, 129.33 x 2, 109.67 x 2, 61.57, 49.71 x 2, 38.34, 38.30, 34.02, 26.12 x 2.

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para C₂₅H₂₈N₂Br⁺: 435.1436; encontrado: 435.1427

5.2.2.1.1.4.- Síntesis de Bromuro de 1-{4-[4-(4-bromometil-fenil)-butil]-bencil-4-pirrolidin-1-il-piridinio (4a).

Seguindo el procedimiento 5.2.2.1 anteriormente descrito, se obtienen 249,8 mg de un sólido blanco identificado como el producto. Rendimiento 51,77%. P.f: 179-181°C.



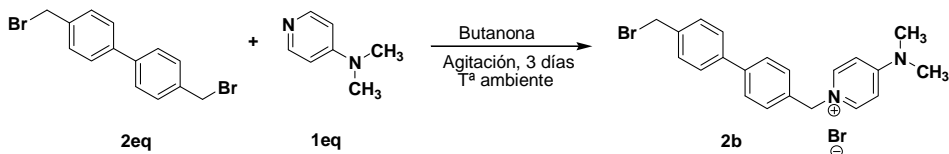
¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 8.18 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.30 – 7.21(m, 6H), 7.12 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 6.84 (d, *J* = 7.5, 2H), 5.30 (s, 2H), 4.53 (s, 2H), 3.54 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H), 2.72 – 2.57 (m, 4H), 2.11 (q, *J* = 6.8 Hz, 4H), 1.62 (m, 4H).

¹³C RMN (125 MHz, CD₃OD): δ155.19, 145.19, 144.08, 142.95 x 2, 137.04, 133.52, 130.44 x 2, 130.13 x 2, 129.75 x 2, 129.33 x 2, 109.66 x 2, 61.67, 49.70 x 2, 36.29, 36.26, 34.19, 32.05, 31.96, 26.11 x 2.

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para C₂₇H₃₂N₂Br⁺: 463.1749; encontrado: 463.1741.

5.2.2.1.2.2.- Síntesis de Bromuro de 1-{{4'-(bromometil)bifenil-4-il}metil}-4-(dimetilamino)piridinio (2b).

Seguendo el procedimiento 5.2.2.1 anteriormente descrito, se obtienen 647,2 mg de un sólido blanco identificado como el producto. Rendimiento: 100%. P.f: 238-240°C.



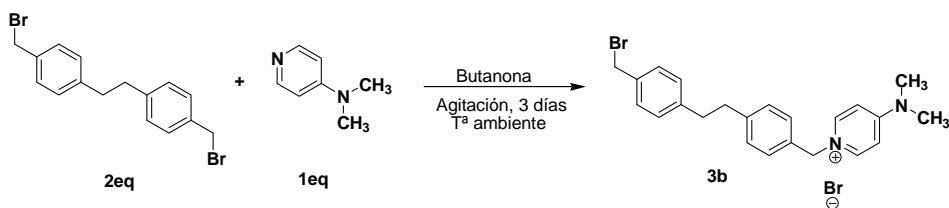
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.25 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.54 – 7.41 (m, 4H), 7.02 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 5.41 (s, 2H), 4.61 (s, 2H), 3.26 (s, 6H).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 156.90, 141.95 x 2, 141.58, 138.25, 134.18, 133.91, 129.66, 128.76, 128.72, 128.34, 127.75, 127.71, 127.15, 126.82, 107.98 x 2, 60.30, 39.18 x 2, 32.45.

HRMS- m/z [$\text{M} - \text{Br}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{Br}^+$: 381,0966; encontrado: 381,0954.

5.2.2.1.2.3.- Síntesis de Bromuro de 1-(4-{2-[4-(bromometil)fenil]etil}fenil)-4-(dimetilamino)piridinio (3b).

Seguendo el procedimiento 5.2.2.1 anteriormente descrito, se obtienen 458,5 mg de un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 82,50%. P.f: 249-251°C.



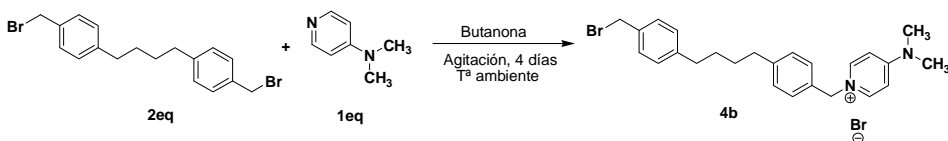
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.19 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.33 – 7.18 (m, 6H), 7.12 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.99 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 5.32 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.24 (s, 6H), 2.91 (m, 4H).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 156.86, 143.22, 141.87 x 2, 141.12, 135.86, 132.45, 129.48 x 2, 128.42 x 2, 128.18 x 2, 127.91 x 2, 107.92 x 2, 74.27, 60.45, 39.19 x 2, 37.29 x 2.

HRMS- m/z [$\text{M} - \text{Br}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{Br}^+$: 409,1279; encontrado: 409,1282.

5.2.2.1.2.4.- Síntesis de Bromuro de 1-(4-{4-[4-(bromometil)fenil]butil}encil)-4-(dimetilamino)piridinio (4b).

Siguiendo el procedimiento 5.2.2.1 anteriormente descrito, se obtienen 231,6 mg de un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 90,6%. P.f: 189-190°C.



$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8.38 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.41 – 7.09 (m, 8H), 7.04 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 5.35 (s, 2H), 4.69 (s, 2H), 3.18 (s, 6H), 2.58 (m, 4H), 1.55 (m, 4H).

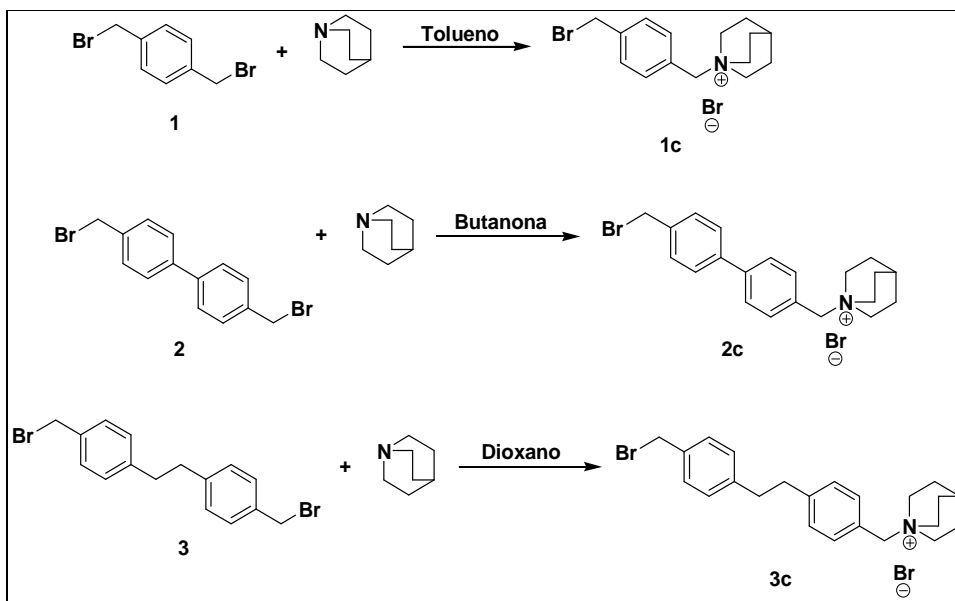
$^{13}\text{C RMN}$ (126 MHz, DMSO- d_6): δ 156.35, 143.29, 142.41 x 2, 140.82, 140.24, 133.50, 129.36, 129.34, 128.45, 128.41 x 2, 128.36, 126.94 x 2, 108.42 x 2, 63.20, 59.66, 40.26 x 2, 34.98 x 2, 30.97 x 2.

HRMS- m/z [$M - \text{Br}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{Br}^+$: 437,1592; encontrado: 437,1599.

5.2.2.2- Síntesis de derivados de sales de quinclidinio.

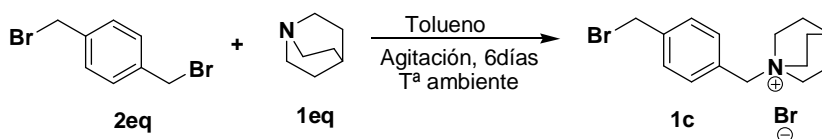
Procedimiento general de síntesis.

Se prepara una disolución de 2 eq de los productos anteriormente sintetizados en el apartado 5.2. (1, 2, 3) con 1 eq de quinclidina en disolvente adecuado [tolueno (1c), butanona (2c), dioxano (3c)] se utilizan 40ml de disolvente por cada 500mg de producto de partida) y se mantiene en agitación y a T^a ambiente durante 6 días, tras los cuáles aparece un precipitado blanco, el cuál se filtra y lava con el disolvente correspondiente en cada caso, obteniéndose un sólido blanco.



5.2.2.2.1.- Síntesis de Bromuro de 1-(4-bromometilbenzil)-1-quinuclidinio (1c).

Siguiendo el procedimiento 5.2.2.2. anteriormente descrito se obtienen mg de un sólido blanco. Rendimiento 100%. P.f: 239-241°C.



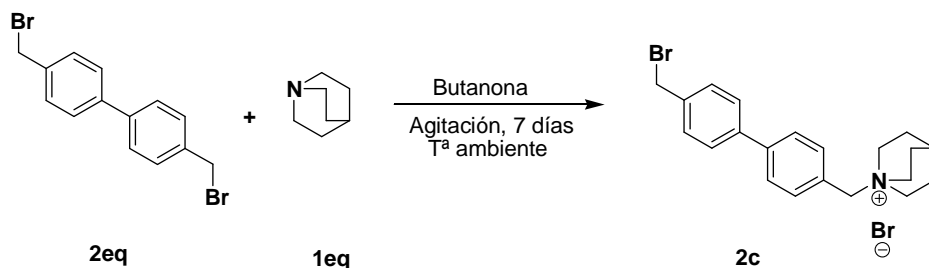
$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, DMSO-d_6): δ 7.57 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 4.75 (s, 2H), 4.41 (s, 2H), 3.40 (m, 3H), 2.04 (m, 1H), 1.85 (m, 3H).

$^{13}\text{C RMN}$ (151 MHz, DMSO-d_6): δ 143.05, 136.47 x 2, 132.82 x 2, 130.80, 68.87, 56.87 x 3, 36.51, 26.44 x 3, 22.59.

HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NBr}^+$: 294,0857; encontrado: 294,0858.

5.2.2.2.2.- Síntesis de Bromuro de 1-(4''-bromometilbifenil-4-ilmetil)-1-quinuclidinio (2c).

Siguiendo el procedimiento 5.2.2.2 anteriormente descrito se obtiene un sólido blanco identificado como el producto. Rendimiento 83,75%. P.f: 261-263°C.



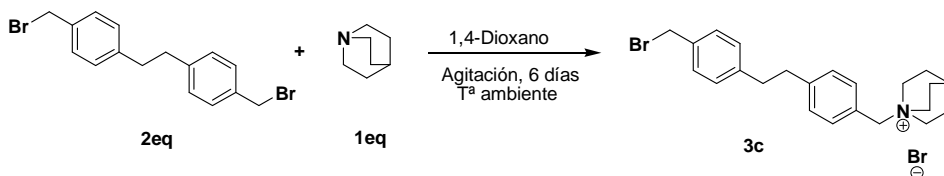
^1H RMN (300 MHz, DMSO-d_6): δ 7.84 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.60 (dd, $J = 15.1, 8.4$ Hz, 4H), 4.78 (s, 2H), 4.45 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.53 – 3.35 (m, 6H), 2.07 (s, 1H), 1.96 – 1.80 (m, 6H).

^{13}C RMN (75 MHz, DMSO-d_6): δ 140.47, 140.35, 137.70, 133.61 x 2, 133.50, 132.35, 129.88, 127.07 x 2, 126.94, 65.82, 65.73, 53.65 x 3, 33.99, 23.21 x 3, 19.34.

HRMS- m/z [$\text{M} - \text{Br}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NBr}^+$: 370,1170; encontrado: 370,1169.

5.2.2.2.3.- Síntesis de Bromuro de 1-{4[2-(4-bromometilfenil)etil]encil}bencil-1-quinuclidinio (3c).

Siguiendo el procedimiento 5.2.2.2 anteriormente descrito se obtiene 517,3 mg de un sólido blanco identificado como el producto. Rendimiento: 95,36%. P.f: 269-271°C.



^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 7.47 – 7.10 (m, 8H), 4.53 (s, 2H), 4.35 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 3.47 (m, 6H), 2.95 (m, 4H), 2.15 (m, 1H), 1.99 (m, 6H).

^{13}C RMN (151 MHz, CD_3OD): δ 145.66, 142.16, 137.12, 130.17, 134.21 x 2, 134.05 x 2, 130.53 x 2, 130.47 x 2, 68.74, 68.13, 55.70 x 3, 38.24, 33.90, 24.93 x 3, 21.41.

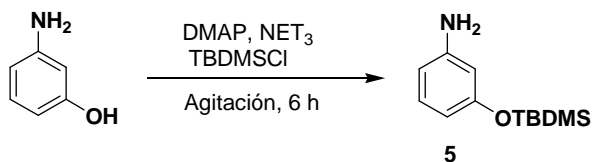
HRMS- m/z [$\text{M} - \text{Br}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{NBr}^+$: 398,1483; encontrado: 398,1488.

5.2.3.- Síntesis de productos finales monocatiónicos (Familia A).

5.2.3.1.- Derivados Fenólicos (Subfamilia A₁).

Procedimiento general

Paso 1: Protección del grupo hidroxilo (OH) del 3-aminofenol con TBDMSCI. Síntesis de 3-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-aminobenceno (**5**).



En un matraz se añade una disolución de 1,19 gr de 3-aminofenol (1 eq) en 32,7 ml de CH₂Cl₂. Posteriormente se añaden 4,9451 gr de TBDMSCI (3 eq), 4,57 ml de NEt₃ (3 eq) y 0,13353 gr de DMAP (0,1 eq). La mezcla se mantiene en agitación durante 6 horas a T^a ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla se diluye en CH₂Cl₂ y se lava con H₂O (3 x 10 ml). La fase orgánica se seca (Na₂SO₄), se filtra, se evapora el disolvente, y el crudo resultante se purifica mediante cromatografía flash usando una mezcla de AcOEt/Hexano (1:100)⁴.

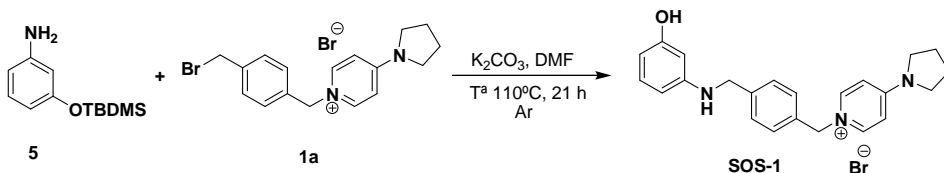
Se obtiene un producto siruposo amarillo y con un peso de 2,44 g identificado como 3-(*terc*-butildimetilsililoxi)-1-aminobenceno. Rendimiento: 99,93%.

Paso 2:

En un matraz se añade 1,2 eq del producto anteriormente sintetizado (**5**), 1 eq de los correspondientes productos sintetizados en el punto 5.3 (**1a-c**, **2a-c**, **3a-c** y **4a-b**) y 1 eq de K₂CO₃ en 10 ml de DMF anhidra. La reacción se mantiene en agitación, bajo argón y a una T^a de 110°C durante 21 horas. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se evapora. La purificación se lleva a cabo mediante cromatografía flash usando una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (9:1 a 8:2), de este modo se aíslan los productos deseados (**SOS-1 a SOS-11**).

5.2.3.1.1.- Síntesis de Bromuro de 1-(4-(3-hidroxifenilaminometil)bencil)-4-pirrolidinapiridino (SOS-1).

Seguendo el procedimiento 5.2.3.1 anteriormente descrito se obtienen 57,6 mg de un sirupo marrón identificado como el producto. Rendimiento: 55,5%.



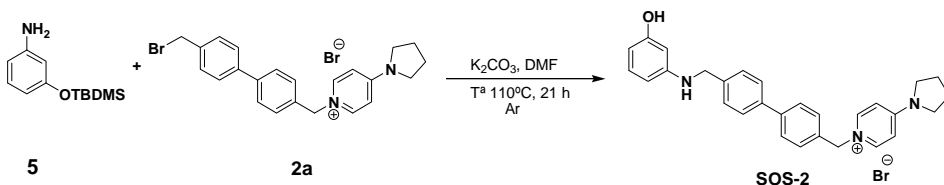
$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 8.14 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.39 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.31 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 6.81 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.76 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 6.08 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 6.03 (s, 1H, H-2_{ph}), 6.02 (d, $J = 10$ Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 5.28 (s, 2H, CH_2N^+), 4.24 (s, 2H, CH_2NH), 3.55 – 3.40 (m, 4H, H-2_{pirr}, H-5_{pirr}), 2.12 – 2.02 (m, 4H, H-3_{pirr}, H-4_{pirr}).

$^{13}\text{C RMN}$ (126 MHz, CD_3OD): δ 157.77 (1C, C-3_{ph}), 153.63 (1C, C-4_{pyr}), 149.86 (1C, C-1_{ph}), 141.78 (1C, C-4'), 141.48 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 133.16 (1C, C-1'), 129.32 (1C, C-5_{ph}), 128.05 (2C, C-2', C-6'), 127.78 (2C, C-3', C-5'), 108.25 (2C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 104.81 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 103.72 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 99.44 (1C, C-2_{ph}), 60.15 (1C, CH_2N^+), 48.29 (2C, C-2_{pirr}, C-5_{pirr}), 46.62 (1C, CH_2NH), 24.69 (2C, C-3_{pirr}, C-4_{pirr}).

HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}^+$: 360,2076; encontrado: 360,2075.

5.2.3.1.2.- Síntesis de Bromuro de de 1-{4'-[3-hidroxi-fenilamino)-metil]-bifenil-4-il-metil}-4-pirrolidin-1-il-piridinio (SOS-2).

Seguendo el procedimiento 5.2.3.1. anteriormente descrito se obtienen 106,5 mg de un sólido marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 40,95%. P.f:179-181°C.



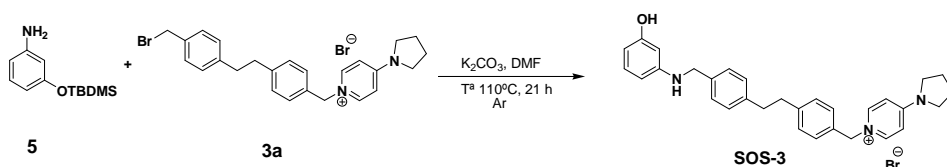
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.18 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.63 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.53 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.48 – 7.38 (m, 4H, H-2'', H-6'' y H-3', H-5'), 6.87 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.81 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 6.15 (ddd, $J = 8.1, 2.2, 0.9$ Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 6.09 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-2_{ph}), 6.06 (ddd, $J = 8.1, 2.2, 0.9$ Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 5.35 (s, 2H, CH_2N^+), 4.30 (s, 2H, CH_2NH), 3.56 – 3.46 (m, 4H, H-2_{pirr}, H-5_{pirr}), 2.13 – 2.03 (m, 4H, H-3_{pirr}, H-4_{pirr}).

¹³C RMN (126 MHz, CD₃OD): δ 157.75 (1C, C-3_{ph}), 153.74 (1C, C-4_{pyr}), 150.07 (1C, C-1_{ph}), 141.78 (1C, C-1''), 141.56 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 140.11 (1C, C-4''), 138.35 (1C, C-4'), 133.54 (1C, C-1'), 129.27 (1C, C-5_{ph}), 128.41 (2C, C-2', C-6'), 127.46 (2C, C-2'', C-6''), 127.34 (2C, C-3', C-5'), 126.56 (2C, C-3'', C-5''), 108.28 (2C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 104.95 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 103.75 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 99.52 (1C, C-2_{ph}), 60.10 (1C, CH₂-N⁺), 48.42 (1C, CH₂-NH), 48.29 (2C, C-2_{pirr}, C-5_{pirr}), 24.69 (2C, C-3_{pirr}, C-4_{pirr}).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para C₂₉H₃₀N₃O⁺: 436,2389; encontrado: 436,2382.

5.2.3.1.3.- Síntesis de Bromuro de 1-[4-(2-{4-[(3-hidroxi-fenilamino)-metil]-fenil}-etil)-benzil]-4-pirrolidin-1-il-piridinio (SOS-3).

Siguiendo el procedimiento 5.2.3.1. anteriormente descrito se obtienen 215,3 mg de un sirupo marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 41,46%.



¹H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 8.04 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.19 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.15 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.11 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.98 (d, J = 8.1 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 6.80 (t, J = 8.3 Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.71 (d, J = 7.8 Hz, 2H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 6.07 (d, J = 10.0 Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 6.02 (s, 1H, H-2_{ph}), 6.01 (d, J = 10.0 Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 5.20 (s, 2H, CH₂-N⁺), 4.14 (s, 2H, CH₂-NH), 3.43 (m, 4H, H-2_{pirr}, H-5_{pirr}), 2.80 (m, 4H, 2CH₂), 2.03 (m, 4H, H-3_{pirr}, H-4_{pirr}).

¹³C RMN (126 MHz, CD₃OD): δ 157.77 (1C, C-3_{ph}), 153.62 (1C, C-4_{pyr}), 150.19 (1C, C-1_{ph}), 142.88 (1C, C-4'), 141.38 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 139.62 (1C, C-1''), 137.73 (1C, C-4''), 132.17 (1C, C-1'), 129.29 (1C, C-5_{ph}), 129.23 (2C, C-3', C-5'), 128.22 (2C, C-2'', C-6''), 127.97 (2C, C-2', C-6'), 126.89 (2C, C-3'', C-5''), 108.22 (2C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 105.00 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 103.67 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 99.55 (1C, C-2_{ph}), 60.21 (1C, CH₂-N⁺), 48.46 (2C, C-2_{pirr}, C-5_{pirr}), 48.27 (1C, CH₂-NH), 37.07 (1C, CH₂), 36.87 (1C, CH₂), 24.69 (2C, C-3_{pirr}, C-4_{pirr}).

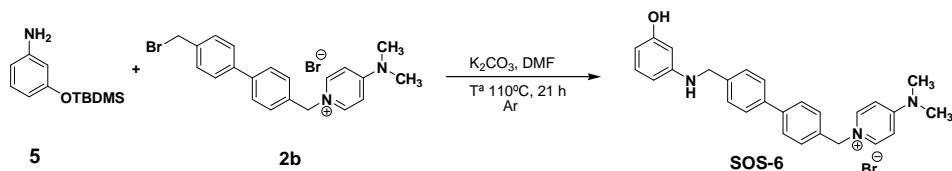
HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para C₃₁H₃₄N₃O⁺: 464,2780; encontrado: 464,2727.

5.2.3.1.4.- Síntesis de Bromuro de 1-[4-(4-{4-[(3-hidroxi-fenilamino)-metil]-fenil}-butil)-benzil]-4-pirrolidin-1-il-piridinio (SOS-4).

Siguiendo el procedimiento 5.2.3.1. anteriormente descrito se obtienen 47,2 mg de un sólido marrón identificado como el producto. Rendimiento: 24,43%. P.f.: 89-90°C.

5.2.3.1.6.- Síntesis de Bromuro de 1-[(4'-{[(3-hidroxifenil)amino]metil}bifenil-4-il)metil]-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-6).

Siguiendo el procedimiento 5.2.3.1. descrito anteriormente se obtienen 86,1 mg de un sólido marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 40,09%. P.f.: 249-251°C.



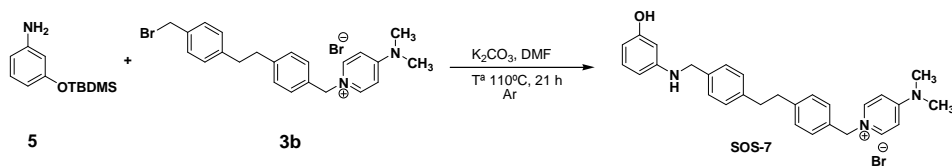
¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.87 (sa, 1H, OH), 8.45 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-2_{pyrr}, H-6_{pyrr}), 7.69 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.60 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.06 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-3_{pyrr}, H-5_{pyrr}), 6.79 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.16 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, NH), 6.04 (dd, *J* = 7.9, 1.8 Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 5.99 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-2_{ph}), 5.95 (dd, *J* = 8.0, 2.2 Hz, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 5.44 (s, 2H, CH₂N⁺), 4.24 (d, *J* = 6.0, 2H, CH₂NH), 3.18 (s, 6H, N(CH₃)₂).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ 158.83 (1C, C-3_{ph}), 156.64 (1C, C-4_{pyrr}), 150.64 (1C, C-1_{ph}), 142.76 (2C, C-2_{pyrr}, C-6_{pyrr}), 141.15 (1C, C-4''), 141.01 (1C, C-1''), 138.35 (1C, C-4'), 135.39 (1C, C-1'), 130.10 (1C, C-5_{ph}), 129.30 (2C, C-2', C-6'), 128.39 (2C, C-3', C-5'), 127.85 (2C, C-3'', C-5''), 127.32 (2C, C-2'', C-6''), 108.76 (2C, C-3_{pyrr}, C-5_{pyrr}), 104.66 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 104.08 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 99.99 (1C, C-2_{ph}), 59.77 (1C, CH₂-N⁺), 46.79 (1C, CH₂-NH), 40.50 (2C, N(CH₃)₂).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para C₂₇H₂₈N₃O⁺: 410,2232; encontrado: 410,2241.

5.2.3.1.7.- Síntesis de Bromuro de 1-{4-[2-(4-{[(3-hidroxifenil)amino]metil}fenil)etil]bencil}-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-7).

Siguiendo el procedimiento 5.2.3.1. descrito anteriormente se obtienen 83,6 mg de sirupo marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 39,11%.



¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8.11 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-2_{pyrr}, H-6_{pyrr}), 7.98 (s, 1H, OH), 7.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.19 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.14 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 6.89 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3_{pyrr}, H-5_{pyrr}), 6.83 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.13 (t, *J* = 3 Hz, 1H, NH), 6.11 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 6.07 (s, 1H, H-2_{ph}), 6.04 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 5.25 (s, 2H, CH₂N⁺), 4.17 (s, 2H, CH₂NH), 3.17 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.83 (m, 4H, 2CH₂).

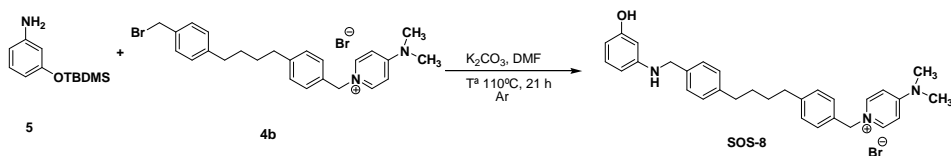
¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 158.03 (1C, C-3_{ph}), 156.70 (1C, C-4_{pyrr}), 150.46 (1C, C-1_{ph}), 143.15 (1C, C-4'), 141.76 (2C, C-2_{pyrr}, C-6_{pyrr}), 139.91 (1C, C-1''), 138.01 (1C, C-4''), 132.37 (1C, C-1'),

129.59 (1C, C-5_{ph}), 129.50 (2C, C-3', C-5'), 128.49 (2C, C-2'', C-6''), 128.34 (2C, C-2', C-6'), 127.19 (2C, C-3'', C-5''), 107.93 (2C, C-3_{pyrr}, C-5_{pyrr}), 105.30 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 103.96 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 99.84 (1C, C-2_{ph}), 60.44 (1C, CH₂-N⁺), 47.29 (CH₂-NH), 39.29 (2C, N(CH₃)₂), 37.34 (1C, CH₂), 37.13 (1C, CH₂).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para C₂₉H₃₂N₃O⁺: 438,2545; encontrado: 438,2561.

5.2.3.1.8.- Síntesis de Bromuro de 1-{4-[4-(4-[(3-hidroxifenil)amino]metil]phenil)butil]benzil}-4-(dimetilamino)-piridinio (SOS-8).

Seguendo el procedimiento 5.2.3.1. anteriormente descrito se obtienen 71,6 mg de un sirupo marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 33,63%.



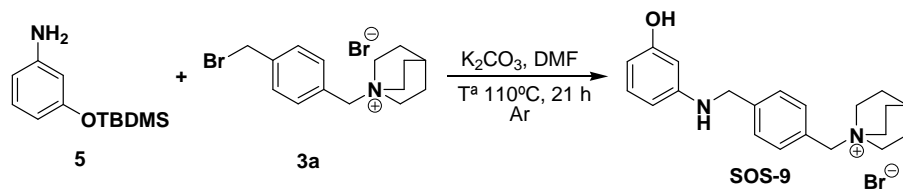
¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8.14 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-2_{pyrr}, H-6_{pyrr}), 7.26 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.21 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.17 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.03 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 6.90 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3_{pyrr}, H-5_{pyrr}), 6.85 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.13 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 0.8 Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 6.09 (t, *J* = 2.1, 1H, H-2_{ph}), 6.06 (ddd, *J* = 7.8, 2.3, 0.9 Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 5.27 (s, 2H, CH₂N⁺), 4.18 (s, 2H, CH₂NH), 3.18 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.57 (m, 4H, 2CH₂), 1.57 (m, 4H, 2CH₂).

¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 158.02 (1C, C-3_{ph}), 156.73 (1C, C-4_{pyrr}), 150.48 (1C, C-1_{ph}), 144.05 (1C, C-4'), 141.80 (2C, C-2_{pyrr}, C-6_{pyrr}), 141.00 (1C, C-1''), 137.70 (1C, C-4''), 132.23 (1C, C-1'), 129.59 (1C, C-5_{ph}), 129.31 (2C, C-3', C-5'), 128.32 (4C, C-2'', C-6'' y C-2', C-6'), 127.23 (2C, C-3'', C-5''), 107.93 (2C, C-3_{pyrr}, C-5_{pyrr}), 105.26 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 103.98 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 99.79 (1C, C-2_{ph}), 60.48 (1C, CH₂-N⁺), 53.70 (1C, CH₂-NH), 39.25 (2C, N(CH₃)₂), 35.14 (1C, CH₂), 35.10 (1C, CH₂), 30.89 (1C, CH₂), 30.74 (1C, CH₂).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para C₃₁H₃₆N₃O⁺: 466,2858; encontrado: 466,2854.

5.2.3.1.9.- Síntesis de Bromuro de 1-{4-[(3-hidroxifenil)amino]metil]benzil}-1-quinuclidinio (SOS-9).

Seguendo el procedimiento 5.2.3.1. anteriormente descrito se obtienen 83,2 mg de un sólido color siena identificado como el producto. Rendimiento: 55,63%. P.f.: 279-281°C.



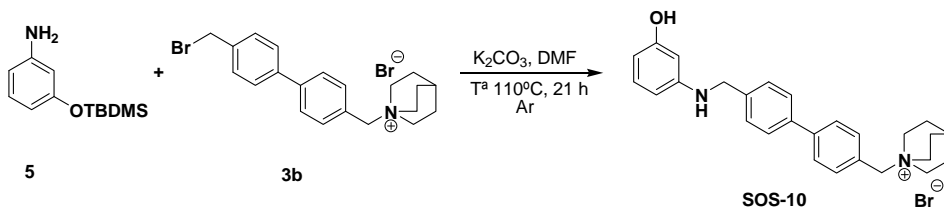
$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.89 (sa, 1H, OH), 7.48 – 7.41 (m, 4H, H-3', H-5' y H-2', H-6'), 6.80 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.20 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, NH), 6.03 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 5.98 (s, 1H, H-2_{ph}), 5.96 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 4.36 (s, 2H, CH_2N^+), 4.26 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, CH_2NH), 3.41 – 3.34 (m, 6H, H-2_q, H-6_q, H-7_q), 2.03 (m, 1H, H-4_q), 1.87 – 1.80 (m, 6H, H-3_q, H-5_q, H-8_q).

$^{13}\text{C RMN}$ (126 MHz, DMSO-d_6): δ 158.57 (1C, C-3_{ph}), 150.28 (1C, C-1_{ph}), 143.40 (1C, C-4'), 133.38 (2C, C-2', C-6'), 129.90 (1C, C-5_{ph}), 127.87 (2C, C-3', C-5'), 126.29 (1C, C-1'), 104.28 (1C, C-6_{ph}), 103.92 (1C, C-4_{ph}), 99.69 (1C, C-2_{ph}), 66.56 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 54.13 (3C, C-2_q, C-6_q, C-7_q), 46.47 (1C, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 23.77 (3C, C-3_q, C-5_q, C-8_q), 19.96 (1C, C-4_q).

HRMS- m/z [M-Br^+] calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}^+$: 323,2123; encontrado: 323,2126.

5.2.3.1.10.- Síntesis de Bromuro de 1-{4''}-[(3-hidroxifenilamino)metil]bifenil-4-ilmetil}-1-quinuclidinio (SOS-10).

Seguendo el procedimiento 5.2.3.1. descrito anteriormente y disolviendo en MeOH/éter etílico se obtienen 119,5 mg de un sólido color siena que se identifica como el producto. Rendimiento: 33,52%. P.f.: 94-95°C.



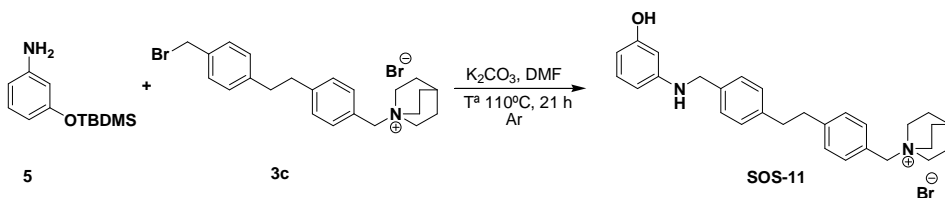
$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.88 (sa, 1H, OH), 7.77 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.66 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.45 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 6.80 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.18 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, NH), 6.05 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 6.01 (s, 1H, H-2_{ph}), 5.96 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 4.47 (s, 2H, CH_2N^+), 4.25 (d, $J = 5.9$, 2H, CH_2NH), 3.45 (m, 6H, H-2_q, H-6_q, H-7_q), 2.04 (m, 1H, H-4_q), 1.86 (m, 6H, H-3_q, H-5_q, H-8_q).

$^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, DMSO-d_6): δ 158.58 (1C, C-3_{ph}), 150.39 (1C, C-1_{ph}), 142.04 (1C, C-4'), 141.05 (1C, C-4''), 137.83 (1C, C-1''), 134.05 (2C, C-2', C-6'), 128.20 (1C, C-5_{ph}), 127.34 (2C, C-3', C-5'), 127,13 (2C, C-2'', C-6''), 127.04 (2C, C-3'', C-5''), 126.92 (1C, C-1'), 104.37 (1C, C-6_{ph}), 103.84 (1C, C-4_{ph}), 99.73 (1C, C-2_{ph}), 66.34 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 54.15 (3C, C-2_q, C-6_q, C-7_q), 46.53 (1C, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 23.82 (3C, C-3_q, C-5_q, C-8_q), 19.99 (1C, C-4_q).

HRMS- $m/z[M-Br]^+$ calculado para $C_{27}H_{31}N_2O^+$: 399,2436; encontrado: 399,2455.

5.2.3.1.11.- Síntesis de Bromuro de 1-[4-(2-{4-[(3-hidroxifenilamino)metil]fenil)etil}bencil)-1-quinuclidinio (SOS-11).

Siguiendo el procedimiento 5.2.3.1. anteriormente descrito y disolviendo en MeOH/éter etílico se obtienen 86,7 mg de un sólido marrón identificado como el producto. Rendimiento: 40,49%. P.f.: 129-131°C.



1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 7.46 – 7.02 (m, 8H, H-3', H-5', H-2'', H-6'', H-2', H-6', H-3'', H-5''), 6.93 – 6.84 (m, 1H, H-5_{ph}), 6.17 – 6.09 (m, 2H, H-4_{ph} y H-6_{ph}), 6.08 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-2_{ph}), 4.34 (d, $J = 14.4$ Hz, 2H, CH_2N^+), 4.22 (s, 2H, CH_2NH), 3.52 – 3.38 (m, 6H, H-2_q, H-6_q, H-7_q), 2.99 – 2.83 (m, 4H, 2 CH_2), 2.17 – 2.07 (m, $J = 3.1$ Hz, 1H, H-4_q), 2.05 – 1.87 (m, $J = 5.3$ Hz, 6H, H-3_q, H-5_q, H-8_q).

^{13}C NMR (126 MHz, $DMSO-d_6$): δ 158.54 (1C, C-3_{ph}), 150.46 (1C, C-1_{ph}), 144.19 (1C, C-4'), 139.90 (1C, C-1''), 138.69 (1C, C-4''), 133.38 (2C, C-2', C-6'), 129.75 (1C, C-5_{ph}), 129.32 (2C, C-3', C-5'), 128.66 (2C, C-2'', C-6''), 127.49 (2C, C-3'', C-5''), 126.92 (1C, C-1'), 104.39 (1C, C-6_{ph}), 103.72 (1C, C-4_{ph}), 99.72 (1C, C-2_{ph}), 66.55 (1C, CH_2-N^+), 54.07 (3C, C-2_q, C-6_q, C-7_q), 46.70 (1C, CH_2-NH), 37.24 (1C, CH_2), 36.84 (1C, CH_2), 23.79 (3C, C-3_q, C-5_q, C-8_q), 20.00 (1C, C-4_q).

HRMS- $m/z[M-Br]^+$ calculado para $C_{29}H_{35}N_2O^+$: 427,2749; encontrado: 427,2742.

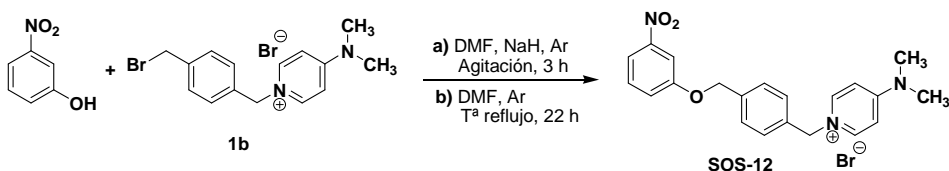
5.2.3.2.- Derivados Nitrados (Subfamilia A₂).

Procedimiento general:

En un matraz se añade 1,2 eq de 3-nitrofenol comercial y 2 eq de NaH 60% en 10 ml de DMF anhidra. La mezcla se mantiene en agitación bajo argón durante 3 horas, transcurrido ese tiempo se añaden 1 eq de los productos sintetizados en el punto 5.3 (2a-d y 3a-c) disueltos en 15 ml de DMF. La mezcla se mantiene en agitación bajo argón y a una T^o de reflujo durante 22 horas. El disolvente del crudo de la reacción se evapora, para purificarlo después mediante cromatografía flash con una mezcla de CH_2Cl_2 : MeOH (9:1).

5.2.3.2.1.- Síntesis de Bromuro de 1-{4-[(3-nitrofenoxi)metil]bencil}-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-12).

Siguiendo el procedimiento 5.2.3.2 anteriormente descrito se obtienen 176,8 mg de un sólido amarillo, que se identifica como el producto. Rendimiento: 71,24%. P.f.: 209-211°C.



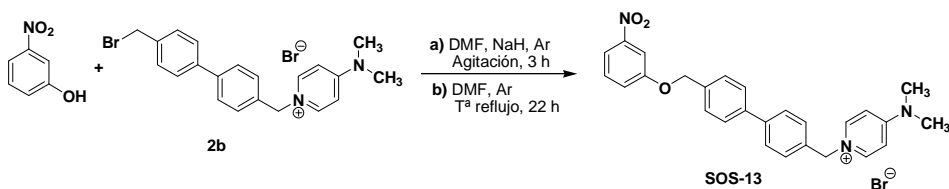
$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, CD_3OD): δ 8.23 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 7.80 (s, 1H, H-2_{ph}), 7.55 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.51 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-5_{ph}), 7.42 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.40 (dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 7.00 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 5.39 (s, 2H, CH_2N^+), 5.23 (s, 2H, CH_2O), 3.25 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C RMN}$ (126 MHz, CD_3OD): δ 159.14 (1C, C-1_{ph}), 156.61 (1C, C-4_{pyr}), 149.18 (1C, C-3_{ph}), 141.69 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 137.62 (1C, C-4'), 134.67 (1C, C-1'), 130.04 (1C, C-5_{ph}), 128.16 (4C, C-2', C-6' y C-3', C-5'), 121.43 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 115.43 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 109.02 (1C, C-2_{ph}), 107.72 (2C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 69.54 (1C, $\text{CH}_2\text{-O}$), 59.99 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 38.93 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

HRMS- m/z [$\text{M} - \text{Br}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_3^+$: 364,1661; encontrado: 346,1646.

5.2.3.2.2.- Síntesis de Bromuro de 1-{4'-[(3-aminofenoxi)metil]bifenil-4-il}metil}-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-13).

Siguiendo el procedimiento 5.2.3.2 anteriormente descrito se obtienen 189,1 mg de un sólido amarillo, que se identifica como el producto. Rendimiento: 81,04%. P.f.: 94-96°C.



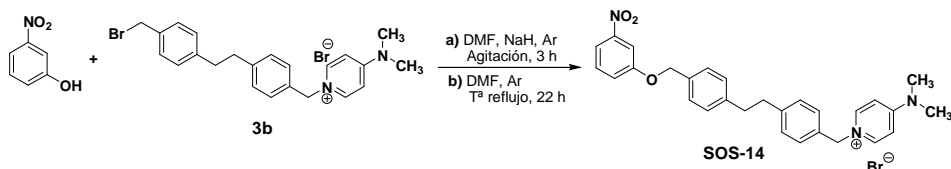
$^1\text{H RMN}$ (600 MHz, CD_3OD): δ 8.26 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.85 (s, 1H, H-2_{ph}), 7.83 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 7.71 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.66 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.56 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.52 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5_{ph}), 7.47 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.42 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 7.02 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 5.42 (s, 2H, CH_2N^+), 5.25 (s, 2H, CH_2O), 3.25 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C RMN}$ (151 MHz, CD_3OD): δ 161.95 (1C, C-1_{ph}), 159.26 (1C, C-4_{pyr}), 151.84 (1C, C-3_{ph}), 144.34 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 144.10 (1C, C-4'), 142.45 (1C, C-1''), 138.65 (1C, C-4''), 136.52 (1C, C-1'), 132.67 (1C, C-5_{ph}), 131.17 (2C, C-2', C-6'), 130.59 (2C, C-3'', C-5''), 130.15 (2C, C-3', C-5'), 129.47 (2C, C-2'', C-6''), 124.07 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 117.99 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 111.71 (1C, C-2_{ph}), 110.37 (2C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 72.46 (1C, $\text{CH}_2\text{-O}$), 62.67 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 41.59 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

HRMS- m/z [M- Br]⁺ calculado para C₂₇H₂₆N₃O₃⁺: 440,1974; encontrado: 440,1988.

5.2.3.2.3.- Síntesis de Bromuro de 1-[4-(2-[4-[(3-nitrofenoxi)metil]fenil]etil)bencil]-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-14).

Siguiendo el procedimiento 5.2.3.2 anteriormente descrito se obtienen 141,9 mg de un sólido amarillo identificado como el producto. Rendimiento: 63,09%. P.f: 219-220°C.



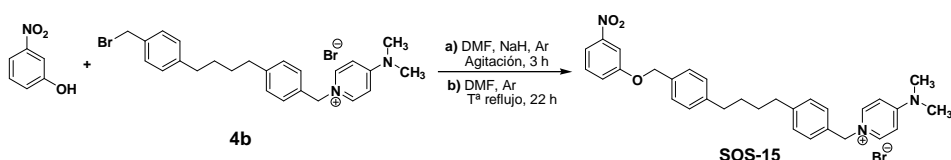
¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8.20 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.77 (ddd, *J* = 8.0, 2.1, 0.9 Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 7.74 (t, *J* = 2.3 Hz, 1H, H-2_{ph}), 7.48 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-5_{ph}), 7.36 (ddd, *J* = 8.4, 2.5, 1.0 Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 7.31 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.27 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.15 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 6.97 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 5.31 (s, 2H, CH₂N⁺), 5.10 (s, 2H, CH₂O), 3.22 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.91 – 2.86 (m, 4H, 2CH₂).

¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 159.59 (1C, C-1_{ph}), 156.79 (1C, C-4_{pyr}), 149.36 (1C, C-3_{ph}), 143.07 (1C, C-4'), 141.89 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 141.66 (1C, C-1''), 134.12 (1C, C-4''), 132.51 (1C, C-1'), 130.30 (1C, C-5_{ph}), 129.48 (2C, C-2', C-6'), 128.72 (2C, C-3'', C-5''), 128.28 (2C, C-3', C-5'), 127.73 (2C, C-2'', C-6''), 121.79 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 115.52 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 109.37 (1C, C-2_{ph}), 107.96 (2C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 70.42 (1C, CH₂-O), 60.43 (1C, CH₂-N⁺), 39.27 (2C, N(CH₃)₂), 37.20 (2C, CH₂).

HRMS- m/z [M- Br]⁺ calculado para C₂₉H₃₀N₃O₃⁺: 468,2287; encontrado: 468,2242.

5.2.3.2.4.- Síntesis de Bromuro de 1-[4-(4-{4-[(3-nitrofenoxi)metil]fenil}butil)bencil]-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-15).

Siguiendo el procedimiento 5.2.3.2 anteriormente descrito se obtienen 136,4 mg de un sirupo amarillo, que se identifica como el producto. Rendimiento: 60,20%.



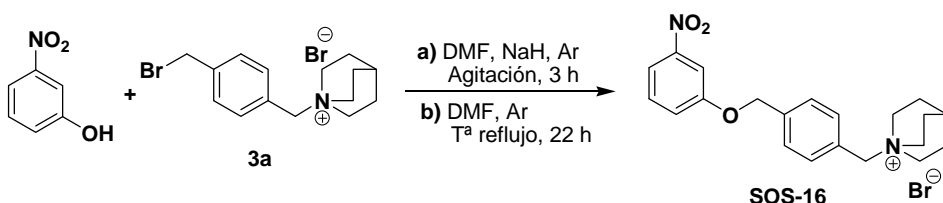
¹H RMN (600 MHz, CD₃OD): δ 8.20 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.81 – 7.75 (m, *J* = 9.7 Hz, 2H, H-4_{ph} o H-6_{ph} y H-2_{ph}), 7.48 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, H-5_{ph}), 7.37 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 7.33 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.28 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.20 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.16 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-2'', H-6''), 6.97 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 5.31 (s, 2H, CH₂N⁺), 5.12 (s, 2H, CH₂O), 3.22 (s, 6H, N(CH₃)₂), 2.66 – 2.57 (m, 4H, aril-2CH₂), 1.60 (m, 4H, 2CH₂).

¹³C RMN (151 MHz, CD₃OD): δ 162.03 (1C, C-1_{ph}), 159.22 (1C, C-4_{pyr}), 151.79 (1C, C-3_{ph}), 146.46 (1C, C-4'), 145.10 (1C, C-1''), 144.26 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 136.26 (1C, C-4''), 134.67 (1C, C-1'), 132.63 (1C, C-5_{ph}), 131.68 (2C, C-2', C-6'), 130.94 (2C, C-3'', C-5''), 130.65 (2C, C-3', C-5'), 130.14 (2C, C-2'', C-6''), 124.11 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 117.87 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 111.75 (1C, C-2_{ph}), 110.32 (2C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 72.85 (1C, CH₂-O), 62.87 (1C, CH₂-N⁺), 41.59 (2C, N(CH₃)₂), 37.56 (1C, aril-CH₂), 37.54 (1C, aril-CH₂), 33.25 (1C, CH₂), 33.22 (1C, CH₂).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para C₃₁H₃₄N₃O₃⁺: 496.2600; encontrado: 496,2590.

5.2.3.2.5.- Síntesis de Bromuro de 1-[4-(3-nitrofenoximetil)benzil]-1-quinuclidinio (SOS-16).

Seguendo el procedimiento 5.2.3.2 descrito anteriormente se obtiene un sirupo marrón que es identificado como el producto. Rendimiento: 81,82%.



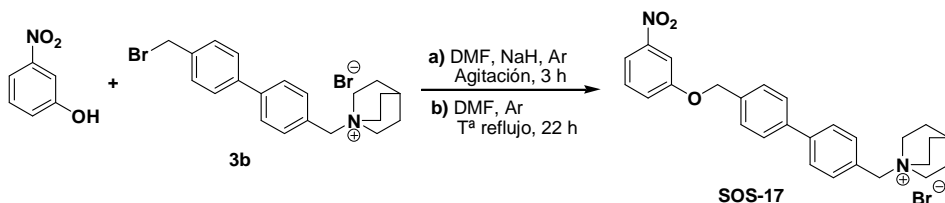
¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7.84 (dd, *J* = 2.1, 1.0 Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 7.82 (s, 1H, H-2_{ph}), 7.61 (m, 4H, H-2', H-6' y H-3', H-5'), 7.57 – 7.51 (m, 1H, H-5_{ph}), 7.43 (ddd, *J* = 8.3, 2.3, 1.2 Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 5.27 (s, 2H, CH₂O), 4.47 (s, 2H, CH₂N⁺), 3.58 – 3.48 (m, 6H, H-2_q, H-6_q, H-7_q), 2.15 (m, 1H, H-4_q), 2.05 – 1.94 (m, 6H, H-3_q, H-5_q, H-8_q).

¹³C RMN (126 MHz, DMSO-d₆): δ 158.74 (1C, C-1_{ph}), 148.75 (1C, C-3_{ph}), 138.24 (1C, C-4'), 133.22 (2C, C-2', C-6'), 130.80 (1C, C-5_{ph}), 128.12 (2C, C-3', C-5'), 127.47 (1C, C-1'), 122.28 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 115.87 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 108.98 (1C, C-2_{ph}), 69.41 (1C, CH₂-O), 65.88 (1C, CH₂-N⁺), 53.72 (3C, C-2_q, C-6_q, C-7_q), 23.25 (3C, C-3_q, C-5_q, C-8_q), 19.48 (1C, C-4_q).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para C₂₁H₂₅N₂O₃⁺: 353,1865; encontrado: 353,1859

5.2.3.2.6.- Síntesis de Bromuro de 1-[4''-(3-nitrofenoximetil)-4-ilmetil]-1-quinuclidinio (SOS-17).

Seguendo el procedimiento 5.2.3.2 descrito anteriormente se obtiene un sirupo marrón que es identificado como el producto. Rendimiento: 48,90%.



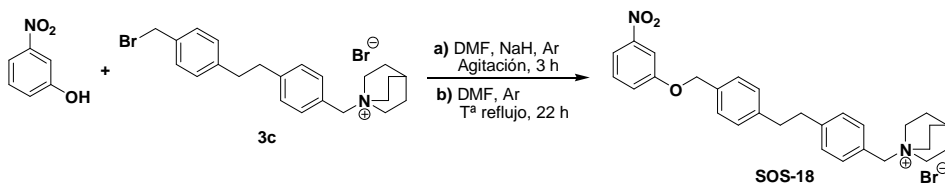
^1H RMN (600 MHz, CD_3OD): δ 7.84 – 7.82 (m, 1H, H-2_{ph}), 7.81 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 7.78 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-2'', H-6''), 7.61 – 7.56 (m, 4H, H-2', H-6' y H-3'', H-5''), 7.52 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-5_{ph}), 7.42 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 5.24 (s, 2H, CH_2O), 4.43 (s, 2H, CH_2N^+), 3.55 – 3.48 (m, 6H, H-2_q, H-6_q, H-7_q), 2.16 (m, 1H, H-4_q), 2.04 – 1.96 (m, 6H, H-3_q, H-5_q, H-8_q).

^{13}C RMN (151 MHz, CD_3OD): δ 161.95 (1C, C-1_{ph}), 151.85 (1C, C-3_{ph}), 145.37 (1C, C-1''), 142.15 (1C, C-4'), 138.97 (1C, C-4''), 135.96 (2C, C-2', C-6'), 132.69 (1C, C-5_{ph}), 130.63 (2C, C-3'', C-5''), 129.96 (2C, C-3', C-5'), 129.57 (2C, C-2'', C-6''), 128.78 (1C, C-1'), 124.10 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 118.02 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 111.77 (1C, C-2_{ph}), 72.47 (1C, $\text{CH}_2\text{-O}$), 69.93 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 57.04 (3C, C-2_q, C-6_q, C-7_q), 26.20 (3C, C-3_q, C-5_q, C-8_q), 22.64 (1C, C-4_q).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_3^+$: 429,2178; encontrado: 429,2182.

5.2.3.2.7.- Síntesis de Bromuro de 1-(4-(2-[3-nitrofenoximetil]fenil)etil)encil)-1-quinuclidinio (SOS-18).

Siguiendo el procedimiento 5.2.3.2. descrito anteriormente se obtienen 111,4mg de un sirupo amarillo que es identificado como el producto. Rendimiento: 48,61%.



^1H RMN (600 MHz, CD_3OD): δ 7.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-4_{ph} o H-6_{ph}), 7.80 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-2_{ph}), 7.52 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-5_{ph}), 7.39 (dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, 1H, H-6_{ph} o H-4_{ph}), 7.36 (m, 4H, H-3'', H-5'' y H-2', H-6'), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.20 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 5.16 (s, 2H, CH_2O), 4.32 (s, 2H, CH_2N^+), 3.48 – 3.39 (m, 6H, H-2_q, H-6_q, H-7_q), 2.97 (m, 4H, 2 CH_2), 2.15 (m, 1H, H-4_q), 2.04 – 1.91 (m, 6H, H-3_q, H-5_q, H-8_q).

^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 160.77 (1C, C-1_{ph}), 150.54 (1C, C-3_{ph}), 145.83 (1C, C-1''), 142.74 (1C, C-4'), 135.37 (1C, C-4''), 134.12 (2C, C-2', C-6'), 131.45 (1C, C-5_{ph}), 130.51 (2C, C-3', C-5'), 129.88 (2C, C-2'', C-6''), 128.89 (2C, C-3'', C-5''), 126.04 (1C, C-1'), 122.94 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 116.69 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 110.52 (1C, C-2_{ph}), 71.57 (1C, $\text{CH}_2\text{-O}$), 68.76 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 55.69 (3C, C-2_q, C-6_q, C-7_q), 38.43 (1C, CH_2), 38.22 (1C, CH_2), 24.96 (3C, C-3_q, C-5_q, C-8_q), 21.43 (1C, C-4_q).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_3^+$: 457,2491; encontrado: 457,2471.

5.2.3.3.- Derivados Amínicos (Subfamilia A₃).

Procedimiento 1:

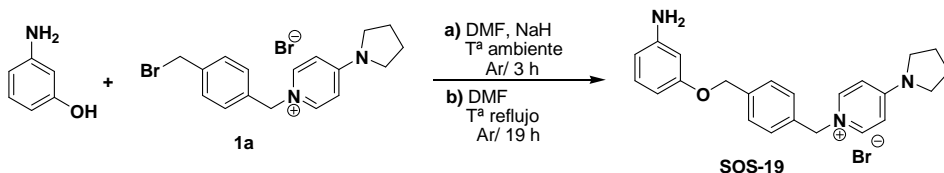
Se añaden 4 eq de NaH a 1 eq de 3-aminofenol en 10ml de DMF anhidra y se mantiene en agitación durante 3 horas bajo atmosfera inerte de argón. Pasado este tiempo se añaden 1 eq del correspondiente producto sintetizado en el apartado 5.2.2. (**1a-d**, **2a-d**, **3a-c** y **4a-b**) en 5 ml de DMF anhidra y se mantiene en agitación, bajo atmosfera inerte de argón y a T^a de reflujo durante 19 horas. Se evapora la DMF. El crudo de la reacción se purifica por columna cromatográfica con una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH (9:0'5).

Procedimiento 2:

Una suspensión 1 eq del nitroderivado (producto sintetizado en el punto 5.2.3.2 (**SOS-12 a SOS-18**) en H₂O se calienta a una T^a de 100°C. Posteriormente se añade 1 eq de SO₄Fe y 10 eq de Fe en polvo. La mezcla se mantiene en agitación y a reflujo durante 4 horas. Pasado este tiempo el crudo de la reacción se filtra por celita⁵. El filtrado se evapora hasta sequedad en el rotavapor y se purifica por columna cromatográfica usando una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH (7:3).

5.2.3.3.1.- Síntesis de Bromuro de 1-(4-(3-aminofenoximetil)fenilmetil)-4-(1-pirrolidin)-piridinio (SOS-19).

Siguiendo el procedimiento 1 del punto 5.2.3.3 anteriormente descrito se obtiene un sólido marrón que es identificado como el producto. Rendimiento: 54,7%. P.f: 135-137°C.



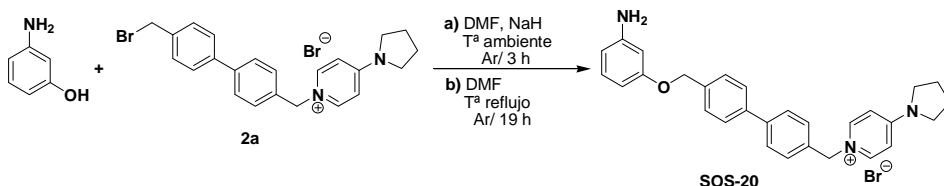
¹H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 8.22 (d, J = 7.7, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.52 (d, J = 8.1, 2H, H-3', H-5'), 7.40 (d, J = 8.1, 2H, H-2', H-6'), 6.99 (t, J = 8.0, 1H, H-5_{ph}), 6.88 (d, J = 7.6, 2H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 6.38 (t, J = 2.2, 1H, H-2_{ph}), 6.34 (dt, J = 8.2, 2.1 Hz, 2H, H-4_{ph}, H-6_{ph}), 5.38 (s, 2H, CH₂N⁺), 5.06 (s, 2H, CH₂O), 3.57 (m, 4H, H-2_{pirr}, H-5_{pirr}), 2.14 (m, 4H, H-3_{pirr}, H-4_{pirr}).

¹³C RMN (126 MHz, CD₃OD): δ 161.04 (1C, C-1_{ph}), 155.20 (1C, C-4_{pyr}), 150.17 (1C, C-3_{ph}), 143.01 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 140.44 (1C, C-4'), 135.59 (1C, C-1'), 130.83 (1C, C-5_{ph}), 129.37 (2C, C-2', C-6'), 129.33 (2C, C-3', C-5'), 109.78 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 109.70 (2C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 105.61 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 103.28 (1C, C-2_{ph}), 70.03 (1C, CH₂-O), 61.54 (1C, CH₂-N⁺), 49.72 (2C, C-2_{pirr}, C-5_{pirr}), 26.12 (2C, C-3_{pirr}, C-4_{pirr}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para C₂₃H₂₆N₃O⁺: 360,2076; encontrado: 360,2078.

5.2.3.3.2.- Síntesis de Bromuro de 1-[4'-(3-aminofenoximetil)bifenil-4-il-pirrolidin-1-il-piridinio (SOS-20).

Seguendo El procedimiento 1 del punto 5.2.3.3 anteriormente descrito se obtiene un sólido marrón identificado como el producto. Rendimiento: 92%. P.f: 254-255°C.



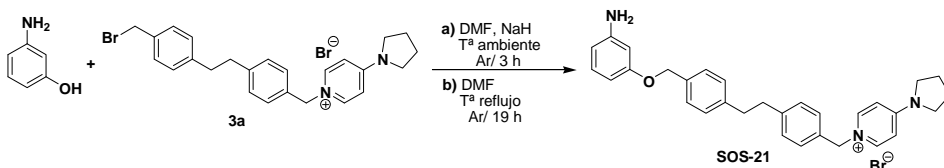
¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.44 (d, J = 7.1, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.71 (m, 4H, H-2', H-6'y H-3'', H-5''), 7.50 (m, 4H, H-3', H-5' y H-2'', H-6''), 6.93 (m, 3H, H-5_{ph} y H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 6.22 (m, 1H, H-2_{ph}), 6.17 (d, J = 5.9, 2H, H-4_{ph}, H-6_{ph}), 5.45 (s, 2H, CH₂-N⁺), 5.05 (s, 2H, CH₂-O), 3.51 (m, 4H, H-2_{pirr}, H-5_{pirr}), 2.01 (m, 4H, H-3_{pirr}, H-4_{pirr}).

¹³C RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ 159.26 (1C, C-1_{ph}), 153.05 (1C, C-4_{pyr}), 149.96 (1C, C-3_{ph}), 141.99 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 140.18 (1C, C-4'), 138.63 (1C, C-1''), 137.14 (1C, C-4''), 134.95 (1C, C-1'), 129.50 (1C, C-5_{ph}), 128.52 (2C, C-2', C-6'), 128.06 (2C, C-3'', C-5''), 127.22 (2C, C-3', C-5'), 126.68 (2C, C-2'', C-6''), 108.60 (2C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 107.08 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 102.18 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 100.33 (1C, C-2_{ph}), 68.27 (1C, CH₂-O), 59.14 (1C, CH₂-N⁺), 48.31 (2C, C-2_{pirr}, C-5_{pirr}), 24.63 (2C, C-3_{pirr}, C-4_{pirr}).

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para C₂₉H₃₀N₃O⁺: 436,2389; encontrado: 436,2388.

5.2.3.3.3.- Síntesis de Bromuro de 1-(4-{2-[4-(3-aminofenoximetil)-fenil]-etil}-bencil)-4-pirrolidin-1-il-piridinio (SOS-21).

Seguendo el procedimiento 1 del punto 5.2.3.3 anteriormente descrito, con la salvedad de que para su purificación se disuelve el producto en una cantidad mínima de MeOH y se precipita con éter etílico, obteniéndose así 74,9 mg de un sólido color siena que es identificado como el producto. Rendimiento: 36,34%. P.f: 189-191°C.



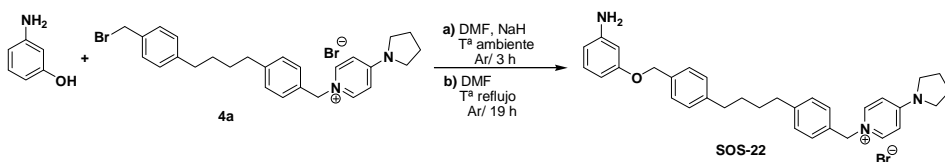
¹H RMN (600 MHz, CD₃OD): δ 8.14 (d, J = 7.6, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.27 (d, J = 8.0, 2H, H-3'', H-5''), 7.25 (d, J = 8.1, 2H, H-2', H-6'), 7.20 (d, J = 8.1, 2H, H-3', H-5'), 7.12 (d, J = 8.0, 2H, H-2'', H-6''), 6.97 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.82 (d, J = 7.6, 2H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 6.36 (t, J = 2.2 Hz 1H, H-2_{ph}), 6.31 (dt, J = 9.32, 1.77 Hz, 2H, H-4_{ph}, H-6_{ph}), 5.28 (s, 2H, CH₂N⁺), 4.94 (s, 2H, CH₂O), 3.52 (m, 4H, H-2_{pirr}, H-5_{pirr}), 2.91 (m, J = 5.6, 4H, 2CH₂), 2.10 (m, 4H, H-3_{pirr}, H-4_{pirr}).

¹³C RMN (151 MHz, CD₃OD): δ 161.30 (1C, C-1_{ph}), 155.15 (1C, C-4_{pyr}), 150.08 (1C, C-3_{ph}), 144.29 (1C, C-4'), 142.90 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 142.18 (1C, C-1''), 136.60 (1C, C-4''), 133.66 (1C, C-1'), 130.80 (1C, C-5_{ph}), 130.67 (2C, C-3', C-5'), 129.66 (2C, C-2'', C-6''), 129.30 (2C, C-2', C-6'), 128.59 (2C, C-3'', C-5''), 109.63 (3C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr} y C-4_{ph} o C-6_{ph}), 105.78 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 103.34 (1C, C-2_{ph}), 70.68 (1C, CH₂-O), 61.64 (1C, CH₂-N⁺), 49.69 (1C, C-2_{pirr}, C-5_{pirr}), 38.36 (4C, CH₂), 26.11 (2C, C-3_{pirr}, C-4_{pirr}).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para C₃₁H₃₄N₃O⁺: 464,2780; encontrado: 464,2768.

5.2.3.3.4.- Síntesis de Bromuro de 1-{4-[4-(3-aminofenoximetil)-fenil]-butil}-bencil-4-pirrolidin-1-il-piridinio (SOS-22).

Seguendo el procedimiento 1 del punto 5.2.3.3 anteriormente descrito se obtiene un sólido marrón identificado como el producto. Rendimiento: 15,5%. P.f: 124-126°C.



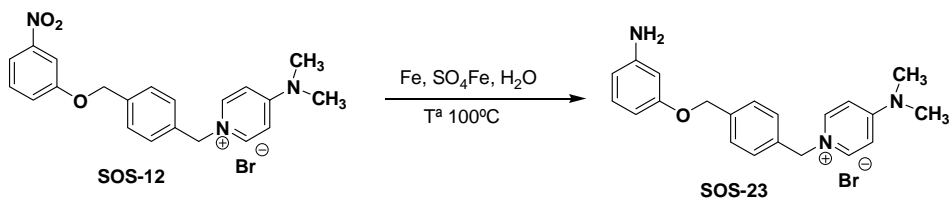
¹H RMN (600 MHz, CD₃OD): δ 8.16 (d, *J* = 7.5, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.31 – 7.25 (m, 4H, H-3'', H-5'' y H-2', H-6'), 7.21 (d, *J* = 8.0, 2H, H-3', H-5'), 7.12 (d, *J* = 7.9, 2H, H-2'', H-6''), 6.96 (t, *J* = 8.0, 1H, H-5_{ph}), 6.80 (d, *J* = 7.5, 2H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 6.36 (t, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-2_{ph}), 6.30 (dt, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 2H, H-4_{ph}, H-6_{ph}), 5.29 (s, 2H, CH₂N⁺), 4.93 (s, 1H, CH₂O), 3.50 (m, 2H, H-2_{pirr}, H-5_{pirr}), 2.62 (m, 4H, 2CH₂), 2.09 (m, 2H, H-3_{pirr}, H-4_{pirr}), 1.61 (m, 4H, 2CH₂).

¹³C RMN (151 MHz, CD₃OD): δ 161.31 (1C, C-1_{ph}), 155.12 (1C, C-4_{pyr}), 150.12 (1C, C-3_{ph}), 145.19 (1C, C-4'), 143.28 (1C, C-1''), 142.90 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 136.30 (1C, C-4''), 133.51 (1C, C-1'), 130.81 (1C, C-5_{ph}), 130.45 (2C, C-3', C-5'), 129.48 (2C, C-2'', C-6''), 129.35 (2C, C-2', C-6'), 128.64 (2C, C-3'', C-5''), 109.64 (2C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 109.61 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 105.72 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 103.28 (1C, C-2_{ph}), 70.70 (1C, CH₂-O), 61.66 (1C, CH₂-N⁺), 49.68 (2C, C-2_{pirr}, C-5_{pirr}), 36.30 (1C, CH₂), 36.27 (1C, CH₂), 31.99 (1C, CH₂), 31.91 (1C, CH₂), 26.10 (2C, C-3_{pirr}, C-4_{pirr}).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para C₃₃H₃₈N₃O⁺: 492,3009; encontrado: 492,3008.

5.2.3.3.5.- Síntesis de Bromuro de 1-{4-[(3-aminofenoxi)metil]bencil}-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-23).

Seguendo el procedimiento 2 del punto 5.2.3.3 anteriormente descrito se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 71,3%. P.f: 119-120°C.



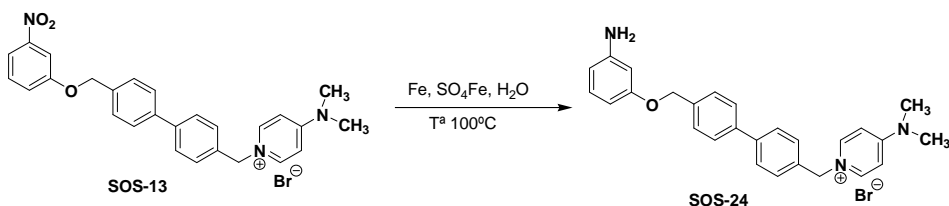
^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.40 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H- 2_{pyr} , H- 6_{pyr}), 7.45 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H- $3'$, H- $5'$), 7.40 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H- $2'$, H- $6'$), 7.04 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H- 3_{pyr} , H- 5_{pyr}), 6.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H- 5_{ph}), 6.18 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H- 2_{ph}), 6.16 – 6.10 (m, 2H, H- 4_{ph} , H- 6_{ph}), 5.39 (s, 2H, CH_2N^+), 4.98 (s, 2H, CH_2O), 2.08 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C RMN (126 MHz, DMSO- d_6): δ 159.15 (1C, C- 1_{ph}), 155.87 (1C, C- 4_{pyr}), 147.73 (1C, C- 3_{ph}), 141.96 (2C, C- 2_{pyr} , C- 6_{pyr}), 138.14 (1C, C- $4'$), 135.07 (1C, C- $1'$), 129.50 (1C, C- 5_{ph}), 128.06 (2C, C- $2'$, C- $6'$), 128.00 (2C, C- $3'$, C- $5'$), 107.98 (2C, C- 3_{pyr} , C- 5_{pyr}), 107.11 (1C, C- 4_{ph} o C- 6_{ph}), 102.11 (1C, C- 6_{ph} o C- 4_{ph}), 100.27 (1C, C- 2_{ph}), 68.14 (1C, CH_2O), 59.12 (1C, CH_2N^+), 30.65 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}^+$: 334,1919; encontrado: 334,1913.

5.2.3.3.6.- Síntesis de Bromuro de 1-({4'-[(3-aminofenoxi)metil]bifenil-4-il}metil)-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-24).

Siguiendo el procedimiento 2 del punto 5.2.3.3 anteriormente descrito se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 76,26%. P.f: 129-131°C.



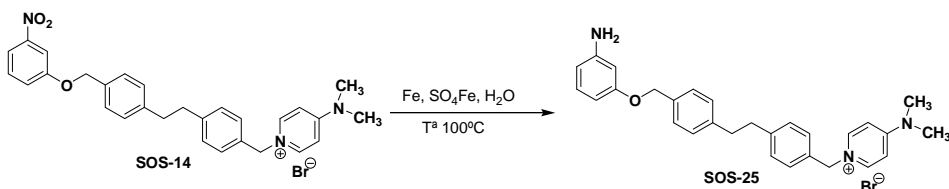
^1H RMN (500 MHz, CD_3OD): δ 8.23 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, H- 2_{pyr} , H- 6_{pyr}), 7.66 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H- $2'$, H- $6'$), 7.61 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H- $3''$, H- $5''$), 7.50 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H- $3'$, H- $5'$), 7.45 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H- $2''$, H- $6''$), 7.35 (m, 1H, H- 5_{ph}), 7.00 (m, 2H, H- 3_{pyr} , H- 5_{pyr} y H- 4_{ph} o 6_{ph}), 6.92 (s, 1H, H- 2_{ph}), 6.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H- 6_{ph} o H- 4_{ph}), 5.39 (s, 2H, CH_2N^+), 5.15 (s, 2H, CH_2O), 3.22 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C RMN (126 MHz, CD_3OD): δ 161.10 (1C, C- 1_{ph}), 157.92 (1C, C- 4_{pyr}), 148.83 (1C, C- 3_{ph}), 143.15 (2C, C- 2_{pyr} , C- 6_{pyr}), 142.73 (1C, C- $4'$), 140.98 (1C, C- $1''$), 137.60 (1C, C- $4''$), 135.11 (1C, C- $1'$), 131.86 (1C, C- 5_{ph}), 129.93 (2C, C- $2'$, C- $6'$), 129.10 (2C, C- $3''$, C- $5''$), 128.77 (2C, C- $3'$, C- $5'$), 128.08 (2C, C- $2''$, C- $6''$), 109.96 (1C, C- 6_{ph} o C- 4_{ph}), 109.17 (2C, C- 3_{pyr} , C- 5_{pyr}), 105.06 (1C, C- 6_{ph} o C- 4_{ph}), 99.99 (1C, C- 2_{ph}), 70.88 (1C, CH_2O), 61.50 (1C, CH_2N^+), 40.49 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}^+$: 410,2235; encontrado: 410,2232.

5.2.3.3.7.- Síntesis de Bromuro de 1-[4-(2-{4-[(3-aminofenoxi)metil]fenil}etil)bencil]-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-25).

Siguiendo el procedimiento 2 del punto 5.2.3.3. anteriormente descrito se obtiene un sirupo amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 72,02%.



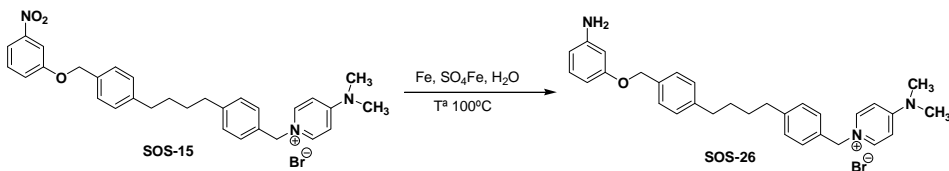
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.19 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.27 (m, 4H, H-3'', H-5'' y H-2', H-6'), 7.19 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.11 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 6.97 (m, 3H, H-5_{ph} y H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 6.39 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-2_{ph}), 6.33 (m, 2H, H-4_{ph}, H-6_{ph}), 5.31 (s, 2H, CH_2N^+), 4.93 (s, 2H, CH_2O), 3.21 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.89 (m, 4H, 2 CH_2).

$^{13}\text{C RMN}$ (126 MHz, CD_3OD): δ 159.18 (1C, C-1_{ph}), 155.70 (1C, C-4_{pyr}), 149.74 (1C, C-3_{ph}), 141.98 (1C, C-4'), 141.78 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 140.56 (1C, C-1''), 134.81 (1C, C-4''), 133.05 (1C, C-1'), 129.31 (1C, C-5_{ph}), 128.84 (2C, C-3', C-5'), 128.13 (2C, C-2'', C-6''), 127.79 (2C, C-2', C-6'), 127.39 (2C, C-3'', C-5''), 107.79 (2C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 106.87 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 102.05 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 100.16 (1C, C-2_{ph}), 68.41 (1C, $\text{CH}_2\text{-O}$), 59.04 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 39.35 (2C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 36.28 (2C, CH_2).

HRMS- m/z [$\text{M} - \text{Br}$] $^+$ calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}^+$: 438,2571; encontrado: 438,2545.

5.2.3.3.8.- Síntesis de Bromuro de 1-[4-(4-{4-[(3-aminofenoxi)metil]fenil}butil)bencil]-4-(dimetilamino)piridinio (SOS-26).

Siguiendo el procedimiento 2 del punto 5.2.3.3 anteriormente descrito se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 74,31%. P.f: 109-110°C.



$^1\text{H RMN}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.37 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.29 (m, 4H, H-3'', H-5'' y H-2', H-6'), 7.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.16 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.03 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 6.88 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.19 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-2_{ph}), 6.14 (td, $J = 7.9, 1.9$ Hz, 2H, H-4_{ph}, H-6_{ph}), 5.33 (s, 2H, CH_2N^+), 4.92 (s, 2H, CH_2O), 3.17 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.58 (m, 4H, 2 CH_2), 1.55 (m, 4H, 2 CH_2).

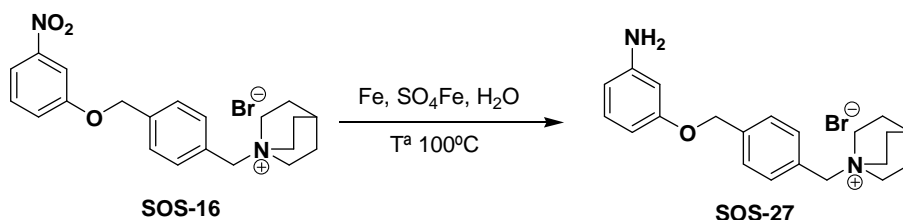
$^{13}\text{C RMN}$ (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 159.34 (1C, C-1_{ph}), 155.82 (1C, C-4_{pyr}), 149.87 (1C, C-3_{ph}), 142.83 (1C, C-4'), 141.90 (2C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 141.52 (1C, C-1''), 134.72 (1C, C-4''), 133.00 (1C, C-1'), 129.45 (1C, C-5_{ph}), 128.88 (2C, C-3', C-5'), 128.18 (2C, C-2'', C-6''), 127.89 (2C, C-2', C-6'),

127.56 (2C, C-3'', C-5''), 107.91 (2C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 106.96 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 102.16 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 100.26 (1C, C-2_{ph}), 68.57 (1C, CH₂-O), 59.19 (1C, CH₂-N⁺), 39.46 (2C, N(CH₃)₂), 34.52 (1C, CH₂), 34.48 (1C, CH₂), 30.45 (1C, CH₂), 30.40 (1C, CH₂).

HRMS-*m/z*[M- Br]⁺ calculado para C₃₁H₃₆N₃O⁺: 466,2858; encontrado: 466,2893.

5.2.3.3.9.- Síntesis de Bromuro de 1-[4-(3-aminofenoximetil)bencil]-1-quinuclidinio (SOS-27).

Siguiendo el procedimiento 2 del punto 5.2.3.3 anteriormente descrito se obtiene un sólido marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 61,60%. P.f: 188-190°C.



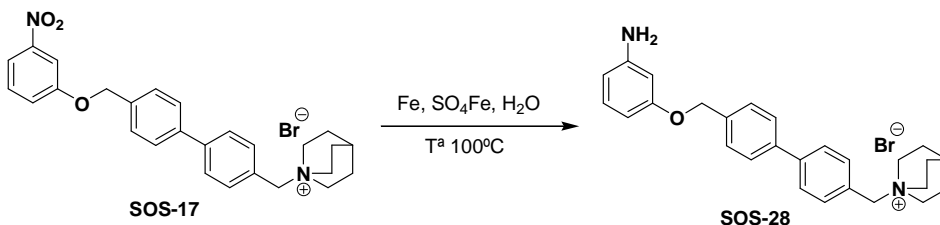
¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ 7.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.52 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.07 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.50 (s, 1H, H-2_{ph}), 6.49 – 6.43 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H, H-4_{ph}, H-6_{ph}), 5.11 (s, 2H, CH₂O), 4.39 (s, 2H, CH₂N⁺), 3.48 (m, 6H, H-2_q, H-6_q, H-7_q), 2.15 (m, 1H, H-4_q), 1.99 (m, 6H, H-3_q, H-5_q, H-8_q).

¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 159.98 (1C, C-1_{ph}), 146.14 (1C, C-3_{ph}), 140.66 (1C, C-4'), 133.14 (2C, C-2', C-6'), 129.89 (1C, C-5_{ph}), 127.96 (2C, C-3', C-5'), 126.71 (1C, C-1'), 109.81 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 106.26 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 103.48 (1C, C-2_{ph}), 68.89 (1C, CH₂-O), 67.51 (1C, CH₂-N⁺), 54.63 (3C, C-2_q, C-6_q, C-7_q), 23.78 (3C, C-3_q, C-5_q, C-8_q), 20.22 (1C, C-4_q).

HRMS-*m/z*[M- Br]⁺ calculado para C₂₁H₂₇N₂O⁺: 323,2123; encontrado: 323,2130.

5.2.3.3.10.- Síntesis de Bromuro de 1-[4''-(3-aminofenoximetil)bifenil-4-ilmetil]-1-quinuclidinio (SOS-28).

Siguiendo el procedimiento 2 del punto 5.2.3.3 anteriormente descrito se obtiene un sólido marrón identificado como el producto. Rendimiento: 61,60%. P.f: 159-161°C.



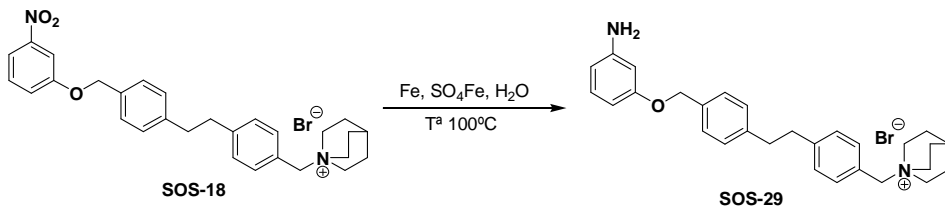
^1H RMN (500 MHz, CD_3OD): δ 7.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.67 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3'', H-5''), 7.60 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.53 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 7.00 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.43 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-2_{ph}), 6.40 – 6.32 (dt, $J = 9.45, 1.89$ Hz, 2H, H-4_{ph}, H-6_{ph}), 5.08 (s, 2H, CH_2O), 4.45 (s, 2H, CH_2N^+), 3.52 (m, 6H, H-2_{qr}, H-6_{qr}, H-7_q), 2.15 (m, 1H, H-4_q), 2.00 (m, 6H, H-3_q, H-5_q, H-8_q).

^{13}C RMN (126 MHz, CD_3OD): δ 159.78 (1C, C-1_{ph}), 148.39 (1C, C-3_{ph}), 142.88 (1C, C-4'), 139.02 (1C, C-1''), 137.67 (1C, C-4''), 133.29 (2C, C-2', C-6'), 129.45 (1C, C-5_{ph}), 127.70 (2C, C-3', C-5'), 127.25 (2C, C-2'', C-6''), 126.72 (2C, C-3'', C-5''), 126.00 (1C, C-1'), 108.46 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 104.59 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 102.11 (1C, C-2_{ph}), 68.95 (1C, $\text{CH}_2\text{-O}$), 67.24 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 54.38 (3C, C-2_{qr}, C-6_{qr}, C-7_q), 23.54 (3C, C-3_{qr}, C-5_q, C-8_q), 19.98 (1C, C-4_q).

HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}^+$: 399,2436; encontrado: 399,2419.

5.2.3.3.11.- Síntesis de Bromuro de 1-(4-{2-[4-(3-aminofenoximetil)fenil]etil}encil)-1-quinuclidinio (SOS-29).

Siguiendo el procedimiento 2 del punto 5.2.3.3 anteriormente descrito se obtiene un sirupo marrón que es identificado como el producto. Rendimiento: 74,26%.



^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 7.38 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.27 (m, 4H, H-3'', H-5'' y H-3', H-5'), 7.14 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H-2'', H-6''), 6.99 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-5_{ph}), 6.40 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-2_{ph}), 6.38 – 6.31 (m, 2H, H-4_{ph}, H-6_{ph}), 4.95 (s, 2H, CH_2O), 4.34 (s, 2H, CH_2N^+), 3.49 – 3.39 (m, 6H, H-2_{qr}, H-6_{qr}, H-7_q), 2.93 (m, 4H, 2 CH_2), 2.11 (m, 1H, H-4_q), 1.95 (m, 6H, H-3_q, H-5_q, H-8_q).

^{13}C RMN (126 MHz, CD_3OD): δ 159.86 (1C, C-1_{ph}), 148.59 (1C, C-3_{ph}), 144.39 (1C, C-4'), 140.72 (1C, C-1''), 135.24 (1C, C-4''), 132.68 (2C, C-2', C-6'), 129.44 (1C, C-5_{ph}), 129.10 (2C, C-3', C-5'), 128.28 (2C, C-2'', C-6''), 127.19 (2C, C-3'', C-5''), 124.58 (1C, C-1'), 108.26 (1C, C-6_{ph} o C-4_{ph}), 104.44 (1C, C-4_{ph} o C-6_{ph}), 102.00 (1C, C-2_{ph}), 69.26 (1C, $\text{CH}_2\text{-O}$), 67.32 (1C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 54.25 (3C, C-2_{qr}, C-6_{qr}, C-7_q), 37.06 (1C, CH_2), 36.81 (1C, CH_2), 23.53 (3C, C-3_{qr}, C-5_q, C-8_q), 19.99 (1C, C-4_q).

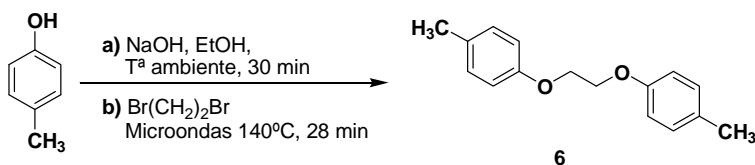
HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}^+$: 427,2749; encontrado: 427,2749.

5.3. Síntesis química de la Familia B.

5.3.1. Síntesis del espaciador de la Familia B.

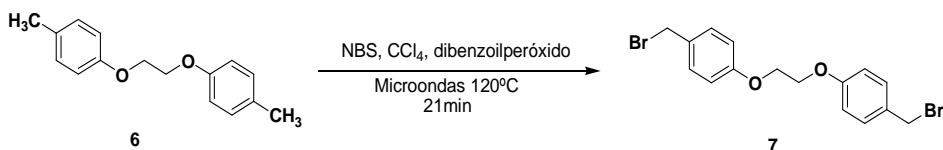
Procedimiento:

Paso 1: A una solución de 0,4 g de NaOH en 5 ml de EtOH se le añade 1 g de *p*-cresol y se mantiene en agitación y a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado este tiempo se añaden 0,4 ml de Br₂(CH₂)₂ y se lleva al microondas durante 28 minutos a una temperatura de 140°C. Posteriormente se le añaden 25 ml de H₂O destilada, se filtra el producto precipitado, se lava con H₂O (2 x 2 ml) y EtOH (1 x 2 ml) y se seca a vacío, obteniéndose de esta manera un sólido blanco cristalino que es identificado como 1,2-bis(*p*-metilfenoxi)etano (**6**) con un rendimiento del 35%.



¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) : δ 7.10-7.08 (d, *J* = 8.61 Hz, 4H, H-3,5 e H-3',5'), 6.86-6.84 (d, *J* = 8.44 Hz, 4H, H-2,6 e H-2',6'), 4.28 (s, 4H, CH₂), 2.29 (s, 6H, CH₃).

Paso 2: Se añaden 100 mg (25 mmoles) del producto procedente de la reacción anterior (**6**), 9,07 mg de NBS (51 mmoles), 3 ml de CCl₄ y 0,5 mg de dibenzoilperóxido (2mmoles) bajo atmósfera inerte de argón^{6,7}. La reacción se realiza en microondas a una temperatura de 120°C durante 21 minutos. Pasado este tiempo se filtra, se lava con éter etílico (2 x 2 ml) y se seca a vacío. Se obtiene de esta manera un sólido amarillo identificado como 1,2-bis(*p*-bromometilfenoxi)etano (**7**) con un rendimiento del 65%.

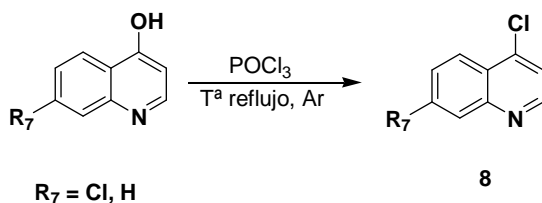


¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) : δ 7.35-7.32 (d, *J* = 8.73 Hz, 4H, H-3,5 y H-3',5') ; 6.92-6.88 (d, *J* = 8.73 Hz, 4H, H-2,6 y H-2',6') ; 4.50 (s, 4H, CH₂-Br) ; 4,32 (s, 4H, CH₂-O).

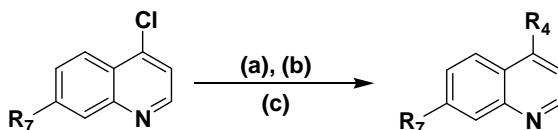
5.3.2. Síntesis de las cabezas catiónicas de la Familia B.

En esta memoria han sido empleadas 10 cabezas catiónicas, de las cuales, la 4-pirrolidinopiridina (**9**), la dimetilaminopiridina (**10**), la quinclidina (**11**) y 3-hidroxiquinclidina (**12**) son asequibles comercialmente. Para el grupo de las quinolinas, la ruta sintética seguida ya ha sido descrita anteriormente⁸ y por tanto no se entrará en detalle. Ésta se divide en dos pasos.

Paso 1:



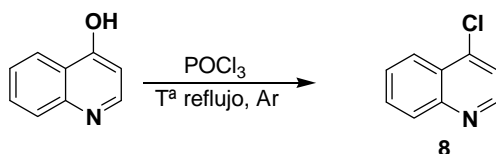
Paso2:



- (a) Perhidroazepina/reflujo/argón (compuesto **13**, R_4 = perhidroazepino; R_7 = H)
- (b) $R_4\text{MeNH/AcOH}$ glacial/reflujo (compuestos **14**, **15**, **16** y **17**, R_4 = N-metilanilino y 4-cloro-N-metilanilino; R_7 = H, Cl; respectivamente).
- (c) $R_4\text{NH/AcOH}$ glacial/reflujo (compuesto **18** y **19**, R_4 = pirrolidina, perhidroazepino ; R_7 = Cl).

5.3.2.1.- Síntesis de la 4-cloroquinolina (8).

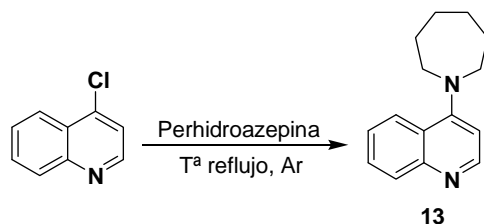
Siguiendo el paso 1 del procedimiento 5.3.2 anteriormente descrito se obtiene un producto siruposo marrón que se identifica como el producto. Rendimiento: 81,6%.



$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.82-8.80 (d, $J = 4.82$ Hz, 1H), 8.29-8.25 (dd, $J = 8.4, 1.4$ Hz, 1H), 8.24-8.21 (dd, $J = 8.5, 0.6$ Hz, 1H), 7.85-7.80 (dt, $J = 8.5, 1.5$ Hz, 1H), 7.72-7.67 (dt, $J = 8.3, 1.2$ Hz, 1H), 7.56-7.54 (d, $J = 4.81$ Hz, 1H).

5.3.2.2.- Síntesis de la 4-perhidroazepinoquinolina (13).

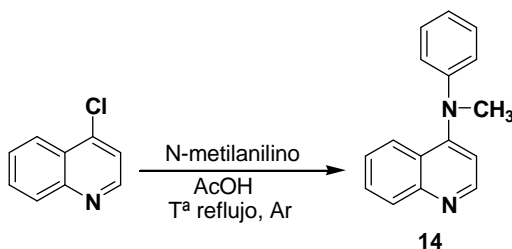
Siguiendo el paso 2 del procedimiento 5.3.2. anteriormente descrito se obtiene un sirupo amarillo identificado como el producto. Rendimiento: 85%.



$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.47-8.45 (d, $J = 6.13$ Hz, 1H), 8.27-8.24 (dd, $J = 8.5, 0.9$ Hz, 1H), 8.11-8.07 (dd, $J = 8.6, 1.2$ Hz, 1H), 7.71-7.65 (dt, $J = 6.9, 1.3$ Hz, 1H), 7.47-7.42 (dt, 6.9, 1.3 Hz, 1H), 6.76-6.74 (d, $J = 6.15$ Hz, 1H), 3.73-3.69 (m, 4H), 1.98 (m, 4H), 1.77-1.73 (m, 4H).

5.3.2.3.- Síntesis de la 4-N-metilaniolinoquinolina (14).

Siguiendo el paso 2 del procedimiento 5.3.2. anteriormente descrito se obtiene un sirupo amarillo identificado como el producto. Rendimiento: 93%.

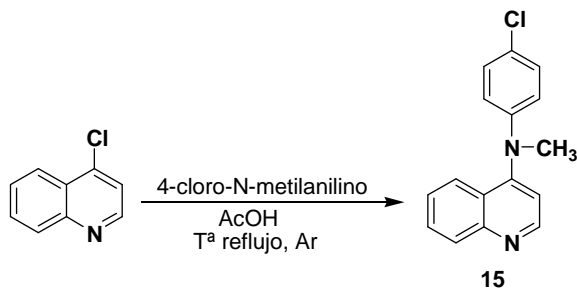


$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8.73-8.71 (d, $J = 5.74$ Hz, 1H), 8.31-8.29 (d, $J = 8.42$ Hz, 1H), 7.67-7.63 (t, $J = 7.69$ Hz, 1H), 7.52-7.50 (d, $J = 8.71$ Hz, 1H), 7.36-7.32 (t, $J = 7.63$ Hz, 2H), 7.28-7.24

(m, 1H), 7.19-7.15 (m, 1H), 7.08-7.07 (d, $J = 5,72$ Hz, 1H), 7.03-7.01 (d, $J = 8,27$ Hz, 2H), 3.58 (s, 3H, CH₃).

5.3.2.4.- Síntesis de la 4-(4-cloro-N-metilanilino)quinolina (15).

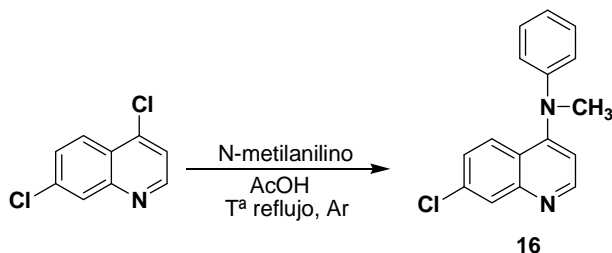
Siguiendo el paso 2 del procedimiento 5.3.2. anteriormente descrito se obtiene un sirupo amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 91%.



¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.73-8.72 (d, $J = 5,87$ Hz, 1H), 8.40-8.38 (d, $J = 8,38$ Hz, 1H), 7.72-7.68 (m, 1H), 7.50-7.48 (d, $J = 8,43$ Hz, 1H), 7.40-7.38 (d, $J = 8,55$ Hz, 1H), 7.34-7.30 (m, 2H), 7.14-7.09 (dd, $J = 7,09$ Hz, 2H), 6.99-6.96 (d, $J = 8,73$ Hz, 1H), 3.59 (s, 3H, CH₃).

5.3.2.5.- Síntesis de la 7-cloro-4-(N-metilanilino)quinolina (16).

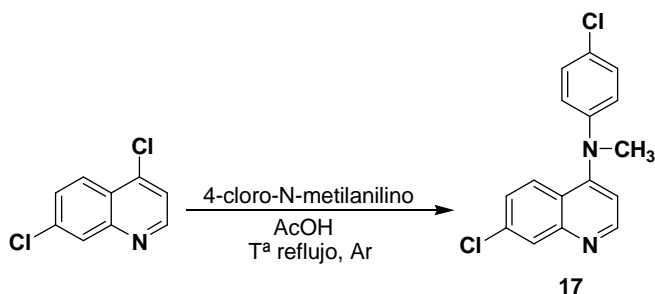
Siguiendo el paso 2 del procedimiento 5.3.2. anteriormente descrito se obtiene un sirupo anaranjado que se identifica como el producto. Rendimiento: 75%.



¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.65-8.63 (d, $J = 6,15$ Hz, 1H), 8.39 (m, 1H), 7.41-7.39 (m, 2H), 7.35-7.30 (m, 2H), 7.20-7.18 (d, $J = 7,98$ Hz, 1H), 7.16-7.13 (dd, $J = 9,2, 2,1$ Hz, 1H), 7.10-7.08 (d, $J = 7,75$ Hz, 1H), 7.04-7.02 (d, $J = 6,20$ Hz, 1H), 3.63 (s, 3H, CH₃).

5.3.2.6.- Síntesis de la 7-cloro-4-(4-cloro-N-metilanilino)quinolina (17).

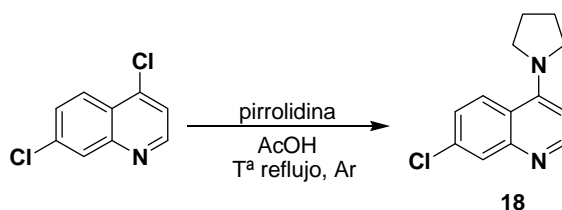
Siguiendo el paso 2 del procedimiento 5.3.2. anteriormente descrito se obtiene un sirupo anaranjado que se identifica como el producto. Rendimiento: 84%.



¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.77-8.75 (d, *J* = 5.60 Hz, 1H), 8.24-8.23 (d, *J* = 2.07 Hz, 1H), 7.46-7.44 (d, *J* = 9.15 Hz, 1H), 7.40-7.38 (d, *J* = 8.50 Hz, 1H), 7.29-7.27 (dd, *J* = 6.7, 2.1 Hz, 2H), 7.09-7.08 (d, *J* = 5.61 Hz, 1H), 6.93-6.90 (d, *J* = 8.83 Hz, 2H), 3.53 (s, 3H, CH₃).

5.3.2.7.- Síntesis de la 7-cloro-4-(pirrolidino)quinolina (18).

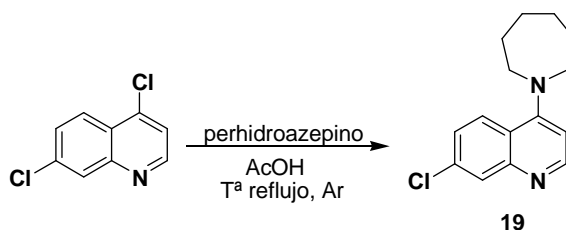
Siguiendo el paso 2 del procedimiento 5.3.2. descrito anteriormente se obtiene un sirupo amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 85%.



¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.35-8.33 (d, *J* = 6.16 Hz, 1H), 8.20-8.17 (d, *J* = 9.25 Hz, 1H), 8.14-8.13 (d, *J* = 2.24 Hz, 1H), 7.34-7.30 (dd, *J* = 9.2, 2.3 Hz, 1H), 6.46-6.44 (d, *J* = 6.17 Hz, 1H), 3.80-3.76 (m, 4H, CH₂), 2.14-2.09 (m, 4H, CH₂).

5.3.2.8.- Síntesis de la 7-cloro-4-(perhidroazepina)quinolina (19).

Siguiendo el paso 2 del procedimiento 5.3.2. descrito anteriormente se obtiene un sirupo amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 81%.



¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.48-8.46 (d, *J* = 5.97 Hz, 1H), 8.18-8.17 (d, *J* = 2.19 Hz, 1H), 8.03-8.00 (d, *J* = 9.17 Hz, 1H), 7.39-7.35 (dd, *J* = 9.2, 2.2 Hz, 1H), 6.75-6.73 (d, *J* = 5.99 Hz, 1H), 3.68-3.65 (m, 4H, CH₂), 2.01-1.93 (m, 4H, CH₂), 1.77-1.73 (m, 4H, CH₂).

5.3.3. Síntesis de productos finales biscatiónicos (Familia B).

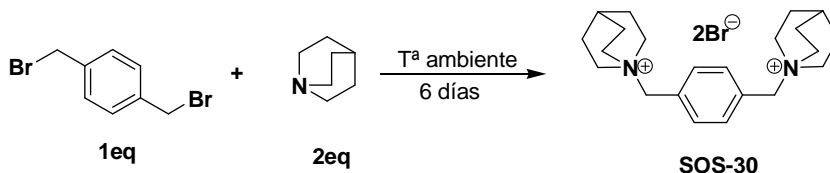
5.3.3.1. Síntesis de productos finales biscatiónicos pertenecientes a la Subfamilia B₁ (Familia B).

Procedimiento:

A una solución de 30 ml de butanona se le añaden 2 equivalentes de quinuclidina y 1 equivalente del correspondiente espaciador (**1**, **2**, **3** y **4**). La mezcla se mantiene en agitación y a temperatura ambiente durante 6 días. Pasado este tiempo aparece un precipitado blanco, el cual, se filtra y lava con butanona.

5.3.3.1.1.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[1,4-fenilenodi(metileno)]bis-1-azabicyclo[2.2.2]octano (SOS-30).

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3.1 y partiendo del espaciador comercial α,α' -p-dibromoxileno (**1**), se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 30%. P.f: >300°C.



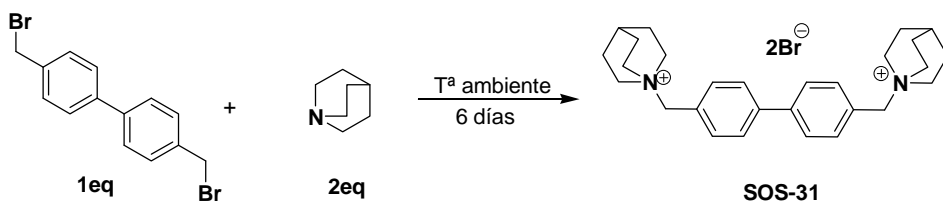
¹H RMN (400 MHz, DMSO): δ 7.66 (s, 4H, H-2, H-3, H-5, H-6), 4.52 (s, 4H, ⁺N-CH₂), 3.49 (m, 12H, H-2_{qr}, H-6_{qr}, H-7_{qr}), 2.09 (dt, $J = 6.1, 3.0$ Hz, 2H, H-4_{qr}), 1.90 (m, 12H, H-3_{qr}, H-5_{qr}, H-8_{qr}).

¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 142.87 (4C, C-2, C-3, C-5, C-6), 138.96 (2C, C-1, C-4), 74.99 (2C, CH₂-N⁺), 63.22 (6C, C-2_{qr}, C-6_{qr}, C-7_{qr}), 32.82 (6C, C-3_{qr}, C-5_{qr}, C-8_{qr}), 28.94 (2C, C-4_{qr}).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para C₂₂H₃₄N₂Br⁺: 405.1905; encontrada: 405.1909.

5.3.3.1.2.- Síntesis de dibromuro de 1,1'- 1,1'-[bifenil-4,4'-diildi(metileno)]bis-1-azabicyclo[2.2.2]octano (SOS-31).

Según el procedimiento anteriormente descrito en el apartado 5.3.3.1 y partiendo del espaciador 4,4'-bis(bromometil)bifenilo (**2**) se obtiene un sólido blanco que es identificado como el producto. Rendimiento: 94%. P.f: 299-300 °C.



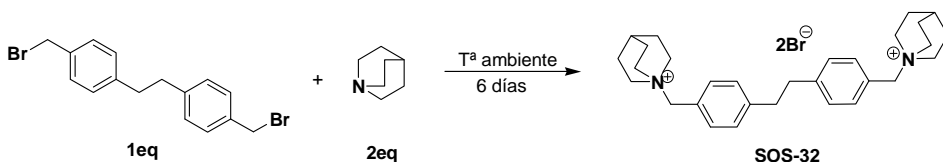
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 7.86 (d, $J = 8.34$ Hz, 4H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 7.68 (d, $J = 8.34$ Hz, 4H, H-3, H-5 y H-3', H-5'), 4.49 (s, 4H, CH_2), 3.56 (m, 12H, H-2_q, H-6_q, H-7_q), 2.20 (dt, $J = 6.4, 3.2$ Hz, 2H, H-4_q), 2.04 (m, 12H, H-3_q, H-5_q, H-8_q).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 144.16 (2C, C-1, C-1'), 135.77 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 129.76 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 129.13 (2C, C-4, C-4'), 69.39 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 56.71 (6C, C-2_q, C-6_q, C-7_q), 25.82 (6C, C-3_q, C-5_q, C-8_q), 22.25 (2C, C-4_q).

HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{Br}^+$: 481.2218; encontrada: 481.2216.

5.3.3.1.3.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(4,1-fenilenometileno)]bis-1-azabicyclo [2.2.2]octano (SOS-32).

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3.1 se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 40,4 %. P.f: 299-300°C.



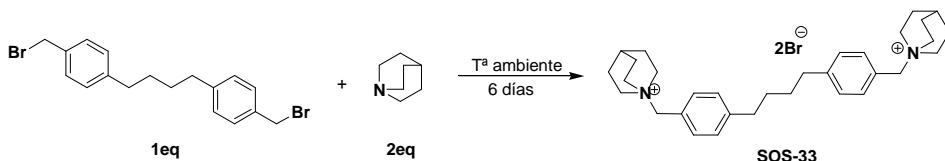
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 7.46 (m, 8H, H-3, H-5 y H-3', H-5', H-2, H-6 y H-2', H-6'), 4.44 (s, 4H, $^+\text{N-CH}_2$), 3.43 (m, 12H, H-2_q, H-6_q, H-7_q), 2.98 (s, 4H, CH_2), 2.08 (m, 2H, H-4_q), 1.89 (m, 12H, H-3_q, H-5_q, H-8_q).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, DMSO-d_6): δ 143.96 (2C, C-1, C-1'), 133.45 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 129.34 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 125.77 (2C, C-4, C-4'), 66.49 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 54.09 (6C, C-2_q, C-6_q, C-7_q), 36.87 (2C, CH_2), 23.8 (6C, C-3_q, C-5_q, C-8_q), 20.00 (2C, C-4_q).

HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{Br}^+$: 509.2531; encontrada: 509.2516.

5.3.3.1.4.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[butano-1,4-diilbis(4,1-fenilenometileno)]bis-1-azabicyclo[2.2.2]octano (SOS-33).

Siguiendo el procedimiento 5.3.3.1 descrito anteriormente se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 82 %. P.f: 279-281°C.



^1H RMN (400 MHz, CD_3OD): δ 7.44 (d, $J = 7.93$ Hz, 4H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 7.36 (d, $J = 7.93$ Hz, 4H, H-3, H-5 y H-3', H-5'), 4.38 (s, 4H, $^+\text{N-CH}_2$), 3.49 (m, 12H, H-2_q, H-6_q, H-7_q), 2.74 (m, 4H, $\text{CH}_{2\text{B}}$), 2.17 (dd, $J = 6.8, 3.6$ Hz, 2H, H-4_q), 2.01 (m, 12H, H-3_q, H-5_q, H-8_q), 1.72 (m, 4H, $\text{CH}_{2\text{A}}$).

^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 147.62 (2C, C-1, C-1'), 135.01 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 131.22 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 126.72 (2C, C-4, C-4'), 69.70 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 56.55 (6C, C-2_q, C-6_q, C-7_q); 37.25 (2C, $\text{CH}_{2\text{B}}$), 32.89 (2C, $\text{CH}_{2\text{A}}$), 25.80 (6C, C-3_q, C-5_q, C-8_q), 22.27 (2C, C-4_q).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{Br}^+$: 537.2844; encontrada: 537.2842.

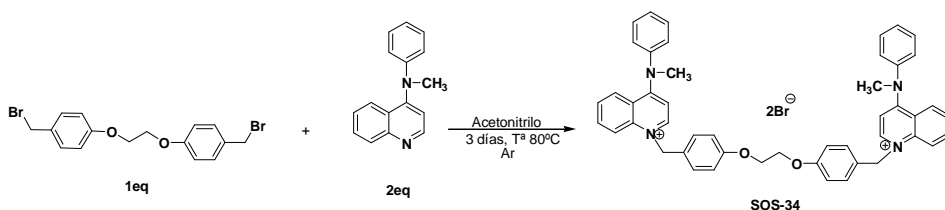
5.3.3.2. Síntesis de productos finales biscatiónicos pertenecientes a la Subfamilia B₂ y Subfamilia B₃ (Familia B).

Procedimiento:

A una solución de 1 eq de 1,2-bis(*p*-bromometilfenoxi)etano (**7**) en acetonitrilo anhidro se le añade, gota a gota, otra solución de 2 eq de la cabeza catiónica correspondiente en acetonitrilo anhidro. La reacción se realiza durante 3 días a una temperatura de 80°C bajo atmósfera inerte de argón. Pasado este tiempo se enfría la reacción en un baño de hielo y se le añade éter etílico hasta la formación de un precipitado, el cual se filtra y lava con éter etílico y hexano y posteriormente se seca a vacío⁹.

5.3.3.2.1.- Síntesis de dibromuro de 4-[metil(fenil)amino]-1-(4-{2-[4-({4-[metil(fenil)amino]-5,8-dihidroquinolino-1-il)metil)fenoxi]etoxi}bencil)quinolinio (SOS-34).

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3.2 y utilizando como cabeza catiónica la 4-(*N*-metilanilina)quinolina, se obtiene un sólido amarillo que es identificado como el producto. Rendimiento: 64%. P.f: 169-170°C.



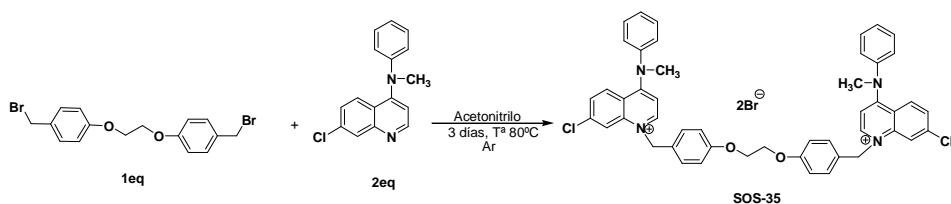
^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 8.86 (d, $J = 7.44$ Hz, 2H, H-2_{quin}), 8.13 (d, $J = 8.37$ Hz, 2H, H-8_{quin}), 7.81 (dt, $J = 5.57, 1.43$ Hz, 2H, H-7_{quin}), 7.62 (dd, $J = 8.8, 1.3$ Hz, 2H, H-5_{quin}), 7.53 (m, 4H, H-2_{ph}, H-6_{ph}), 7.46 (t, $J = 7.36$ Hz, 2H, H-6_{quin}), 7.40-7.29 (m, 12H, H-3_{quin}, H-3_{ph}, H-5_{ph}, H-3, H-5 y H-3', H-5', H-4_{ph}), 7.03 (d, $J = 8.76$ Hz, 4H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 5.89 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 4.33 (s, 4H, CH_2), 3.84 (s, 6H, CH_3).

^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 161.47 (2C, C-1, C-1'), 160.80 (2C, C-4_{quin}), 150.14 (2C, C-1_{ph}), 148.54 (2C, C-2_{quin}), 141.68 (2C, C-8_{aquin}), 135.51 (2C, C-7_{quin}), 132.75 (4C, C-2_{ph}, C-6_{ph}), 130.63 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 130.28 (2C, C-4_{ph}), 130.15 (2C, C-8_{quin}), 128.64 (2C, C-4, C-4'), 127.85 (2C, C-6_{quin}), 127.73 (4C, C-3_{ph}, C-5_{ph}), 122.29 (2C, C-4_{aquin}), 120.97 (2C, C-5_{quin}), 117.30 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 107.73 (2C, C-3_{quin}), 68.85 (2C, CH_2), 59.94 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 46.75 (2C, CH_3).

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para $\text{C}_{48}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_2\text{Br}^+$: 787.2648; encontrada: 787.2639.

5.3.3.2.2.- Síntesis de dibromuro de 7-cloro-1-(4-{2-[4-{{7-cloro-4-[metil(fenil)amino]-5,8-dihidroquinolino-1-il}metil)fenoxi]etoxi}bencil)-4-[metil(fenil)amino]quinolinio (SOS-35).

Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3.2, usando como cabeza catiónica la 7-cloro-4(N-metilnilina)quinolina. El crudo resultante se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1). Se obtiene un sólido verde que se identifica como el producto. Rendimiento: 61%. P.f: 181-183°C.



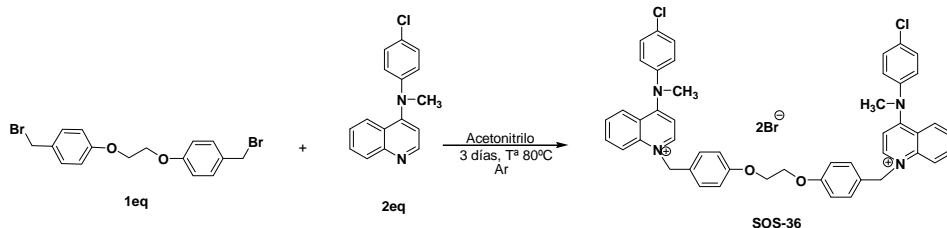
^1H RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 8.82 (d, $J = 7.50$ Hz, 2H, H-2_{quin}), 8.15 (d, $J = 1.89$ Hz, 2H, H-8_{quin}), 7.56-7.53 (m, 6H, H-2_{ph}, H-6_{ph} y H-5_{quin}), 7.47 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-6_{quin}), 7.41-7.40 (d, $J = 7.48$ Hz, 4H, H-3_{ph}, H-5_{ph}), 7.34-7.31 (m, 6H, H-3, H-5, H-3', H-5' y H-3_{quin}), 7.29 (dd, $J = 9.3, 1.9$ Hz, 2H, H-4_{ph}), 7.06-7.03 (d, $J = 8.70$ Hz, 4H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 5.85 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 4.34 (s, 4H, CH_2), 3.82 (s, 6H, CH_3).

^{13}C RMN (75 MHz, CD_3OD): δ 161.58 (2C, C-1, C-1'), 160.51 (2C, C-4_{quin}), 149.76 (2C, C-1_{ph}), 148.95 (2C, C-2_{quin}), 142.51 (2C, C-8_{aquin}), 141.90 (2C, C-7_{quin}), 132.92 (4C, C-2_{ph}, C-6_{ph}), 131.80 (2C, C-5_{quin}), 130.77 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 130.59 (2C, C-6_{quin}), 128.35 (2C, C-4_{ph}), 128.24 (2C, C-4, C-4'), 127.72 (4C, C-3_{ph}, C-5_{ph}), 120.68 (2C, C-4_{aquin}), 120.45 (2C, C-8_{quin}), 117.41 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 107.93 (2C, C-3_{quin}), 68.86 (2C, CH_2), 59.91 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 46.87 (2C, CH_3).

HRMS-m/z[M- Br]⁺ calculado para $\text{C}_{48}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}_2\text{Br}^+$: 855.1868; encontrada: 855.1863.

5.3.3.2.3.- Síntesis de dibromuro de 4-[(4-clorofenil)(metil)amino]-1-(4-{2-[4-({4-[(4-clorofenil)(metil)amino]-5,8-dihidroquinolino-1-il)metil]fenoxi}etoxi)bencil)quinolinio (SOS-36).

Siguiendo el procedimiento 5.3.3.2 anteriormente descrito y utilizando como cabeza catiónica la 4-(4-cloro-N-metilnilina)quinolina, se obtiene un sólido amarillo que es identificado como el producto. Rendimiento: 70%. P.f: 178-180°C.



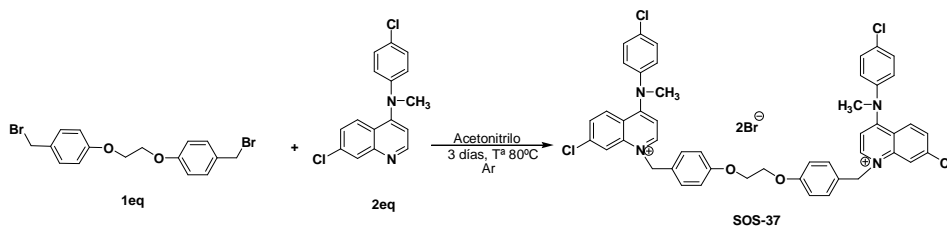
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.90 (d, $J = 7.40$ Hz, 2H, H-2_{quin}), 8.16 (dd, $J = 8.9$, 0.6 Hz, 2H, H-8_{quin}), 7.84 (dt, $J = 5.64$, 1.36 Hz, 2H, H-7_{quin}), 7.67 (dd, $J = 8.8$, 1.2 Hz, 2H, H-5_{quin}), 7.52 (d, $J = 8.91$ Hz, 4H, H-2_{ph}, H-6_{ph}), 7.41-7.37 (m, 8H, H-3_{ph}, H-5_{ph}, H-6_{quin}, H-3_{quin}), 7.33 (d, $J = 8.77$ Hz, 4H, H-3, H-5 y H-3', H-5'), 7.03 (d, $J = 8.77$ Hz, 4H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 5.91 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 4.33 (s, 4H, CH_2), 3.82 (s, 6H, CH_3).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 161.48 (2C, C-1, C-1'), 160.92 (2C, C-4_{quin}), 148.81 (2C, C-1_{ph}), 148.77 (2C, C-2_{quin}), 141.68 (2C, C-8_{aquin}), 135.68 (2C, C-7_{quin}), 135.58 (2C, C-4_{ph}), 132.72 (4C, C-2_{ph}, C-6_{ph}), 130.69 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 130.00 (2C, C-8_{quin}), 129.28 (4C, C-3_{ph}, C-5_{ph}), 128.52 (2C, C-4, C-4'), 128.20 (2C, C-6_{quin}), 122.41 (2C, C-4_{aquin}), 121.13 (2C, C-5_{quin}), 117.30 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 108.36 (2C, C-3_{quin}), 68.84 (2C, CH_2), 60.09 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 46.53 (2C, CH_3).

HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{48}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}_2\text{Br}^+$: 855.1868; encontrada: 855.1880.

5.3.3.2.4.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilnometileno)]bis[7-cloro-4-[(4-clorofenil)(metil)amino]quinolinio} (SOS-37).

Se sigue el procedimiento 5.3.3.2 anteriormente descrito, usando como cabeza catiónica la 7-cloro-4-(4-cloro-N-metilnilina)quinolina. El crudo resultante se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente CH_2Cl_2 :MeOH (9:1). Se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 39%. P.f: 185-186°C.



$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.87 (d, $J = 7.46$ Hz, 2H, H-2_{quin}), 8.20 (d, $J = 1.93$ Hz, 2H, H-8_{quin}), 7.63 (d, $J = 9.31$ Hz, 2H, H-5_{quin}), 7.55 (d, $J = 8.78$ Hz, 4H, H-2_{ph}, H-6_{ph}), 7.42 (d, $J = 8.78$ Hz, 4H, H-3_{ph}, H-5_{ph}), 7.40 (d, $J = 1.96$ Hz, 2H, H-6_{quin}), 7.38 (d, $J = 7.47$ Hz, 2H, H-3_{quin}), 7.35 (d, $J = 8.73$

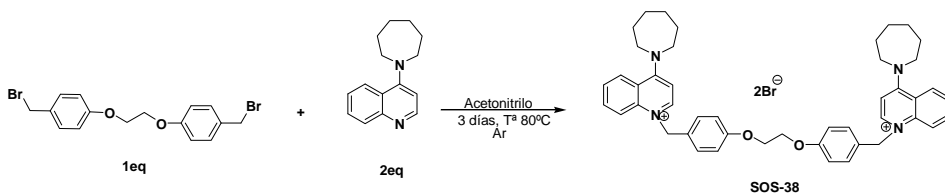
Hz, 4H, H-3, H-5 y H-3', H-5'), 7.06 (d, $J = 8.73$ Hz, 4H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 5.88 (s, 4H, CH₂-N⁺), 4.35 (s, 4H, CH₂), 3.82 (s, 6H, CH₃).

¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 161.59 (2C, C-1, C-1'), 160.65 (2C, C-4_{quin}), 149.22 (2C, C-2_{quin}), 148.45 (2C, C-1_{ph}), 142.50 (2C, C-8_{aquin}), 142.06 (2C, C-7_{quin}), 135.92 (2C, C-4_{ph}), 132.88 (4C, C-2_{ph}, C-6_{ph}), 131.68 (2C, C-5_{quin}), 130.85 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 129.33 (4C, C-3_{ph}, C-5_{ph}), 128.71 (2C, C-6_{quin}), 128.15 (2C, C-4, C-4'), 120.82 (2C, C-4_{aquin}), 120.61 (2C, C-8_{quin}), 117.40 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 108.57 (2C, C-3_{quin}), 68.85 (2C, CH₂), 60.05 (2C, CH₂-N⁺), 46.69 (2C, CH₃).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para C₄₈H₄₀N₄O₂Cl₄Br⁺: 923.1089; encontrada: 923.1082.

5.3.3.2.5.- Síntesis de dibromuro de 4-azepan-1-il-1-[4-(2-{4-[(4-azepan-1-il-5,8-dihidroquinolino-1-il)metil]fenoxi}etoxi)encil]quinolinio (SOS-38).

Seguendo el procedimiento 5.3.3.2 anteriormente descrito y utilizando como cabeza catiónica la 4-perhidroazepinoquinolina, se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 67%. P.f: 75-77°C.



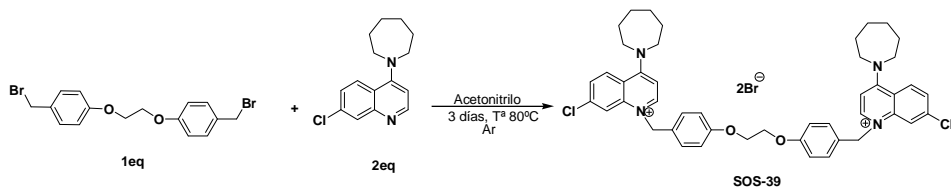
¹H RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 8.54 (d, $J = 7.73$ Hz, 2H, H-2_{quin}), 8.42 (dd, $J = 8.62, 1.28$ Hz, 2H, H-8_{quin}), 8.05 (dd, $J = 8.83, 1.05$ Hz, 2H, H-5_{quin}), 7.90 (dt, $J = 5.67, 1.33$ Hz, 2H, H-7_{quin}), 7.66 (dt, $J = 5.77, 1.15$ Hz, 2H, H-6_{quin}), 7.27 (d, $J = 8.80$ Hz, 4H, H-3, H-5 y H-3', H-5'), 7.10 (d, $J = 7.74$ Hz, 2H, H-3_{quin}), 7.00 (d, $J = 8.80$ Hz, 4H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 5.74 (s, 4H, CH₂-N⁺), 4.30 (s, 4H, CH₂), 4.09 (m, 8H, H-2_{az}, H-7_{az}), 2.09 (m, 8H, H-3_{az}, H-6_{az}), 1.75 (dt, $J = 5.40, 2.54$ Hz, 8H, H-4_{az}, H-5_{az}).

¹³C RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 161.91 (2C, C-4_{quin}), 161.34 (2C, C-1, C-1'), 146.48 (2C, C-2_{quin}), 142.10 (2C, C-8_{aquin}), 135.52 (2C, C-7_{quin}), 130.48 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 130.44 (2C, C-8_{quin}), 128.98 (2C, C-4, C-4'), 127.04 (2C, C-6_{quin}), 121.41 (2C, C-4_{aquin}), 120.33 (2C, C-5_{quin}), 117.22 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 104.55 (2C, C-3_{quin}), 68.84 (2C, CH₂), 58.99 (2C, CH₂-N⁺), 56.06 (4C, C-2_{az}, C-7_{az}), 29.37 (4C, C-3_{az}, C-6_{az}), 29.23 (4C, C-4_{az}, C-5_{az}).

HRMS-m/z[M-Br]⁺ calculado para C₄₆H₅₂N₄O₂Br⁺: 771.3274; encontrada: 771.3282.

5.3.3.2.6.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis(4-azepan-1-il-7-cloroquinolinio) (SOS-39).

Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3.2, utilizando como cabeza catiónica la 7-cloro-4-(perhidroazepino)quinolina. El crudo resultante se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente CH₂Cl₂:MeOH (8:2). Se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 41%. P.f: 87-88°C.



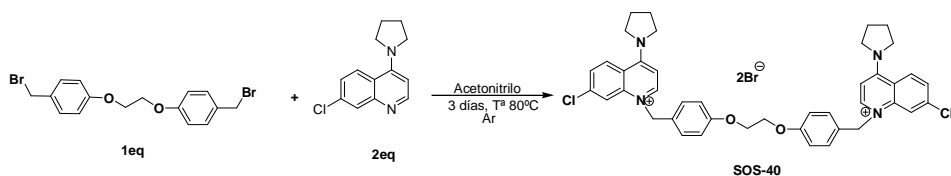
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.51 (d, $J = 7.75$ Hz, 2H, H-2_{quin}), 8.40 (d, $J = 9.21$ Hz, 2H, H-8_{quin}), 8.07 (d, $J = 1.82$ Hz, 2H, H-5_{quin}), 7.65 (dd, $J = 9.2, 1.9$ Hz, 2H, H-6_{quin}), 7.29 (d, $J = 8.64$ Hz, 4H, H-3, H-5 y H-3', H-5'), 7.11 (d, $J = 7.78$ Hz, 2H, H-3_{quin}), 7.03 (d, $J = 8.64$ Hz, 4H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 5.72 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 4.33 (s, 4H, CH_2), 4.08 (m, 8H, H-2_{az}, H-7_{az}), 2.08 (m, 8H, H-3_{az}, H-6_{az}), 1.74 (m, 8H, H-4_{az}, H-5_{az}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 161.56 (2C, C-4_{quin}), 161.44 (2C, C-1, C-1'), 146.77 (2C, C-2_{quin}), 142.95 (2C, C-8_{aquin}), 141.82 (2C, C-7_{quin}), 132.31 (2C, C-8_{quin}), 130.59 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 128.57 (2C, C-4, C-4'), 127.45 (2C, C-6_{quin}), 119.88 (2C, C-4_{aquin}), 119.78 (2C, C-5_{quin}), 117.32 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 105.00 (2C, C-3_{quin}), 68.85 (2C, CH_2), 59.00 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 56.12 (4C, C-2_{az}, C-7_{az}), 29.28 (4C, C-3_{az}, C-6_{az}), 29.16 (4C, C-4_{az}, C-5_{az}).

HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}_2\text{Br}^+$: 839.2494; encontrada: 839.2494.

5.3.3.2.7.- Síntesis del dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis(7-cloro-4-pirrolidino-1-il-quinolinio) (SOS-40).

Se sigue el procedimiento 5.3.3.2 anteriormente descrito, utilizando como cabeza catiónica la 7-cloro-4-(pirrolidino)quinolina. El crudo resultante se purifica mediante cromatografía flash de gel de sílice usando como eluyente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9:1). Se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 48%. P.f: 118-120°C.



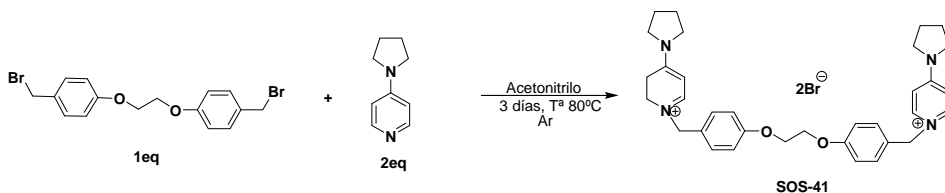
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.63 (d, $J = 9.23$ Hz, 2H, H-2_{quin}), 8.51 (d, $J = 7.69$ Hz, 2H, H-8_{quin}), 8.04 (d, $J = 2.02$ Hz, 2H, H-5_{quin}), 7.66 (dd, $J = 9.2, 2.0$ Hz, 2H, H-6_{quin}), 7.27 (d, $J = 8.75$ Hz, 4H, H-3, H-5 y H-3', H-5'), 7.01 (d, $J = 8.75$ Hz, 4H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 6.90 (d, $J = 7.69$ Hz, 2H, H-3_{quin}), 5.71 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 4.32 (s, 4H, CH_2), 4.02 (m, 8H, H-2_{pirr}, H-5_{pirr}), 2.20 (m, 8H, H-3_{pirr}, H-4_{pirr}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 161.37 (2C, C-4_{quin}), 157.92 (2C, C-1, C-1'), 146.91 (2C, C-2_{quin}), 142.45 (2C, C-8_{aquin}), 141.76 (2C, C-7_{quin}), 131.76 (2C, C-8_{quin}), 130.45 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 128.68 (2C, C-4, C-4'), 127.71 (2C, C-6_{quin}), 120.16 (2C, C-4_{aquin}), 119.73 (2C, C-5_{quin}), 117.29 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 104.64 (2C, C-3_{quin}), 68.83 (2C, CH_2), 59.06 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 55.43 (4C, C-2_{pirr}, C-5_{pirr}), 24.64 (4C, C-3_{pirr}, C-4_{pirr}).

HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}_2\text{Br}^+$: 783.1868; encontrada: 783.1874.

5.3.3.2.8.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilometileno)]bis(4-pirrolidin-1-il-piridinio) (SOS-41).

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3.2 anteriormente descrito y utilizando como cabeza catiónica la 4-pirrolidinapiridina, se obtiene un sólido marrón que es identificado como el producto. Rendimiento: 48%. P.f: 128-130°C.



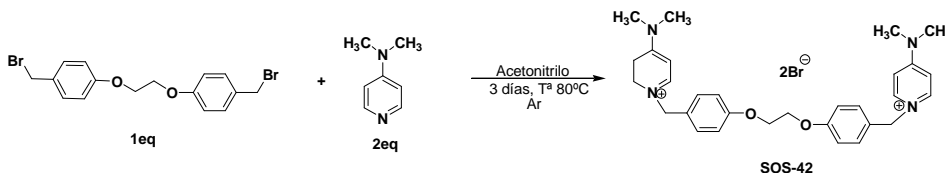
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.17 (d, $J = 7.77$ Hz, 4H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.34 (d, $J = 8.73$ Hz, 4H, H-3, H-5 y H-3', H-5'), 7.01 (d, $J = 8.73$ Hz, 4H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 6.84 (d, $J = 7.77$ Hz, 4H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 5.28 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 4.32 (s, 4H, CH_2), 3.54 (t, $J = 6.84$ Hz, 8H, H-2_{pirr}, H-5_{pirr}), 2.11 (t, $J = 6.86$ Hz, 8H, H-3_{pirr}, H-4_{pirr}).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 161.79 (2C, C-1, C-1'), 156.05 (2C, C-4_{pyr}), 143.68 (4C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 131.92 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 129.31 (2C, C-4, C-4'), 117.29 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 110.51 (4C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 68.86 (2C, CH_2), 62.26 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 50.28 (4C, C-2_{pirr}, C-5_{pirr}), 26.98 (4C, C-3_{pirr}, C-4_{pirr}).

HRMS- m/z [M-Br]⁺ calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_2\text{Br}^+$: 615.2335; encontrada: 615.2333.

5.3.3.2.9.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilometileno)]bis[4-(dimetilamino)piridinio] (SOS-42).

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3.2 y usando como cabeza catiónica la 4-dimetilaminopiridina, se obtiene un sólido amarillo que se identifica como el producto. Rendimiento: 42%. P.f: 62-63°C.



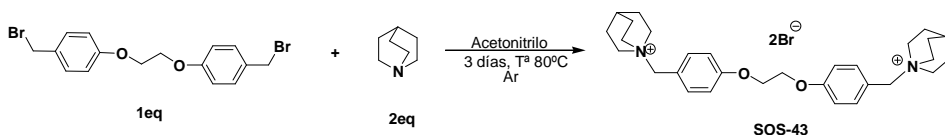
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 8.20 (d, $J = 7.86$ Hz, 4H, H-2_{pyr}, H-6_{pyr}), 7.35 (d, $J = 8.73$ Hz, 4H, H-3, H-5 y H-3', H-5'), 7.02 (d, $J = 8.73$ Hz, 4H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 6.99 (d, $J = 7.86$ Hz, 4H, H-3_{pyr}, H-5_{pyr}), 5.30 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 4.33 (s, 4H, CH_2), 3.24 (s, 12H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 161.80 (2C, C-1, C-1'), 158.87 (2C, C-4_{pyr}), 143.76 (4C, C-2_{pyr}, C-6_{pyr}), 131.98 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 129.20 (2C, C-4, C-4'), 117.30 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 109.93 (4C, C-3_{pyr}, C-5_{pyr}), 68.86 (2C, CH_2), 62.22 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 41.20 (4C, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

HRMS- m/z [M-Br]⁺ calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_2\text{Br}^+$: 563.2022; encontrada: 563.2015.

5.3.3.2.10.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis-1-azabicyclo[2,2,2]octano (SOS-43).

Siguiendo el procedimiento 5.3.3.2 descrito anteriormente y utilizando como cabeza catiónica la quinuclidina, se obtiene un sólido blanco que es identificado como el producto. Rendimiento: 56%. P.f > 300°C.



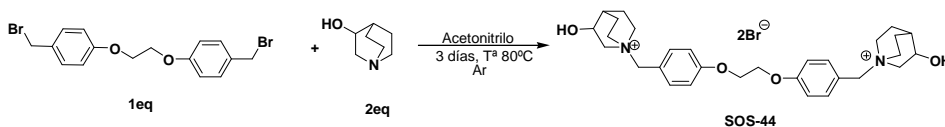
$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, CD_3OD): δ 7.47 (d, $J = 8.78$ Hz, 4H, H-3, H-5 y H-3', H-5'), 7.13 (d, $J = 8.78$ Hz, 4H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 4.43 (s, 4H, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 4.35 (s, 4H, CH_2), 3.48 (m, 12H, H-2_q, H-6_q, H-7_q), 2.18 (dt, $J = 6.44, 3.23$ Hz, 2H, H-4_q), 2.01 (dt, $J = 8.23, 3.23$ Hz, 12H, H-3_q, H-5_q, H-8_q).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, CD_3OD): δ 162.80 (2C, C-1, C-1'), 136.48 (4C, C-3, C-5 y C-3', C-5'), 121.54 (2C, C-4, C-4'), 117.14 (4C, C-2, C-6 y C-2', C-6'), 69.52 (2C, CH_2), 68.87 (2C, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 56.39 (6C, C-2_q, C-6_q, C-7_q), 25.81 (6C, C-3_q, C-5_q, C-8_q), 22.33 (2C, C-4_q).

HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}^+$: 541.2430; encontrada: 541.2426.

5.3.3.2.11.- Síntesis de dibromuro de (SS/RR y RS) 1,1'-[etano-1,2-diilbis(oxi-4,1-fenilenometileno)]bis(3-hidroxi-1-azabicyclo[2,2,2]octano) (SOS-44).

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 5.3.3.2 y usando como cabeza catiónica la 3-hidroxiquinuclidina, se obtiene un sólido blanco que se identifica como el producto. Rendimiento: 63%. P.f: 268-270°C.



$^1\text{H RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 7.48 (d, $J = 8.66$ Hz, 8H, H-3, H-5 y H-3', H-5'), 7.13 (d, $J = 8.66$ Hz, 8H, H-2, H-6 y H-2', H-6'), 4.43 (s, 8H, $\text{CH}_2\text{-N}^+$), 4.41 (s, 8H, CH_2), 4.08, 3.64, 3.35, 3.04, 2.27, 2.10 (52H, 3-hidroxiquinuclidinio).

$^{13}\text{C RMN}$ (75 MHz, DMSO-d_6): δ 159.52 x 2 (C-1, C-1'), 134.43 x 2 (C-3, C-5, C-3', C-5'), 119.63 x 2 (C-4, C-4'), 114.77 x 2 (C-2, C-6, C-2', C-6'), 65.61 x 2 (CH_2), 62.26 x 2 ($\text{CH}_2\text{-N}^+$), 66.37, 63.27, 53.46, 52.52, 26.83, 20.87, 17.29 (3-hidroxiquinuclidinio).

HRMS- m/z [M-Br] $^+$ calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_4\text{Br}^+$: 573.2328; encontrada: 573.2330.

5.4.- Ensayos biológicos de los compuestos sintetizados.

Material y métodos.

5.4.1.- Cultivo celular.

La línea celular de hepatoma humano HepG2, designada con la referencia HB-8065 en la ATCC (American Type Of Culture Collection), ha sido adquirida a través de la ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures). Esta línea celular requiere para su cultivo medio mínimo esencial Eagle (MEM), conteniendo un 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor durante 60°C una hora, y suplementado con L-glutamina 2 mM, un 1% de aminoácidos no esenciales y antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml). El pH del medio de cultivo se regula mediante los sistemas tampón NaHCO₃ 25 mM y Hepes 10 mM, ajustado dentro del intervalo 7,2-7,4.

Las células se siembran en placas de Petri y/o Falcons con su superficie tratada para una adecuada adhesión celular, y se incuban a 37°C en una estufa termostatazada con una atmósfera humidificada de 95% aire: 5% CO₂. El cambio de medio de cultivo se ha realizado en condiciones estériles empleando una cámara de flujo laminar. Tras eliminar el medio, la monocapa celular se lava dos veces con una solución salina isotónica de fosfatos (PBS) pH 7,4 a 37°C para la retirada de los productos de desecho y restos celulares en suspensión. A continuación se añade el medio nuevo precalentado a 37°C. El medio de cultivo es rutinariamente reemplazado cada dos días por medio fresco, manteniéndose de esta forma las células en unas óptimas condiciones de aporte de nutrientes, hasta que requieren un subcultivo o bien son utilizadas en un ensayo.

El subcultivo de las células se realiza mediante tripsinización, de modo que las células son despegadas de la superficie de la placa de cultivo y sembradas en nuevas placas. Este procedimiento se lleva a cabo cuando las células han alcanzado una confluencia cercana al 90%. El proceso de tripsinización se realiza en condiciones estériles, con una solución de tripsina al 0,25% (w/v) conteniendo EDTA al 0,02% (w/v). Para conseguir una velocidad de crecimiento adecuada, las células HepG2 requieren ser cultivadas a una dilución 1:10, sembrándolas a una densidad inicial de 5×10^4 células/cm².

5.4.2.- Ensayos de inhibición de la proliferación celular.

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (10.000 células por pocillo) y se mantuvieron en MEM con FBS 10% durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco, y las células fueron incubadas en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de inhibidores de colina quinasa. El efecto antiproliferativo de los distintos compuestos 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 μ l 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.

5.4.3.- Preparación de la fracción citosólica.

El citosol se obtuvo tal como describe Jiménez-López et al. (2002) con ligeras modificaciones. Las células HepG2 se sembraron en placas de 6 pocillos y se mantuvieron en medio MEM con FBS 10% hasta confluencia. Entonces, las células se rasparon en Tris 275 mM (pH 8.5) frío. La suspensión celular se sonicó a 50 W durante 3 seg en un baño de hielo, con un microtip de titanio. El homogeneizado celular se centrifugó a inmediatamente a 12000 rpm durante 5 min, obteniéndose una fracción particulada y el sobrenadante citosólico. El sobrenadante citosólico se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso¹⁰.

5.4.4.- Ensayos de inhibición de la actividad colina quinasa (Chok) *ex vivo*.

La actividad colina quinasa (CK) ha sido ensayada en la fracción citosólica determinando la velocidad de incorporación de [metil-¹⁴C]colina a colina fosfato.

El medio de reacción contiene aproximadamente 50 μ g de proteína citosólica, 10 mM MgCl₂, 10 mM ATP y tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8.5). Tras preincubar a 37°C durante 5 min, la reacción enzimática se inicia mediante la adición de 1 mM [metil-¹⁴C]colina (3594 dpm/nmol), siendo el volumen final de reacción de 55 μ l. Incubamos durante 20 min a la misma temperatura, y la reacción se detiene por inmersión de los tubos en un baño de agua a 100°C durante 3 min. El precipitado proteico se elimina mediante centrifugación a 12 000 g durante 3 min. La colina, sustrato de la reacción, se separa cromatográficamente de la colina fosfato sintetizada mediante una cromatografía en capa fina utilizando placas de silicagel sobre cristal 5 x 10 cm del tipo 60 A con capa preadsorbente, con objeto de comprimir la muestra en una línea horizontal estrecha (LK6D Silica G 60A; WVR). Para ello, 25 μ l del sobrenadante de la reacción se aplica en el origen de placas de silicagel en la presencia de colina fosfato (0.1 mg) y colina (0.1 mg) como portadores y empleando como líquido de desarrollo la mezcla metanol/NaCl 0.6 %/NH₄OH 28 % en agua (50:50:5, v/v/v). Tras la correspondiente separación cromatográfica, las placas se dejaron secar al aire, revelándose mediante exposición a iodo sublimado. La colina fosfato fue identificada mediante el uso de un patrón que se desarrolló simultáneamente con las muestras. Las bandas correspondientes a colina fosfato se rasparon y transfirieron a viales de centelleo, donde se les añadió 3 ml de líquido de centelleo líquido (Cocktail Biogreen 3, Sharlab). Los viales se agitaron vigorosamente y se dispusieron en un contador de centelleo líquido (Beckman 6000-TA), determinándose el contenido de ¹⁴C de cada

una de las muestras. La cuantificación de la incorporación de radiactividad a colina fosfato se ha efectuado utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Incorporación de radiactividad} = \text{dpm} / \text{AE} \cdot \text{C}$$

representando, dpm: desintegraciones por min de la muestra problema; AE: actividad específica del sustrato en el medio de incubación, expresada como dpm/pmol; C: cantidad de proteínas de la muestra de partida, expresada en mg. La incorporación de radiactividad fue expresada en pmol/mg proteína.

Para estudiar el efecto de los diferentes inhibidores sobre la actividad CK, el ensayo se efectuó de la forma indicada anteriormente pero añadiendo una cantidad adecuada del inhibidor al medio de preincubación para conseguir la concentración final deseada. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición de cada compuesto sobre la actividad enzimática respecto al control.

La IC₅₀ se determinó calculando la concentración inhibitoria media de los compuestos, concentración a la cual el compuesto inhibe el 50% de la actividad colina quinasa, utilizando el software ED50plus v1.0.

Cuantificación de proteínas

Los resultados experimentales han sido referidos a la cantidad de proteína celular. La cuantificación de proteínas se ha realizado mediante el método de Bradford (1976), empleando como patrón BSA 1 mg/ml. Los valores de concentración de proteína se expresaron en mg/ml¹¹.

Bibliografía

1. H. A. Staab; M. Haenel. 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.
2. D. J. Cram; H. Steinberg. Macro rings. I. Preparation and spectra of the paracyclophanes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 5691-5704.
3. J. M. Campos; M. C. Núñez; R. M. Sánchez; J. A. Gómez-Vidal; A. Rodríguez-González; M. Báñez; M. A. Gallo; J. C. Lacal; A. Espinosa. Quantitative structure-activity relationships for a series of symmetrical bisquaternary anticancer compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, 10, 2215-2231.
4. Díaz-Gavilán, M.; Rodríguez-Serrano, F.; Gómez-Vidal, J. A.; Marchal, J. A.; Aránega, A.; Gallo, M. A.; Espinosa, A.; Campos, J. M. Synthesis of tetrahydrobenzoxapine acetals with electron-withdrawing groups on the nitrogen atom. Novel scaffolds endowed with anticancer activity against breast cancer cells. *Tetrahedron*, **2004**, 60, 11547-11557.
5. Luisa C. López Cara; M. Encarnación Camacho; M. Dora Carrión; Víctor Tapias; Miguel A. Gallo; Germaine Escames; Darío Acuña-Castroviejo; A. Espinosa; A. Entrena. Phenylpyrrole derivatives as neutral and inducible nitric oxide synthase (nNOS and iNos) inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 44, 2655-2666.
6. X. Xiao et al. Binuclear titanocenes linked by the bridge combination of rigid and flexible segment: Synthesis and their use as catalysts for ethylene polymerization. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **2007**, 267, 86-91.
7. John McMurry ; Química orgánica, **2008**, 7° edición, pág. 655.
8. Sánchez Martín, R. M. Nuevos antitumorales específicos frente a células transformadas por el oncogén *ras*, con estructura bisquinolínica, dirigidos a la colina quinasa. *Tesis Doctoral*. **2002**.
9. Rosario Sánchez-Martín; Joaquín M. Campos; Ana Conejo-García; Olga Cruz-López; Mónica Báñez-Coronel; Agustín Rodríguez-González; Miguel A. Gallo; Juan C. Lacal;

- Antonio Espinosa. Symmetrical Bis-Quinolinium Compounds: New Human Choline Kinase Inhibitors with Antiproliferative Activity against the HT-29 Cell Line. *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, 48, 3354-3363.
10. Jiménez-López, J.M.; Carrasco, M.P.; Segovia, J.L.; Marco, C. Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of HepG2 cells. *Eur. J. Biochem.*, **2002**, 269, 4649-4655.
11. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **1976**, 72, 248-254.

SUMMARY

Antecedents

Cancer is a group of diseases characterized by the excessive and uncontrolled growth of cells that invade and damage tissues and organs, eventually causing the death of the individual¹. In industrialized countries, it is considered the leading cause of death after cardiovascular disease, but it is intended to be the first².

Cancer treatment is in the need of selective drugs that can interfere specifically with signalling pathways affected during the carcinogenic process. Identification of new potential molecular targets is the key event in the design of new anticancer strategies. The relevance of deregulation of choline kinase (ChoK) in oncogene-driven cell transformation has been previously demonstrated³⁻⁷.

Choline kinase (ChoK) is a cytosolic enzyme present in various tissues, which catalyzes the phosphorylation of choline to form phosphorylcholine (PCho) in the presence of ATP and magnesium. ChoK is important for the generation of two major membrane phospholipids, phosphatidylcholine (PC) and sphingomyelin (SM) and subsequently for the cell division. ChoK plays a vital role in cell signaling pathways and regulation of cell growth along with PCho involved in malignant transformation through *ras* oncogenes in different cancers such as breast, lung, colon, prostate, neuroblastoma, hepatic lymphomas, meningiomas and diverse murine tumours. The Ras effectors serine/threonine kinase (Raf-1), the Ral-GDP dissociation stimulator (Ral-GDS) and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) are involved in the activation of ChoK during tumorigenesis⁸.

It is well reported that in mammalian cells, the three known isoforms of ChoK (ChoK- α 1, ChoK- α 2, and ChoK- β) are encoded by two separate genes: *ChoK- α* and *ChoK- β* . The two functional isoforms of ChoK- α , ChoK α 1 and ChoK α 2, are the result of alternative splicing of the ChoK- α transcript. None of the isoforms are active as monomers and the active enzyme consists of homo- or heterodimers⁹. ChoK α 1 differs from ChoK α 2 in only an extra stretch of 18 amino acids, while ChoK β differs from ChoK α 1 and ChoK α 2 in approximately 40% of amino acids.

ChoK α and its product (PCho) have been implicated in malignant transformation. This hypothesis is supported by a number of observations. First, *ras*-, *raf*-, *src*- and increased PCho levels compared to the parental cells from which they were originated as a consequence of an increase in ChoK activity¹⁰. An increase in both ChoK α protein levels and activity was also confirmed in different human tumour-derived cell lines and human tumour biopsies¹¹. Furthermore, a clear association between ChoK α expression and activity, and a more malignant phenotype and worse prognosis, has been established in human breast and lung tumours¹². In addition, ChoK activity has been related to the regulation of cell proliferation in both normal breast cells, and tumor-derived cell lines from breast cancers¹³.

On the other hand, recently has been reported that Choline kinase overexpression increases invasiveness and drug resistance of human breast cancer cells¹⁴. All these evidences indicate that ChoK α participates in the regulation of cell proliferation and its function is deregulated during carcinogenesis.

The consideration of ChoK as a novel target for the development of new anticancer drugs is justified. The obtained ChoK inhibitors it was based in structural modifications of hemicholinium-3 (HC-3). Moreover It was be demonstrated that the inhibition of this enzyme by a selective inhibitor is rather specific to this enzyme with no effect on a variety of oncogene-activated signalling pathways involved in the regulation of cell proliferation. Nontransformed cells were able to resume cell proliferation after removal of the drug, while transformed cells were irreversibly affected¹⁵. In normal cells, blockage of de novo phosphorylcholine (PCho) synthesis by inhibition of ChoK promotes the dephosphorylation of pRb, resulting in a reversible cell cycle arrest at G0/G1phase. In contrast, ChoK inhibition in tumor cells renders cells unable to arrest in G0/G1as manifested by a lack of pRb dephosphorylation. Furthermore, tumor cells specifically suffer a drastic wobble in the metabolism of main membrane lipids PC and sphingomyelin (SM). This lipid disruption results in the enlargement of the intracellular levels of ceramides. As a consequence, normal cells remain unaffected, but tumor cells are promoted to apoptosis¹⁶.

On the other hand, Malaria is a major global threat that results in more than 2 million deaths each year caused by parasites of the genus *Plasmodium*. The treatment of malaria is becoming extremely difficult due to the emergence of drug-resistant parasites, the absence of an effective vaccine, and the spread of insecticide-resistant vectors. Thus, malarial therapy needs new chemotherapeutic approaches leading to the search for new drug targets¹⁷.

High levels of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) in *Plasmodium*-infected cells have been observed. Genetic and pharmacological data confirm that the biosynthesis pathways of novo both phospholipids are essential for the survival of the parasite¹⁸.

The intracellular Kennedy pathway is the route of synthesis of new PC in the *Plasmodium* and it has been proposed as a therapeutic target for the development of new antimalarial drugs, in order to reduce and combat the drug-resistance. In particular, the ChoK enzyme has been proposed as therapeutic target since intervenes in the Kennedy pathway of the *Plasmodium* with a regulatory activity in the biosynthesis of PC.

The PfCK gene, unlike the human choline kinase, exists as a single copy in the *Plasmodium* genome and therefore leads to the absence of the isoforms present in the ChoK¹⁸.

Various mono- and biscuaternary compounds with aliphatic chains are able to inhibit the growth of *Plasmodium* *in vitro* and *in vivo*¹⁹. Although the mechanism of action of these is not yet entirely clear, recent studies have suggested the capacity, by these molecules, attack at Kennedy pathway via the enzymatic passages²⁰.

These results indicate that inhibition of ChoK is a rather specific strategy for the cytotoxic treatment of transformed cells and open the doors for the development of new drugs against the *Plasmodium* infected cells, justifying the research of new and better rational antitumoral and antimalarial drug design.

Aims

The previously mentioned antecedents indicate that the selective inhibition of choline kinase (ChoK) could lead to the development of new antitumor drugs with minimized adverse effects that are present in other chemotherapy agents.

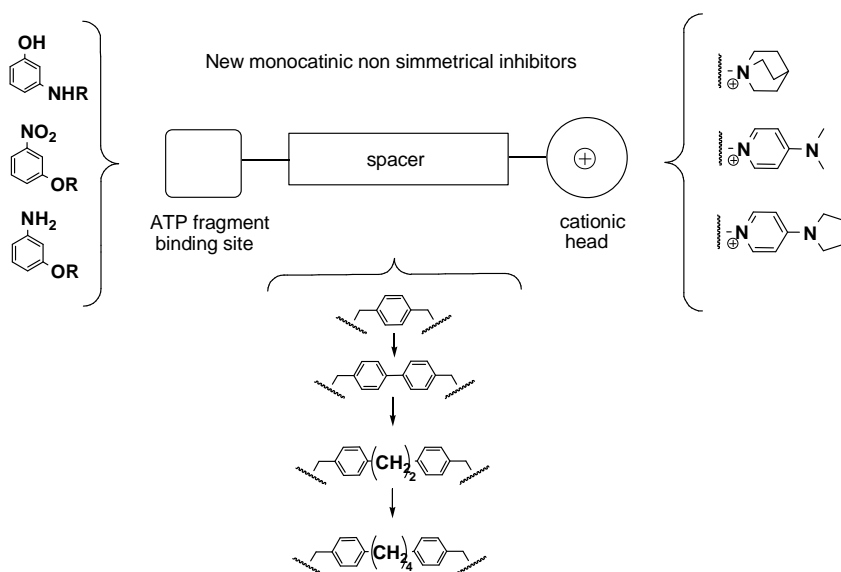
Our research group have developed several series of compounds that can act as choline kinase inhibitors and as antiproliferative agents, justifying the correlation between both types of biological activities. These series of compounds show a biscationic, cyclophanic or bicyclophanic structures, which include different linkers and cationic heads.

Docking studies performed with some of these compounds in a homology model of human choline kinase and the recent crystallization of this enzyme indicate that the inhibitors could be inserted simultaneously in both ATP and Cho binding sites.

Since the nature of both binding sites is different, the design, synthesis and analysis of new monocationic non-symmetrical inhibitors were considered. However, new biscationic structures have also been synthesized to study the influence of new linkers on the biological activity.

The objectives of this Thesis are:

Objective 1.- The design and synthesis of new monocationic non-symmetric inhibitors (**SOS-1** to **SOS-29**) with the following structure:



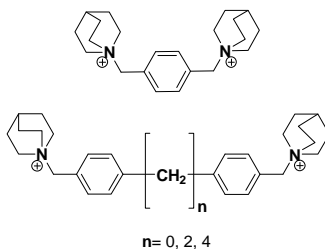
Objective 1a.- Study of the influence of some functional groups present in the fragment that can be inserted into the ATP binding site on the biological activity of these new inhibitors.

Objective 1b.- Study of the influence of various cationic heads on the inhibition of ChoK.

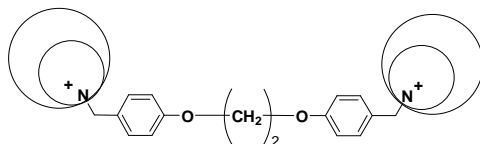
Objective 1c.- Study of the influence of different aryl alkyl linkers.

Objective 2.- Continuing the research line developed by our research group, and in order to further deep in the influence of both the cationic head and the polarity of the molecule, the desing and synthesis of new compounds with biscationic structure have been performed.

Objective 2a.- Introduction of a quinuclidine moiety as a cationic head and various aryl alkyl linkers (**SOS-30 to 33**).



Objective 2b.- Introduction of two oxygen atoms in the linker, in order to see the influence of these groups on the antiproliferative and inhibitory activity of ChoK, using various cationic heads previously synthesized by our group in similar compounds (**SOS- 34 to 44**).



Objective 3.- Unambiguous identification of all synthesized compounds by means of nuclear magnetic resonance techniques (1H -RMN, ^{13}C , HMBC y HSQC) and mass spectrometry.

Objective 4.- Study of the ChoK inhibition activity of these new inhibitors.

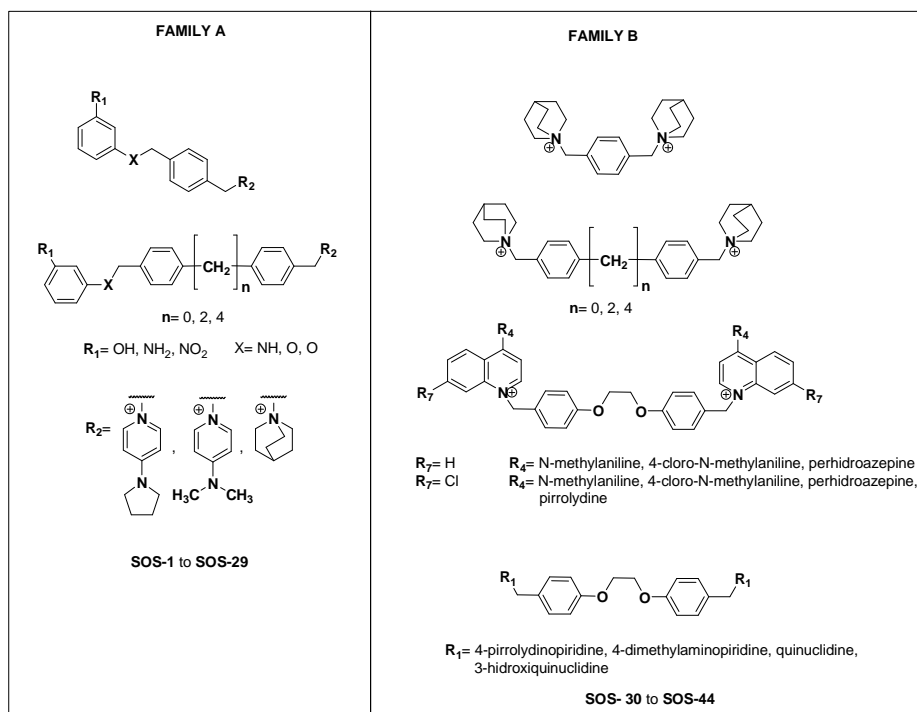
Objective 5.- Study of the antiproliferative activity of the new designed and synthesized ChoK inhibitors.

Objective 6.- Study of the antimalarial activity of the designed and synthesized compounds.

Objective 7.- Molecular modelling techniques will be use in order to perform theoretical study of the viability or impracticality of various synthesized inhibitors.

Designed and Synthesized compounds

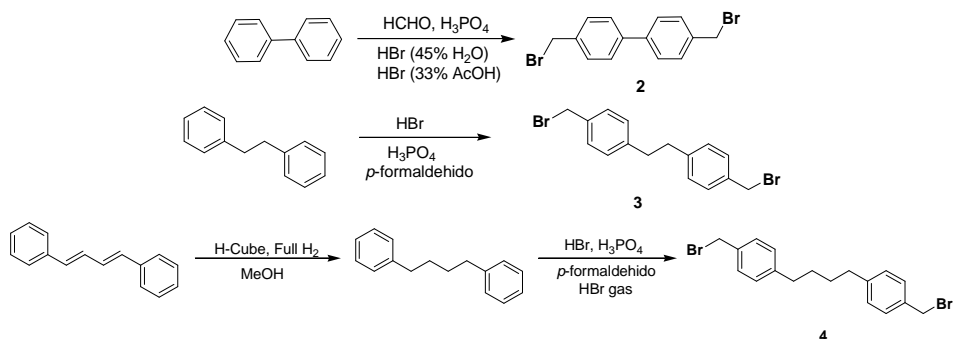
Forty-three compounds have been designed, synthesized and characterized in this Thesis. Among them, twenty-nine are non-symmetrical monocationics bromide salts (**Family A**) and fifteen are symmetrical biscationics bromide salts (**Family B**), with different semirigid linkers (Scheme 1).



Scheme 1.- Families of compounds designed a synthesized.

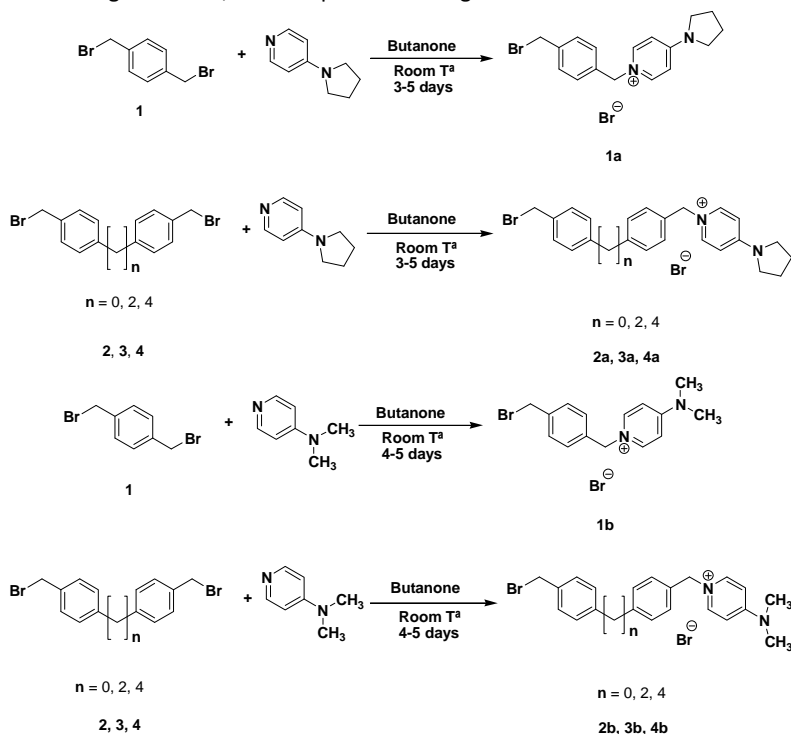
Chemistry-Family A

The general procedure used in the syntheses of the final monocationics non-symmetric compounds (**Family A**) are performed by means of three different steps. The first step (Scheme 2) is the bromomethylation of the four different linkers used in the synthesis (benzene, biphenyl, 1,2-diphenylethane or 1,4-diphenylbutane), in order to obtain the intermediates **1-4**. 1,4-Bis(bromomethyl)benzene **1** is commercially available, and was not synthesized. Reaction of biphenyl or 1,2-diphenylethane with formaldehyde and hydrogen bromide in the presence of H₃PO₄ yields 4,4'-bis(bromomethyl)biphenyl **2**²¹ and 1,2-bis[(bromomethyl)phenyl]ethane **3**²², respectively. Finally, 1,4-diphenylbutane was prepared by hydrogenation, using the Full-H₂ conditions of the H-Cube hydrogenator, of *trans,trans*-1,4-diphenyl-1,3-butadiene, in presence of MeOH, and was bisbromomethylated following the previous mentioned conditions to yield the intermediated 1,4-bis[4-(bromomethyl)phenyl]butane **4**²².

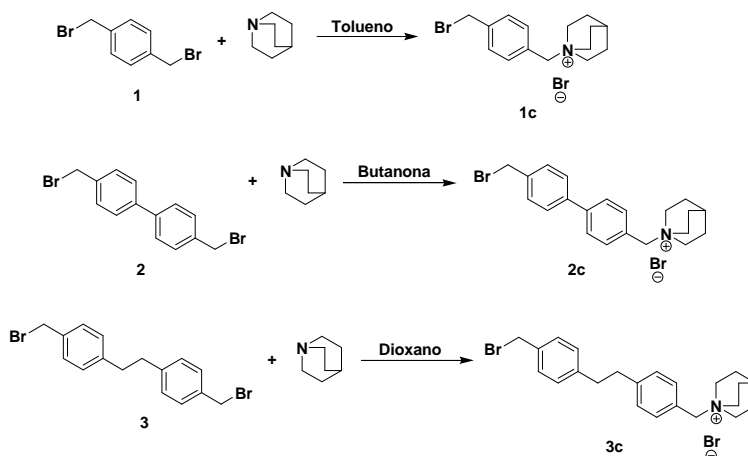


Scheme 2.- Bromomethylation of the four different Linkers used in the síntesis.

In the second step, different conditions have been used depending on the intermediate compounds that will be obtained. The pyrimidine derivatives intermediates **1a-4a** and **1b-4b** (Scheme 3) were obtained by reaction of the bisbromomethylated linkers **1-4** with pyrrolidinopyridine or dimethylaminepyridine (2:1 equivalent relationships). This reaction was performed in butanone at room temperature during 3 days, and intermediates **1a-4a** and **1b-4b** were isolated as a white precipitate which was filtered and washed with butanone, ethyl acetate and diethyl ether to obtain the product as white solid. The derivatives of quinuclidine intermediates (Scheme 4) **1c-3c** were obtained using different solvents depending on the intermediates compounds that will be obtained. Compound **1c** was obtained using toluene, compound **2c** using butanone, and compound **3c** using dioxane as solvent.



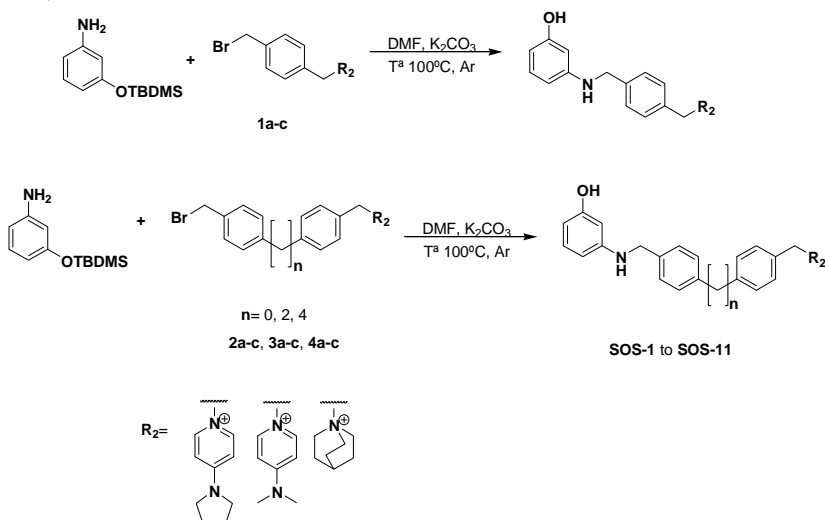
Scheme 3.- Synthesis of the intermediates derivatives of pyrimidine.



Scheme 4.- Synthesis of the intermediates derivatives of quinuclidine.

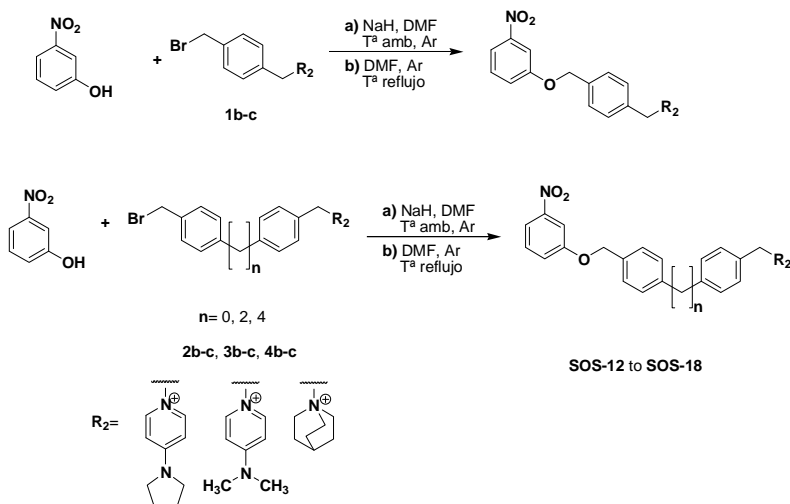
The third step allows the insertion of the *m*-aminophenol fragment in the other extreme of the bisbromomethylated linker. Different conditions have been used depending on the final compound that would be obtained.

In the synthesis of compounds of **Subfamily A₁**, the hydroxyl group of the 3-aminophenol is firstly protected, in order to avoid the reaction through the OH group, by treatment with TBDMSCl, TEA and DMAP, in CH₂Cl₂ at room temperature during 6h. The obtained 3-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)aniline was treated with compounds **1a-4a**, **1b-4b** and **1c-3c** in DMF in the presence of K₂CO₃ during 20-24 h at 110 °C. In this reaction the OH protecting group is liberated, probably due to the acid pH generated by the HBr formed during the nucleophilic substitution, being compounds **SOS-1** to **SOS-11** obtained as the final products of the reaction (Scheme 5).



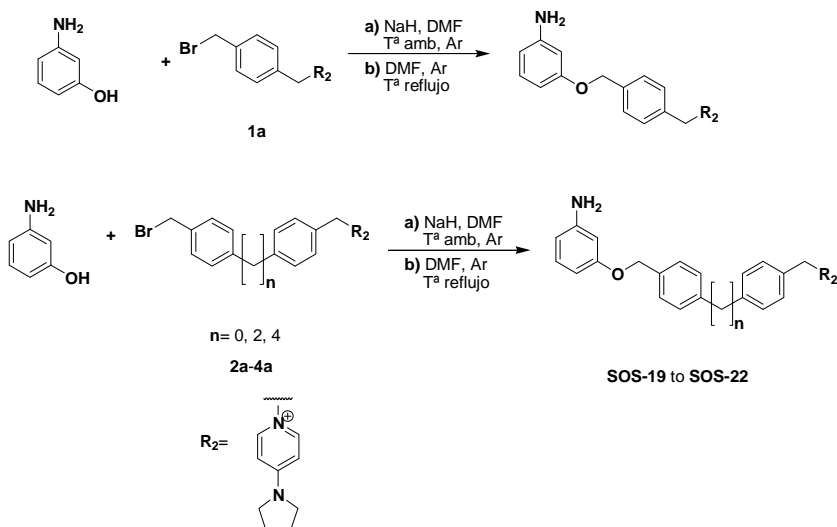
Scheme 5.- Synthesis of compounds of Subfamily A₁.

In the synthesis of compounds of **Subfamily A₂**, the compounds **1b-4b** and **1c-3c** was treated with 3-nitrophenol and NaH, in DMF at reflux during 20h, yielding final compounds **SOS-12** to **SOS-18** (Scheme 6).



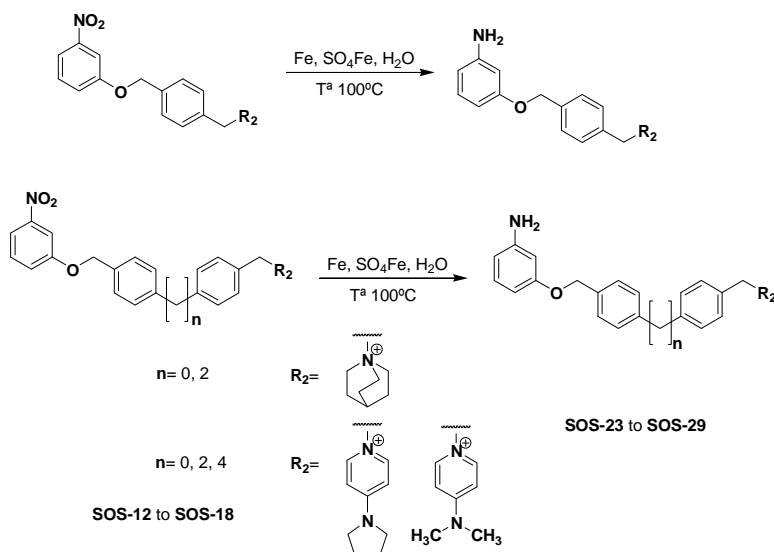
In the synthesis of compounds of **Subfamily A₃**, two different routes have been used. The first one is the treatment of the intermediates **1a-4a** with 3-aminophenol and HNa, in DMF at a temperature of 110 °C during 22 h. This route allows the isolation of compounds **SOS-19** to **SOS-22** (Scheme 7).

Route 1



In the second route, the nitro group of the compounds of the Subfamily A₂ was reduced by treatment with Fe/ SO₄Fe in water at reflux temperature during 3 h, yielding the final compounds **SOS-23** to **SOS-29** (Scheme 8)

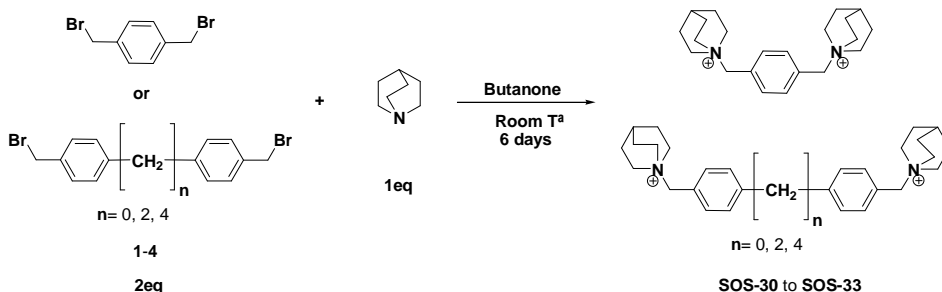
Route 2



Scheme 8.- Second route: Synthesis of compounds of Subfamily A₃.

Chemistry-Family B

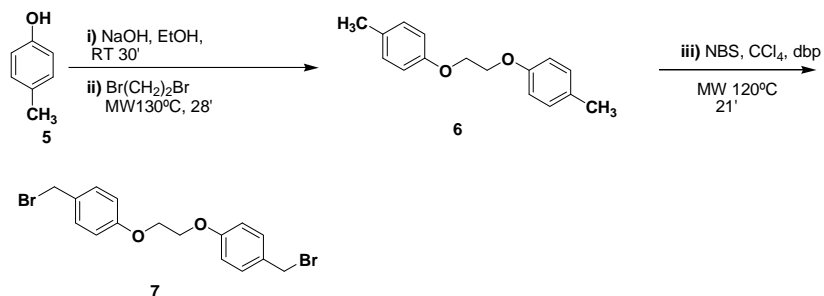
The general procedure used in the synthesis of the final biscationic symmetric compounds of the **Subfamily B₁** has two different steps. The first step (Scheme 2) is the bromomethylation of the four different linkers used in the synthesis of the A Family to obtain **1-4**. The second step is the reaction of the bisbromomethylated linkers **1-4** with quinuclidine (1:2 equivalent relationships) to obtain the final compounds **SOS-30** to **SOS-33** (Scheme 8). This reaction was performed in butanone at room temperature during 6 days, and compounds **SOS-30** to **SOS-33** were isolated as a white precipitate, filtered and washed with butanone to obtain the product as white solid.



Scheme 8.- Synthesis of compounds of Subfamily B₁.

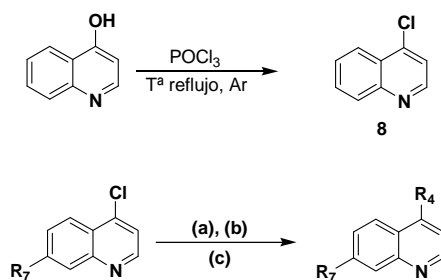
The general procedure used in the synthesis of the final biscationic symmetric compounds of **Subfamily B₂** and **B₃** has three different steps. The first step (Scheme 9) is the preparation of the

linker used in the final synthesis (1,2-bis(4-bromomethylphenoy)ethane (**7**)): (I) Reaction of 4-methoxyphenol (**5**) with NaOH in presence of EtOH at RT during 30 min, (II) after this 1,2-dibromoethane was added and the mixture was microwave irradiated at 140°C during 28 min to obtain 1,2-bis(*p*-methylphenoxy)ethane (**6**); (III) Finally, in order to yield the linker 1,2-bis(4-bromomethylphenoy)ethane (**7**), the bromomethylation of **6** was carried out in presence of benzoyl peroxide, NBS and CCl₄ by microwave irradiation at 120°C during 21 min.



Scheme 9.- Synthesis of the linker 1,2-bis(4-bromomethylphenoy)ethane (**7**).

The second step is the synthesis of the cationics head (Scheme 10). The cationic head 4-pyrrolidinopiridine (**9**), 4-dimethylaminopiridine (**10**), quinuclidine (**11**) and 3-hidroxyquinuclidine (**12**) are commercially available, while the cationic heads derivatives of quinoline (**13-19**) were obtained following the procedure previously described²³, starting of 4-quinoline and 7,4-dichloroquinoline which were treated with *N*-methylaniline, 4-chloro-*N*-methylaniline, perhydroazepine or pyrrolidine to obtain **13** (4-perhydroazepinoquinoline), **14** (4-*N*-methylanilinoquinoline), **15** (4-(4-chloro-*N*-methylanilino)quinoline), **16** (7-chloro-4-(*N*-methylanilino)quinoline), **17** (7-chloro-4-(4-chloro-*N*-methylanilino)quinoline), **18** (7-chloro-4-(pyrrolidino)quinoline) and/or **19** (7-chloro-4-perhydroazepinoquinoline).



R₇= H, Cl

- (d) Perhydroazepine/reflux/argon (compound **13**, R₄= perhydroazepino; R₇= H)
 (e) R₄MeNH/AcOH glacial/reflux/argon (compounds **14**, **15**, **16** y **17**, R₄= *N*-methylaniline and 4-chloro-*N*-methylaniline; R₇= H, Cl; respectively).
 (f) R₄NH/AcOH glacial/reflux (compounds **18** and **19**, R₄= pyrrolidine, perhydroazepine ; R₇= Cl).

Scheme 10.- Synthesis of cationics heads derivatives of quinoline.

The third step is the synthesis of the final biscationic compounds of **Subfamily B₃** and **B₃**. A solution of 1eq 1,2-bis(4-bromomethylphenyl)ethane (**7**) in dry CH₃CN was added drop to drop to a solution of **9-19** (2 eq) in dry CH₃CN under argon conditions. The mixture was heated under reflux during 3 days and, after cooling down to room temperature, washed with diethyl ether and hexane, filtered and dry to vacuum to afford **SOS-34** to **SOS-44** as a solid product.

Results and discussion

Molecular modelling and drug design

Human choline kinase ChoK α 1 (PDB id: 3G15) was chosen for the docking studies due to the presence in the same crystal structure of both the HC-3 and ADP. Molecular modeling studies were performed using Sybyl-X program²³.

Initial docking studies, performed on ChoK α 1 with the **Family A (Subfamily A₁ and A₃)** of non-symmetrical monocationic inhibitors described in this Thesis, show that the *m*-aminophenol moiety can mimics the adenine moiety that is present in the first family of previously published compounds, being inserted into de ATP binding site and stabilized by hydrogen bonds with Arg146, Asp206, Gln207 or Ile209²⁴.

Docking studies also indicate that there are different modes for the binding of the inhibitors inside the enzyme. The length of the linker in compounds **SOS-1**, **SOS-5**, **SOS-19** and **SOS-23** is too short to allow these molecules to be allocated in both ATP and Cho binding sites simultaneously. The obtained poses for these compounds indicate that they can be inserted into the Cho binding site or into the ATP binding site.

Finally, in the other compounds of these Subfamilies, the length of the linker is enough to allow these molecules to be inserted simultaneously in both ATP and choline binding sites. Consequently, it would be expected higher activity for those compounds that has the longer linker, like in the first series of non-symmetrical monocationic inhibitors previously described²³.

Biological results

The data indicate that the best inhibitors of this new family of non-symmetrical monocationic choline kinase inhibitors (**Family A**) are characterized by the presence of both a biphenyl linker and a dimethylaminepyridinium fragment, and that the nature of the *m*-aminophenol does not significantly affect the inhibitory effect.

IC₅₀ ChoK inhibition value has been calculated only for the most active compound **SOS-6** (IC₅₀ ChoK = 6.37 ± 0.53 μM) and **SOS-24** (IC₅₀ = 7.89 ± 0.05 μM), since the inhibition percentage of the other molecules are, in general, very small.

No clear structure-activity relationships can be established in the antiproliferative activity, since most of these molecules originate toxicity on the HepG2 line cells when they are tested at concentrations of 10 or 50 μM . In relation to the linker, compounds with bibenzyl (**SOS-7**, **SOS-14**) or 1,4-diphenylbutane (**SOS-8**, **SOS-15**) show better antiproliferative activity. Compounds with a pyrrolidinopyridinium cationic head show higher antiproliferative activity than their analogues with dimethylaminopyridinium moiety. Finally, Subfamily A₃ molecules also shows in general higher antiproliferative percentage than their analogues from Subfamily A₁.

Unfortunately, biological results do not confirm the initial docking studies performed for the design of these inhibitors, neither the previously published results related to the influence of the linker of the first family of non-symmetrical inhibitors on the ChoK inhibitory activity²³.

The fact that all molecules with long linkers are inactive or show low inhibition percentage indicate that the conclusions obtained from the initial docking studies are not correct. There is only one reason for this behaviour: even the docking studies have indicated that the *m*-aminophenol fragment could bind inside the ATP binding site, the affinity of the ATP adenine fragment for its binding site in the choline kinase should be higher than that of the *m*-aminophenol. Consequently, in the biological assays, all these non-symmetrical compounds could not compete with the ATP adenine moiety, and they could not bind simultaneously in both binding sites.

With the object of justify the obtained biological results, new docking studies have been performed using only the Cho binding site as the possible zone for the insertion of the ligands.

With regard to the **Family B** (Table 1), in general these compounds behave as good ChoK inhibitors. Nevertheless, its antiproliferative activity against HepG2 are very low.

Compounds of **Subfamily B₁** and **B₂** (**SOS-32**, **SOS-33**, **SOS-41** and **SOS-42**) presents good IC₅₀ *ex vivo* against ChoK, however they do not have antiproliferative activity against HepG2, which suggest that these structures are too polar to pass through the plasma membrane

Structures of **Subfamily B₂** containing a quinoline substituted at the 4 position by a rest of a cycloalkilamine presents good results of ChoK inhibition (**SOS-38**, **SOS-39** y **SOS-40**), as well as a relatively good antiproliferative activity , establishing a clear structure-activity relationships.

All compounds have shown a good activity against *Plasmodium falciparum* (Table 2) but its necessary to make inhibition assays against ChoK of *P. falciparum*, to verify that these compounds really act by the inhibition of this enzyme or if they had another mechanism of action.

Table 1.- Compounds of the Family B with the best activities of ChoK inhibition.

Compuesto	Cabeza catiónica (R ₁)	Espaciador	ChoK Inhibition 10 μM	ChoK Inhibition 50 μM	IC ₅₀	Proliferation IC ₅₀ (μM)
SOS-32			61.60 ± 2.66 (P=0.0001)	73.11 ± 1.37 (P=0.0001)	4.83 ± 0.41	No Inhibe
SOS-33			81.77 ± 1.83 (P=0.0005)	84.88 ± 2.40 (P=0.0004)	0.66 ± 0.11	No Inhibe
SOS-38			41.57 ± 3.83 (P=0.0179)	71.14 ± 2.09 (P=0.0022)	26.33 ± 4.09	3.85 ± 0.23
SOS-39			--	71.60 ± 0.10 (P=0.0022)		12.64 ± 0.70
SOS-40			27.44 ± 7.63 (nds)	76.70 ± 2.81 (P=0.0007)		2.38 ± 0.71
SOS-41			27.97 ± 3.33 (P=0.0275)	61.54 ± 2.75 (P=0.0016)		24.57 ± 0.648
SOS-42			71.46 ± 2.47 (P=0.0002)	82.37 ± 0.48 (P=0.0001)	2.20 ± 0.10	No se puede

Table 2.- Best compounds with activities against *P.falciparum*.

Compuesto	Cabeza catiónica (R ₁)	Espaciador	Antimalaric activity IC ₅₀ (μM)	Ajuste	Family
SOS-2			0,0157 ± 0,0012	Sigmoidal	A
SOS-13			0,085 ± 0,007	Hyperbolic	
SOS-21			0,0587 ± 0,001	Hyperbolic	
SOS-31			0,088 ± 0,008	Hyperbolic	B
SOS-32			0,015 ± 0,001	Hyperbolic	
SOS-39			0,035 ± 0,004	Hyperbolic	
SOS-40			0,059 ± 0,001	Hyperbolic	
SOS-41			0,016 ± 0,001	Hyperbolic	
SOS-42			0,016 ± 0,001	Hyperbolic	

Bibliografía

1. Muñoz, A. Cáncer. Genes y Nuevas terapias. Eds. Feduchi, E.; Irunzun, A.: Hélice: Madrid, **1997**.
2. Gibbs, Jackson B.; Mechanism-Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research. *Science*, **2000**, 287, 1969.
3. Elsayed, Y. A.; Sausville, E. A. Selected novel anticancer treatments targeting cell signalling proteins. *Oncologist*, **2001**, 6, 517-537.
4. Campos, J. *et al.*; Choline kinase inhibitory effect and antiproliferative activity of new 1,1',1''-(benzene-1,3,5-trylmethylene)tris{4-[(disubstituted)amino]pyridinium} tribromides. *Chem. Eur. J.*, **2003**, Vol. 38, 109-116.
5. Campos Joaquin M. *et al.*; QSAR-derived choline kinase inhibitors: How rational can antiproliferative drug design be? *Curr. Med. Chem.*, **2003**, 10, 1095-1112.
6. Ramírez de Molina, A. *et al.*; 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*, **2002c**, 296, 580-583.
7. Ramírez de Molina *et al.*; Choline Kinase Activation Is a Critical Requirement for the Proliferation of Primary Human Mammary Epithelial Cells and Breast Tumor Progression. *Cancer Research*, **2004**, 64, 6732-6739.
8. a) C. Kent. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis. *Prog. Lipid. Res* 29 (**1990**) 87–105. b) A. Yalcin, B. Clem, S. Makoni, A. Clem, K. Nelson, J. Thornburg, D. Siow, A.N. Lane, S.E. Brock, U. Goswami, J.W. Eaton, S. Telang, J. Chesney. Selective inhibition of choline kinase simultaneously attenuates MAPK and PI3K/AKT signalling. *Oncogene* , **2010**, 29, 139–149.
9. C. Aoyama, H. Liao, K. Ishidate. Structure and function of choline kinase isoforms in mammalian cells. *Prog. Lipid. Res*, **2004**, 43, 266–281.
10. R. Hernández-Alcoceba, L. Saniger, J. Campos, M. C. Nunez, F. Khaless, M. A. Gallo, A. Espinosa, J. C. Lacal. Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene*, **1997**, 15, 2289-2301.

11. (a) A. Ramírez de Molina, A. Rodríguez-González, R. Gutiérrez, L. Martínez-Pineiro, J. Sánchez, F. Bonilla, R. Rosell, J. C. Lacal. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumour-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2002**, 296, 580-583. b) G. Eliyahu, T. Kreizman, H. Degani. Phosphocholine as a biomarker of breast cancer: molecular and biochemical studies. *Int. J. Cancer.*, **2007**, 120, 1721-1730. c) K. Nakagami, T. Uchida, S. Ohwada, Y. Koibuchi, Y. Suda, T. Sekine, Y. Morishita, Increased choline kinase activity and elevated phosphocholine levels in human colon cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, **1999**, 90, 419-424.
12. a) A. Ramírez de Molina, R. Gutiérrez, M. A. Ramos, J. M. Silva, J. Silva, F. Bonilla, J. J. Sánchez, J. C. Lacal. Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. *Oncogene*, **2002**, 21, 4317-4322. b) A. Ramirez de Molina, J. Sarmentero-Estrada, C. Belda-Iniesta, M. Taron, V. Ramirez de Molina, P. M. Cejas, Skrzypski, D. J. Gallego- Ortega, de Castro, E. Casado, M. A. Garcia-Cabezas, J. J. Sanchez, M. Nistal, R. Rosell, M. Gonzalez-Baron, J. C. Lacal, Expression of choline kinase alpha to predict outcome in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol.*, **2007**, 8, 889-897.
13. Ramírez de Molina *et al.*; Choline Kinase Activation Is a Critical Requirement for the Proliferation of Primary Human Mammary Epithelial Cells and Breast Tumor Progression. *Cancer Research*, **2004**, 64, 6732-6739.
14. T. Shah, F. Wildes, M.F. Penet, P.T. Winnard Jr, K. Glunde, D. Artemov, E. Ackerstaff, B. Gimi, S. Kakkad, V. Raman, Z. M. Bhujwalla. Choline kinase overexpression increases invasiveness and drug resistance of human breast cancer cells *NMR Biomed.*, **2010**, 23, 633–642.
15. Lacal, J. C. et al.; Inhibition of Choline kinase as a specific cytotoxic strategy in oncogene-transformed cells. *Oncogene*, **2003**, 22, 8803-8812.
16. Rodríguez-Gonzalez, A., Ramírez de Molina, A., Fernández, F., Lcal, 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, 8247-8259.

17. Athar Alam, Manish Goyal, Mohd Shameel, Iqbal, Chinmay Pal, Sumanta Dey, Samik Bindu, Pallab Maity and Uday Bandyopadhyay. Novel antimalarial drugs targets: hope for new antimalarial drugs. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, **2009**, 2(5), 469-489.
18. Alberge, B. et al. Comparison of the cellular and biochemical properties of plasmodium falciparum choline and ethanolamine kinases. *Biochem J.*, **2009**, 425(1), 149-58.
19. Ancelin, ML.; Calas, M.; Vidal-Sailhan, V.; Herbute, S.; Ringwald, P.; Vial, HJ. Potent inhibitors of Plasmodium phospholipid metabolism with a broad spectrum of *in vitro* antimalarial activities. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2003**, 47(8), 2590–2597.
20. Choubey, V. et al. Molecular characterization and localization of Plasmodium falciparum choline kinase. *Biochimica et Biophysica*, **2006**, 1027-1038.
21. H. A. Staab, M. Haenel, Transanulare Wechselwirkungen bei [2.2]Phanen, II. Synthesen von [2.2](4,4')biphenylophan, [2.2](2,7)phenanthrenophan und [2](4,4')biphenylo[2](2,7)phenanthrenophan. *Chem. Ber.*, **1973**, 106, 2190-2202.
22. D. J. Cram, H. Steinberg, Macro rings. I. Preparation and spectra of the paracyclophanes, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 5691-5704.
23. SYBYL-X 1.2, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA. <http://www.tripos.com>
24. B. Rubio-Ruiz, A. Conejo-García, P. Ríos-Marco, M. P. Carrasco-Jiménez, J. Segovia, C. Marco, M. A. Gallo, A. Espinosa, A. Entrena Guadix. Design, synthesis, theoretical calculations and biological evaluation of new non-symmetrical choline kinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* (**2012**), 50, 154-162.

6. Conclusions

6. Conclusions

1. In this Thesis forty-three compounds have been designed, synthesized and characterized. Among them, twenty-nine are non-symmetrical monocationic bromide salts (**Family A**) and fifteen are symmetrical biscationic bromide salts (**Family B**), with different semirigid linkers in the search of new ChoK inhibitors with antiproliferative activity.
2. The structure described of both final compounds and its intermediates synthetic have been unequivocally established by means of the combined use of various spectroscopic techniques ($^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, HMBC y HSQC) and mass spectrometry.
3. Starting docking studies and *ex vivo* biological results suggest that the monocationic compounds (**Family A**) have a similar behaviour to HC-3 over the inhibition of the ChoK enzyme, probably due to the most affinity of the ATP for its binding site.
4. In the **Family A**, 4,4'-biphenyl as a linker and dimethylaminopyridine as a cationic head are the moieties that offer the best values of ChoK inhibition. The difference of activity between the 3'-OH and 3'-NH₂ derivatives (**Subfamily A₁** and **A₃**) is almost undetectable. Thus, the most active compounds over human ChoK are **SOS-6** ($\text{IC}_{50} = 6.37 \pm 0.53 \mu\text{M}$) and **SOS-24** ($\text{IC}_{50} = 7.89 \pm 0.05 \mu\text{M}$).
5. The results obtained for **Family A** compounds in the *in vitro* assays against the tumour line HepG2, have shown that compounds **SOS-2**, **SOS-3**, **SOS-7**, **SOS-8**, **SOS-14**, **SOS-17**, **SOS-18**, **SOS-21**, **SOS-22**, **SOS-25** and **SOS-26** present the best antiproliferative activity, despite that they present a marginal inhibitory activity on ChoK, which reinforces the hypothesis that such structures could act in another route involved in cell proliferation.
6. In general, compounds belonging to the **Family B** behave as good inhibitors of the enzyme in contrast with their very low values of antiproliferative activity against HepG2.
 - **Subfamily B₁** presents good *ex vivo* IC_{50} values against ChoK (are **SOS-32** ($\text{IC}_{50} = 4.83 \pm 0.41 \mu\text{M}$) and **SOS-33** ($\text{IC}_{50} = 0.66 \pm 0.11 \mu\text{M}$)). However the antiproliferative activity probably decrease due to its high polarity which hinders its passage through the plasma membrane.
 - **Subfamily B₂** shows good results in both *ex vivo* and *in vivo* assays. This can be explained as a consequence of the higher lipophilicity of these compounds, since they bear a 4-cycloalkylamine-quinoline as a cationic head.

- **Subfamily B₃** compounds with a 4-substituted-pyridine as a cationic head (**SOS-41** y **SOS-42**) also have a good inhibitory activity against ChoK (**SOS-42**, IC₅₀= 2.20 ± 0.10 μM) but not significant antiproliferative activity. The increment of the polarity plays again an essential role in this kind of compounds.
7. The introduction of a more polar linker, like 1,2-bis(*p*-tolyl)ethane that is present in some compounds of the **Family B**, decreases both *in vivo* and *in vitro* activity in relation to the structures previously reported by our research group⁷ that contain 3,3'-biphenyl, 4,4'-biphenyl or 4,4'-bibencyl as linkers.
 8. All compounds show high levels of activity in therapy against *Plasmodium falciparum*.
 - The most appropriate linker for **Subfamilies A₁ and A₂** (OH or NO₂ in 3 position of *m*-aminophenol, respectively) is biphenyl, while for the **Subfamily A₃** (NH₂ in 3 position) are the bibencyl or biphenylethane. This factor reveals that there is no competition for ATP binding site when the hydroxyl or nitro groups are present in these molecules, due to the higher affinity of ATP for ATP binding site. On the other hand, when the amino group is present, these compounds can be introduced in both binding sites (ATP site and Cho site), and for this reason they need a longer linker. Compounds with better antimalarial activity data are **SOS-2** (IC₅₀= 0,0157 ± 0,0012 μM), **SOS-13** (IC₅₀= 0,085 ± 0,007 μM) y **SOS-21** (IC₅₀= 0,0587 ± 0,001μM).
 - In the **Family B**, compounds that show the best values of antimalarial activity are **SOS-32** (IC₅₀= 0,088 ± 0,008 μM), **SOS-33** (IC₅₀= 0,015 ± 0,001 μM), **SOS-39** (IC₅₀= 0,035 ± 0,004 μM), **SOS-40** (IC₅₀= 0,059 ± 0,001 μM), **SOS-41** y **SOS-42** (IC₅₀= 0,016 ± 0,001 μM). These results are concordant with those of human antiproliferative activity in **Family B**.
 9. In order to determine the mechanism of action of these compounds against *P. falciparum* more assays should be done, with the object of confirming that the antimalarial activity could be due to the inhibition of the PfCK.
 10. More and new human ChoK inhibition and antiproliferative activity assays against new cell lines are necessary to confirm the obtained results. Trials against different cell lines are currently underway.