

F-Proc-22/14

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Farmacia

T 2-26



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Farmacia

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE COMPUESTOS
ANTITUMORALES QUE INTERFIEREN
CON SEÑALES QUÍMICAS
INDUCIDAS POR
ONCOGENES**

TESIS DOCTORAL

FOUAD KHALESS

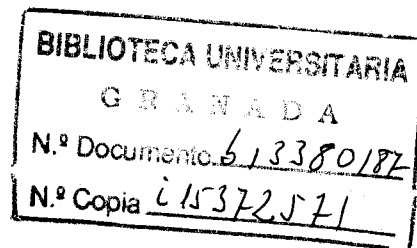
UNIVERSIDAD DE GRANADA
19 DIC. 1997
COMISION DE DOCTORADO

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE COMPUESTOS
ANTITUMORALES QUE INTERFIEREN
CON SEÑALES QUÍMICAS
INDUCIDAS POR
ONCOGENES**

**DISEÑO Y SÍNTESIS DE COMPUESTOS ANTITUMORALES
QUE INTERFIEREN CON SEÑALES QUÍMICAS
INDUCIDAS POR ONCOGENES**

Por

Fouad Khaless



Visado en Granada a
19 de Diciembre de 1997
Los Directores:

Fdo.: Antonio Espinosa Úbeda,
Catedrático de Química Orgánica;
Miguel Ángel Gallo Mezo,
Catedrático de Química Farmacéutica

Memoria presentada para
optar al grado de doctor
en Ciencias Químicas

Fdo.: Fouad Khaless
Licenciado en Bioquímica

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1997

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han contribuido en la realización de este trabajo.

A mis directores Prof. Dr. D. Antonio Espinosa Úbeda y Prof. Dr. D. Miguel Ángel Gallo Mezo, por su eficaz ayuda y colaboración, así como por su constante apoyo, dedicación y enseñanza en la realización de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Antonio Entrena Guadix que me ayudó en la comprensión de los estudios conformacionales incluidos en la discusión de esta Memoria.

Al Prof. Dr. D. Joaquín Campos Rosa por sus inestimables consejos y su apoyo incondicional durante la realización de esta Memoria.

A los profesores, Dr. D. José Francisco Domínguez Seglar y Dra. D^a. Encarnación Camacho Quesada por su apoyo y ayuda en las horas de laboratorio compartidas.

Al Prof. Dr. D. Juan Carlos Lacal y su equipo por la realización de los ensayos biológicos.

Al Profesor C.G . Wermuth y Dr. J. J. Bourguignon quienes me introdujeron en la investigación en Química Farmacéutica.

Al Instituto de Cooperación con el Mundo Árabe (ICMA) por la beca concedida.

Finalmente, a mis compañeros del departamento de Química Orgánica que han contribuido a crear un ambiente caluroso.



ÍNDICE

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1.-INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS | 7 |
| 2.1.- La fosfatidilcolina como fosfolípido de membrana | 8 |
| 2.2.- biosíntesis de fosfolípido: síntesis novo de fosfatidilcolina | 12 |
| 2.3.- Papeles biológicos de la colina quinasa | 15 |
| 2.3.1.- La colina quinasa en la síntesis de fosfatidilcolina | 15 |
| 2.3.2.- La colina quinasa en la transducción de señales | 16 |
| 2.3.2.1.- Biología molecular del cáncer | 16 |
| 2.3.2.2.- Protooncogenes y oncogenes | 19 |
| 2.3.2.3.- Oncogén ras en el metabolismo de fosfolípidos | 26 |
| 2.4.- Inhibidores de la colinaquinasa | 29 |
| 2.5.- Modificaciones moleculares del hemicolinio | 33 |
| 2.5.1.- El hemicolinio como inhibidor de la recaptación de colina | 33 |
| 2.5.1.1.- Compuestos con sólo un fragmento de la molecula prototipo | 33 |
| 2.5.1.2.- Modificación en la región A | 36 |
| 2.5.1.3 Modificación de la región B del HC-3 | 38 |
| 2.5.1.3.1.- Modificaciones de la estructura ciclica de HC-3 | 38 |
| 2.5.1.3.2 Modificaciones de la estructura abierta del HC-3 | 42 |
| 2.5.2.- Hemicolinio como protector contra la toxicidad inducida por los organofosforados | 46 |

| | |
|---|-----|
| 3.- PARTE TEÓRICA | 50 |
| 3.1- Propósitos y objetivos a cumplir en este trabajo | 50 |
| 3.2- Diseño, síntesis y elucidación estructural de los derivados del hemicolinio pertenecientes al grupo A | 53 |
| 3.2.1- Diseño de derivados de la forma abierta del HC-3: Subgrupo A ₁ | 54 |
| 3.2.1.1.- Determinación estructural de los derivados del HC-3 | 58 |
| 3.2.2- Diseño y elucidación estructural de análogos de la forma cíclica del HC-3 (Compuestos 30 - 32 y 55 - 56): Subgrupo A ₂ | 70 |
| 3.2.2.1- Análisis estructural de los compuestos 30 - 32 y 55 - 56 ... | 72 |
| 3.2.3.- Diseño y análisis estructural de los derivados del HC-3 con un heteociclo aromático 54 y 57 - 60: Subgrupo A ₃ | 78 |
| 3.2.3.1- Análisis estructural de los compuestos 54 y 57- 60 (Subgrupo A ₃) | 80 |
| 3.2.4.- Síntesis de los compuestos incluidos en el grupo A | 84 |
| 3.2.5.- Resultados biológicos: actividad inhibitoria de colina quinasa y antiproliferativa | 85 |
| 3.3.- Diseño, síntesis y análisis espectroscópico-estructural de los compuestos pertenecientes al grupo B | 90 |
| 3.3.1.- Compuestos en los que el nitrógeno positivo forma parte de estructura acíclica: Subgrupo B ₁ | 91 |
| 3.3.1.1.- análisis espectroscópico-estructural de los compuestos 5 y 61 - 63 | 92 |
| 3.3.2.- Diseño y análisis espectroscópico-estructural de compuestos provistos de un anillo heterocíclico saturado (Compuestos 64 - 67): Subgrupo B ₂ | 100 |
| 3.3.2.1. análisis espectroscópico-estructural de los compuestos 64 - 67 | 102 |
| 3.3.3.- Diseño y análisis espectroscópico-estructural de los análogos del prototipo HC-15 provistos con un anillo heterocíclico aromático: Subgrupo B ₃ .. | 108 |

| | |
|--|-----|
| 3.3.3.1.- análisis espectroscópico-estructural de los compuestos 68 - 78: Subgrupo B ₃ | 110 |
| 3.3.4.- Síntesis de los derivados pertenecientes al grupo B | 118 |
| 3.3.5.- Resultados biológicos: actividades inhibitorias de colina quinasa <i>ex vivo</i> , <i>in vitro</i> y actividad antiproliferativa de los compuestos pertenecientes al grupo B | 120 |
| 3.4.- Diseño, síntesis y análisis estructural de análogos del hemicolinio pertenecientes al grupo C | 123 |
| 3.4.1.- Diseño de los compuestos 79 - 83 | 124 |
| 3.4.1.1.- análisis espectroscópico-estructural de los compuestos del grupo C | 126 |
| 3.4.2.- Síntesis de los compuestos del grupo C | 129 |
| 3.4.3.- Resultados biológicos | 129 |
| 3.5.- Diseño, síntesis y determinación estructural de los compuestos pertenecientes al grupo D y E | 131 |
| 3.5.1.- Consideraciones generales | 131 |
| 3.5.2.- Diseño de los compuestos de los grupos D y E | 132 |
| 3.5.3.- Síntesis de los compuestos pertenecientes a los grupos D y E | 134 |
| 3.5.4.- Determinación estructural de los compuestos de los grupos D y E | 134 |
| 3.5.5.- Actividades biológicas de los compuestos pertenecientes a los grupos D y E | 140 |
| 3.6.- Diseño, síntesis y determinación estructural de los compuestos de los grupos F, G y H | 143 |
| 3.6.1.- Diseño, síntesis y determinación estructural de los compuestos del grupo F | 143 |
| 3.6.1.1.- Diseño de los compuestos 91 - 93 | 143 |
| 3.6.1.2.- Síntesis de los compuestos del grupo F | 145 |

| | |
|---|-----|
| 3.6.1.3.- Elucidación estructural de los compuestos del grupo F | 145 |
| 3.6.2.- Diseño, síntesis y determinación estructural de los compuestos pertenecientes al grupo G | 148 |
| 3.6.2.1.- Diseño de los compuestos 96 - 99 | 148 |
| 3.6.2.2.- Síntesis de los compuestos del grupo G | 150 |
| 3.6.2.3.- Determinación estructural de los compuestos del grupo G | 150 |
| 3.6.3.- Diseño, síntesis y determinación estructural de los compuestos pertenecientes al grupo H | 154 |
| 3.6.3.1.- Diseño y síntesis de los compuestos 100 - 105 | 154 |
| 3.6.3.2.- Determinación espectroscópico-estructural de los compuestos 100 - 105 | 155 |
| 3.6.4.- Valores de actividades biológicas de los compuestos pertenecientes a los grupos F - H | 159 |
| 3.7.- Discusión de resultados biológicos | 162 |
| 3.7.1.- La enzima colina quinasa | 162 |
| 3.7.2.- Relaciones estructura-actividad entre el prototipo HC-3 y sus derivados | 163 |
| 3.7.2.1.- Actividad inhibitoria <i>ex vivo</i> sobre colina quinasa de levaduras | 163 |
| 3.7.2.2.- Análisis conformacional de diversos inhibidores de colina quinasa | 171 |
| 3.7.2.3.- Actividad inhibitoria de colina quinasa <i>ex vivo</i> . Correlaciones cuantitativas estructura-actividad | 179 |
| 3.7.3.- Correlación entre la estructura y la actividad antiproliferativa frente a la línea tumoral humana HT-29 | 181 |
| 4.- PARTE EXPERIMENTAL | 193 |
| 4.1.- Consideraciones generales | 194 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.- Materias primas | 196 |
| 4.2.1.- Síntesis de 4,4'-di(bromoacetil)bifenilo 53a | 196 |
| 4.2.2.- Síntesis de 4,4'-di(cloroacetil)bifenilo 53b | 196 |
| 4.2.3.- Síntesis de 3-quiunuclidinopalmitato 95 | 197 |
| 4.3.- Método general de síntesis de derivados de 4,4'-diacetilbifenilo, Grupo A .. | 198 |
| 4.3.1.- Síntesis de cloruro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis- <i>N</i> -metil pirrolidinio (32, FK2) | 198 |
| 4.3.2.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(4-dimetil amino)piridinio (58, FK3) | 198 |
| 4.3.3.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis (etildimetil amonio) (33b, FK5) | 199 |
| 4.3.4.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(butil dimetilamonio) (33d, FK6) | 200 |
| 4.3.5.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis[(2,2- dimetoxietil)dimetilamonio] (51a, FK10) | 200 |
| 4.3.6.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis [(2,2- dietoxietil)dimetilamonio] (51b, FK11) | 201 |
| 4.3.7.- Síntesis de bromuro de de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis- <i>N</i> -metil morfolinio (31, FK12) | 201 |
| 4.3.8.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis [(2-hiroxi etil)dimetilamonio] (1, FK14) | 202 |
| 4.3.9.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis (4-hidroxi piridinio) (57, FK17) | 203 |
| 4.3.10.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis (isoquino- linio) (60, FK19) | 203 |
| 4.3.11.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis (3-hidroxi Quinuclidinio) (56, K21) | 204 |
| 4.3.12.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis Quinucli- dinio) (55, FK22) | 204 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.13.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis [(2-hiroxi propil)dimetilamonio] (41, FK23) | 205 |
| 4.3.14.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis [(3-hiroxi etil)dimetilamonio] (47, FK24) | 206 |
| 4.3.15.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis piridinio (54, FK7) | 206 |
| 4.3.16.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bisquinolinio (59, FK13) | 207 |
| 4.3.17.- Síntesis de bromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis-N-metil piperidinio (30, FK8) | 208 |
| 4.4.- Método general de síntesis de derivados de acetofenona, Grupo B | 209 |
| 4.4.1.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-hidroxiquinuclidinio (66, FK26) | 209 |
| 4.4.2.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-hidroxi propildimetilamonio (62, FK28) | 210 |
| 4.4.3.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-dimetilaminopiridinio (74, FK33) | 210 |
| 4.4.4.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-2-hidroxi propildimetilamonio (61, FK34) | 211 |
| 4.4.5.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-2-hidroxi etildimetilamonio (5, FK35) | 211 |
| 4.4.6.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-N-2-hidroxi etilmorfolinio (64, FK36) | 212 |
| 4.4.7.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-2,2-dimetoxi etildimetilamonio (63, FK37) | 212 |
| 4.4.8.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-hidroxi metilpiridinio (72, FK50) | 213 |
| 4.4.9.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-acetilpiridinio (69, FK51) | 214 |

| | |
|--|-----|
| 4.4.10.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-hidroxipiridinio (76, FK52) | 214 |
| 4.4.11.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-(1-pirrolidino)piridinio (75, FK53) | 215 |
| 4.4.12.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-aminopiridinio (73, FK54) | 215 |
| 4.4.13.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-cianopiridinio (71, FK55) | 216 |
| 4.4.14.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-hidroxiiminopiridinio (70, FK57) | 216 |
| 4.4.15.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-hidroxipiridinio (77, FK58) | 217 |
| 4.4.16.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-palmitoilquinuclidinio (67, FK29) | 218 |
| 4.4.17.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-oxoquinuclidinio (65, FK30) | 218 |
| 4.4.18.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)isoquinolinio (78, FK32). | 219 |
| 4.4.19.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)piridinio 68 (FK56) . | 220 |
| 4.5.- Método general de síntesis de derivados de feniletilo, Grupo C | 221 |
| 4.5.1.- Síntesis de bromuro de 1-(feniletil)-4-dimetilaminopiridinio (82, FK60). | 221 |
| 4.5.2.- Síntesis de bromuro de 1-(feniletil)-3-hidroxiquinuclidinio (80, FK61). | 221 |
| 4.5.3.- Síntesis de bromuro de 1-(feniletil)-4-(1-pirrolidino)piridinio (83, FK62) | 222 |
| 4.5.4.- Síntesis de bromuro de 1-(feniletil)-4-aminopiridinio (81, FK69) .. | 223 |
| 4.5.5.- Síntesis de bromuro de 1-(feniletil)-2-hidroxietildimetilamonio (79, FK70) | 223 |
| 4.6.- Método general de síntesis de derivados de 3-metoxiacetofenona, Grupo D . | 225 |
| 4.6.1- Síntesis de bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-3-hidroxiquinucli- | |

| | |
|---|-----|
| dinio (84, FK25) | 225 |
| 4.6.2.- Síntesis de bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-3-hidroxi-propil dimetilamonio (85, FK27) | 226 |
| 4.6.3.- Síntesis de bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-4-dimetilamino piridinio (86, FK47) | 226 |
| 4.6.4.- Síntesis de bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-4-(1-pirrolidino) piridinio (87, FK48) | 227 |
| 4.7.- Método general de síntesis de derivados de 4-bromoacetofenona, Grupo E . | 228 |
| 4.7.1.- Síntesis de bromuro de 1-[(4-bromofenil)carbonilmetil]-3-hidroxi-quinuclidinio (88, FK44) | 228 |
| 4.7.2.- Síntesis de bromuro de 1-[(4-bromofenil)carbonilmetil]-4-dimetilaminopiridinio (89, FK45) | 229 |
| 4.7.3.- Síntesis de bromuro de 1-[(4-bromofenil)carbonilmetil]-4-(1-pirrolidino) piridinio (90, FK46) | 229 |
| 4.8.- Método general de síntesis de derivados de fenilpropilo, Grupo F | 231 |
| 4.8.1.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilpropil)-3-hidroxi-quinuclidinio (91, FK38) | 231 |
| 4.8.2.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilpropil)-4-dimetilaminopiridinio (92, FK39) | 231 |
| 4.8.3.- Síntesis de bromuro de 1-(fenilpropil)-4-(1-pirrolidino)piridinio (93, FK40) | 232 |
| 4.9.- Método general de síntesis de derivados de fenetol, Grupo G | 233 |
| 4.9.1.- Síntesis de bromuro de 1-(fenoxietil)- <i>N</i> -metilpiperidinio (96, FK31). | 233 |
| 4.9.2.- Síntesis de bromuro de 1-(fenoxietil)-3-hidroxi-quinuclidinio (97, FK41) | 233 |
| 4.9.3.- Síntesis de bromuro de 1-(fenoxietil)-4-dimetilaminopiridinio (98, FK42) | 234 |
| 4.9.4.- Síntesis de bromuro de 1-(fenoxietil)-4-(1-pirrolidino)piridinio (99, FK43) | 235 |

| | |
|---|-----|
| 4.10.- Método general de síntesis de derivados de etilbenzoato, Grupo H | 236 |
| 4.10.1.- Síntesis de bromuro de 1-(benzoiloxietil)-2-hidroxiöldimetilamonio (100, FK66) | 236 |
| 4.10.2.- Síntesis de bromuro de 1-(benzoiloxietil)-N-metilpiperidinio (101, FK63) | 236 |
| 4.10.3.- Síntesis de bromuro de 1-(benzoiloxietil)-3-hidroxiquinuclidinio (102, FK64) | 237 |
| 4.10.4.- Síntesis de bromuro de 1-(benzoiloxietil)-4-(1-pirrolidino)piridinio (103, FK68) | 238 |
| 4.10.5.- Síntesis de bromuro de 1-(benzoiloxietil)-4-dimetilaminopiridinio (104, FK67) | 238 |
| 4.10.6.- Síntesis de bromuro de 1-(benzoiloxietil)isoquinolinio (105, FK65).239 | |
| 4.11.- Ensayos biológicos | 240 |
| 4.11.1.- Inhibición de la actividad de la colina quinasa | 240 |
| 4.11.1.1.- Ensayo <i>ex vivo</i> de inhibidores de la colina quinasa | 240 |
| 4.11.1.2.- Ensayo <i>in vitro</i> de inhibidores de la colina quinasa | 241 |
| 4.11.2.- Ensayo de inhibición de la proliferación celular | 243 |
| 5.- COCLUCIONES | 244 |
| 6.- BIBLIOGRAFFÍA | 249 |
| 7.- APÉNDICE 1 | 257 |
| 8.- APÉNDICE 2 | 338 |

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

La terapia anticancerosa se basa principalmente en el uso de fármacos con actividad antiproliferativa de tal forma que el grupo más numeroso de fármacos anticancerosos es el constituido por los denominados fármacos citotóxicos^{1,2}. El mecanismo de acción de este tipo de fármacos se basa en el hecho de que son más efectivos sobre las células cancerosas porque tienen una actividad proliferativa más elevada que las células normales². No obstante, las células de crecimiento rápido, tales como las células precursoras del sistema hematopoyético y las células epiteliales del intestino y de otros tejidos, son también afectadas negativamente por el tratamiento terapéutico anticanceroso. Como consecuencia, este tipo de terapia conlleva efectos de toxicidad sobre las células germinales que provoca anemia, inmunosupresión, disfunción de las células epiteliales (caída de cabello, desórdenes digestivos, etc.)^{1,2}.

A pesar de la existencia de múltiples agentes citotóxicos, alrededor del 50% de los pacientes afectados por cáncer mueren después del tratamiento¹. Por estas razones, la disponibilidad de nuevos agentes antiproliferativos es un requerimiento esencial para el tratamiento con éxito del cáncer en el futuro.

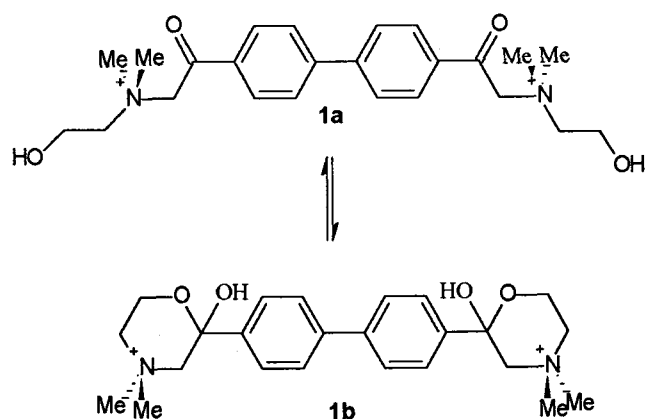
Recientemente³ se han conseguido progresos espectaculares en el conocimiento de los mecanismos que regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis celular que están abriendo nuevas perspectivas en el desarrollo de estrategias que permitan la investigación y desarrollo de nuevos agentes antitumorales basados en el diseño racional. Así, hoy se conoce que las células tumorales muestran cascadas aberrantes de transducción de señales que controlan los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis.

En los momentos actuales se está investigando en las interacciones específicas entre nuevos fármacos antitumorales y el sistema aberrante de señalización celular con dos finalidades principales: por un lado, se pretende revertir el fenotipo de las células transformadas, proceso que se conoce como diferenciación celular; por otro lado, se pretende también, en base al uso de estos nuevos fármacos, la destrucción selectiva de las células tumorales. De esta forma, la caracterización de nuevas dianas intracelulares, responsables de las alteraciones e inducidas por la actividad de los diferentes oncogenes y genes supresores, constituye o puede constituir la base para el diseño racional de nuevas estrategias antiproliferativas y antitumorales³. Esta estrategia tiene un carácter muy general y puede también ser aplicada a otras enfermedades causadas por alteraciones en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación celular o la apoptosis, entre las que el cáncer es, en el momento actual, la más temida.

En este sentido hay que mencionar que los resultados previos de varios grupos de investigadores⁴⁻¹¹ han demostrado que en células transformadas por oncogenes *ras* (encontrado en alrededor del 30% del total de los tumores humanos) existe una activación constitutiva de la colina quinasa, una enzima que es responsable de la conversión de colina (Cho) en fosforilcolina (PCho)¹². Como consecuencia del incremento de la actividad colina quinasa, en estas células se produce una elevación en los niveles de PCho, un segundo mensajero putativo involucrado en la

proliferación celular⁸.

Por otro lado, existe también evidencia de que el hemicolinio HC-3 **1**, el más potente inhibidor de colina quinasa conocido, bloquea la síntesis de ADN estimulada por factores de crecimiento tales como PDGF, FGF, EGF o ésteres de forbol pero no la estimulada por suero o insulina⁸. Asimismo, se ha podido comprobar que el bloqueo con HC-3 es más efectivo a las 4-6 horas de la adición de los factores de crecimiento¹⁰, sugiriendo con ello que el compuesto HC-3 es altamente específico en el bloqueo de algún paso específico y particular del ciclo celular. Finalmente, estudios recientes de RMN han demostrado que los niveles de fosforilcolina (PCho) se encuentran más elevados en un gran número de células de tumores de humanos y de ratones que los que se encuentran en las análogas y correspondientes células normales¹³. Todos estos resultados, conjuntamente, sugieren un papel importante de la fosforilcolina (PCho) en la regulación del crecimiento celular normal y que su alteración debe ser importante para el establecimiento de un proceso canceroso.



El mecanismo por el cual se produce el bloqueo de la síntesis de ADN por HC-3 es todavía desconocido; sin embargo, ha sido demostrado que no se lleva a cabo a nivel de receptores para factores de crecimiento, es decir, no es una consecuencia del bloqueo de receptores con actividad tirosina quinasa, ni tampoco es debido a la inhibición de otras enzimas conocidas que participan en el metabolismo fosfolipídico⁸.

El bloqueo de la producción de PCho, efecto que lleva a cabo el compuesto hemicolinio HC-3, puede ser una nueva estrategia para la inhibición específica de células tumorales transformadas por la superfamilia de oncogenes *ras* ya que se cumplen, al menos, dos aspectos importantes:

- a) La inhibición de la enzima colina quinasa es selectiva.
- b) El bloqueo de la maquinaria sintética de ADN, mediante el bloqueo de la actividad de la enzima colina quinasa, no involucra un mecanismo inespecífico de toxicidad celular, como se demuestra por el hecho de que las células, tras el tratamiento con HC-3, recuperan su capacidad sintética en presencia de suero o insulina.

Sin embargo, la actividad antimitogénica del compuesto HC-3 se logra únicamente a altas concentraciones debido a su escasa potencia como inhibidor de colina quinasa ($CI_{50} = 500\mu\text{M}$), lo que puede involucrar efectos secundarios del compuesto que se logran a dosis menores; por ejemplo, se ha descrito que el compuesto muestra también una alta afinidad por el sistema de transporte de colina y provoca una alta toxicidad respiratoria¹⁴. Todo ello hace del compuesto HC-3 un agente antitumoral imposible para el uso *in vivo*.

Pero, a pesar de los problemas de toxicidad inherentes al compuesto, los antecedentes sugieren que el compuesto HC-3 1 puede ser un excelente modelo para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales selectivos.

Nuestra intención en este trabajo es utilizar el compuesto HC-3 como base para el diseño de nuevos derivados y análogos que permitan mejorar la potencia y la selectividad de la acción inhibidora de la enzima colina quinasa y, al mismo tiempo, disminuir los efectos secundarios de toxicidad que son inherentes al bloqueo muscarínico y a la parada cardiorespiratoria provocada por el HC-3. Finalmente, también se pretende generalizar la hipótesis de que la inhibición de la producción de fosforilcolina (PCho) puede emplearse como una nueva estrategia en el diseño de fármacos antitumorales más selectivos.

El hemicolinio HC-3 es un inhibidor competitivo de la enzima ChoK debido a su homología estructural con la molécula de colina¹⁵. La estructura de la molécula de HC-3 contiene un núcleo central formado por el anillo de bifenilo que se une a dos cadenas semejantes a la colina a través de sus posiciones 4 y 4'. De acuerdo con algunos investigadores¹⁴, la forma ciclocetálica **1b**, que es preferente en disolución, es responsable de la actividad inhibitoria frente a colina quinasa.



2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

2.1.- La fosfatidilcolina como fosfolípido de membrana.

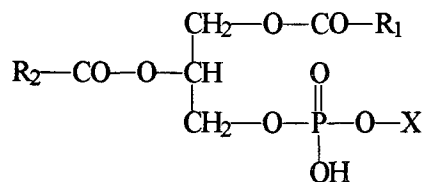
Los lípidos complejos, a diferencia de los simples, son aquellos que además de carbono, hidrógeno y oxígeno, poseen a nivel molecular nitrógeno, fósforo, azufre o un glúcido. Son moléculas constitutivas de la doble capa lipídica de las membranas citoplásmicas¹⁶, donde desempeñan un papel importante tanto estructural, como funcional¹⁷, por lo que también se les denomina lípidos de membrana.

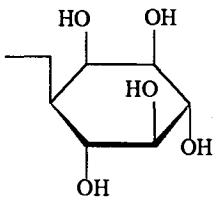
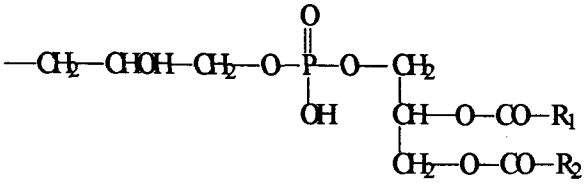
Al igual que los ácidos grasos, estos lípidos tienen un comportamiento anfipático. En contacto con el agua, los lípidos complejos se deforman formando bicapas, en las que los grupos lipófilos, quedan en la parte interior y los sustituyentes hidrófilos en la exterior, enfrentados a las moléculas de agua con la que establecen interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno¹⁸.

Los lípidos complejos se dividen en dos grandes grupos: los fosfoglicéridos y los esfingolípidos. Los primeros, también denominados glicerofosfolípidos o glicerosfosfátidos, son lípidos saponificables cuya estructura molecular deriva de la unión de un ácido fosfatídico con un alcohol o un aminoalcohol (Tabla 2.1). Dicha estructura es un éster de una molécula de ácido fosfórico con un diacilglicérido, que contiene un ácido graso saturado en C-1 y uno insaturado en C-2, con una longitud de la cadena carbonada normalmente comprendida entre 16 o 18 carbonos.

Entre los fosfolípidos que se unen a alcoholes destacan el fosfatidilinositol (PI), que contiene el polialcohol inositol y, la fosfatidilglicerina, cuyo alcohol presente es la glicerina o 1,2,3-propanotriol. Por otro lado, entre los fosfoglicéridos con aminoalcoholes es importante la fosfatidiletanolamina (PE) o cefalina, cuyo aminoalcohol es la etanolamina, que se encuentra presente en el cerebro y otros tejidos tanto animales como vegetales, la fosfatidilcolina (PC) o lecitina, cuyo componente es la colina, que se encuentra presente en la yema de huevo y, por último, la fosfatidilserina (PS) que contiene el aminoácido hidroxilado serina.

La esterificación con ácidos grasos no es la única vía para la incorporación de cadenas hidrocarbonadas en los glicerofosfolípidos. Los plasmalógenos son otro tipo de fosfolípidos en los que el grupo hidroxilo en C-1 del glicerol-3-fosfato está unido a una cadena hidrocarbonada mediante un enlace viniléter, siendo la etanolamina el alcohol que esterifica al grupo fosfato del glicerol. El tejido cardíaco de los vertebrados es rico en estos fosfolípidos; también se encuentran presentes en las membranas de las bacterias halófilas, de los protistas ciliados y de ciertos invertebrados aunque no se conoce su significación¹⁹ en dichas membranas pero se sospecha que quizás confieran resistencia a las fosfolipasas. Existe al menos un lípido de tipo éter, el denominado factor activador plaquetario (PAF), que es una hormona importante. Se libera de los glóbulos blancos, denominados basófilos, acumulando la agregación plaquetaria y la liberación de serotonina contenida en la mismas²⁰. Ejerce diversos efectos sobre el hígado, músculo liso, corazón, tejidos internos y en la respuesta alérgica.

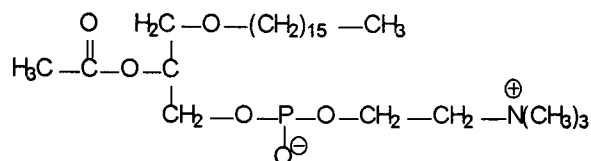
Tabla 2.1.- Los diferentes tipos de fosfoglicéridos. R_1 y R_2 representan ácidos grasos.

| X | Nombre | Carga neta |
|---|--|------------|
| —H | Acido fosfatídico | -1 |
| —CH ₂ —CH ₂ —NH ₃ [⊕] | Fosfatidiletanolamina | 0 |
| —CH ₂ —CH ₂ —N(CH ₃) ₃ [⊕] | Fosfatidilcolina | 0 |
| —CH ₂ —CH(NH ₃ [⊕])—COO [⊖] | Fosfatidilserina | -1 |
| —CH ₂ —CH(OH)—CH ₂ OH | Fosfatidilglicerol | -1 |
|  | Fosfatidilinositol | -1 |
|  | Difosfatidilglicerol o cardiolipina | -2 |

UNIVERSIDAD DE COLOMBIA

19 JUL 1967

COMISION DE DOCTORADO



Factor activador de plaquetas (PAF).

Por otra parte, aunque los glicerofosfolípidos son los lípidos más abundantes en las membranas celulares, se puede encontrar un segundo tipo de moléculas lipídicas conocidas como esfingolípidos. Estos lípidos se encuentran en todas las membranas celulares de mamíferos pero son particularmente abundantes en los tejidos del sistema nervioso. El esqueleto de los esfingolípidos es la esfingosina, alcohol de cadena larga hidrocarbonada con un grupo hidroxílico en C-1 que se enlaza al grupo que forma la cabeza polar. La formación de un enlace amídico entre el grupo amino de la esfingosina y un ácido graso origina la molécula de ceramida, precursor de todos los esfingolípidos²¹, cuyo hecho diferencial es la naturaleza de la cabeza polar que, por ejemplo, en la esfingomielina contiene fosforilcolina y por ello se considera como un fosfolípido junto a la familia de glicerofosfolípidos. En los gangliósidos, los esfingolípidos más complejos, una cadena de oligosacáridos, que contiene al menos un azúcar ácido, esta unida a la ceramida.

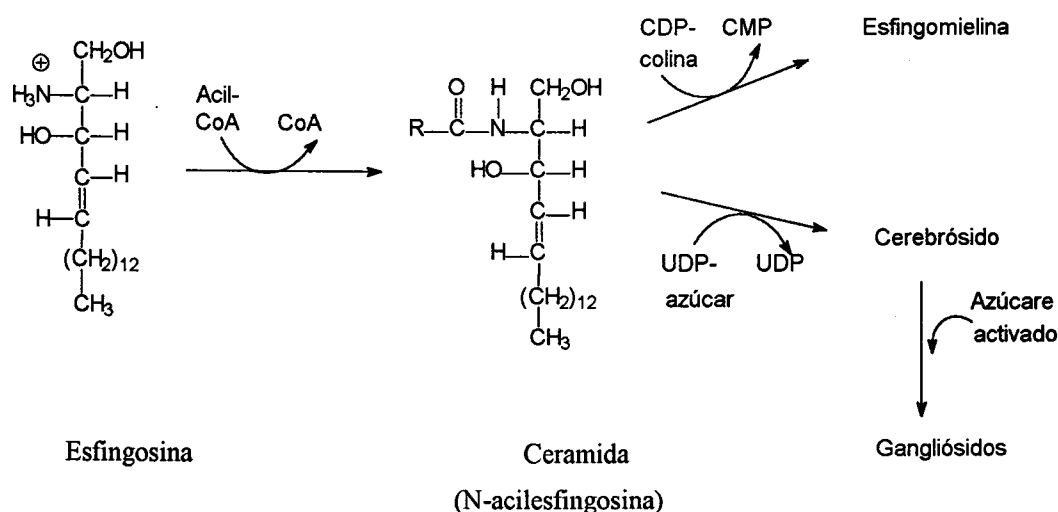


Figura 2.1.- La ceramida como precursor de los esfingolípidos.

Cuando hace un siglo el fisico-químico Thudicum descubrió los esfingolípidos, su papel biológico parecía tan enigmático como el simbolismo de la esfinge egipcia, por lo que los bautizó de este modo. En la actualidad tienen una importancia fisiológica y médica considerable ya que actúan en diversos procesos de reconocimiento celular, a nivel de membrana, tales como los diferentes antígenos de los grupos sanguíneos humanos o el carácter receptorial frente a ciertas hormonas glucoproteicas pituitarias o la toxina colérica. Hoy día existen muchas pruebas de que los gangliósidos son determinantes específicos del reconocimiento intercelular por lo que probablemente tienen un papel importante en el crecimiento y en la diferenciación de los tejidos y, por consiguiente, en la carcinogénesis.

2.2.-Biosíntesis de fosfolípidos: Síntesis *de novo* de fosfatidilcolina.

La fosfatidilcolina, componente mayoritario de los fosfolípidos de membrana de células de eucariotas, funciona como reservorio de moléculas cuya misión es la transducción de señales en diferentes tipos celulares²²⁻²⁴. Debido a ello, en estos últimos años, se han intensificado mucho los estudios del metabolismo y regulación de los diferentes fosfolípidos, debido a su importancia y relevancia en el esclarecimiento de diversas rutas biosintéticas.

Dentro de la célula, los fosfolípidos se generan *de novo* a partir de precursores que siguen rutas metabólicas muy precisas. Estos precursores pueden ser simples, como es el caso de los aminoalcoholes colina y etanolamina, o complejas, como la fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina.

En la biosíntesis de fosfatidilcolina se han descrito tres rutas metabólicas diferentes. La primera ruta está descrita solo en bacterias y algunas levaduras como *Saccharomices cervisiae*²⁵⁻²⁶. Comienza con la descarboxilación del fosfoglicérido fosfatidilserina (PS) que se forma por condensación del citidildifosfato diacilglicerol (CDP-diacilglicerol) y serina, formando así la fosfatidiletanolamina (PE) (Fig 2.2). Una ruta alternativa es una reacción de intercambio del grupo de cabeza mediante el desplazamiento de la serina por la etanolamina mediante la acción de la fosfatidiletanolamina-serintransferasa.

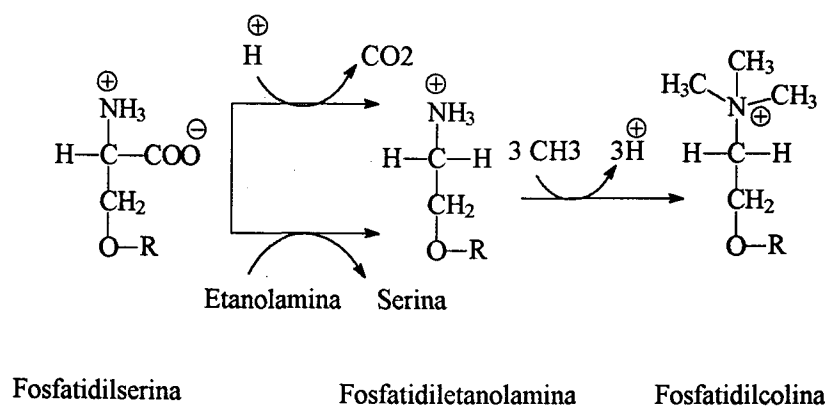


Figura 2.2.- Biosíntesis de PC a partir de PE, donde R representa el ácido fosfatídico.

La reacción de descarboxilación está catalizada por una descarboxilasa asistida con fosfato de piridoxal. Esta enzima está presente en microorganismos procariotas y levaduras, de tal modo que los mamíferos son incapaces de utilizarla. La fosfatidiletanolamina resultante sufre tres metilaciones sucesivas por la acción de la metiltransferasa formando así la fosfatidilcolina (PC). El donador de los grupos metilo es la S-adenosilmetionina (SAM)²⁷⁻²⁸, que se forma por la acción de la metionina adeniltransferasa, en un proceso donde el átomo de azufre de la metionina ataca al carbono 5' del ATP, desplazando el grupo trifosfato que se une a la enzima y rápidamente se hidroliza a ortofosfato y pirofosfato.

La segunda ruta de biosíntesis comienza con la formación de fosforilcolina (PCho) a partir de la colina (Cho). Esta reacción está catalizada por la enzima colina quinasa (Fig. 2.3). La fosforilcolina obtenida reacciona con el trifosfato de citidina (CTP) para formar citidildifosfocolina (CDP-colina), la forma activada de la colina. Esta reacción está catalizada por la enzima fosfocolina citidil transferasa y se encuentra favorecida por la hidrólisis del pirofosfato (PPi). El fragmento fosforilcolina activado se transfiere al diacilglicerol (DAG) para generar la fosfatidilcolina en un proceso catalizado por la enzima colina fosfatidil transferasa^{26,29}.

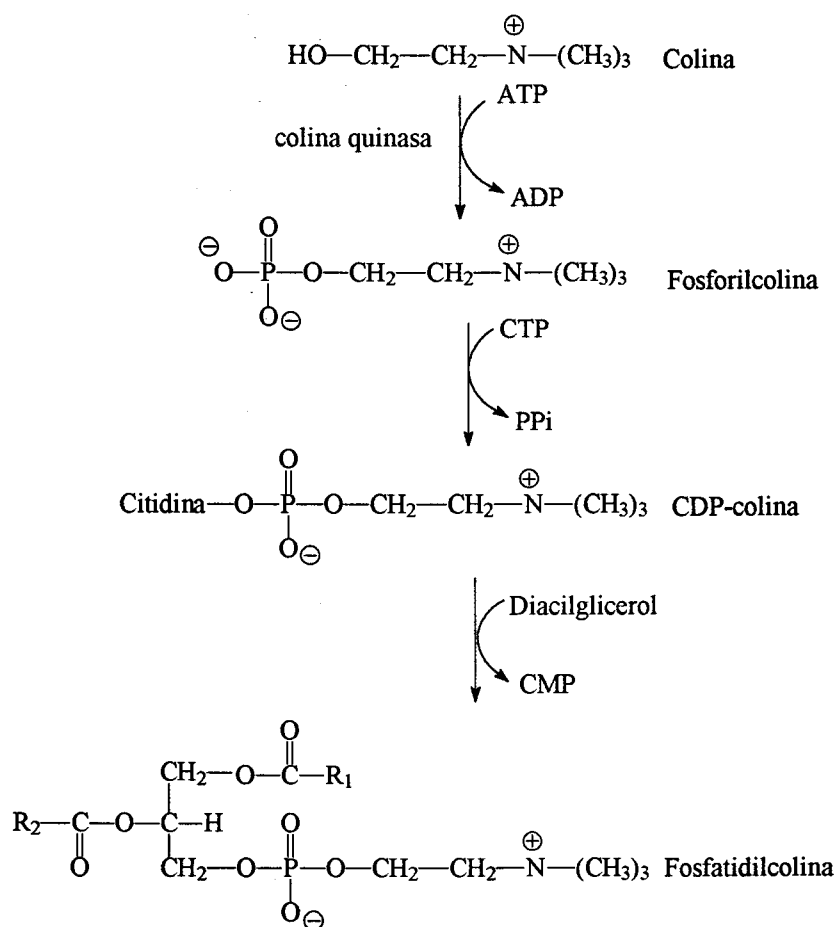


Figura 2.3.- Biosíntesis de PC a partir de la colina. R_1 y R_2 representan ácidos grasos.

En la tercera ruta se parte de fosfatidiletanolamina como metabolito de partida. El grupo amino de este fosfoglicérido se metila también tres veces consecutivas formando fosfatidilcolina, siendo de nuevo la S-adenosilmetionina el sustrato donador de los grupos metilo³⁰. La fosfatidiletanolamina puede sintetizarse, a su vez, a partir de la etanolamina por una serie de reacciones análogas a la fosfatidilcolina, que origina un intermediario CDP-etanolamina, o mediante una vía alternativa que parte de PS e intercambia, mediante catálisis enzimática, el fragmento de serina por etanolamina en el fosfolípido (Fig. 2.2).

Los microorganismos procariontes o eucariontes pero no así los mamíferos, utilizan una ruta u otra para sintetizar la PC. Las bacterias pueden utilizar cualquiera de las tres rutas metabólicas en función de los constituyentes del medio de cultivo donde crecen. En los mamíferos, la segunda ruta es la vía preferente para la síntesis de la fosfatidilcolina en todos los tejidos. El hígado es el único tejido donde se han detectado cantidades significativas de PC que provienen de la vía de metilación de PE³¹. No obstante, también se ha detectado actividad metiltransferasa en fosfolípidos de tejidos no hepáticos, aunque es extremadamente inferior a la actividad de enzimas correspondientes a la ruta CDP-colina³². Las levaduras, que son microorganismos eucariotas, al contrario de los mamíferos, utilizan la ruta de metilación de la PE como vía principal de síntesis de PC y la ruta de CDP-colina como vía accesoria.

2.3.- Papeles biológicos de la colina quinasa.

2.3.1.- La colina quinasa en la síntesis de fosfatidilcolina.

La colina quinasa es una enzima de la familia de las quinastas, que desempeñan en el organismo muchos papeles importantes tales como la señalización de mensajes, activación o desactivación de proteínas, etc. En definitiva, las quinastas son aquellas enzimas que catalizan la transferencia de grupos fosfato desde un nucleótido como el ATP a alguna molécula aceptora (un azúcar, proteína o un intermediario metabólico) o bien de un intermediario rico en energía al ADP.

La colina quinasa es la enzima que cataliza la primera etapa de la ruta de los nucleótidos (CDP-colina), a través de la que se incorpora colina dentro de la PC. Dicha enzima, presente en casi todos los tejidos, fue inicialmente descrita por Witenberg y Kornberg³³ en 1953 y posteriormente, fue Kennedy³⁴ quien la situó en la ruta metabólica de la síntesis de PC.

Algunos autores consideran que la reacción de la colina quinasa es la etapa limitante en la biosíntesis de PC, junto a la de CTP-fosfocolina citidil transferasa³⁵. Sin embargo muchos trabajos han llevado a otros autores³⁶ a considerar a la segunda enzima como etapa limitante,

puesto que la fosforilación de la colina está estrechamente vinculada con su transporte a través de la membrana. Posteriormente, se ha descrito que la reacción correspondiente a la etapa limitante depende de la concentración extracelular de colina^{26,37}.

2.3.2.- La colina quinasa en la transducción de señales

2.3.2.1.- Biología molecular del cáncer

El cáncer es una patología mixta ya que está producida por agentes externos pero tiene también una componente genética de base. Hoy día existen tres tipos de agentes carcinogénicos probados³⁸: químicos (entre los que se encuentran algunos componentes de los alimentos), físicos (radiaciones diversas) y biológicos (algunos virus).

El desarrollo tumoral requiere la interacción de varias alteraciones genéticas, es decir, es un proceso múltiple que incluye, además, factores no genéticos. Las células normales y sanas viven en un condominio complejo e interdependiente en el que unas regulan la proliferación de otras. Las células normales sólo se dividen cuando reciben instrucciones adecuadas que les envían otras células vecinas. Tal colaboración permanente asegura que cada tejido mantenga el tamaño y la arquitectura adecuada a las necesidades del cuerpo. Las células cancerosas vulneran este esquema, ignoran los controles normales de proliferación y siguen sus propias instrucciones internas de reproducción³⁹.

Se sabe que las células de un tumor descienden de una célula ancestral común que, en algún momento, generalmente décadas antes de que el tumor se manifieste, inició un programa de reproducción indebido. La transformación maligna de una célula acontece después, por acumulación de mutaciones en unos genes específicos. Estos genes son la clave para entender las raíces del cáncer. Un gen cifra una secuencia de aminoácidos, que deben unirse entre sí para formar una proteína particular, que es la que finalmente realiza el trabajo del propio gen, de tal modo, que cuando éste se activa la propia célula responde sintetizando la proteína cifrada. Las mutaciones génicas que cambian la cantidad o la actividad del producto proteico, pueden perturbar

el funcionamiento de la célula, conduciendo a trastornos en la proliferación descontrolada que caracteriza a los procesos tumorales⁴⁰.

Tabla 2.2.- Algunos oncogenes implicados en cánceres humanos.

| | |
|---|--|
| Genes de factores de crecimiento o sus receptores | |
| <i>PDGF</i> | Cifra el factor de crecimiento derivado de plaquetas. Implicado en los gliomas (un cáncer de cerebro) |
| <i>erb-B</i> | Cifra el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Implicado en el glioblastoma (un cáncer de cerebro) y en el cáncer de mama |
| <i>erb-B2</i> | También denominado <i>HER-2</i> o <i>neu</i> . Cifra un receptor de factor de crecimiento. Implicado en cánceres de mama, glándulas salivales y ovario |
| <i>RET</i> | Cifra un receptor de factor de crecimiento. Implicado en el cáncer de tiroides |
| Genes de proteínas transmisoras citoplasmáticas de cascadas de señales estimuladoras | |
| <i>Ki-ras</i> | Implicado en cánceres de pulmón, ovario, colon y páncreas |
| <i>N-ras</i> | Implicado en leucemias |
| Genes de factores de transcripción que activan a genes que promueven el crecimiento | |
| <i>c-myc</i> | Implicado en leucemias y cánceres de mama, estómago y pulmón |
| <i>N-myc</i> | Implicado en neuroblastoma (cánceres de neuronas) y glioblastomas |
| <i>L-myc</i> | Implicado en el cáncer de pulmón |
| Genes para otros tipos de moléculas | |
| <i>Bcl-2</i> | Cifra una proteína que, en situación de normalidad, bloquea el suicidio celular. Implicado en linfomas de células B |
| <i>Bcl-1</i> | También denominado <i>PRADI</i> . Cifra la ciclina D1, un componente estimulador del reloj del ciclo celular. Implicado en cánceres de mama, cabeza y garganta |
| <i>MDM2</i> | Cifra un antagonista de la proteína supresora de tumores p53. Implicado en sarcomas (cánceres de tejido conjuntivo) y otros tumores. |

En la iniciación del cáncer desempeñan un papel fundamental dos clases de genes, que en conjunto constituyen sólo una pequeña proporción de toda la dotación génica del individuo. En sus versiones normales, controlan el ciclo vital de la célula, esto es, la compleja secuencia de

eventos que hacen que una célula crezca y se divida. Los protooncogenes activan el crecimiento, mientras que los genes supresores de tumores lo inhiben. Considerados en su conjunto, estos dos tipos de genes son responsables, en buena medida, de la proliferación celular incontrolada que se observa en los tumores humanos. Cuando mutan, los protooncogenes pueden transformarse en oncogenes carcinogénicos capaces de dirigir una multiplicación desenfrenada. Las mutaciones pueden hacer que el protooncogén produzca un exceso de proteína estimuladora del crecimiento o una forma hiperactiva de la misma. Los genes supresores de tumores, por el contrario, contribuyen al cáncer cuando las mutaciones los silencian⁴¹.

Tabla 2.3.- Algunos genes supresores implicados en cánceres humanos

| | |
|---|--|
| Genes de proteínas citoplasmáticas | |
| <i>APC</i> | Implicado en cánceres de colon y estómago |
| <i>DPC4</i> | Cifra una molécula transmisora de un cascada de señales que inhiben la división celular. Implicado en cánceres de páncreas |
| <i>NF-1</i> | Cifra una proteína que inhibe a una proteína estimuladora (<i>Ras</i>). Implicado en neurofibromas, feocromocitomas (cánceres del sistema nervioso periférico) y leucemia mieloide |
| <i>NF-2</i> | Implicados en meningiomas, epindimomas (cánceres de cerebro) y schwannomas (afectan a los revestimientos de los nervios periféricos) |
| Genes de proteínas nucleares | |
| <i>MTS1</i> | Cifra la proteína p16, uno de los componentes-freno del reloj del ciclo celular. Implicado en muchos cánceres |
| <i>RB</i> | Cifra la proteína pRB, uno de los frenos principales del ciclo celular. Implicado en retinoblastomas y cánceres óseos, de vejiga, pulmón y mama |
| <i>p53</i> | Cifra la proteína p53 que puede detener la división celular e inducir a las células anormales a suicidarse. Implicado en muchos cánceres |
| <i>WT1</i> | Implicado en tumor de Wilms (riñón) |
| Genes de proteínas cuya localización celular no esta determinada | |
| <i>BRCA1</i> | Implicado en cáncer de mama y ovario |
| <i>BRCA2</i> | Implicado en cáncer de mama |
| <i>VHL</i> | Implicado en cánceres de células renales |

Actualmente se conocen más de cien genes (Tablas 2.2 y 2.3) relacionados con la aparición de tumores humanos. Estos genes pueden clasificarse, en función del mecanismo de acción, en cuatro categorías diferentes:

- a) Oncogenes, cuya mutación indica la aparición de una proteína con actividad constitutivamente activada.
- b) Genes supresores, que participan en la regulación negativa del crecimiento y la mutación transformante genera su inactivación o pérdida de expresión.
- c) Genes reparadores, cuya misión es la vigilancia para la correcta reparación de las mutaciones en el genoma, debido a factores exógenos.
- d) Genes desconectores o interruptores, cuya función es la interrupción de las señales mitogénicas mediante la inactivación específica de enzimas claves en la activación mitogénica.

Tan sólo dos décadas de investigación nos han permitido conocer tales funciones genéticas con una claridad y detalle sin precedentes. Para que un tumor se desarrolle, deben ocurrir mutaciones en media docena o más de genes que controlan el crecimiento de las células fundadoras.

Ultimamente se han detectado, además, algunos genes y proteínas implicados en los fenómenos invasivos, tan característico de las células cancerosas, que permiten específicamente que una célula que prolifera se torne invasiva y se disemine por todo el cuerpo (metástasis)⁴². De todos modos, todavía quedan muchos procesos por conocer, especialmente la pérdida de la capacidad de respuesta inmunológica del organismo frente a las células transformadas.

2.3.2.2.- Protooncogenes y oncogenes

En las últimas décadas se ha producido un avance espectacular en el conocimiento de las bases moleculares, genéticas y bioquímicas del proceso tumoral. Este gran avance ha sido posible, fundamentalmente, por el estudio de los oncogenes y sus oncoproteínas de señalización.

Los oncogenes (del griego onkos, masa o tumor) se descubrieron originalmente en el genoma de los virus tumorales, como los genes responsables de la capacidad del virus (en concreto el RSV, virus del sarcoma de Rous) de producir tumores *in vivo*⁴³. El RSV es un virus bastante sencillo que posee únicamente cuatro genes, tres de ellos codifican proteínas esenciales para el virus, mientras que el cuarto es el gen que codifica la proteína oncogénica PP 60src (del griego sarcios, carne). En 1976, Michael Bishop y Harold Varmes, mediante estudios de hibridación demostraron que el gen del retrovirus no era sino una copia ligeramente alterada de un gen de origen celular, presente en pollos no infectados, habiendo sido transducido por el virus a partir del genoma del huésped; en el proceso se altera, convirtiéndose en un gen transformado. El gen mutado se denominó oncogén y el gen normal del cual procede proto-oncogén.

Dicho descubrimiento dio lugar a la formulación de una hipótesis según la cual los tumores humanos espontáneos, en cuya génesis no intervienen los virus, podrían contener genes celulares alterados de forma semejante a como les ocurre durante la transducción vírica siendo dichos genes los responsables de la tumorigénesis. Esta hipótesis se vio confirmada en 1982⁴⁴ con el aislamiento del primer oncogén celular a partir de DNA de células tumorales humanas, utilizando la técnica de transfección. El análisis de este gen, aislado de un carcinoma de vejiga humana y cuya única mutación puntual consistía en un cambio de la glicina en la posición 12 por valina, demostró que se trataba de un miembro de la familia *ras*, el cual se había encontrado anteriormente en el retrovirus de los múridos que induce la aparición de tumores en los roedores.

En consecuencia, las claves para entender el papel que desempeñan los protooncogenes mutados en el desarrollo del cáncer vienen dadas por el estudio de las funciones celulares que ejercen en condiciones de normalidad, es decir, como genes no mutados. Además, los protooncogenes son prácticamente idénticos en todos los organismos, lo que demuestra su importante papel fisiológico y, por otra parte, como norma general todos los oncogenes conocidos intervienen en el control de la proliferación celular, bien sean dominantes o recesivos según su aspecto funcional.

Si queremos comprender cómo interfieren los oncogenes en los procesos normales de la división celular hemos de entender en primer lugar dichos procesos. En los organismos pluricelulares el crecimiento y la proliferación celular son procesos sometidos a un control estricto y complejo cuyo objetivo es mantener el equilibrio entre proliferación, diferenciación y muerte celular. Este control es ejercido en gran parte por polipéptidos de bajo peso molecular, denominados genéricamente factores de crecimiento, aunque dentro de este grupo de proteínas se incluyen factores que inducen diferenciación celular e inhibidores del crecimiento.

Algunos factores de crecimiento son específicos de ciertos tipos celulares y estimulan la división tan sólo de aquellas células que poseen receptores apropiados; otros factores de crecimiento tienen efectos más generalizados. Entre los factores de crecimiento bien estudiados se hallan el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la eritropoyetina y una familia de proteínas denominadas linfoquinas, a las que pertenecen las interleuquinas (ILs) y el interferón. Existen también factores extracelulares que antagonizan los efectos de los factores de crecimiento, frenando o impidiendo la división celular, como el factor de crecimiento transformante (TGF) y el factor de necrosis tumoral (TNF)⁴⁵.

La comunicación entre las células puede producirse mediante un sistema endocrino, donde la célula secretora está distante de la célula efectora, como ocurre en el sistema hormonal. Un segundo sistema es el denominado paracrino, en el que las células secretoras y efectoras están muy próximas entre sí, como son los sistemas de comunicación neuronal o neurona-musculo. En el sistema autocrino las funciones de la célula secretora y efectora son asumidas por la misma célula, como es el caso de células transformadas por oncogenes de la familia de factores de crecimiento. Por último, el sistema denominado yustracrino consiste en la interacción entre dos células mediante receptores para factores de crecimiento en la superficie de la célula efectora que interaccionan con factores expuestos en la superficie de la célula secretora mediante un anclaje semejante al utilizado por los receptores de superficie. Un ejemplo de este último sistema lo constituye el factor EGF con el TGF.

En consecuencia, tanto los factores estimuladores como inhibidores del crecimiento ejercen sus efectos vía receptores específicos, presentes en la superficie de la célula diana, a los que se unen con alta afinidad y de forma reversible. Esta unión desencadena una serie de procesos bioquímicos, que se denominan genéricamente como transmisión de señales, que culminan con la expresión de genes específicos cuyos productos determinan las respuestas o fenotipo celular.

Las proteínas codificadas por muchos oncogenes son análogas a varios factores de crecimiento o diversos componentes del sistema hormonal, con lo cual participan de igual modo o utilizan mecanismos similares en la transmisión de señales desde el exterior celular hasta los sitios más recónditos del interior de la célula. Cuando un factor estimulador del crecimiento se une a un receptor, éste transmite una señal de proliferación a otras proteínas presentes en el citoplasma. A su vez, estas proteínas emiten señales estimuladoras a toda una cadena de proteínas distintas, en una cascada que acaba en el corazón de la célula, su núcleo. En dicho lugar, otras proteínas, los factores de transcripción, responden activando a un conjunto de genes que son los que coadyuvan a que la célula entre en su ciclo de crecimiento.

El primer oncogén del que se dilucidó su función, denominado *sis* por encontrarse presente en el genoma del virus del sarcoma de los simios, corresponde al factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo B (PDGF-B) que constituye uno de los factores de crecimiento mayoritario de la sangre en humanos y es un potente agente mitogénico de células del tejido conectivo y células gliales en cultivo. El oncogén *v-sis*, derivado del protoocogen *c-sis* que codifica la cadena B del PDGF y que ha sido transducido por el virus a partir del huésped incorporándolo a su genoma, produce una proteína P 28 que resulta prácticamente idéntica a una de las dos subunidades del PDGF⁴⁶. Por consiguiente, el crecimiento incontrolado de las células infectadas por el virus del sarcoma símico puede ser consecuencia de la presencia continua e inapropiada de este homólogo del PDGF. Se trata, en consecuencia de un mecanismo oncogénico mediante un funcionamiento autocrino directo que también se ha detectado en otros oncogenes tales como *hst*, *put*, *fgf*, etc., siendo productores de entidades semejantes a los propios factores de crecimiento⁴⁷.

Otros, en cambio, codifican proteínas señalizadoras que tienen una estructura molecular más o menos compleja que pueden inducir un dominio catalítico con actividad enzimática semejante a los receptores de los propios factores de crecimiento. Dichos receptores transmembranales, con actividad enzimática proteína-tirosina quinasa, tienen una topología semejante con tres dominios fundamentales: a) Dominio extracelular glicosilado, normalmente rico en residuos de cisteína, probablemente implicado en conferir una estructura tridimensional que constituye el sitio de unión del ligando; b) Un dominio transmembranal formado por aminoácidos hidrofóbicos que cruza la membrana y que conecta el dominio de unión del ligando con el sistema intracelular y; c) Dominio citoplasmático que contiene fundamentalmente el dominio catalítico tirosina quinasa, constituido por unos 250-300 aminoácidos que pueden alinearse de forma que se distinguen once subdominios conservados en todas las quinasas, intercalados con regiones de diversidad. Esta organización puede permitir una estructura tridimensional glomerular en la cual las regiones variables se pliegan permitiendo que las zonas conservadas se sitúen próximas entre sí, constituyendo el sitio activo⁴⁸.

Hoy en día se conocen numerosos receptores susceptibles de alteración oncogénica entre los que destacan los oncogenes *erb-B*, receptor del EGF; *fms*, receptor para el factor estimulante de la formación de colonias de macrófagos (M-CSF-1); *mas*, receptor de péptidos adrenérgicos, y *trk*, receptor para el factor de crecimiento neuronal NGF. Diversas alteraciones estructurales o funcionales explican el mecanismo de activación. En efecto, el oncogén *v-erb B* codifica una versión truncada del receptor del EGF que carece de dominio de fijación para el mismo pero que conserva el segmento transmembranal y el dominio de la proteína quinasa; de tal modo que las proteínas quinasas codificadas por el oncogén fosforilan de forma incorrecta a las proteínas diana reconocidas normalmente por los receptores EGF, llevando de ese modo a las células afectadas a un estado de proliferación desenfrenada.

Existen otros oncogenes, que codifican proteínas quinasas que no presentan las características de receptores y que se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo a que fosforilen residuos de tirosina o de serina-treonina. El arquetipo de este primer grupo es el oncogén *src* (además del *lck*, *fyn*, *fps*, *yes*, *fgr*, etc.), que codifica una proteína, de 60 KDa de peso molecular,

con actividad tirosina quinasa. Células transformadas por el virus del sarcoma de Rous (RSV) poseen niveles elevados de (7-10 veces) de fosfotirosina, afectando una gran variedad de proteínas de diferente naturaleza, incluyendo proteínas estructurales (vinculina), enzimáticas (fosfoglicerato mutasa, lactato deshidrogenasa) y otras de naturaleza desconocida.

En la familia de oncogenes con actividad serina-treonina quinasa, destaca por su relevancia el efector del gen *raf* necesario para la regulación del crecimiento de células normales, además de otros menos estudiados, tales como *mos*, *pim*, *cot*, *akt*, etc. Existen múltiples evidencias bioquímicas y genéticas según las cuales *raf* es el eslabón siguiente a *ras* en la cadena de transmisión de señales en una variedad de sistemas biológicos. Hace unos pocos años se ha demostrado que esta asociación requiere que la proteína Ras esté unida a guanosina trifosfato (GTP) y que el dominio efector de Ras esté intacto, con objeto de activar Raf, que conecta con la cascada de quinastas de la proteína que activa la mitosis (MAPK / MEK), que a su vez fosforilan y activan algunos productos de genes nucleares correspondientes a factores de transcripción involucrados en la modulación de la expresión génica.

Por último, tenemos los productos de los genes nucleares (*ets*, *vel*, *ski*, *evi-1*, etc.), blanco final de la vía de señalización, como factores de transcripción o los productos de genes de inducción temprana por factores de crecimiento (*fos*, *jun*, *myc*)⁴⁹⁻⁵², pudiendo activarse oncogénicamente mediante alteraciones estructurales que estimulan constitutivamente su capacidad de regular la transcripción génica o por medio de una sobreexpresión.

Ahora bien, antes de pasar al próximo apartado, hemos de señalar que uno de los productos oncogénicos más estudiados por su relación con la producción de tumores en humanos corresponde al oncogén *ras*⁵³⁻⁵⁵, con incidencia de aparición variable dependiendo del tipo de tumor (30% en carcinomas pulmón, 50% en cancer de colón⁵⁶ y un 90% en cancer de páncreas⁵⁷). Los genes *ras* codifican proteínas de 188-189 aminoácidos (21KDa) con capacidad de unir e hidrolizar GTP, siendo su forma activa el complejo [p21-*ras*-GTP] y su forma inactiva [p21-*ras*-GDP], comportándose como un interruptor molecular. La inactivación de la proteína se produce como consecuencia de una baja actividad intrínseca GTPasa, que es estimulada (100-200 veces)

por proteínas activadoras G (GAP) o a través de la molécula adaptadora Grb-2 y el intercambiador de nucleósidos Sos.

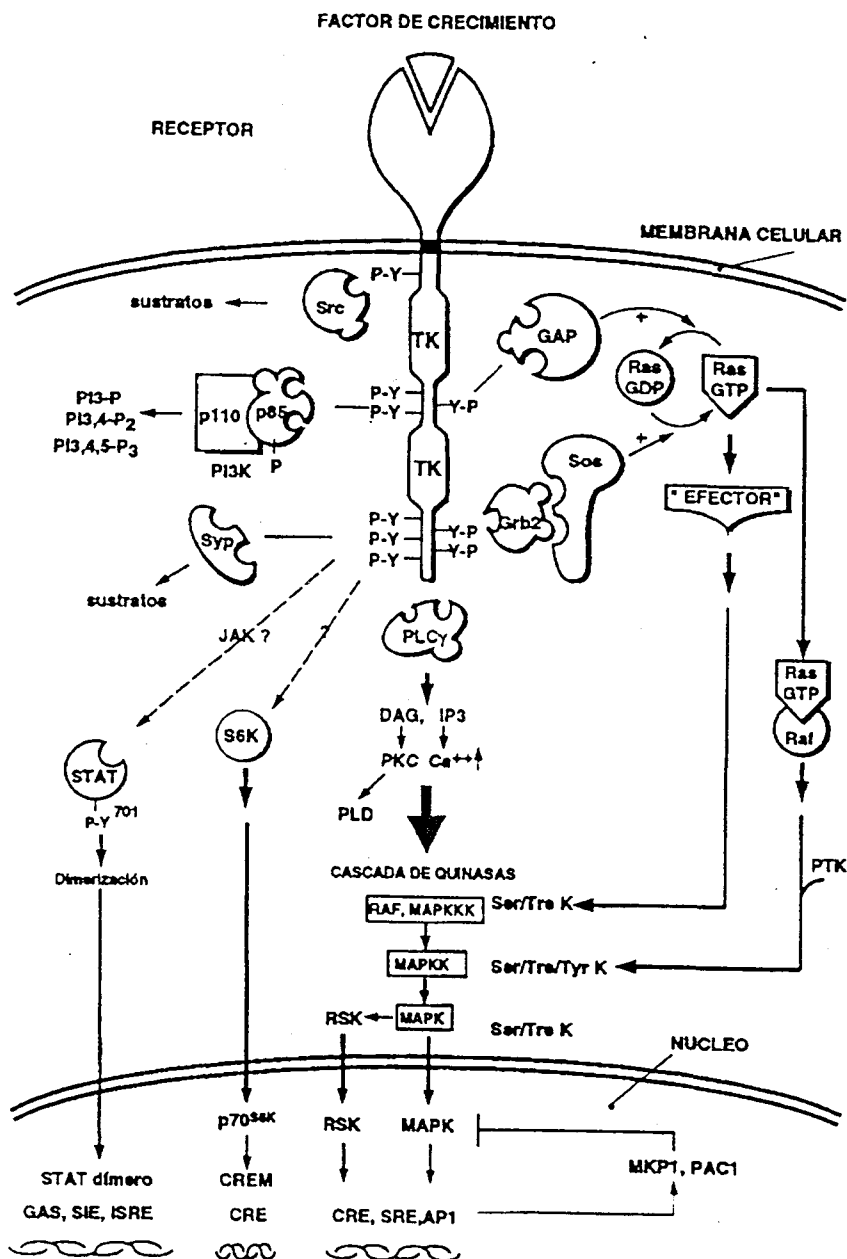


Figura 2.4.- Señalización por receptor tirosina quinasa. Representación de algunas de las vías mejor conocidas de conexión entre el exterior celular y el núcleo.

En ausencia de estímulo extracelular el receptor está defosforilado y Ras se encuentra unido a GDP en su forma inactiva. En estas condiciones la molécula Grb-2 se encuentra en el citoplasma unida a Sos. Ahora bien, con la activación del receptor EGF tiene lugar la fosforilación de residuos de tirosina, al cual se une el complejo Grb-Sos o proteínas acopladoras activadas GAP, a través del dominio SH2 del adaptador. Como consecuencia de dicha unión, el complejo es translocado a la membrana induciendo el intercambio del GDP unido a Ras por GTP, dando lugar a la formación del complejo activando el efector Raf que ejecuta la etapa siguiente de la vía de señalización, conectando con la cascada MAP quinasas. La cascada de quinasas citoplasmáticas tiene tres componentes: una serina/treonina quinasa denominada MAPKKK, que fosforila y activa a una serina/treonina/tirosina quinasa MAPKK o MEK, la cual a su vez fosforila y activa a otra serina/treonina quinasa MAPK o ERK, translocándose al núcleo y fosforilando factores de transcripción involucrados en la modulación de la expresión génica (Elk-1, Jun quinasa JNK), o a la quinasa responsable de la proteína S6 (S6K) de la unidad 40S ribosómica o a la familia de quinasas dependientes de Ca^{2+} y fosfolípidos (PKC)⁵⁸.

Dado el papel central que, como hemos visto juega la proteína Ras en cuya activación convergen multitud de señales proliferativas⁵⁹ y de diferenciación celular, la activación constitutiva de p21-*ras* parece ser pieza clave como intermediaria en rutas de transducción de señales⁶¹⁻⁶², convirtiéndola en un oncogén muy frecuente en diversos tumores humanos y por ello es objeto de constantes trabajos que tienden a describir su modo de acción⁶³⁻⁶⁴.

2.3.2.3.- El oncogén *ras* en el metabolismo de fosfolípidos.

Los fosfolípidos forman la bicapa lipídica de la membrana citoplásmica desempeñando así un importante papel estructural; sin embargo, también pueden tener un papel funcional como reserva de mensajeros intracelulares que amplifican o llevan la señal inicial a los siguientes eslabones de la cascada de señalización. Los fosfolípidos son la diana de varias fosfolipasas específicas. Estas últimas cumplen en la naturaleza dos clases de funciones: muchas de ellas son enzimas digestivas presentes a altas concentraciones, en el jugo intestinal, en secreciones bacterianas o en diversos venenos y también participan en las cascadas enzimáticas que generan

lípidos muy activos o transducen señales. A título de ejemplo, la fosfolipasa A2 (PLA2) libera araquidonato, un precursor de las prostaglandinas, mientras que la fosfolipasa C (PLC) participa en la cascada del inositol trifosfato.

En la ruta biosintética de PC, la primera enzima de la cadena metabólica es la colina quinasa, responsable de la fosforilación de colina (Cho) en fosforilcolina (PCho). En un trabajo de Warden y Friedkin⁶⁵ se ha demostrado que el incremento en la biosíntesis de PC en células mitogénicas, es debido al incremento en la actividad de la colina quinasa. Posteriormente, en otros trabajos⁶⁶⁻⁶⁷ se ha correlacionado el incremento de la actividad colina quinasa con la expresión del oncogén *ras* que puede ser responsable de los elevados niveles de PCho en células transformadas por *ras*.

Existe una excelente revisión bibliográfica de Del Peso y cols.⁶⁸ en la que se relaciona la actividad del oncogén *ras* con el metabolismo de glicerofosfolípidos, particularmente con la fosfatidilcolina (PC). En este trabajo, los autores ponen de manifiesto la existencia de una nueva vía absolutamente necesaria para la respuesta mitogénica a determinados factores de crecimiento.

La regulación de la proliferación celular está mediada por la generación de segundos mensajeros intracelulares que amplifican y llevan la señal inicial a los siguientes eslabones de la cascada de señalización. Muchos de estos segundos mensajeros son moléculas derivadas de fosfolípidos. Así, tras la unión de factores de crecimiento a los receptores con actividad tirosina quinasa, se produce la activación de varias fosfolipasas. Una de las primeras fosfolipasas en activarse, tras la adición de estímulos mitogénicos, es la fosfolipasa C- γ (PLC γ) que es capaz de hidrolizar fosfatidilinositol, liberando inositol-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG); ambas moléculas desempeñan un papel importante como segundos mensajeros en la transducción de señales mitogénicas⁶⁹. También se comprobó que, tras el primer pico de producción de DAG, se produce una segunda elevación de los niveles de DAG, con mayor duración que la primera que al no estar asociada con la aparición de IP₃, no proviene de la hidrólisis de PI. Posteriormente se ha demostrado que este DAG proviene fundamentalmente de la PC, componente mayoritario de

las membranas de células de mamíferos y, por tanto, está presente en cantidad suficiente como para ser la fuente de DAG durante un período prolongado de tiempo sin que se altere la composición de la membrana⁷⁰.

Los factores de crecimiento no son los únicos factores capaces de inducir la elevación en los niveles de DAG. De forma paralela, se ha descrito que los niveles de DAG en células transformadas por *ras* y *src* son también elevados y que la fuente de este DAG es de nuevo PC⁴. Lacal y cols. han propuesto que la formación de DAG a partir de PC puede seguir dos rutas distintas. Una de estas rutas implica a una PC-PLC que da lugar a la liberación de DAG y PCho. La otra es más compleja e implica la acción secuencial de una fosfolipasa D, específica de PC (PC-PLD), que da lugar a colina (Cho) y ácido fosfatídico (PA), que se convierten, respectivamente en PCho y DAG por la acción de la colina quinasa y la PA-fosfatasa. Así, se ha descrito que en células de mamíferos transformadas por el oncogén *ras* se observa una elevación constitutiva de los niveles de PA y DAG como consecuencia de la activación constitutiva de una PC-PLD. Además, estas células transformadas por *ras* muestran niveles elevados de PCho, que no parece provenir de la acción de PC-PLC sino de la colina derivada de la actividad PLD, seguida de la acción de la enzima colina quinasa.

Especialmente interesante para nuestro objetivo es el siguiente hecho: el tratamiento de la células transformadas por *ras* con hemicolinio HC-3, el único inhibidor conocido de colina quinasa hasta 1994, produce una disminución de los niveles elevados de PCho y provoca una acumulación de colina, demostrando que, efectivamente, la concentración elevada de PCho proviene de colina fosforilada a través de la colina quinasa. Este descubrimiento es muy relevante porque pone de manifiesto un nuevo efector del oncogén *ras*: la PLD⁹.

Recientemente, Carnero y Lacal⁷¹ han demostrado que en células diferentes de los de mamíferos, como en oocitos de *Xenopus laevis*, la microinyección de la proteína purificada p21-*ras* activa la PC-PLD y, al mismo tiempo, se provoca la maduración del oocito.

Por lo tanto, diversos factores que inducen mitosis tales como factores de crecimiento y oncogenes, activan una PC-PLD. Además, la adición de PC-PLD purificada sobre células en cultivo, induce la entrada a la fase de síntesis de DNA, sugiriendo que es probable que la PC-PLD y, por consiguiente, los productos derivados de su acción sobre PC, tengan importancia en la transducción de señales que llevan a la mitogénesis.

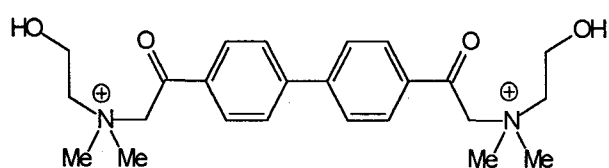
2.4.- Inhibidores de la colina quinasa.

Existen muchos trabajos en la literatura sobre la colina quinasa. La mayoría de ellos tratan aspectos biológicos, desde la purificación de la proteína hasta estudios de cinética enzimática, en los que se ha utilizado siempre el hemicolinio 1 como inhibidor competitivo y específico. Sin embargo, hay pocas referencias sobre inhibición de la colina quinasa con otros fármacos diferentes al hemicolinio.

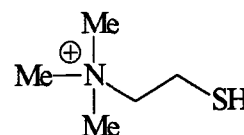
En 1974, Ansell y Spanner⁷² describieron que el hemicolinio tiene una acción inhibidora sobre esta enzima. Trabajos posteriores^{15,73}, confirmaron esta inhibición con otros tipos celulares. En estudios cinéticos realizados sobre la inhibición enzimática de dicha enzima se citan algunos otros inhibidores⁷⁴; dichos compuestos son análogos de los propios sustratos de la enzima, tales como la tiocolina 2, isómera de la colina o, el Adenosina 5'-[β , γ -imido] trifosfato de tetralitio (AMP-PNP) 3, que es un análogo no hidrolizable de ATP. Recientemente, se ha encontrado que el compuesto H-89 4, descrito⁷⁵ inicialmente como inhibidor selectivo de la proteína quinasa A, es también inhibidor de la colina quinasa⁷⁶.

El hemicolinio (HC-3) 1 fue descrito por primera vez en 1954, por Long y Schweler⁷⁷ y desde entonces se han sintetizado varios derivados estructurales modificados. Muchos de ellos han sido utilizados como fármacos, muy útiles para descifrar diferentes mecanismos bioquímicos hasta el nivel subcelular, aunque la principal característica farmacológica descrita para el hemicolinio es como potente bloqueante neuromuscular, con alta toxicidad, que lleva hasta parálisis respiratoria¹⁴.

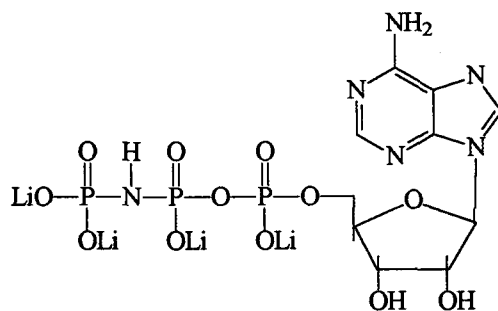
Estudios posteriores⁷⁸⁻⁸⁰ han mostrado, que el HC-3 inhibe la recaptación de colina a nivel presináptico del nervio terminal. Esta recaptación se efectúa a través de un mecanismo de transporte de alta afinidad, sodio dependiente, denominado SDHACU (sodium dependent high affinity choline uptake).



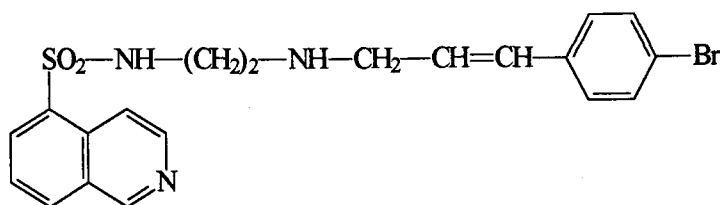
1



2



3



4

Figura 2.5.- Estructura de los inhibidores de la colina quinasa 1- 4 .

En el espacio sináptico, la acetilcolina (ACh) que se encuentra disociada de su receptor sufre la acción de la acetilcolinesterasa y la colina liberada se recapta dentro del nervio para ser acetilada de nuevo. Al ser un proceso de transporte de alta afinidad, es capaz de captar incluso si la concentración de colina es baja. La colina del espacio sináptico proviene del plasma y, principalmente, de la que deriva de la hidrólisis de ACh, calculándose que entre un 30-50% de la colina liberada es reutilizada por este proceso de recaptación. En consecuencia, el SDHCU es tan importante que se considera el factor limitante en la velocidad de síntesis de la ACh.

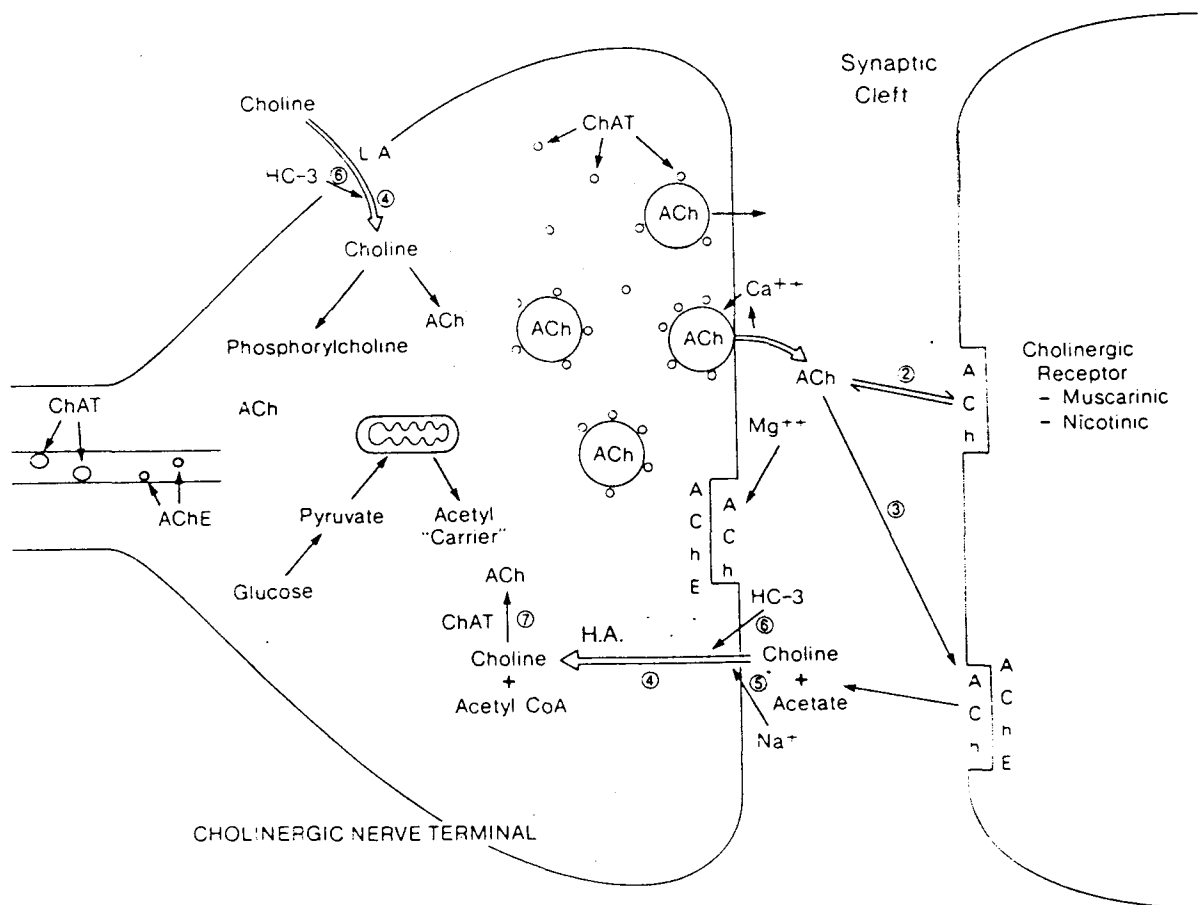


Figura 2.6.- Modelo hipotético para la síntesis, almacenamiento y liberación de la acetilcolina⁸¹.

Al ser el HC-3 un inhibidor competitivo del SDHACU, se produce una depleción del depósito de ACh que conlleva la disminución de la estimulación parasimpática, siendo antagonizados tales efectos mediante colina. También se ha comprobado que el HC-3 es un excelente agente que produce depleción de ACh en otros tejidos, incluidos diferentes regiones del cerebro⁸²⁻⁸⁵, pero en cambio no afecta al transporte de la ACh a las vesículas de almacenamiento⁸⁶. Es, sin embargo, un inhibidor débil de la acetilcolinaesterasa y de colinaesterasas plasmáticas^{77,87}, inhibiendo también a la colina acetiltransferasa de manera competitiva⁸⁸. Por consiguiente, el hemicolinio ha sido tomado como prototipo referencial para investigar las vías de transmisión y regulación colinérgicas.

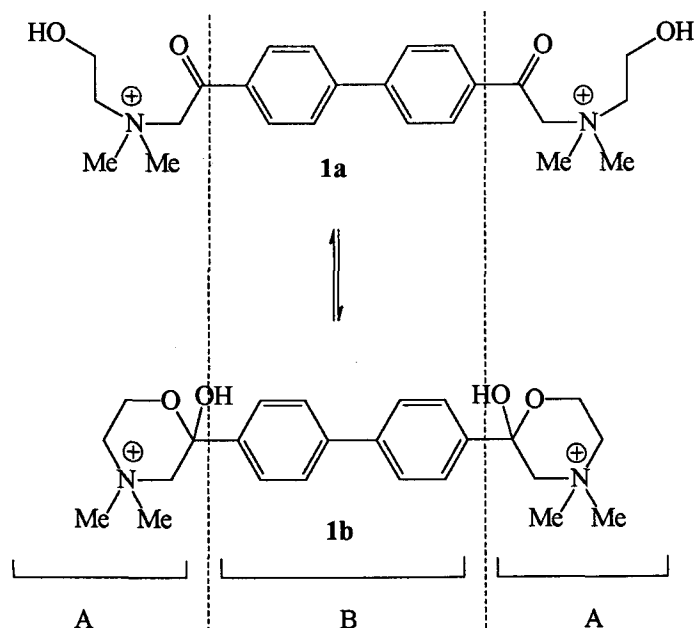


Figura 2.7.- Equilibrio tautomérico entre la forma abierta 1a y ciclada 1b.

La estructura del HC-3, tal y como viene descrita en los primeros trabajos⁷⁷, está representada en la figura 2.7 bajo la forma 1a; sin embargo, basándose en los datos de

espectroscopía infrarroja y en estudios previos de espectroscopía ultravioleta realizados por Cromwell, Tsou⁸⁹ y Schwele⁹⁰, se ha comprobado que el HC-3 existe bajo la forma de ciclohemiacetal **1b**.

Recientemente la estructura ciclohemiacetalica ha sido confirmada experimentalmente⁹¹ y se ha llegado a la conclusión de que existe un equilibrio tautomérico entre la forma hemiacetalica y la forma abierta, desplazándose dicho equilibrio de HC-3 hacia la formación del ciclohemiacetal. Otros autores⁹² justifican que la actividad biológica es debida a la forma ciclohemiacetalica.

Analizando la estructura del HC-3, se puede comprobar que se trata de una molécula simétrica y se puede dividir en dos regiones: región A, formada por el bifenilo y la región B formada por el ciclo de oxazinio con un nitrógeno cuaternizado⁹³.

2.5.- Modificación molecular del hemicolinio.

Para analizar la relación estructura-actividad del HC-3 como inhibidor de la recaptación de colina (SDHACU) y como protector contra la toxicidad inducida por los organofosforados, se han sintetizado muchos compuestos que representan varias modificaciones en la estructura de la molécula prototipo.

2.5.1.- El hemicolinio como inhibidor de la recaptación de colina.

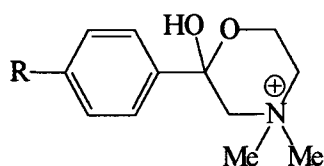
2.5.1.1.-Compuestos con sólo un fragmento de la molécula prototipo.

Se han sintetizado varios compuestos que contienen en su estructura sólo una parte del HC-3. Así se ha descrito el compuesto (HC-15) **5**, molécula mitad del HC-3 y una serie de sus derivados que contienen diversos sustituyentes en el anillo bencénico **6-11**^{90, 94-95}.

Las estructuras correspondientes a estos compuestos se recogen en la Tabla 2.4.

La síntesis de estos compuestos consta de dos etapas; primero, condensación de bromoacetofenona o de su correspondiente derivado sustituido en posición para, con *N,N*-dimetilaminoetanol, para obtener la forma abierta. La segunda etapa es un proceso de ciclación, en el que la forma abierta se disuelve en etanol, formándose el derivado con anillo oxazinio^{90,96}.

Tabla 2.4.- Estructura de los compuestos 5-11.



| Compuesto | | R | Compuesto | R |
|-----------|-------|-----------------|-----------|-----------------|
| 5 | HC-15 | H | 9 | Cl |
| 6 | | Ph | 10 | CN |
| 7 | | NHAc | 11 | NO ₂ |
| 8 | | NH ₂ | | |

Estos compuestos presentan algunas actividades como inhibidores de la acetilcolinesterasa pero pierden mucha actividad como inhibidores de la recaptación de colina, salvo en el caso del compuesto 6 cuya estructura conserva el sistema bifenilo del HC-3 con un solo ciclo de oxazinio⁷⁷.

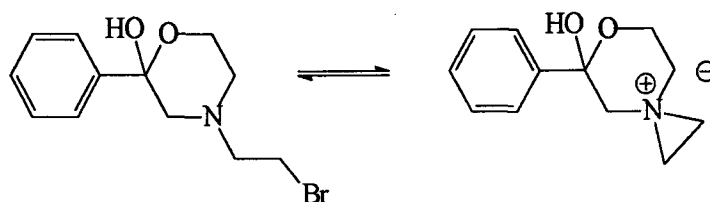
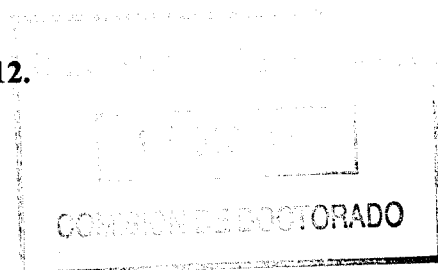


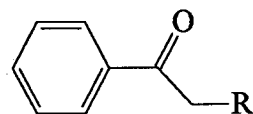
Figura 2.8.- Forma activa del compuesto 12.



El compuesto **12**, que contiene un resto N-(2-bromoetilamino)morfolina, presenta la misma actividad que HC-15 **5** en cuanto a la inhibición de la recaptación de colina (100 veces menos activo que HC-3). Esta molécula parece actuar por un mecanismo distinto al de HC-15, ya que, al tener la forma bioactiva de las mostazas, puede establecer enlaces covalentes con la proteína transportadora, inhibiéndola de manera irreversible⁹⁷.

También se han sintetizado varios análogos **13-16** mediante sustitución del ciclo oxazinio del compuesto **5** por otros sistemas heterocíclicos (piridinio, quinolinio, isoquinolinio y quinuclidinio)⁹⁸. Todas estas modificaciones conllevan la pérdida de la actividad y las estructuras correspondientes a estos compuestos se recogen en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5.- Estructura de los compuestos 13-16.

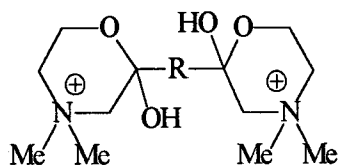


| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|---|-----------|---|
| 13 | | 15 | |
| 14 | | 16 | |

2.5.1.2.- Modificación en la región A.

Para analizar la contribución del sistema bifenílico y la influencia de la distancia entre las dos cargas positivas de los átomos de nitrógeno en la estructura del compuesto HC-3 sobre la actividad farmacológica, se han sintetizado varios conjuntos de moléculas como se recoge en la Tabla 2.6.

Tabla 2.6.- Estructura de los compuestos 17-23.



| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|---------------------|-----------|---|
| 17 | | 21 | |
| 18 | | 22 | |
| 19 | $-(\text{CH}_2)_6-$ | 23 | |
| 20 | $-(\text{CH}_2)_7-$ | | |

Esta serie consta de moléculas en las que el bifenilo ha sido sustituido por otros sistemas mono-, bi-, o tricíclicos (fenilo, naftaleno, biciclohexilo, fenantreno, y terfenilo)^{75, 95, 99- 103} y otros compuestos contienen una cadena polimetilénica en lugar del bifenilo¹⁰⁴. También se ha diseñado una serie homóloga de productos que contienen grupos metileno intercalados entre los dos anillos bencénicos.

Los métodos utilizados para la síntesis de estos compuestos constan de tres etapas :

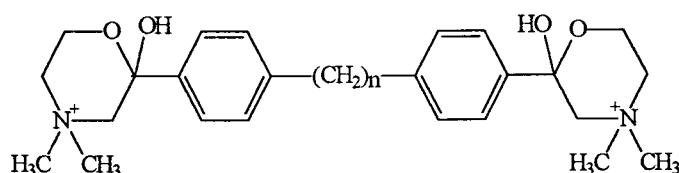
a) Síntesis de la materia prima (4,4'-dihaloacetil bifenilo y de sus derivados o análogos); para la que se han seguido tres metodos, a) de Long y Schweler⁷⁷, b) y c) los descritos por Domer¹⁰³ y Hemsworth¹⁰⁵, respectivamente, que son modificaciones del primero.

b) Condensación del derivado halogenado con N,N-dimetilaminoetanol.

c) Ciclación en etanol.

Los compuestos **21** y **22**, con anillos de benceno casi perpendiculares en el primer caso, y coplanares en el segundo caso, han sido diseñados para comprobar la posible influencia de las interacciones estéricas entre los dos anillos aromáticos sobre la actividad biológica. En este sentido, se ha constatado que ambas modificaciones no afectan a la actividad, pero se nota una ligera disminución de la misma.

El análisis de los datos de actividad biológica como inhibidores de la recaptación de colina, de todos los compuestos, nos permite sacar dos conclusiones: 1) La región central del HC-3 puede ser remplazada por una variedad de grupos lipofílicos como aril, alquil o cicloalquil sin comprometer la actividad y 2) Las cabezas catiónicas formadas por los dos grupos amonio cuaternarios, parecen desempeñar un papel importante y decisivo en el farmacóforo de los inhibidores de la recaptación de colina. Estudios previos de análisis conformacional realizados en la estructura del HC-3 han mostrado que, en la conformación energéticamente favorecida, la distancia entre los dos nitrógenos es aproximadamente de 14.4Å. El sistema bifenílico parece actuar como enlace que permite conservar la distancia óptima entre las dos cabezas polares; sin embargo, analizando los datos de actividad farmacológica de los compuestos de la serie homóloga **24**, se constata que está permitida una variación considerable en esta distancia.



24

 $n = 1-4$

2.5.1.3.- Modificaciones en la región B del HC-3.

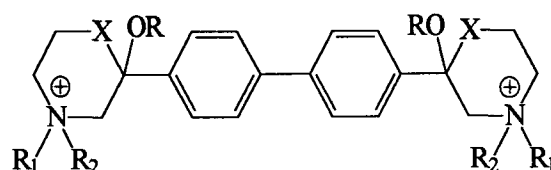
2.5.1.3.1.- Modificaciones en la estructura cíclica del compuesto HC-3.

Para explorar la cadena lateral del HC-3 y conocer su contribución a la actividad biológica se ha modificado esta zona de la molécula. Se han diseñado muchos compuestos que representan una amplia variedad de modificaciones y alteraciones del anillo oxazinio. En cuanto al método sintético, se ha adoptado el descrito por Schweler⁷⁷, que involucra la obtención del dicloro o dibromoacetilbifenilo y su condensación con la amina adecuada obtenida comercialmente o previamente sintetizada.

El compuesto **28** ha sido diseñado como bioisómero de la forma cíclica del HC-3, cambiando oxígeno por azufre⁹⁸; esta modificación no afecta a la actividad biológica pero disminuye su toxicidad. La serie de cetales dialquílicos **25a-c** ha sido diseñada para comprobar la importancia de la forma cicloetánica. La estructura cíclica de estos compuestos ha sido confirmada por Bove y Haarstad¹⁰⁶ basándose en diversos análisis espectroscópicos y datos de combustión. Estos compuestos contienen un grupo hidroxilo enmascarado y presentan sólo una parte de la actividad encontrada con el hemicolinio, lo que supone que el grupo hidroxilo es esencial para la actividad biológica. También, se han efectuado modificaciones sobre el nitrógeno cuaternizado.

Asimismo el compuesto **26**⁸⁹ corresponde al homólogo N-etílico del HC-3 que conserva toda la actividad y, por último, los compuestos **27a-b**^{99,107-108} corresponden a mostazas que inhiben la recaptación de la colina de manera drástica, quizás por el mismo mecanismo descrito anteriormente para el compuesto **12**. En la Tabla 2.7 se recogen las diferentes estructuras correspondientes a estas modificaciones.

Tabla 2.7.- Estructura de los compuestos 25-28.

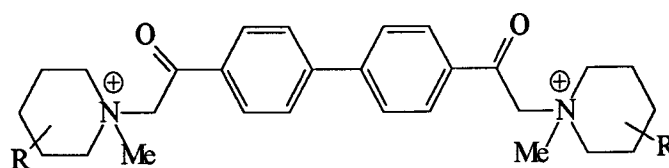


| Compuesto | R | R ₁ | R ₂ | X |
|-----------------|------|----------------|----------------|---|
| 1 (HC-3) | H | Me | Me | O |
| 25a | Me | Me | Me | O |
| 25b | Et | Me | Me | O |
| 25c | n-Pr | Me | Me | O |
| 26 | H | Et | Et | O |
| 27a | H | | Aziridinio | O |
| 27b | Me | | Aziridinio | O |
| 28 | H | Me | Me | S |

Benz y Long¹⁰⁹ han sintetizado la serie de compuestos **29a-d**, en los que el anillo de piperidinio sustituye al del oxazinio, como se recoge en la Tabla 2.8. La superposición de éstos compuestos con la estructura cíclica del HC-3 demuestra que la posición del sistema bifenílico y el nitrógeno cuaternizado se corresponden perfectamente, así como la posición del átomo de

oxígeno de la cetona en los derivados piperidínicos con la del átomo de oxígeno del anillo de oxazinio.

Tabla 2.8.- Estructura de los compuestos 29a-d.

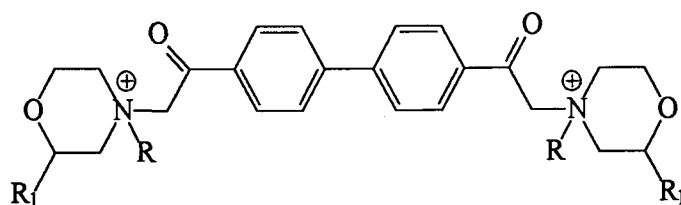


| | | | |
|-----|----------|-----|----------|
| 29a | R = H | 29c | R = 3-Me |
| 29b | R = 2-Me | 29d | R = 4-Me |

Estos compuestos presentan actividades similares al hemicolinio y por tanto muestran que el grupo hemicetálico o cualquier otro grupo hidroxilo no son esenciales para la actividad biológica. También los compuestos de la serie 29 son excelentes inhibidores de la enzima responsable de la hidrólisis de la acetilcolina: la acetilcolinesterasa. El mecanismo de inhibición de la recaptación de colina es diferente del hemicolinio, tratándose ahora de una inhibición no-competitiva.

También se ha cambiado el anillo de oxazinio por su bioisómero morfolinio¹¹⁰; así se han sintetizado los derivados *N*-metil 30a, *N*-etil 30b y el derivado *C*-metil 30c de la morfolina como se recoge en la Tabla 2.9. Tales compuestos no presentan actividad como inhibidores de la recaptación de colina pero, en cambio, muestran una buena acción como bloqueantes musculares.

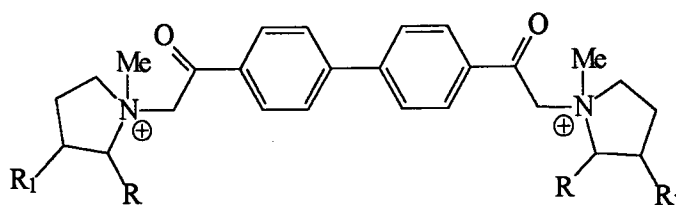
Tabla 2.9.- Estructura de los compuestos 30a-c.



| | | |
|------------|--------|---------------------|
| 30a | R = Me | R ₁ = H |
| 30b | R = Et | R ₁ = Me |
| 30c | R = Me | R ₁ = Me |

Cannon y Sahin¹⁰, han descrito también una serie de moléculas derivadas de HC-3 **31a-c**, en las que se ha sustituido el anillo de oxazinio por pirrolidinio; estas modificaciones no afectan a la actividad biológica. En la Tabla 2.10 se recogen las diferentes estructuras correspondientes a dichos compuestos.

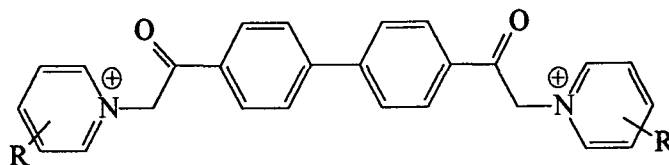
Tabla 2.10.- Estructura de los compuestos 31a-c.



| | | |
|------------|--------|---------------------|
| 31a | R = H | R ₁ = H |
| 31b | R = H | R ₁ = Me |
| 31c | R = Me | R ₁ = H |

Con el fin de obtener derivados planos del HC-3 se ha diseñado un conjunto de compuestos en los que el anillo aromático de piridinio^{77,109} sustituye al anillo de oxazinio del HC-3. En estos compuestos (**32a-d**, Tabla 2.11) se constata que la distancia entre las dos cargas positivas sobre los átomos de nitrógeno es similar a la del prototipo, por lo que el átomo de oxígeno cetónico se debe superponer al átomo de oxígeno del anillo de oxazinio. Estos compuestos son potentes bloqueantes musculares e inhibidores de la acetilcolinesterasa.

Tabla 2.11.- Estructura de los compuestos 32a-d.

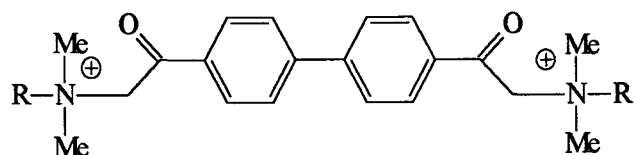


| | | | |
|------------|----------|------------|----------|
| 32a | R = H | 32c | R = 3-Me |
| 32b | R = 2-Me | 32d | R = 4-Me |

2.5.1.3.2.- Modificaciones en la estructura abierta del HC-3.

Se han descrito varias series de compuestos que presentan modificaciones en la cadena lateral de la molécula del prototipo. En este sentido, Benz y Long¹¹¹ han descrito una serie de derivados del HC-3 en los que la cadena β -hidroxietílica ha sido sustituida por una cadena hidrocarbonada, dando lugar a la serie de compuestos de bis-amonio cuaternario **33a-f** como se recoge en la Tabla 2.12. Estos compuestos presentan actividad en el sistema colinérgico como inhibidores de la acetilcolinesterasa.

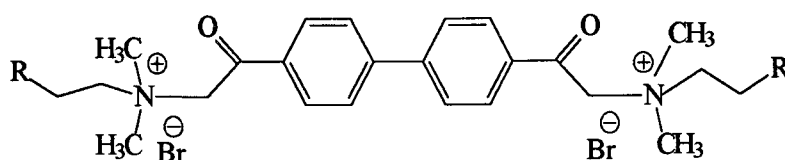
Tabla 2.12.- Estructura de los compuestos 33a-f.



| | | | |
|------------|----------|------------|-----------|
| 33a | R = Me | 33d | R = n-Bu |
| 33b | R = Et | 33e | R = n-Pen |
| 33c | R = n-Pr | 33f | R = alilo |

Por otro lado, se ha modificado la naturaleza del grupo hidroxilo en el HC-3. Por ejemplo, se han sintetizado varios ésteres del HC-3, como el acetato **34**⁸⁹, que ha mostrado ser menos activo que el hemicolinio en cuanto a la inhibición de la recaptación de colina, quizás porque es un profármaco del hemicolinio o el tioacetato **37**⁹⁷, bioisómero del compuesto **34**, que posee la misma actividad que el hemicolinio. La sustitución del grupo hidroxilo por un grupo éter etílico⁸⁹ **35** conlleva una pérdida de actividad biológica, pero el isómero del HC-3 representado por el compuesto **36** presenta la misma actividad que el HC-3. En el caso del compuesto **38**, la sustitución del grupo hidroxilo por un grupo ciano⁹⁸ lo transforma en un compuesto carente de actividad biológica. En la Tabla 2.13 se recogen las diferentes estructuras correspondientes a estos compuestos.

Tabla 2.13.- Estructura de los compuestos 34-38.

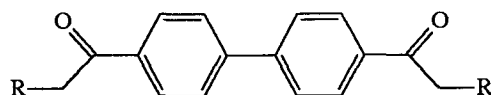


| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|-----|-----------|-----|
| 1 (HC-3) | OH | 36 | SH |
| 34 | OAc | 37 | SAc |
| 35 | OEt | 38 | CN |

Finalmente, se diseñó otra serie de derivados^{89, 78}, se trata de compuestos que contienen modificaciones en los átomos de carbono y de nitrógeno de la cadena lateral del prototipo como los mostrados en la Tabla 2.14.

El análisis de la actividad biológica de tales compuestos 39 - 44 muestra que el producto 42 es más activo que el HC-3 y los demás desarrollan otras actividades como curarizantes y bloqueantes ganglionarios. En cambio, los compuestos 45-50 no presentan actividades similares al HC-3. Algunos autores, sin dar fundamentos experimentales, especulan que la presencia o ausencia de actividad en estos compuestos reside en la tendencia o no de cada molécula por ciclarse y dar la forma hemicetálica, siendo esta última la verdadera responsable de la actividad biológica.

Tabla 2.14.- Estructura de los compuestos 39-50.



| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|--|-----------|--|
| 39 | $\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ \oplus\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$ | 45 | $\begin{array}{c} \text{C}_4\text{H}_9 \\ \\ \oplus\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$ |
| 40 | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \oplus\text{N}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | 46 | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \oplus\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}-\text{OH} \end{array}$ |
| 41 | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \oplus\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | 47 | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \oplus\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p style="text-align: center;">n 2-5</p> |
| 42 | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \quad \\ \oplus\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | 48 | |
| 43 | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \oplus\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$ | 49 | |
| 44 | $\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \\ \oplus\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$ | 50 | $\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \oplus\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$ |

2.5.2.- El hemicolinio como protector contra la toxicidad inducida por los organo fosforados.

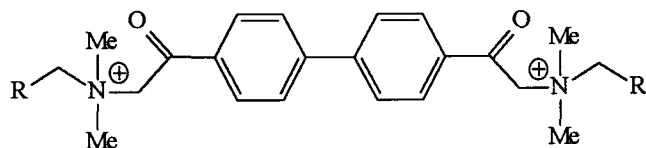
Fue Harris y colbs.¹¹² quienes postularon que la inyección intracerebroventricular de HC-3 es efectiva para reducir la toxicidad inducida por los organofosforados en ratones. Sin embargo, no se conoce si esta protección esta relacionada con la inhibición del transporte de colina o mediada por otro mecanismo.

Con el objetivo de diseñar fármacos con posible efecto protector contra la toxicidad inducida por los compuestos organofosforados, los denominados inhibidores irreversibles de la acetilcolinesterasa, se han sintetizado una serie de compuestos **51b-52** que contienen en su cadena lateral una estructura acetálica.

El compuesto **51b** es un derivado oxidado del HC-3 con grupo acetal etílico en lugar del grupo hidroxilo y muestra un complejo espectro de actividades biológicas, incluyendo antagonismo nicotínico. También es un inhibidor débil de la acetilcolinesterasa, pero resulta inefectivo como protector contra la toxicidad de los organofosforados.

Otros productos que se han estudiado pertenecen a una serie de compuestos **52a-f**, como se recoge en la Tabla 2.15, que contienen en su estructura un acetal o anillo de cinco, seis o siete miembros con uno o dos heteroátomos representados por el átomo de oxígeno, salvo en el compuesto **52d** que contiene un ciclohexano^{102, 113- 116}. Asimismo, el compuesto **52a** es el acetal cíclico correspondiente al compuesto **51b**, en el que se ha sustituido el anillo de oxazinio del HC-3 por el 1,3-dioxano. Los compuestos **52c** y **52d** son isómeros del compuesto **52a** donde se ha cambiado un átomo de oxígeno por un metileno, en el primer caso y, en el segundo caso, se han cambiado los dos átomos de oxígeno por grupos metilenos. El compuesto **52b** nace por el cambio de la posición de enlace sobre el anillo 1,3-dioxano y la contracción del sistema cíclico acetálico en el compuesto **52a** a un anillo de cinco miembros da lugar al compuesto **52e**, mientras que su expansión a un anillo de siete miembros da lugar al compuesto **52f**.

Tabla 2.15.- Estructura de los compuestos 51b-52.



| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|---|-----------|---|
| 51b | | 52d | |
| 52a | | 52e | |
| 52b | | 52f | |
| 52c | | | |

El análisis de la actividad protectora de todos estos compuestos muestra que, los compuesto 52a y 52f son potentes agentes protectores contra la toxicidad de los organofosforados y también muestran una gran actividad como inhibidores de la

acetilcolinesterasa; sin embargo, son inhibidores débiles en el transporte de colina. Por otro lado, las modificaciones efectuadas sobre la estructura del compuesto **52a** conducen a una notable pérdida de la actividad.

Como resumen diremos, por último, que todas estas modificaciones en la estructura del hemicolinio han sido efectuadas inicialmente para determinar el farmacóforo responsable de sus diversas actividades biológicas y, en segundo lugar, para estudiar el mecanismo de acción de algunos derivados del hemicolinio que presentan actividades interesantes, como es el caso de los compuestos **52a** y **52f**, que resultan ser buenos protectores contra la toxicidad inducida por los organofosforados. Sin embargo, estos objetivos no se han podido lograr del todo ya que los distintos derivados y análogos del HC-3 presentan una gran variedad de acciones en el sistema colinérgico, desde la inhibición en la recaptación de colina hasta la acción inhibitoria sobre diferentes enzimas del metabolismo de la acetilcolina (colinesterasas plasmáticas, acetilcolinesterasa, colina acetiltransferasa).

3.- PARTE TEÓRICA.

3.-PARTE TEÓRICA

3.1.-Propósitos y objetivos a cumplir en este trabajo.

De acuerdo con lo especificado en la Introducción, el propósito de la investigación aquí contenida es obtener réplicas de la molécula de hemicolinio HC-3 que permita disponer de nuevos inhibidores de la enzima colina quinasa que, al bloquear la producción de fosforilcolina (PCho), actúen como inhibidores de la mitosis en células transformadas por oncogenes de la superfamilia *ras*.

El propósito general de nuestra investigación comporta, por lo tanto, una serie de objetivos más específicos que también se pretende cubrir en la investigación contenida en esta Memoria. Así, los siguientes objetivos constituyen nuestros planteamientos investigadores:

Objetivo nº 1.- Se pretende preparar varias series exploratorias de réplicas de la molécula HC-3, que respondan a diferentes criterios de diseño y que puedan permitir el descubrimiento de nuevos compuestos líderes.

Objetivo nº 2.- En la investigación que forma parte de esta Memoria se pretende estudiar cómo influye sobre la actividad inhibitoria de colina quinasa las modificaciones llevadas a cabo sobre la parte de la molécula de HC-3 que se asemeja a la de colina; es decir, se pretende explorar las modificaciones realizadas en los extremos de la molécula de HC-3 respetando la unidad central de la misma.

Objetivo nº 3.- Asimismo, es también objetivo de esta investigación estudiar cómo influye sobre la actividad inhibidora de colina quinasa la presencia de una sola cabeza catiónica en las nuevas moléculas (la molécula de HC-3 contiene dos cabezas catiónicas). A este respecto se han diseñado varios grupos de nuevas moléculas que pueden considerarse como la mitad de la de HC-3.

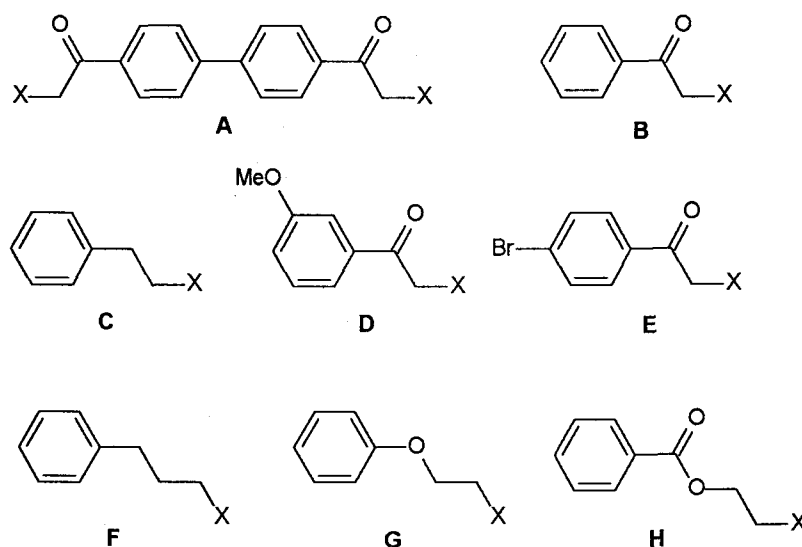
Objetivo nº 4.- Es también objetivo de la investigación aquí contenida estudiar la potencia inhibitoria de colina quinasa y su relación con la actividad antiproliferativa en células transformadas por oncogenes *ras*.

Objetivo nº 5.- Finalmente, se pretende también, si ello fuese posible, estudiar los posibles efectos de la estructura sobre la toxicidad debida al bloqueo de receptores muscarínicos.

Objetivo nº 6.- Por último, se pretende encontrar correlaciones entre estructura y actividad inhibitoria de colina quinasa y de actividad antiproliferativa de los compuestos aquí sintetizados.

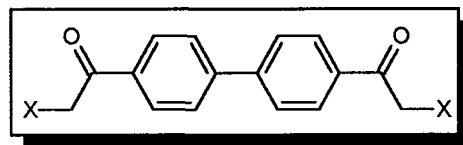
Con estos objetivos se ha preparado un total de sesenta y un compuestos finales, de los que algunos, aunque pocos, han sido previamente descritos en bibliografía. Los compuestos sintetizados caen dentro de los grupos A - G en base a la materia prima empleada en sus respectivas síntesis (Esquema 3.1). No obstante este criterio clasificatorio, los componentes de

cada uno de los grupos obtenidos constituyen variaciones estructurales que deben aportar algún tipo de información para el establecimiento de correlaciones entre estructura y actividad.



Esquema 3.1.- Grupos estructurales en los que se clasifican los compuestos objeto de la investigación contenida en esta Memoria.

En todos los casos estudiados el sustituyente X se corresponde a un grupo amonio o iminio unido a través del heteroátomo al resto de las estructuras que constituyen los diferentes grupos estudiados. El sustituyente X cae también dentro de las siguientes tres categorías: a) sales de amonio cuaternarias de estructura acíclica, b) sales de amonio cuaternarias de estructura mono o bicíclica y c) sales de iminio aromáticas.



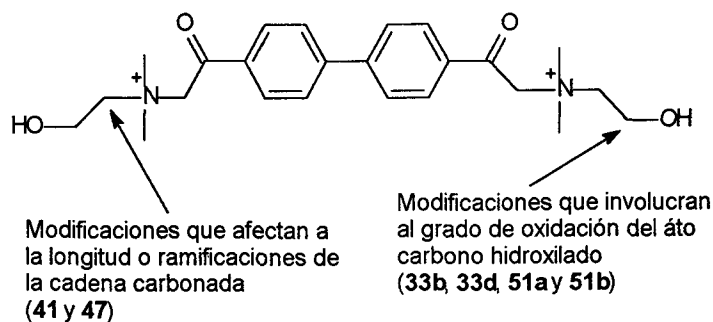
3.2.-Diseño, síntesis y elucidación estructural de derivados del hemicolinio pertenecientes al grupo A.

De acuerdo con lo descrito en el apartado anterior, aquí se estudian los compuestos incluidos en el grupo A. En consecuencia, aquí se describe un conjunto de moléculas simétricas que pueden obtenerse a partir de 4,4'-Dibromoacetil-1,1'-difenilo **53**. En este sentido, este grupo de compuestos representa la primera serie exploratoria en la búsqueda de nuevas cabezas de serie. Los aspectos que se estudian en este apartado incluyen las bases racionales del diseño, la síntesis empleada para su preparación y la discusión concerniente a sus respectivos análisis estructurales.

Los compuestos pertenecientes al grupo A caen dentro de los tres subgrupos A₁ (Derivados de la forma abierta del hemicolinio 1, 33b, 33d, 41, 47, 51a y 51b), A₂ (Análogos estructurales con heterociclos saturados 30 - 32, 55 y 56) y A₃ (Análogos estructurales del HC-3 con heterociclos aromáticos 54, 57 - 60) en base a su semejanza con la molécula modelo.

3.2.1-Diseño de derivados de la forma abierta del HC-3: Subgrupo A₁.

En la Tabla 3.1 se resumen las estructuras de este subgrupo de compuestos que han sido diseñados como derivados de la molécula líder HC-3 con el objeto de verificar la importancia que la forma abierta de HC-3 ejerce sobre su actividad biológica como inhibidor de colina quinasa. Toda la farmacomodulación efectuada sobre la molécula prototipo en su forma abierta responde a dos modificaciones moleculares que están relacionadas con la naturaleza del sustituyente hidroxietílico que soportan los dos átomos de nitrógeno cuaternario: a) principalmente, las modificaciones llevadas a cabo sobre el modelo involucran al grado de oxidación del carbono hidroxilado y b) también se ha modificado la longitud y/o presencia de ramificaciones de la cadena que separa a los heteroátomos -O-Cadena-N⁺- (Esquema 3.2). De esta forma se pretende explorar la influencia de este sustituyente sobre la inhibición de la enzima colina quinasa.

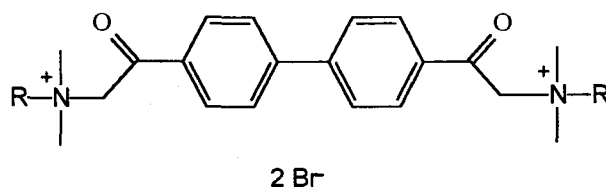


Esquema 3.2.- Modificaciones moleculares sobre la estructura abierta del hemicolinio.

Algunos de los compuestos de este grupo han sido descritos anteriormente por otros autores^{77, 82, 98, 111, 116} pero, se han incluido también en nuestro estudio porque las modificaciones moleculares involucradas en ellos pueden ser útiles para obtener información sobre el sitio activo de la proteína enzimática.

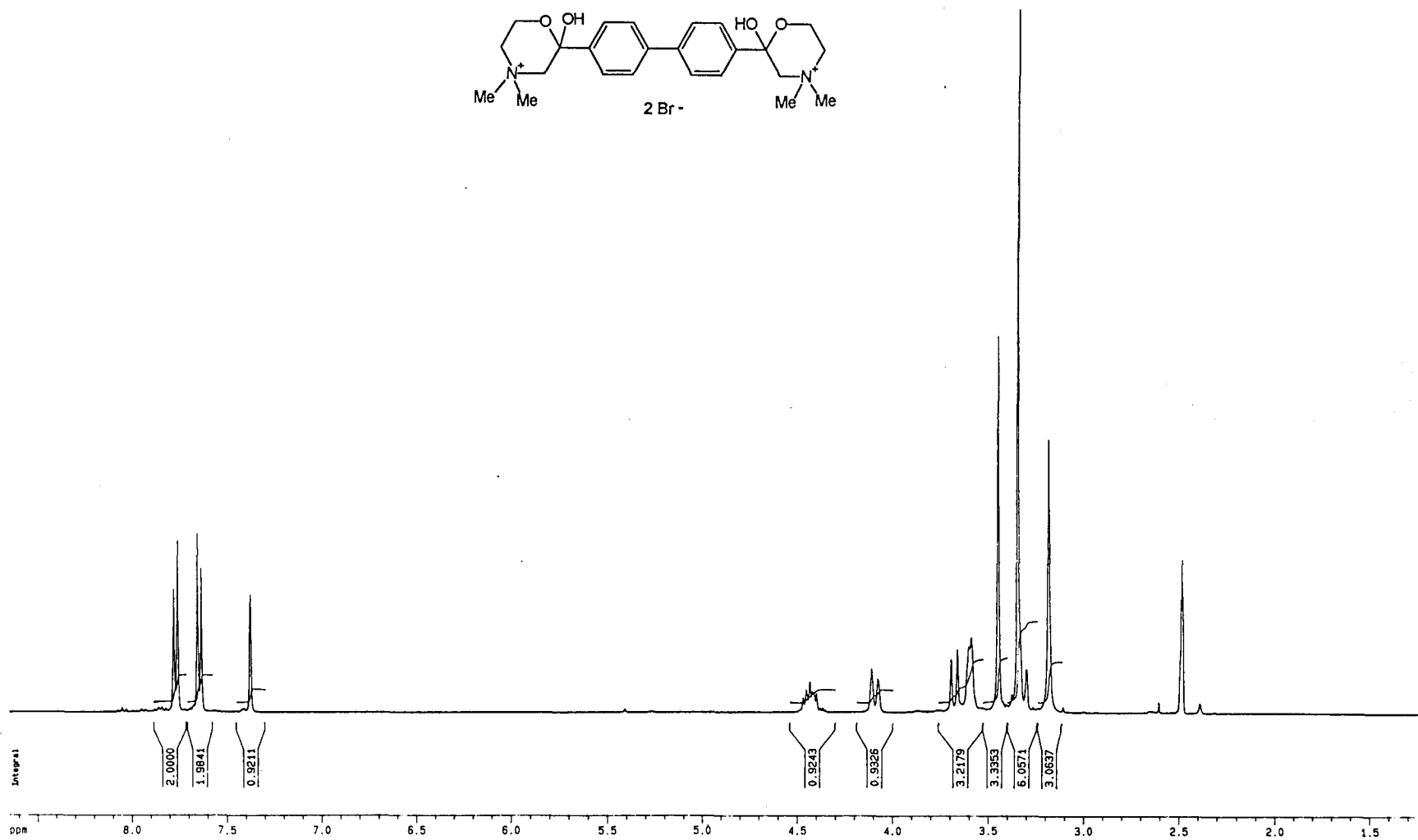
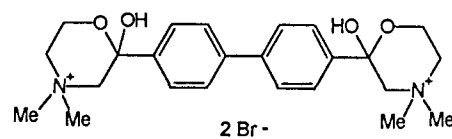
Asimismo se ha resintetizado en este trabajo la molécula del hemicolinio **1** porque parece razonable someterla al mismo conjunto de ensayos biológicos que los llevados a cabo sobre el resto de los compuestos. Al analizar su espectro de ¹³C RMN se ha podido constatar la ausencia de la señal del grupo carbonilo en las condiciones del experimento de RMN.

Tabla 3.1.- Estructura de los compuestos del subgrupo A_r



| Compuesto | R | Compuesto | R |
|------------------------|---|------------|---|
| 1 (HC-3) | | 47 | |
| 33b^a | | 51b | |
| 33d | | 51a | |
| 41 | | | |

^aEl compuesto **33b** ha sido sintetizado bajo forma de bicloruro.



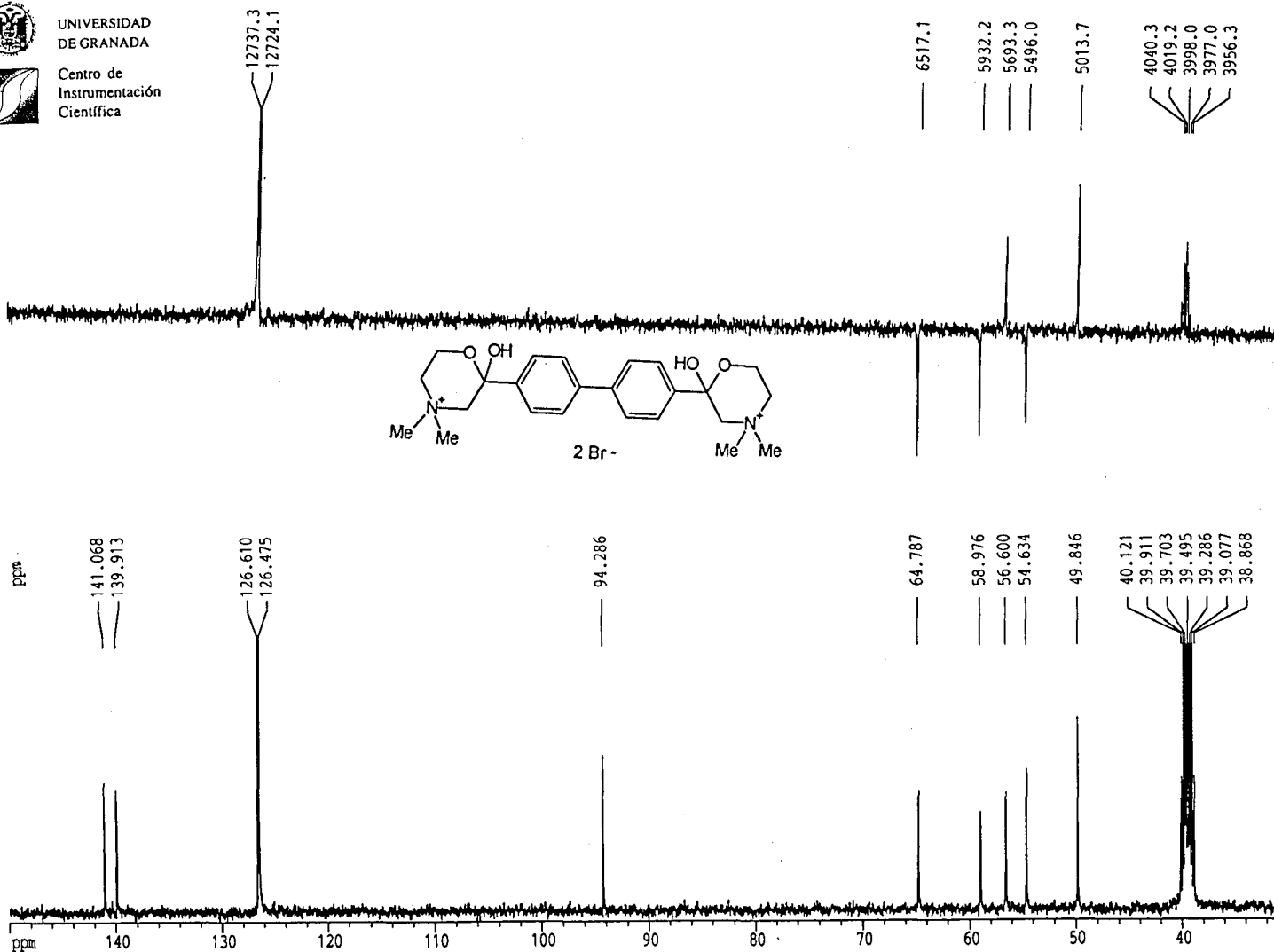
¹H-RMN-1: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(2-hidroxi-etildimetilamonio) 1.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN-1: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(2-hidroxiöldimetilamonio) 1.

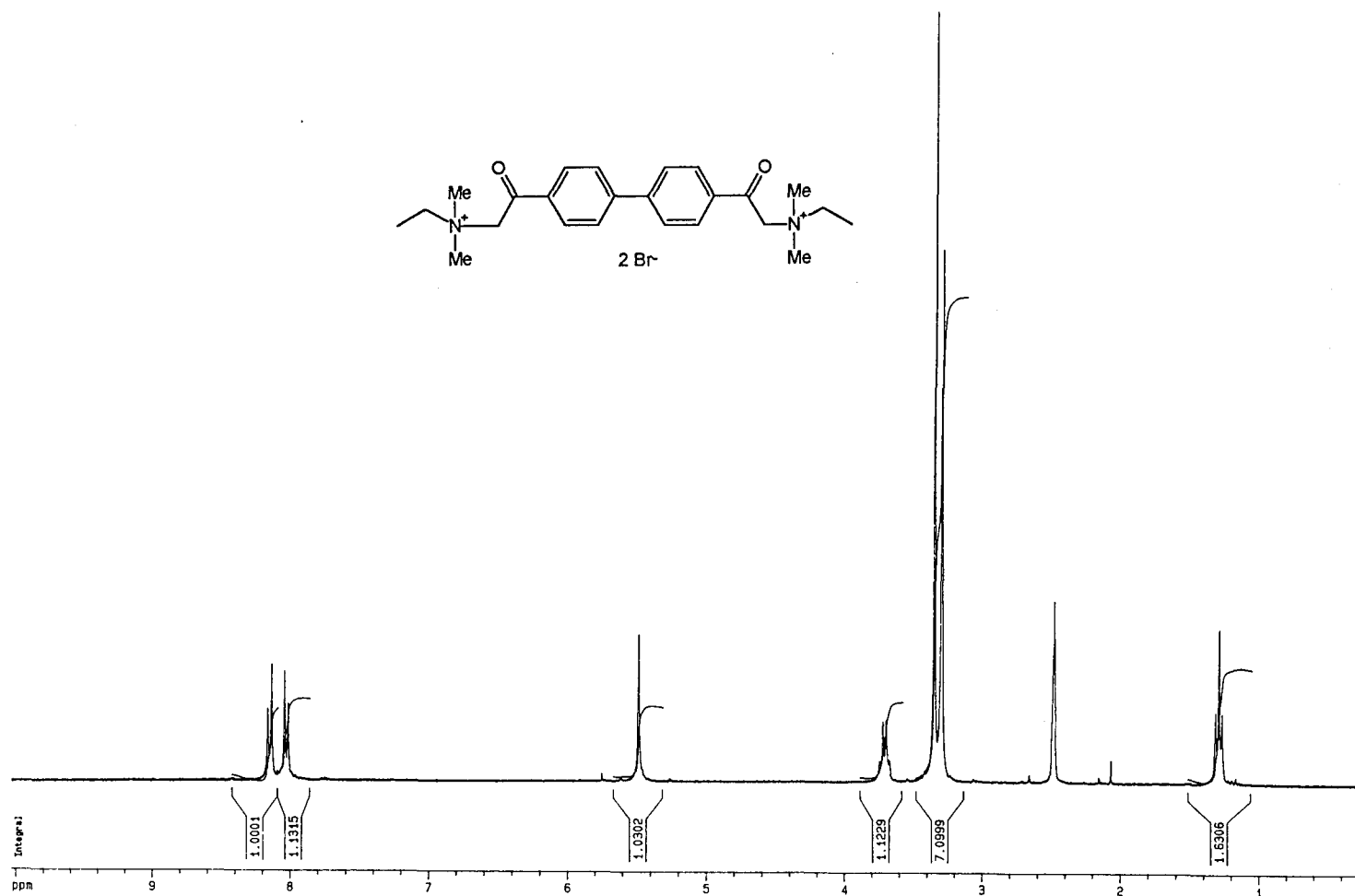
Resulta interesante mencionar que la sustitución del grupo hidroxilo por un átomo de hidrógeno da lugar al compuesto **33b**. Esta molécula a priori puede resultar adecuada para valorar el papel del grupo hidroxilo sobre la actividad inhibitoria de la enzima colina quinasa y, por tanto, para ser utilizado en diseños posteriores.

El compuesto **33d** es un homólogo del compuesto **33b**, y contiene una cadena lateral hidrocarbonada más larga, y por consiguiente de mayor lipofilia. El análisis de la actividad de este compuesto puede permitir explorar el sitio activo de la enzima desde el punto de vista del tamaño de sitio activo. Los compuestos **51a** y **51b** derivan de la oxidación del átomo de carbono hidroxilado y, conceptualmente, representa una solución opuesta al caso anterior. Estos compuestos contienen en la cadena lateral átomos de oxígeno aceptores capaces de formar enlaces de hidrógeno con grupos dadores adecuados situados en el sitio activo de la proteína enzimática.

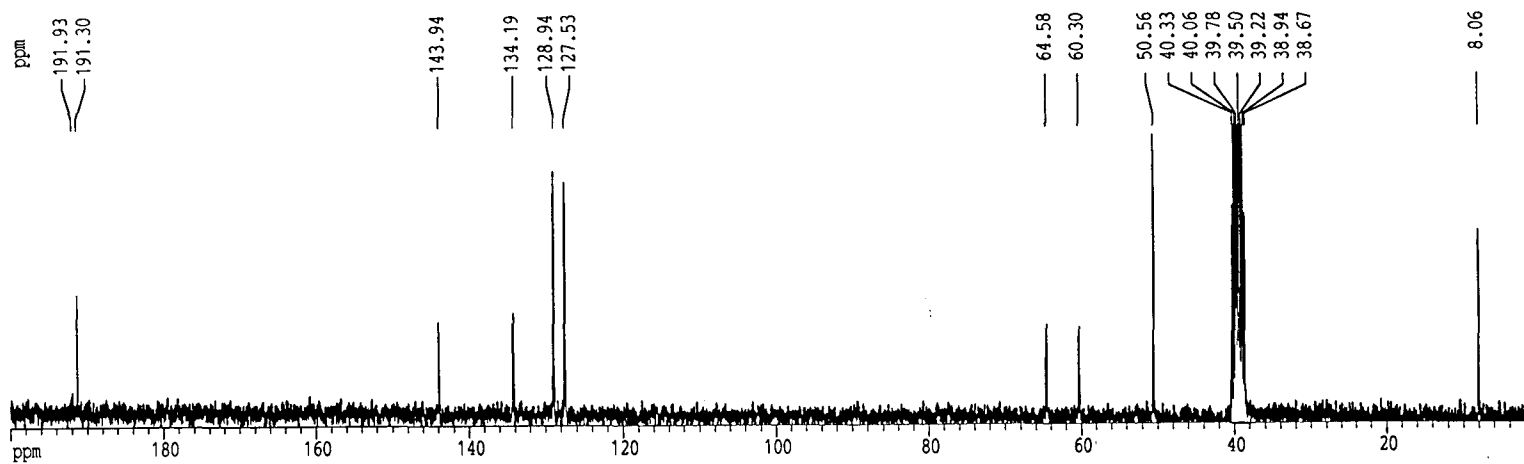
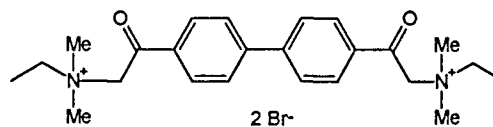
3.2.1.1.- Determinación estructural de los derivados del HC-3.

En todos los casos estudiados, las estructuras de los compuestos sintetizados ha sido confirmada mediante espectroscopías RMN y análisis elemental. Todos los datos de desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (J , Hz) correspondientes a estos derivados se muestran resumidos en las Tablas 3.2, 3.3 y 3.4. Todos los experimentos de RMN han sido realizados utilizando como disolvente el DMSO- d_6 .

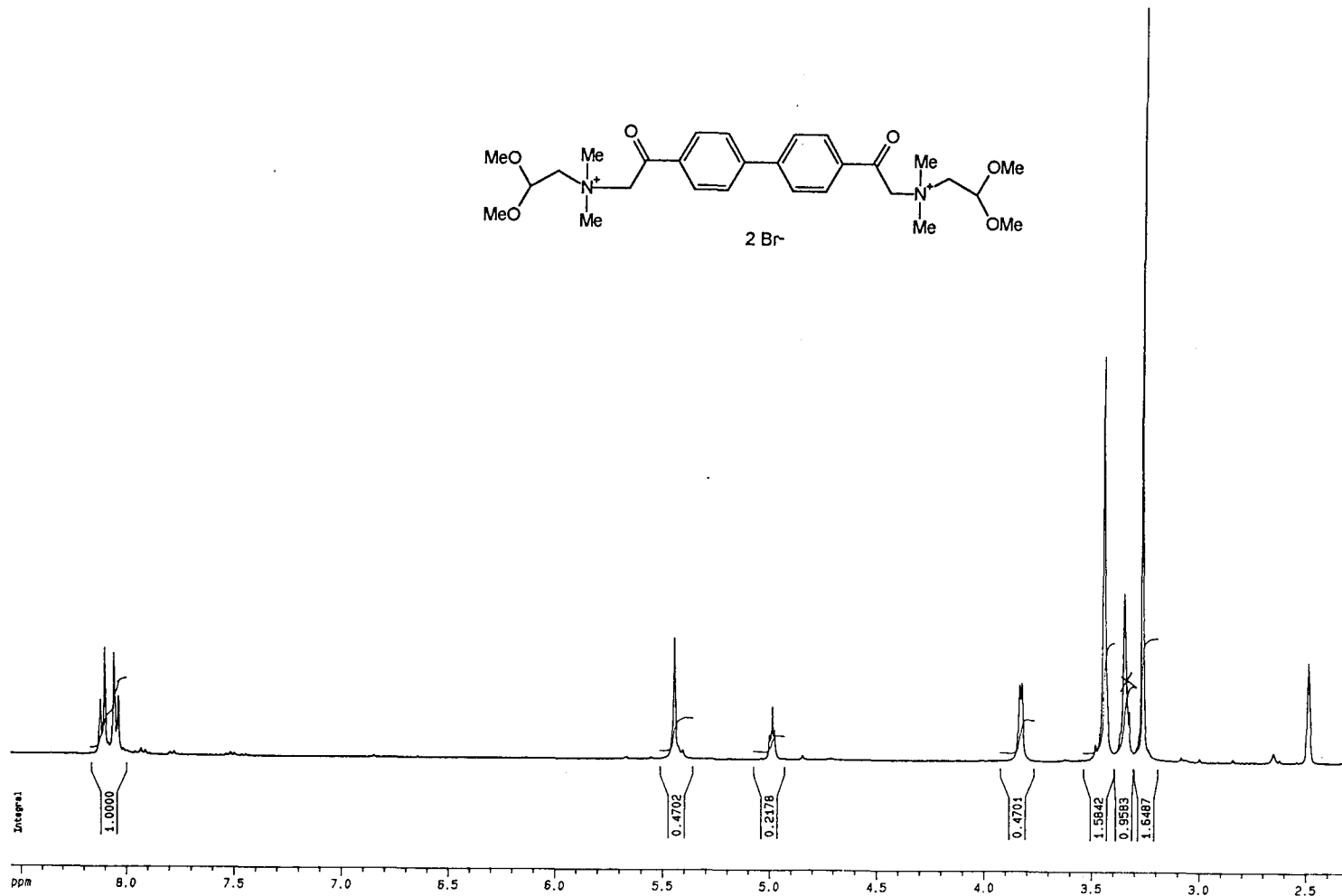
En los trabajos de investigación sobre derivados del HC-3 que existen en bibliografía se han publicado pocos datos de espectroscopía ^{13}C -RMN y ^1H -RMN de los compuestos descritos. Domer y colbs.^{97, 103, 117} han publicado datos de ^1H -RMN de algunos compuestos. En esta memoria se pretende también ordenar toda la información relativa a los datos espectroscópicos de ^{13}C -RMN y de ^1H -RMN de todos los compuestos sintetizados en nuestro laboratorio. De otro lado, se ha considerado también conveniente aportar los datos espectroscópicos de los compuestos ya existentes pero no publicados.



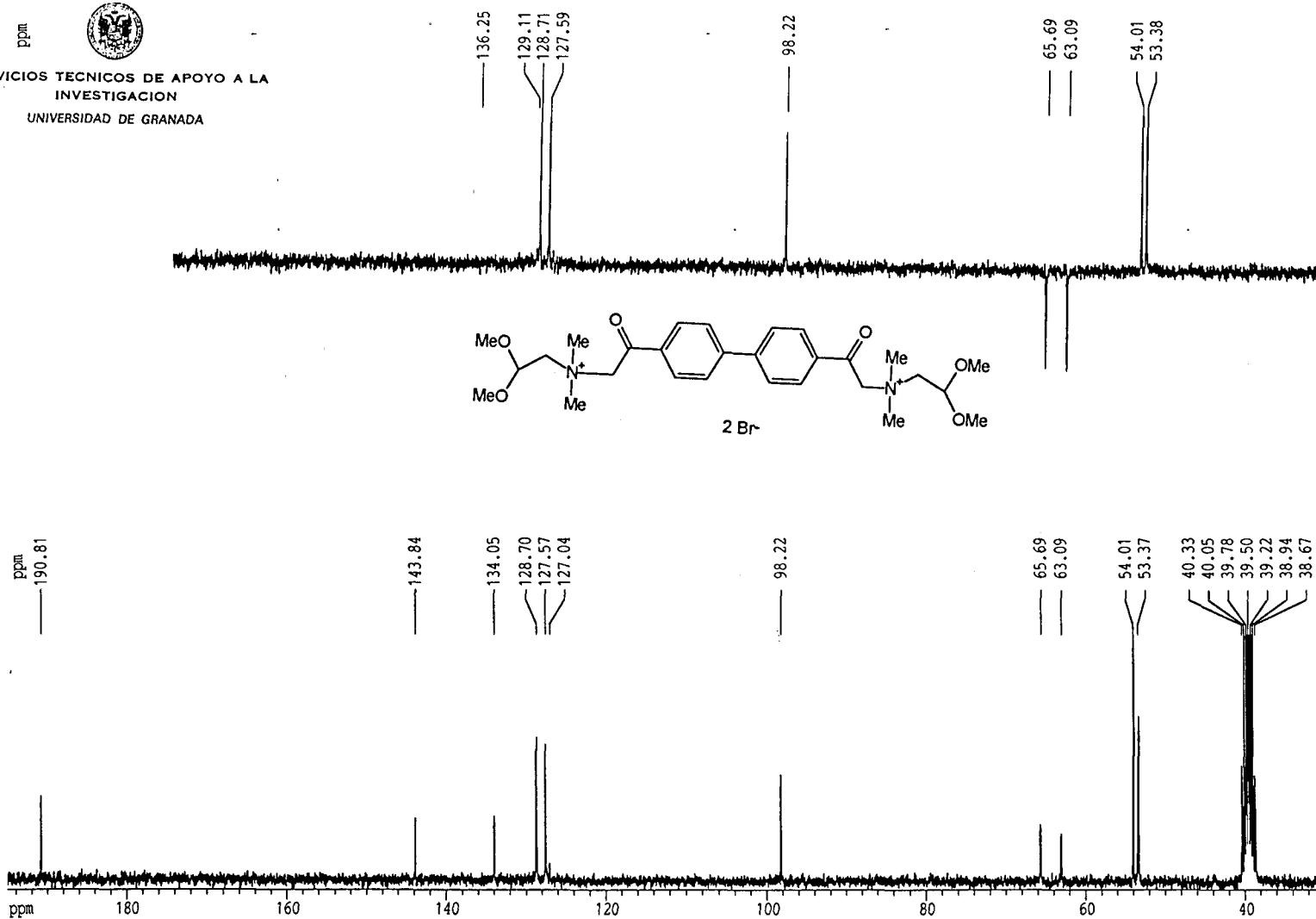
¹H-RMN-2: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(etildimetilamonio) 33b.



¹³C-RMN-2: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(etildimetilamonio) 33b.



¹H-RMN-3: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis[(2,2-dimetoxietil)dimetilamonio] 51a.

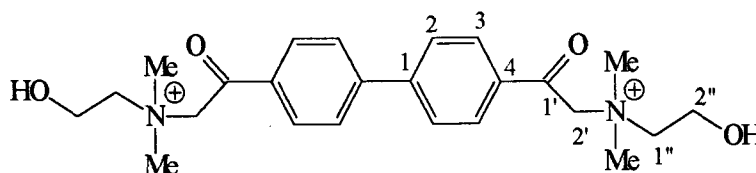


¹³C-RMN-3: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis[(2,2-dimetoxietil)dimetilamonio] 51a.

En general, los datos espectroscópicos son compatibles con las estructuras propuestas. En este sentido, las señales correspondientes a los protones aromáticos aparecen siempre entre 8,20 y 7,60 ppm como un sistema AB y con constantes de acoplamiento J cercanas a 8,40 Hz.

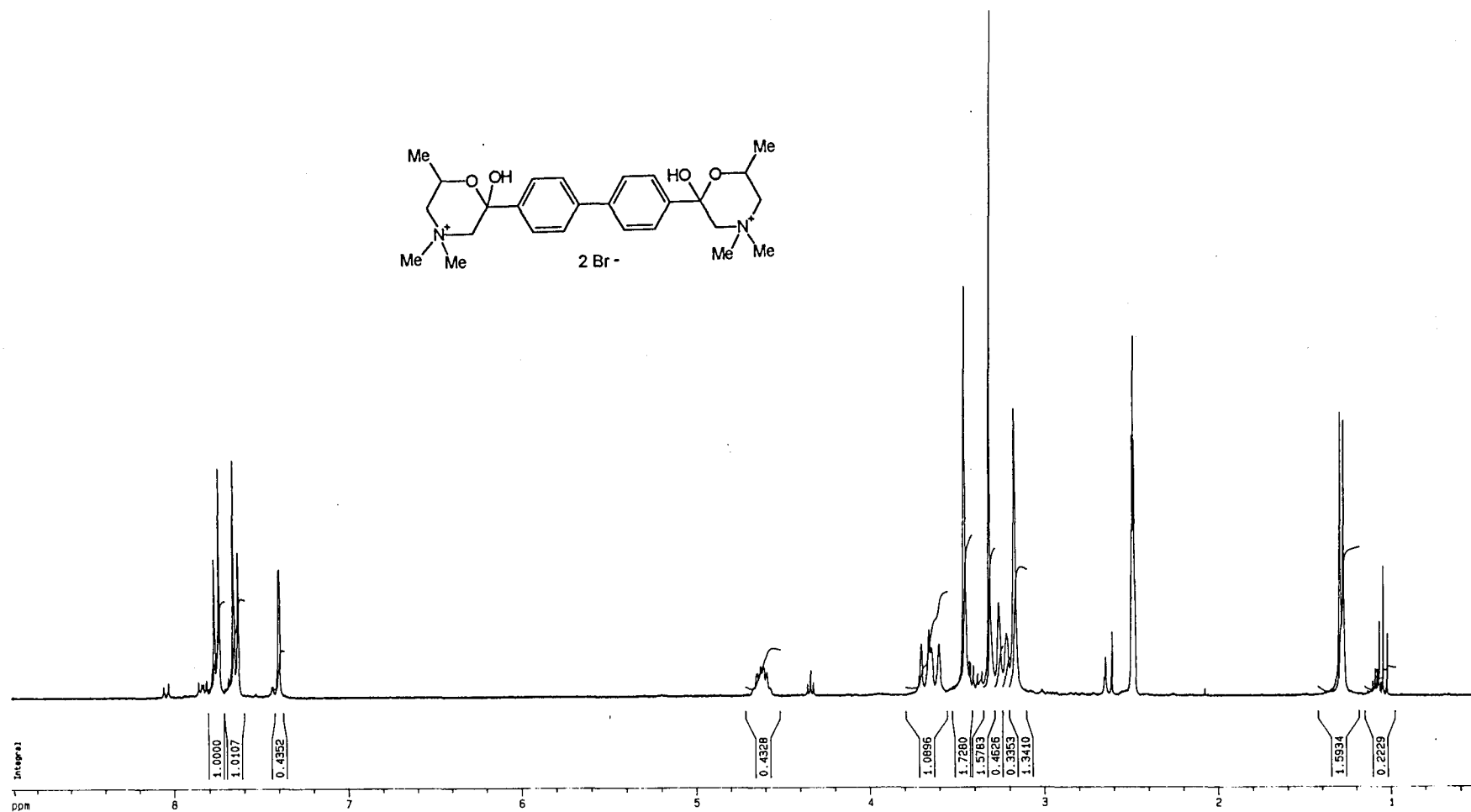
La sustitución del grupo hidroximetilo por agrupamientos acetálicos, como sucede en los compuestos **51a** y **51b** influye, sobre todo, en la señal del protón H-2'', correspondiente al protón acetálico, que sufre el esperado desapantallamiento hasta valores de 5,06 y 5,03 ppm. Obviamente, no es éste el caso para los compuestos **33b** y **33d**, que contienen una cadena lateral hidrocarbonada.

Tabla 3.2.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) de ^1H -RMN de los compuestos del subgrupo A_T

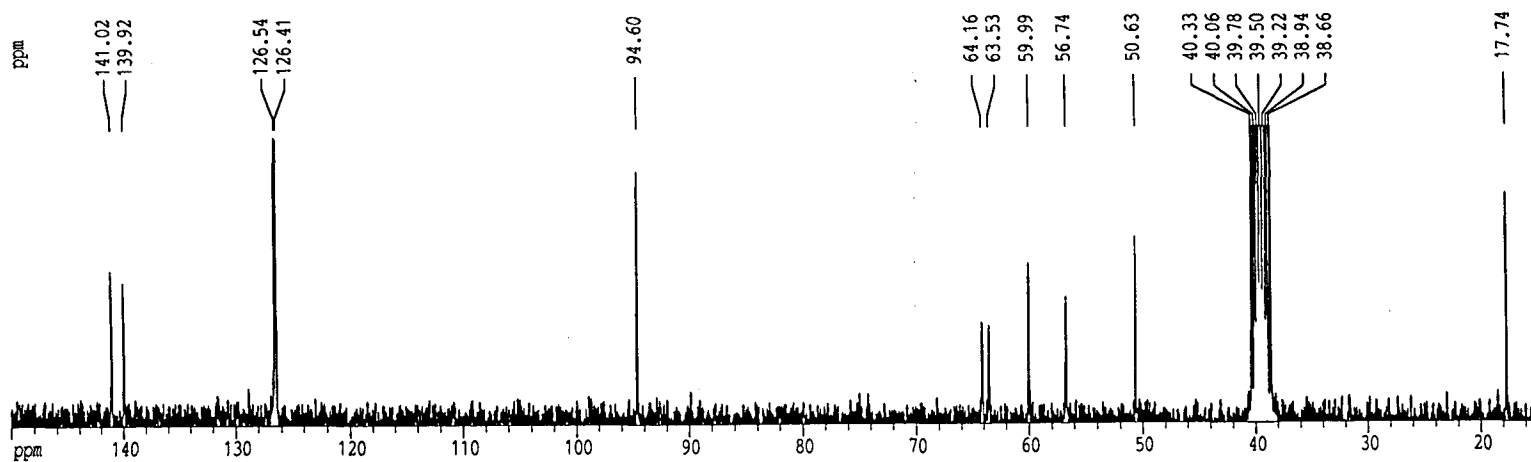
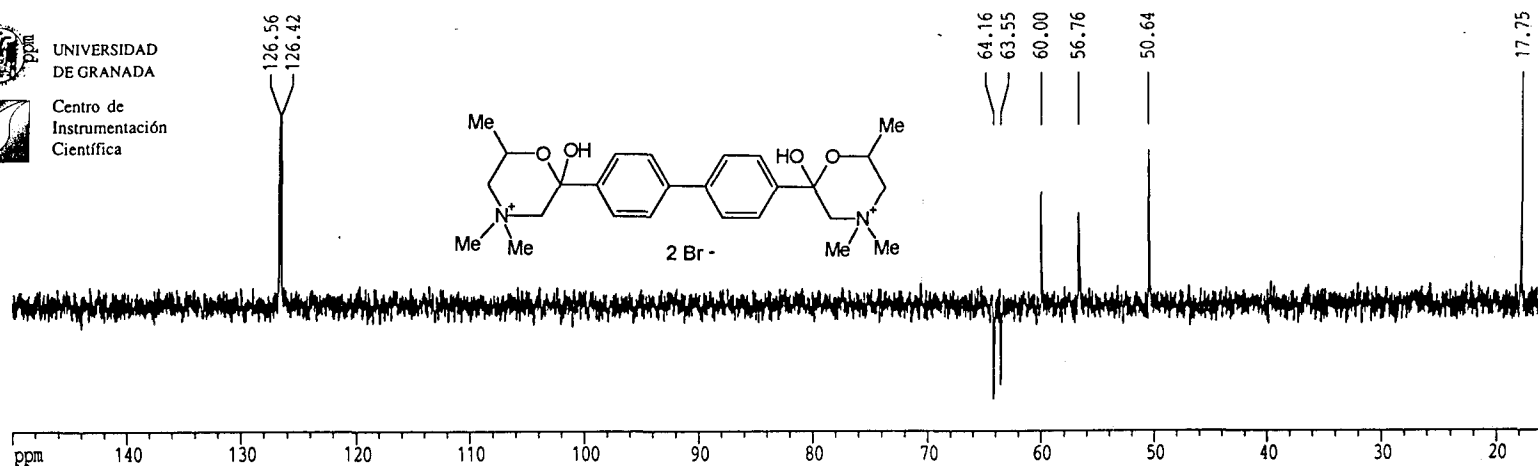


| Comp. ^a | H-2 | H-3 | H-2' | H-1'' | H-2'' | H-3'' | H-4'' | N-Me |
|--------------------|-----------------------|---------|---------|-----------------------|-----------------------|---------|-----------------------|--------------------|
| 33b | 8,03, d J ; 8,50 | 8,15, d | 5,49, s | 3,71, c J ; 7,0 | 1,30, t J ; 7,2 | | | 3,36, s 3,30, s |
| 33d | 8,04, d J ; 8,40 | 8,14, d | 5,40, s | 3,62, t J ; 8,20 | 1,71, m | 1,31, m | 0,92, t J ; 7,25 | 3,31, s |
| 47 | 8,05, d J ; 8,60 | 8,14, d | 5,42, s | 3,71, m | 1,89, m | 3,48, m | | 3,32, s |
| 51a | 8,06, d J ; 8,60 | 8,12, d | 5,42, s | 3,83, d J ; 4,50 | 5,03, t J ; 4,60 | | | 3,44, s |
| 51b | 8,05, d J ; 8,60 | 8,12, d | 5,42, s | 3,83, d J ; 4,42 | 5,06, t J ; 4,60 | | | 3,43, s 3,33, s |

^aEn la fórmula se representa la estructura abierta del hemicolinio HC-3 con la finalidad de mostrar la numeración seguida en la asignación de señales. Para cada compuesto se representan los valores de desplazamiento químico (δ) en la primera línea y los de J (Hz) en la segunda línea.



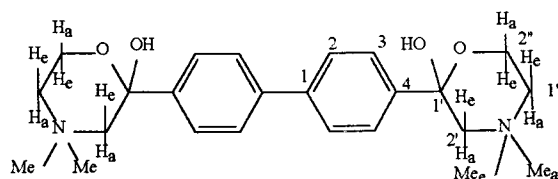
¹H-RMN-4: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis[(2-hidroxiopropil)dimetilamonio] 41.



¹³C-RMN-4: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis[(2-hidroxiopropil)dimetilamonio] 41.

En el compuesto líder **1** y en su derivado ramificado **41** aparece una señal entre 7,30 y 7,40 ppm que corresponde al átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo hemiacetalico, que resuena como doblete. Comparando las señales espectroscópicas para estos dos compuestos con las de los demás se constata un cambio en la del proton H-2', que puede interpretarse en base al equilibrio entre forma abierta y forma cicloetálica que se produce sólo en aquellos dos compuestos y que conduce a sistemas provistos de anillo de morfolinio (1,4-oxazinio), cuyos hidrógenos geminales no son equivalentes.

Tabla 3.3 Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) de ^1H -RMN de los compuestos **1 y **41**.**



| Com | H2 | H3 | H2'a | H2'e | H1''a | H1''e | H2''a | H2''e | Me-a | Me-e |
|----------------------|----------------|---------|---------------------|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 1^a | 7.64, d | 7.77, d | 3.68, d | 4.09, d | 3.60, m | 3.60, m | 3.32, d | 4.43, m | 3.18, s | 3.45, s |
| | $J_{2,3}; 8.4$ | | $J_{a,e};$ 12.93 | $J;$ 13.19 | | | | | | |
| 41 | 7.65, d | 7.79, d | 3.65dd | 3.65dd | 3.22, m | 3.26, m | 4.62, m | — | 3.32, s | 3.46, s |
| | $J_{2,3}; 8.0$ | | $J_{a,e};$ 13.1 | | | | | | | |

^aEn la fórmula se representa la estructura cicloetálica del hemicolinio HC-3 con la finalidad de mostrar la numeración seguida en la asignación de señales. Para cada compuesto se representan los valores de desplazamiento químico (δ) en la primera línea y los de J en la segunda línea.

Al analizar los valores de los desplazamientos químicos ^{13}C -RMN se vuelve a confirmar que los compuestos **1** y **41** existen sólo bajo la forma cíclica **1b**, que contiene en su estructura

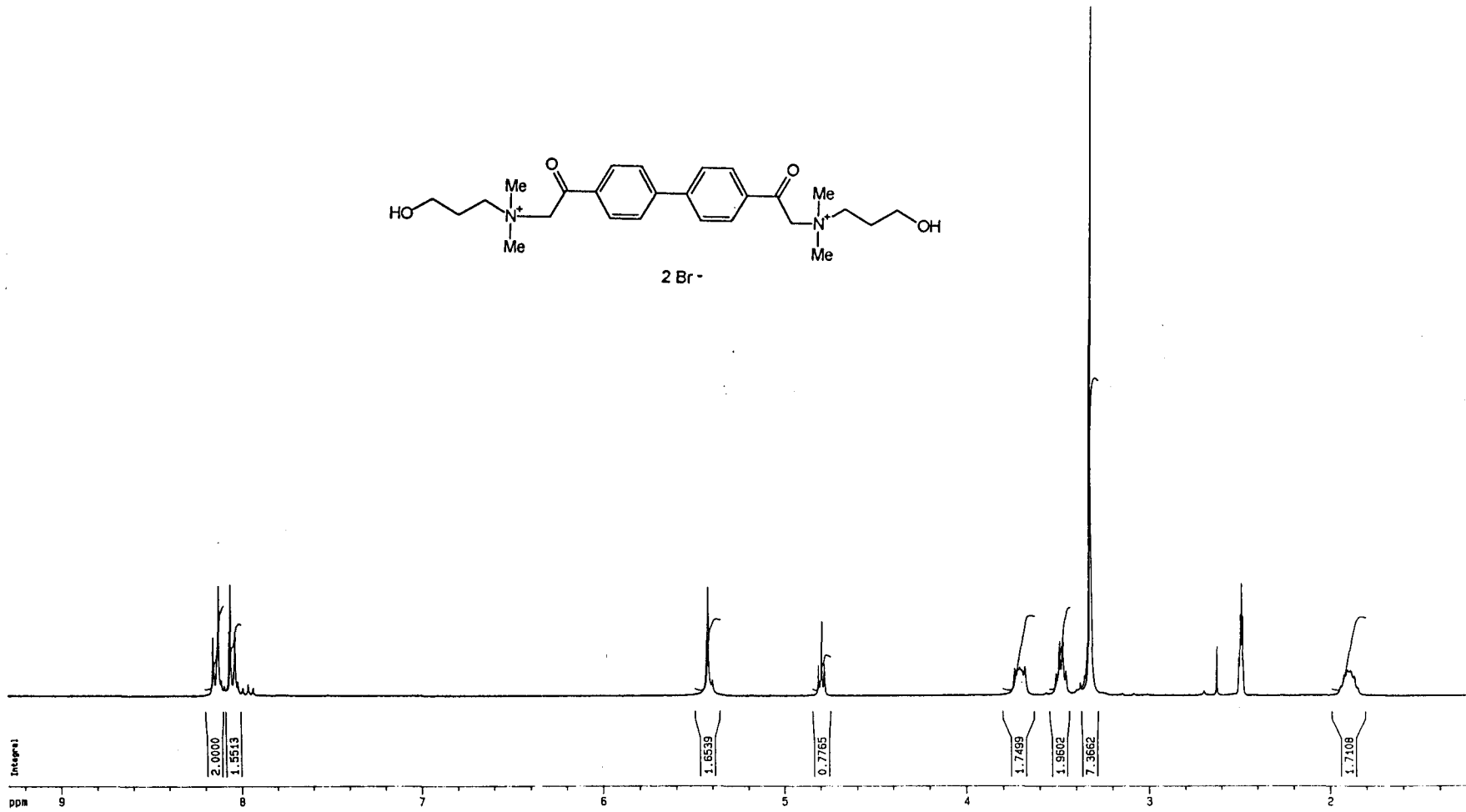
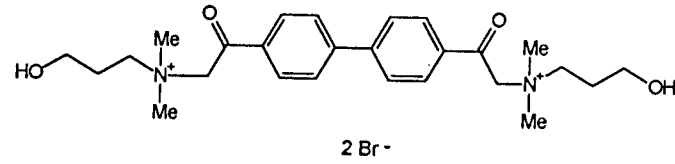
el anillo oxazinio. Esto se demuestra observando la señal a 94.29 (compuesto 1) y 94.60 ppm. (compuesto 41), debida al carbono hemiacetalico, que, como puede ser visto, no existe en los demás compuestos estudiados, por lo que se puede afirmar que, bajo las condiciones experimentales en las que se ha registrado el espectro, ambos compuestos se encuentran exclusivamente bajo la forma cíclica.

Sin embargo, el análisis del espectro del compuesto 47, muestra la presencia de la señal correspondiente a un átomo de carbono carbonílico a 191.02 ppm., lo que concordaría con la preferencia, bajo las condiciones del experimento de resonancia, por la forma abierta, en completo acuerdo con lo descrito previamente por otros autores¹¹⁸. Una interpretación plausible de este hecho podría ser la siguiente: la estructura septanoide (catión perhidro 1,4-oxazepinio) que debe formarse a partir del compuesto 47, como forma ciclocetalica, muestra una cinética muy desfavorable para su formación si se le compara con la del catión 1,4-oxazinio. Las señales correspondientes a los átomos de carbono aromáticos aparecen entre 144,00 y 126,00 ppm.

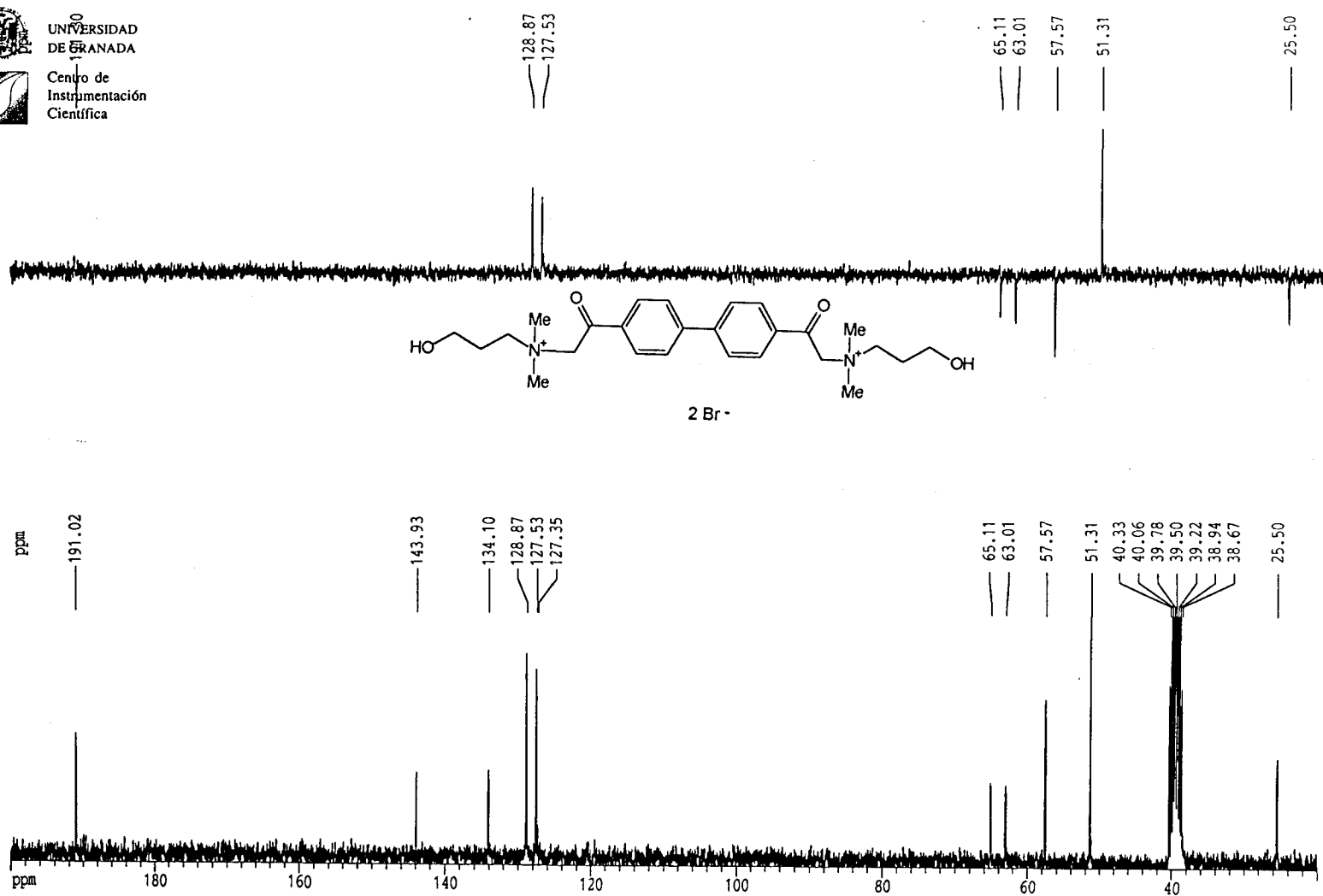
Tabla 3.4.- Desplazamientos químicos ¹³C-RMN de los compuestos del grupo A_r

| Compuesto | C-1' | C-2' | C-1'' | C-2'' | C-3'' | C-4'' | N-Me |
|-----------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| 1 ^a | 94,29 | 64,78 | 58,98 | 54,63 | | | 56,60 49,85 |
| 33b | 191,30 | 64,58 | 60,30 | 8,06 | | | 50,56 |
| 33d | 191,10 | 64,59 | 64,95 | 23,86 | 19,12 | 13,40 | 51,27 |
| 41 ^a | 94,60 | 64,16 | 63,53 | 60,00 | | | 56,74 50,64 |
| 47 | 191,02 | 65,11 | 63,01 | 25,50 | 57,57 | | 51,31 |
| 51a | 190,66 | 65,80 | 63,61 | 96,54 | | | 53,50 |
| 51b | 190,81 | 65,69 | 63,09 | 98,22 | | | 54,01 |

^aLos dos grupos metilo sobre el átomo de nitrógeno positivo son diastereotópicos



¹H-RMN-5: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis[(3-hidroxiopropil)dimetilamonio] 47.



¹³C-RMN-5: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis[(3-hidroxiopropil)dimetilamonio] 47.

3.2.2.- Diseño y elucidación estructural de análogos de la forma cíclica del HC-3 (Compuestos 30 - 32 y 55 - 56): Subgrupo A₂.

Se ha preparado un conjunto de compuestos que responden a una serie de modificaciones llevadas a cabo sobre la molécula de HC-3 con la finalidad de obtener derivados rígidos y/o planos del prototipo. En primer lugar se incluye el grupo de compuestos 30- 32 y 55- 56, (Subgrupo A₂) que muestran en común la sustitución de la cadena lateral de la molécula prototipo por un heterociclo saturado de cinco o seis miembros o por un sistema bicíclico. En segundo lugar se estudian los compuestos 54 y 57- 60 (Subgrupo A₃) que contienen un anillo aromático reemplazando al anillo de oxazinio.

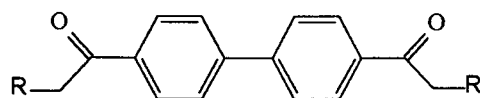
Los compuestos 30 - 32, 55 y 56 (véase Tabla 3.5) han sido incluidos en nuestro estudio porque pueden ser considerados como derivados rígidos del prototipo HC-3 que contienen una serie de modificaciones en la cadena lateral del prototipo. Los compuestos 30- 32 han sido previamente descritos en la bibliografía¹¹⁰ ya que han sido estudiados como anticolinérgicos. En consecuencia, se puede asumir que algunos de nuestros compuestos podrán tener un efecto anticolinérgico secundario debido a que en ellos se mimetiza la distancia entre los dos átomos de nitrógeno cuaternarios (13-15 Å) propia de los bloqueantes muscarínicos. No obstante este presumible efecto secundario, se ha considerado conveniente incluirlos para su estudio como inhibidores de colina quinasa debido a la información estructural que pueden suministrar sobre el proceso de reconocimiento molecular entre enzima y sus ligandos.

La sustitución de la cadena lateral de la molécula de hemicolinio HC-3 por el anillo de *N*-metil piperidinio da lugar al compuesto 30. El análisis de la actividad de este compuesto debe suministrar información sobre la importancia del grupo hidroxilo en el proceso de reconocimiento molecular y, en segundo lugar, sobre el papel del anillo de piperidinio, que mimetiza una de las conformaciones preferentes de la cadena lateral y que aumenta la lipofilia de la molécula.

El compuesto **31** contiene en su estructura el anillo de *N*-metil morfolinio y es un isómero del compuesto **30** que mimetiza perfectamente la forma cíclica (**1b**) de la molécula de hemicolinio, de la que se diferencia solamente en los dos grupos hidroxilos situados en las posiciones 1' (véase fórmula en Tabla 3.3). El átomo de oxígeno morfolinico podría establecer enlaces de hidrógeno con la proteína enzimática y, en consecuencia, podrá ser fuente de información sobre la capacidad del sitio activo de la enzima para establecer este tipo de interacciones.

También se ha sustituido la cadena lateral del prototipo HC-3 por un anillo de cinco miembros y, por lo tanto, de menor tamaño representado por el anillo *N*-metil pirrolidinio (Compuesto **32**).

Tabla 3.5.- Estructuras de los compuestos del subgrupo A_2



| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------------------|---|-----------|---|
| 30 | | 55 | |
| 31 | | 56 | |
| 32^a | | | |

^aEl compuesto 32 ha sido sintetizado bajo forma de bicloruro.

Una regla general de la farmacomodulación que se aplica en el diseño racional de inhibidores enzimáticos es la búsqueda de compuestos de mayor volumen que el sustrato. Esta regla se ha aplicado en el diseño de los derivados de quinuclidinio **55** y **56**.

Resulta interesante la estructura del compuesto **56** ya que se trata de un derivado rígido del prototipo que muestra una gran semejanza estructural con la forma abierta **1a** del hemicolinio en la conformación extendida de la cadena lateral, que queda perfectamente mimetizada a través del grupo hidroxilo situado en la posición 3 del anillo de quinuclidinio. En la Tabla 3.5 se recogen las diferentes estructuras de los compuestos arriba citados.

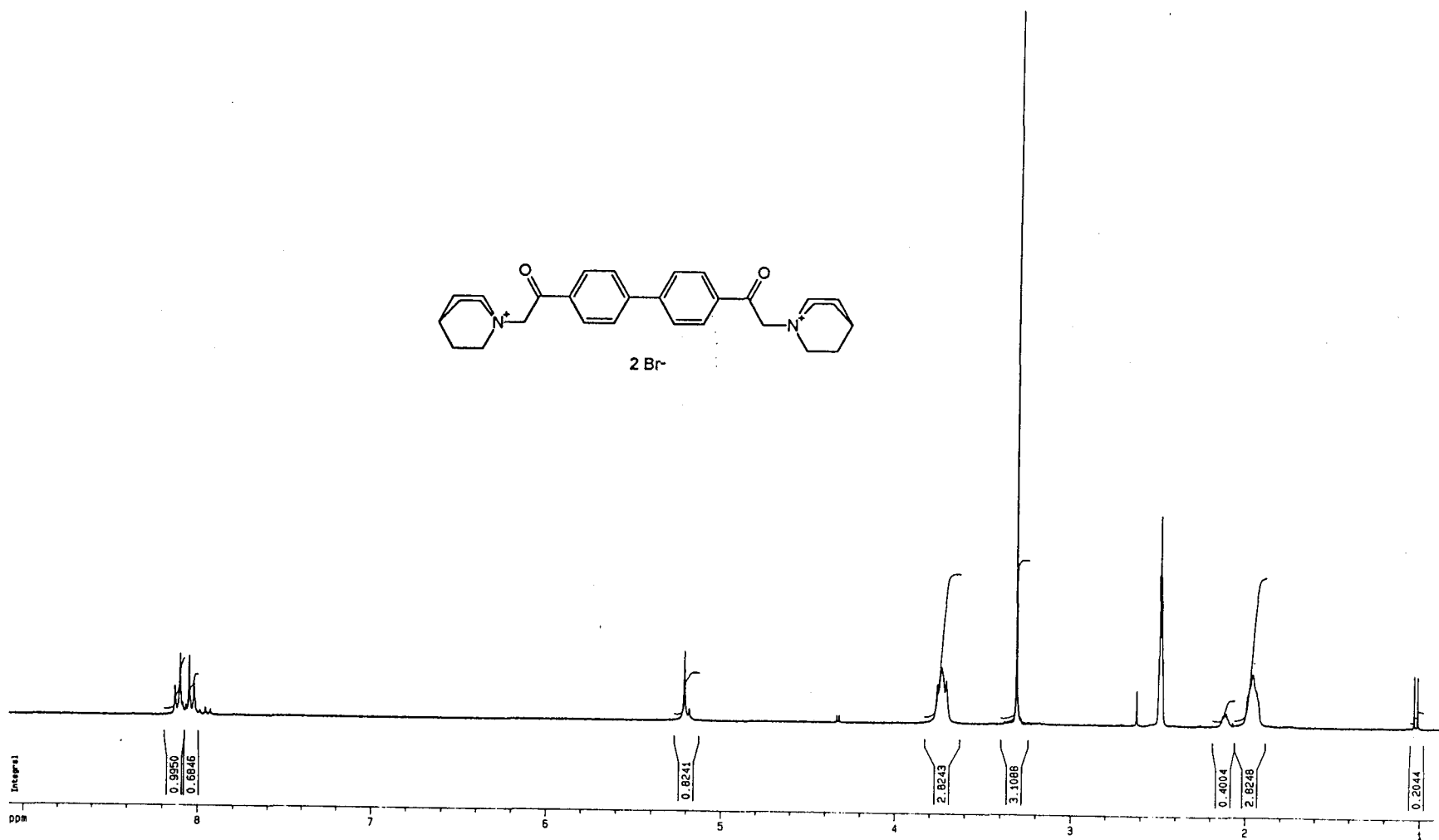
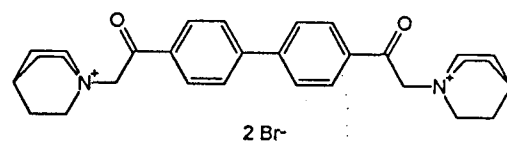
3.2.2.1.- Análisis estructural de los compuestos 30-32 y 55-56 (Subgrupo A₂).

En las Tablas 3.6 (¹³C-RMN) y 3.7 (¹H-RMN) se resumen las principales características espectroscópicas de este grupo de compuestos. Los datos espectroscópicos (y los resultados del análisis elemental) confirman las estructuras propuestas para estos compuestos que, como puede ser visto, presentan un alto grado de simetría con la excepción del compuesto **56**, en el que la introducción del grupo hidroxilo sobre el anillo de quinuclidinio rompe la simetría propia del anillo bicíclico.

Tabla 3.6.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) ¹³C-RMN de los compuestos del grupo A₂.

| Com. | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-1' | C-2' | C-2'' | C-3'' | C-4'' | NMe |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|------|
| 30 | 134.4 | 127.5 | 129.1 | 143.9 | 191.4 | 64.4 | 61.4 | 54.1 | 23.2 | 47.8 |
| 31 | 134.2 | 127.5 | 128.9 | 143.9 | 190.7 | 63.3 | 60.4 | 59.8 | — | 47.4 |
| 32 | 134.0 | 127.4 | 128.8 | 143.8 | 191.2 | 66.9 | 65.1 | — | — | 49.2 |
| 55 | 134.4 | 127.6 | 128.9 | 143.9 | 190.9 | 65.3 | 54.9 | 45.8 | 18.8 | — |
| 56^a | 134.3 | 127.6 | 128.2 | 143.9 | 190.9 | 65.2 | 63.5 | 63.3 | 26.1 | — |

^aEl espectro de **56** se muestra completo en la Parte Experimental.



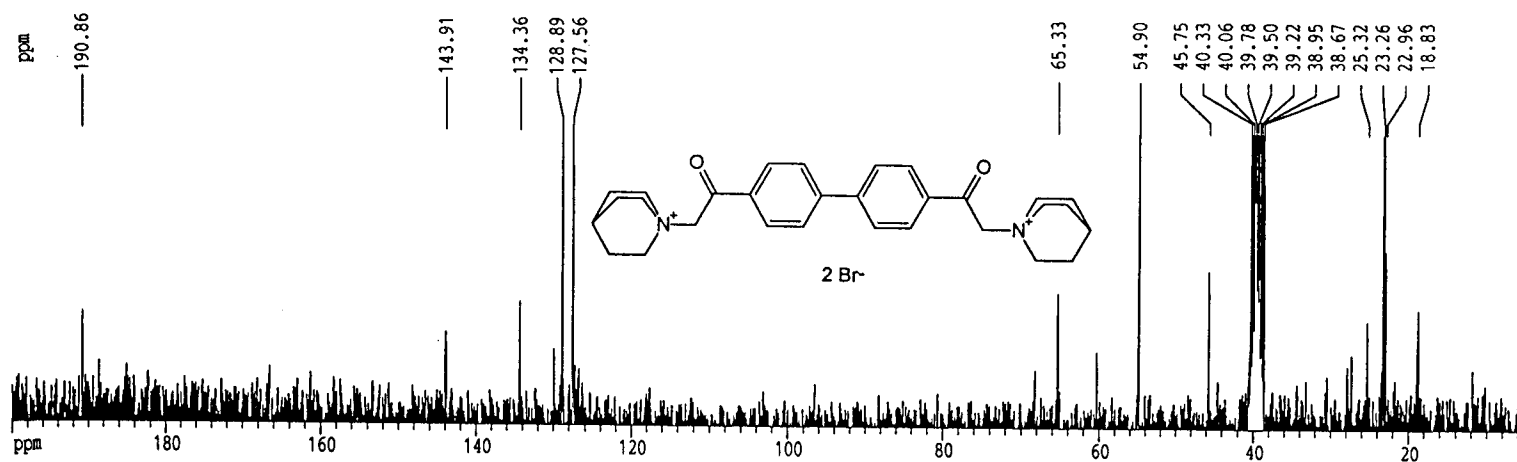
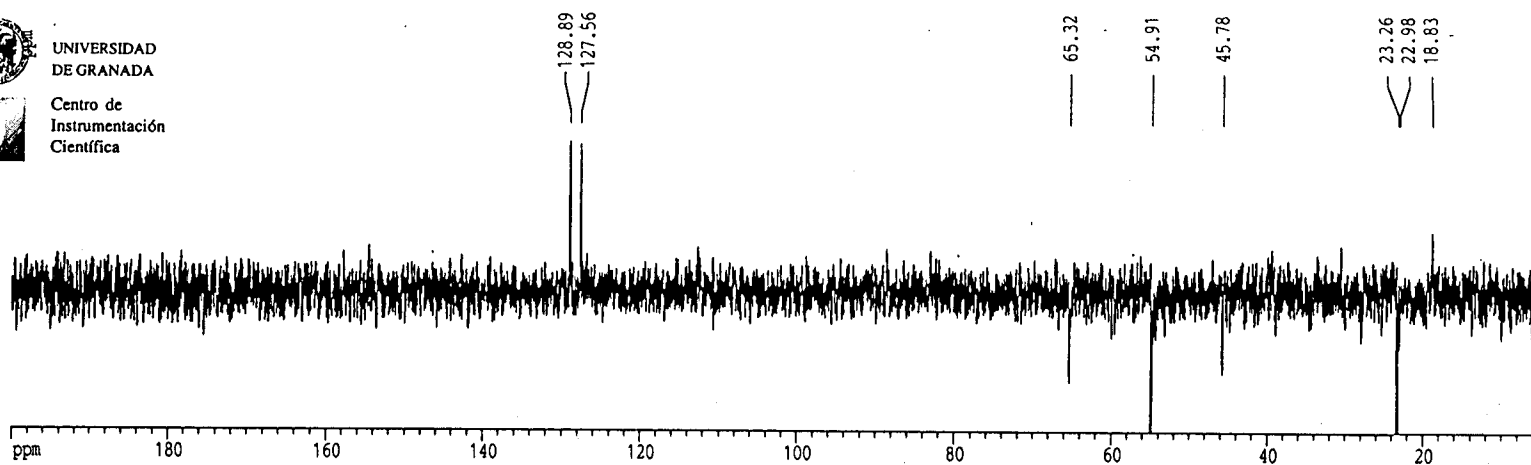
¹H-RMN-6: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carboximetil)]bisquinuclidinio 55.



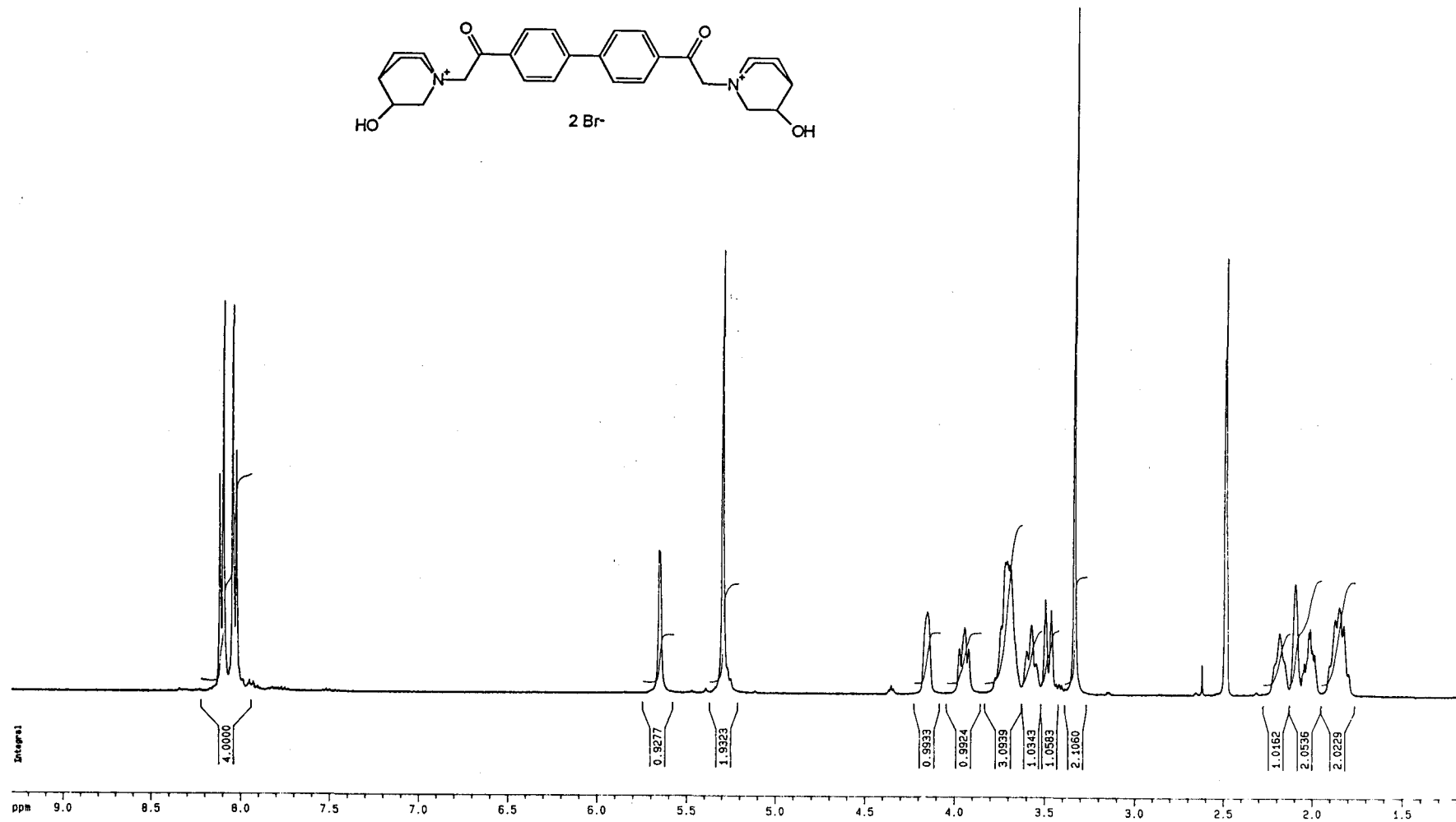
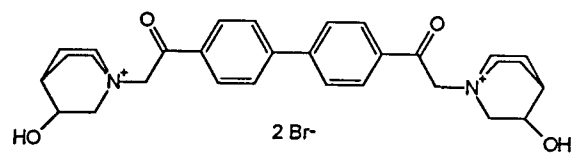
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



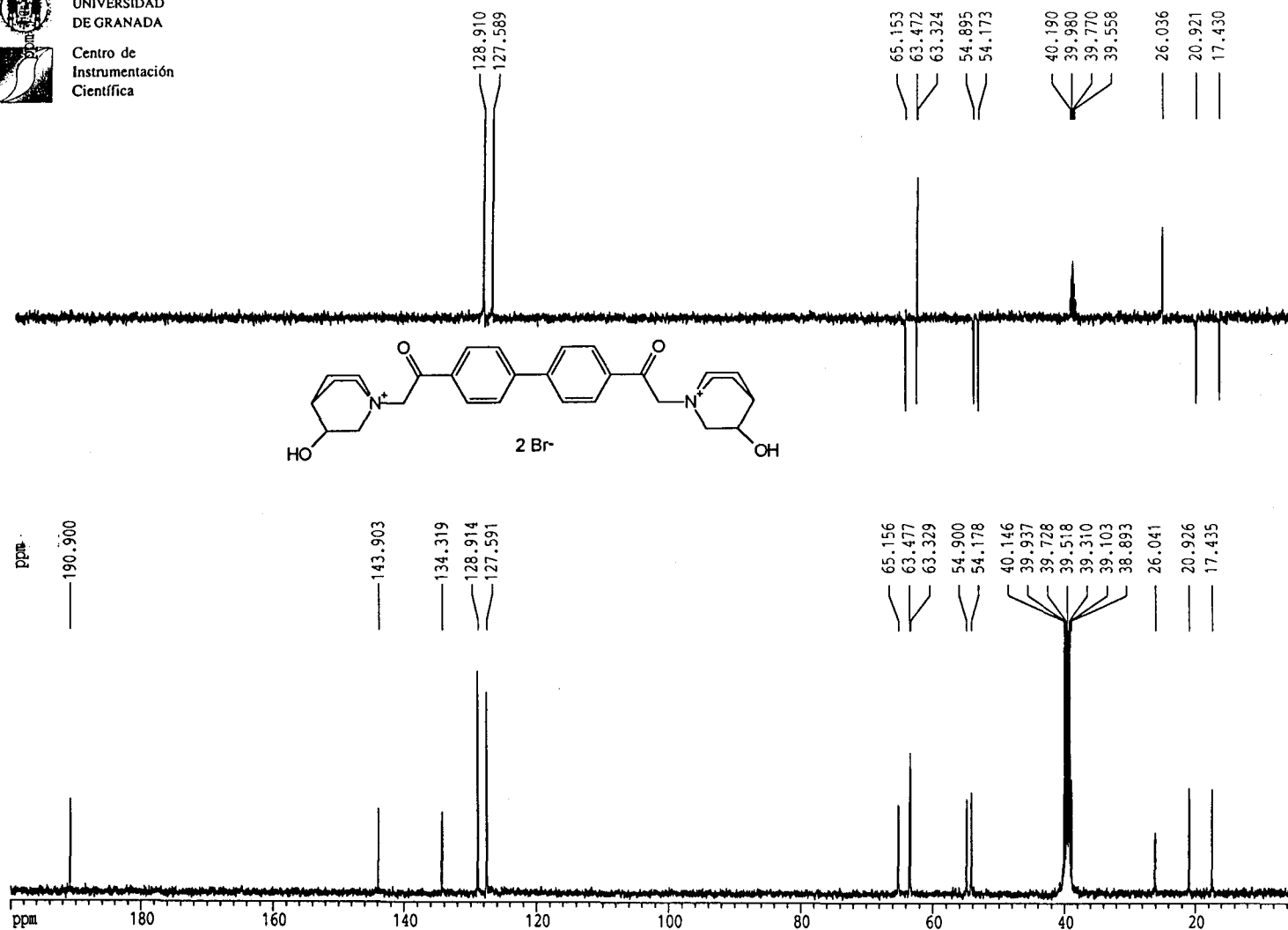
^{13}C -RMN-6: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(quinuclidinio) 55.



¹H-RMN-7: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis[(3-hidroxi)quinuclidinio] 56.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA
Centro de
Instrumentación
Científica

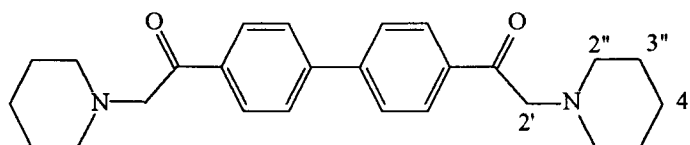


¹³C-RMN-7: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(3-hidroxi)quinuclidinio 56.

Las señales de los átomos de carbono aromáticos resuenan entre 143.80 y 127,40 ppm en ^{13}C -RMN. Las señales de los átomos de hidrógeno aromáticos resuenan entre 8,20 y 8,00 ppm en ^1H -RMN bajo el patrón de acoplamiento de sistemas AB con constantes de acoplamiento de 8,40 Hz.

Como se ha mencionado previamente, la introducción de un grupo hidroxilo en la posición 3'' del sistema bicíclico rompe la simetría de la quinuclidina. Esto se refleja claramente en el espectro de ^1H -RMN de los compuestos 55 y 56.

Tabla 3.7.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento J (Hz) de los compuestos del subgrupo A_2 .



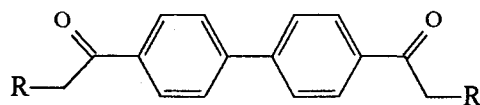
| Comp. ^a | H-2 | H-3 | H-2' | H-2'' | H-3'' | H-4'' | N-Me |
|--------------------|-----------------------|---------|---------|---|---------|---------|---------|
| 30 | 8,03, d J , 8,44 | 8,17, d | 5,57, s | 3,82-3,65 m | 1,89, m | 1,60, m | 3,34, s |
| 31 | 8,03, d J , 8,60 | 8,15, d | 5,58, s | 3,80, m | 3,74, m | | 3,46, s |
| 32 | 8,05, d J , 8,42 | 8,15, d | 5,50, s | 3,80, m | 2,15, m | | 3,26, s |
| 55 | 8,03, d J , 8,40 | 8,15, d | 5,21, s | 3,74, t J , 7,6 | 1,96, m | 2,15, m | |
| 56 | 8,04, d J , 8,45 | 8,11, d | 5,30, s | 3,97 (He),t 3,58 (Ha),t J , 11,02 | 4,15, m | 2,19, m | |

^aEl resto de señales se muestra en la Parte Experimental. Las constantes de acoplamiento no son siempre observables ya que las señales son, en general, anchas y, en muchos casos, superpuestas.

3.2.3.- Diseño y análisis estructural de los derivados del hemicolinio con un heterociclo aromático 54 y 57- 60: Subgrupo A₃.

Los derivados previamente descritos contienen en sus extremos diversos sustituyentes sobre grupos de amonio cuaternario, es decir, los extremos de las moléculas simétricas adoptan diferentes ordenamientos tridimensionales de los átomos que la componen. Con la finalidad de explorar sistemáticamente el sitio activo de la enzima colina quinasa se ha considerado conveniente diseñar y sintetizar moléculas que contengan en sus extremos grupos iminio, provistos de estructura plana, para analizar cómo influye esta propiedad espacial sobre la actividad biológica.

Tabla 3.8.- Estructura de los compuestos del grupo A₃.

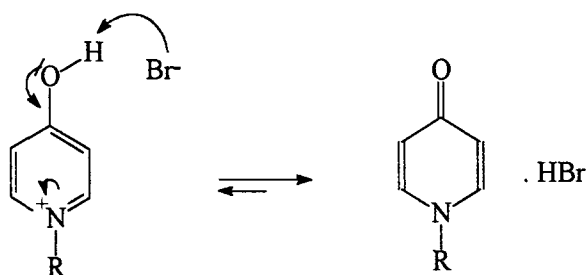


| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|---|-----------|---|
| 54 | | 59 | |
| 57 | | 60 | |
| 58 | | | |

Desde un punto de vista formal, estos compuestos pueden ser considerados como réplicas del compuesto líder en los que se ha sustituido en anillo de oxazinio por diferentes anillos aromáticos. Se debe mencionar que en la síntesis de los compuestos **54** y **59** no se ha utilizado disolvente como en los demás compuestos. En estos casos, la amina aromática, líquida a temperatura ambiente, actúa como reactivo y disolvente. La utilización de disolvente hace bajar los rendimientos.

El compuesto **54**, descrito previamente por Long y Schweler⁷⁷, representa el esqueleto común de todos estos compuestos, y deriva de la molécula de HC-3 por sustitución de su anillo de 1,4-oxazinio por un anillo de 1-piridinio.

La sustitución en la posición 4 del anillo piridínico de **54** por grupos hidroxilo y dimetilamino da lugar a los compuestos **57** y **58**. Aunque los dos sustituyentes caen dentro de la categoría de grupos electrondonantes, existen entre ellos diferencias de comportamiento notables que deben ser destacadas. En efecto, las sales de 4-hidroxipiridinio existen preferentemente como 4-oxo-derivados (Esquema 3.3) mientras que las sales de 4-amino (o dimetilamino)-piridinio no muestran tal preferencia estructural.



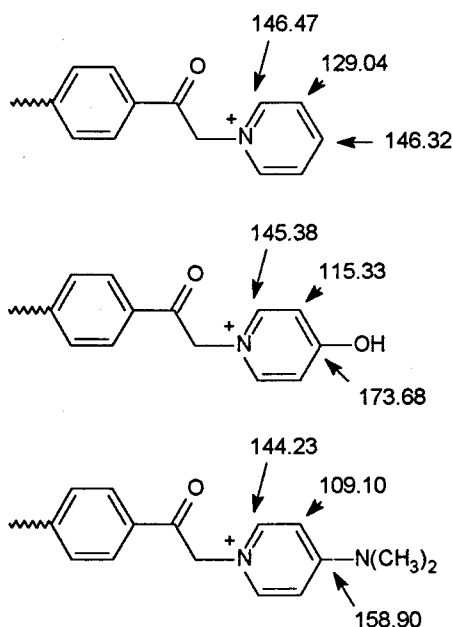
Esquema 3.3.- Equilibrio tautomérico piridinona- piridinol.

Finalmente, es necesario destacar que, debido a su carácter electrondonante, tanto el grupo hidroxilo como el dimetilamino enriquece electrónicamente al heterociclo π -deficiente lo que hace a estas moléculas más susceptibles de establecer interacciones de transferencia de carga con anillos aromáticos electróndeficientes contenidos en el sitio activo de la proteína enzimática.

Otros análogos aromáticos del prototipo HC-3 han sido diseñados sustituyendo el anillo de piridinio por heterociclos aromáticos más voluminosos. Tal es el caso de los compuestos **59** y **60** que contienen los heterociclos quinoleína e isoquinoleína, respectivamente. Como se ha mencionado anteriormente, la introducción de grupos voluminosos en el diseño de inhibidores enzimáticos y/o de antagonistas, es una regla de la farmacología que permite la exploración de las dimensiones del sitio activo de la enzima.

3.2.3.1.- Análisis estructural de los compuestos **54** y **57- 60** (Subgrupo A₃).

El análisis de los datos espectroscópicos de los compuestos **54**, **57** y **58** se muestra resumido en las Tablas 3.9 y 3.10. Asimismo, en el Esquema 3.4 se muestran y se comparan las señales de resonancia de los átomos C-2, C-3 y C-4 del anillo de piridinio diversamente sustituido.



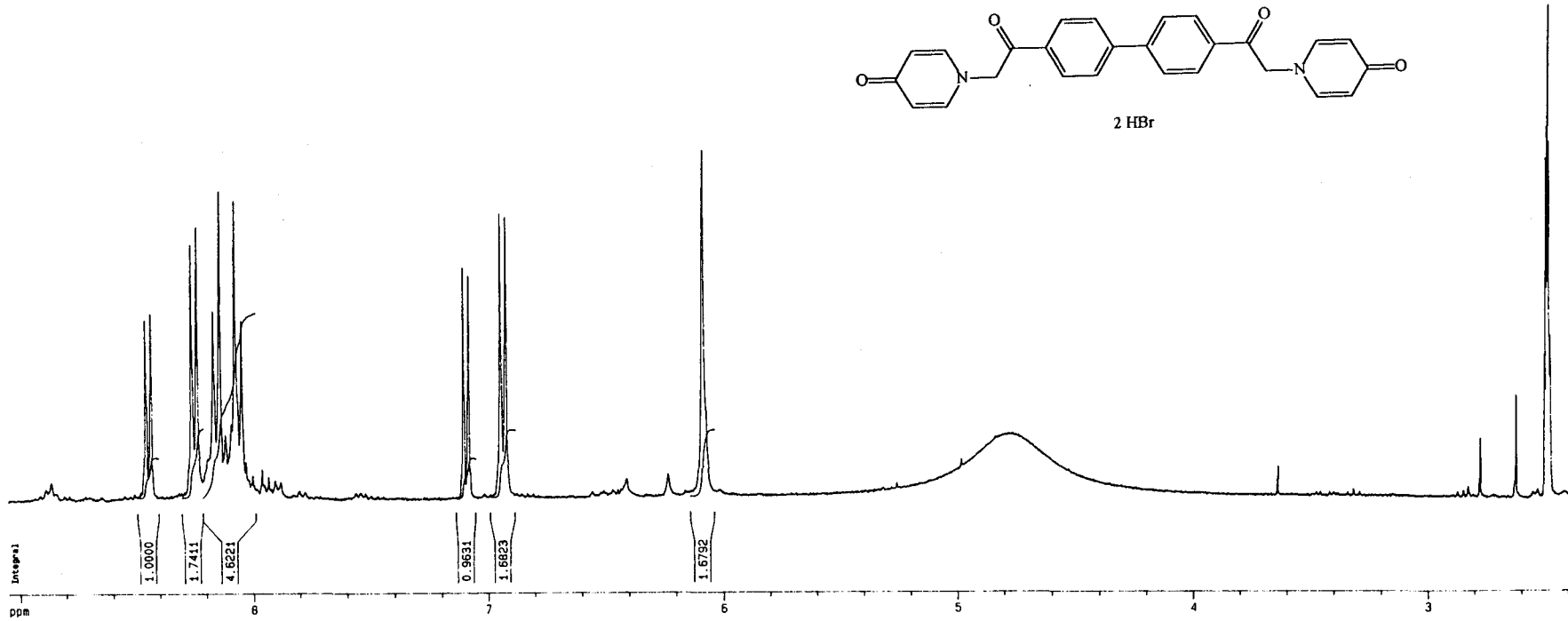
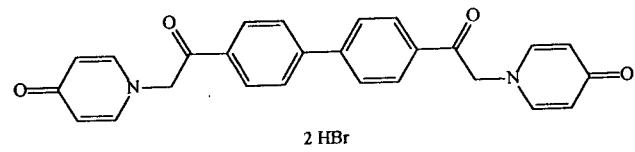
Esquema 3.4.- Desplazamientos químicos ¹³C-RMN del fragmento piridínico diversamente sustituido en posición 4.

Como puede observarse, los valores de los desplazamientos químicos de C-2 y C-3 se encuentran algo apantallados como consecuencia del carácter electrón-donante de los sustituyentes en la posición 4. Sin embargo, el hecho más significativo es el gran desapantallamiento observado para C-4 en el piridinol **57** (173.68 ppm frente a 146.32 ppm en el producto no sustituido), así como la presencia de dos señales para este átomo de carbono (173.68 y 172.42 ppm, respectivamente) que puede ser interpretado, de acuerdo con Katrizky¹¹⁹, como debido al equilibrio tautomérico entre el 4-piridinol y la 4-piridinona. Sin embargo, estudios más detallados de los espectros tanto de ¹H-RMN como de ¹³C-RMN, han mostrado que, el producto obtenido es una mezcla de la 4-piridinol y el producto de la reacción, que se encuentra en forma de 1,1'-[bifenil(carbonilmetil)]-4-piridona.

Tabla 3.9.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) ¹³C-RMN de los compuestos del grupo A₃

| Compuesto | C-2" | C-3" | C-4" | C-5" | C-6" | C-7" | C-8" |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 54 | 146,47 | 129,04 | 146,32 | | | | |
| 57 | 145,38 | 115,33 | 173,68 | | | | |
| 58 | 144,23 | 109,10 | 158,90 | | | | |
| 59 | 150,97 | 135,92 | 148,62 | 130,63 | 119,15 | 127,65 | 122,15 |
| 60 | 137,49 | 136,33 | 130,59 | 129,14 | 125,45 | 131,39 | 151,69 |

Las señales correspondientes a los protones aromáticos bifenílicos resuenan entre 8,40 y 8,00 ppm como sistema AB y con constante de acoplamiento de 8,40 Hz. Las señales de los átomos de carbono aromáticos aparecen entre los valores esperados de 145.00 y 110.00 ppm. El resto de las señales espectroscópicas son compatibles con las estructuras propuestas.



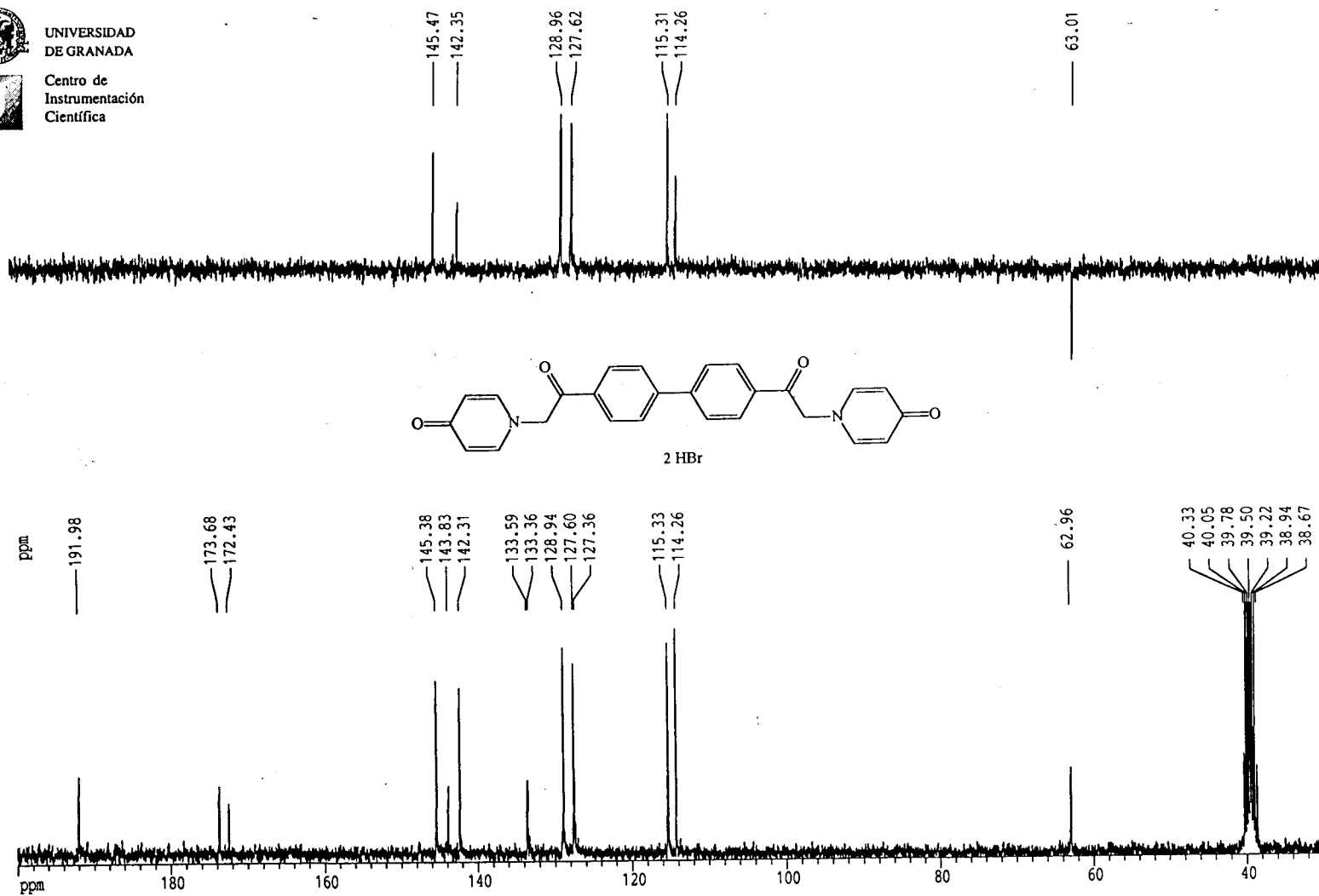
¹H-RMN-8: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis-4-piridona 57.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN-8: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis-4-piridona 57.

Tabla 3.10.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) determinadas en los compuestos del grupo A₃

| Comp. | H-2 | H-3 | H-2' | H-2'' | H-3'' | H-4'' |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 54 | 8,13, d | 8,21, d | 6,63, s | 9,09, d | 8,30, t | 8,76, t |
| | J; 8,40 | | | J; 5,64 | J; 7,20 | J; 7,80 |
| 57 | 8,06, d | 8,16, d | 6,09, s | 8,45, d | 7,09, d | |
| | J; 8,50 | | | J; 7,30 | J; 7,30 | |
| 58 | 8,07, d | 8,15, d | 6,03, s | 8,12, d | 6,92, d | |
| | J; 8,49 | | | J; 7,33 | J; 7,43 | |
| 59 | 8,17, d | 8,31, d | 7,14, s | 9,62, d | 8,36, t | 9,47, d |
| | J; 8,60 | | | J; 7,00 | J; 5,80 | J; 8,40 |
| 60 | 8,16, d | 8,27, d | 6,73, s | 8,79, d | 8,71, d | 8,44, d |
| | J; 8,50 | | | J; 6,80 | J; 6,90 | J; 8,30 |

3.2.4.- Síntesis de los compuestos incluidos en el grupo A.

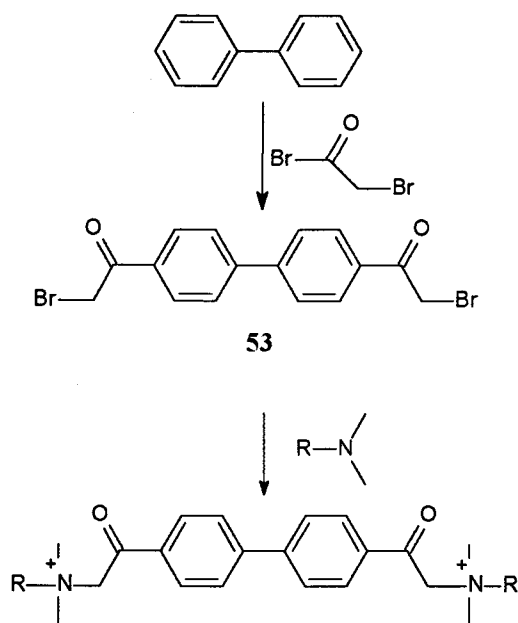
La química involucrada en la síntesis de estos compuestos es muy sencilla. En general, la síntesis consta de dos etapas (véase Esquema 3.5):

1) Síntesis de la materia prima: 4,4'-Dibromoacetil-1,1'-bifenilo **53**, para la que se ha utilizado la metodología descrita por Martin Shreeve y Hemsworth¹⁰⁵ habiéndose mejorado el rendimiento de la reacción (rendimiento bibliográfico 35%; rendimiento mejorado 50 %).

2) Condensación del compuesto **53** con la amina apropiada asequible comercialmente.

Aunque la química involucrada en la formación de los compuestos pertenecientes al grupo A es sencilla, la manipulación y purificación de estos compuestos es realmente difícil. Normalmente son muy higroscópicos, por un lado, y de difícil recristalización, por otro, siendo los alcoholes de tres átomos de carbono los mejores disolventes para la purificación. En la Parte

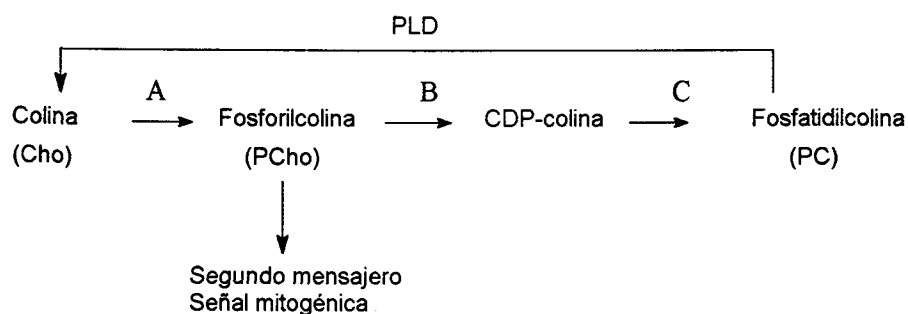
experimental se indican rendimientos, disolventes de purificación, etc., de cada uno de estos compuestos, que aparecen como sólidos cristalinos o amorfos, incoloros, en la mayor parte de los casos estudiados.



Esquema 3.5.- Esquema simplificado de la síntesis de los compuestos pertenecientes al grupo A.

3.2.5.- Resultados biológicos: actividad inhibitoria de colina quinasa y antiproliferativa.

Los ensayos que se han utilizado para el cribaje de compuestos con actividad antitumoral se basan en la capacidad de los mismos de inhibir la producción de fosforilcolina (PCho) o de interferir con la utilización de este metabolito en rutas de transmisión de señales mitogénicas, independientes de las rutas de síntesis de fosfatidilcolina (PC), uno de los lípidos de membrana de las células eucarióticas más abundantemente. El esquema de síntesis de PC se puede resumir en el Esquema 3.6.:



Esquema 3.6.- Representación de las rutas metabólica y mitogénica de fosforilcolina (PCho).

En el Esquema 3.6 **A** corresponde a la enzima colina quinasa (EC 2.7.1.32), **B** a la citidil transferasa (EC 2.7.7.15) y **C** a la colino fosfotransferasa (EC 2.7.8.2).

Nuestra hipótesis original implica que la PCho es utilizada por las células para una ruta de transmisión de señales alternativa a la de síntesis de PC, esencial para la regulación del crecimiento celular. Por otro lado, se conoce que las células transformadas por oncogenes ras presentan valores elevados de PCho. Basado en estos descubrimientos se puede concluir que existen, al menos, dos rutas por las cuales se puede inhibir drásticamente la proliferación celular de líneas tumorales de manera específica. Las dos estrategias son:

a) Inhibiendo directamente a la enzima colina quinasa, responsable de la producción de PCho, y

b) Bloqueando la utilización de PCho directamente en rutas de señalización mitogénica, sin afectar a la producción de PCho en las células.

Los compuestos se han sintetizado como inhibidores de colina quinasa aunque no es descartable que en algún caso se pueda inhibir alguna de las enzimas desconocidas que intervienen en el proceso desconocido de señalización mitogénica a partir de PCho.

Para medir la actividad inhibitoria de colina quinasa se han empleado tanto sistemas *ex vivo* (métodos llevados a cabo en tubos de ensayo libres de células) como *in vitro* (determinación de la actividad sobre células vivas e intactas).

En el método *ex vivo* se ha utilizado, por su sencillez y economía, colina quinasa comercial procedente de levaduras, aunque se puede usar también colina quinasa procedentes de mamíferos, incluyendo humanos. En la Parte Experimental se describe el método seguido.

En los ensayos *in vitro* se han utilizado tanto fibroblastos de ratón NIH 3T3 como células humanas disponibles como cultivos inmortalizados, concretamente, células cancerosas humanas HT-29. En la Parte Experimental también se describen las metodologías seguidas por nosotros.

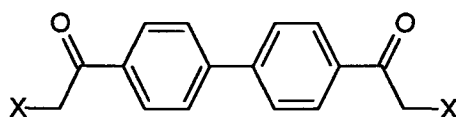
En el trabajo contenido en esta Memoria no se ha determinado la actividad de inhibición de la utilización de la fosforilcolina en la señalización mitogénica, aunque, como se describirá más adelante, no se puede descartar que algunos de los compuestos incluidos en esta investigación actúe a este nivel.

Finalmente, la actividad antiproliferativa de los compuestos objeto de esta Memoria se ha determinado sobre la línea celular humana HT-29, un cáncer de colon que muestra una gran resistencia al tratamiento con fármacos y que expresa resistencia múltiple a fármacos (MDR). Este ensayo debe considerarse como un primer cribaje a que son sometidos nuestros compuestos.

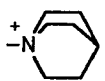
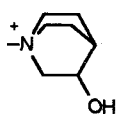
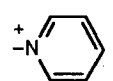
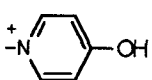
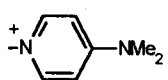
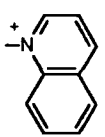
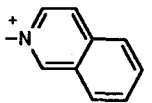
En la Tabla 3.11 se muestran los valores de IC_{50} (μM) de las actividades inhibitorias *ex vivo* e *in vitro* (sobre células NIH 3T3 y/o HT-29) y de la actividad antiproliferativa frente a HT-29.

El análisis de los valores de las diferentes actividades y la correlación estructura-actividad se discute en el apartado Discusión de Resultados.

Tabla 3.11.- Valores de CI_{50} (μM) de la actividad inhibidora de colina quinasa *ex vivo*, *in vitro* NIH3T3 e *in vitro* HT-29 y de la actividad antiproliferativa en HT-29.

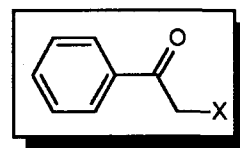


| Comp | Siglas | X | <i>Ex vivo</i> NIH3T3 ^a | <i>In vitro</i> NIH3T3 ^a | <i>In vitro</i> HT-29 ^a | <i>Antiprolif.</i> HT-29 ^a |
|------|--------------|---|---------------------------------------|--|---------------------------------------|--|
| 1 | FK14 HC-3 | | 500 | 600 | | 2.500 |
| 33b | FK5 | | >100 | | | (10) |
| 33d | FK6 | | >100 | | | >50 (7) |
| 41 | FK23 | | 3.5 | 70 | | |
| 47 | FK24 | | >100 | | | |
| 51a | FK10 | | >100 | | | >50 (8) |
| 51b | FK11 | | >100 | | | (9) |
| 30 | FK8 | | 7 | 90 | | >100 (9) |
| 31 | FK12 | | 100 | | | (9) |
| 32 | FK2 | | >100 | >100 | | >50 (10) |

| Continua Tabla 3.11 | | | | | | |
|---------------------|--------|---|---------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Comp. | Siglas | X | <i>Ex vivo</i> NIH 3T3 | <i>In vitro</i> NIH 3T3 | <i>In vitro</i> HT-29 | <i>Prolifer</i> HT-29 |
| 55 | FK22 |  | 30 | 80 | | |
| 56 | FK21 |  | 0.5 | >100 | >50 | >50 |
| 54 | FK7 |  | 13 | 55 | 22 | 5-20 (10) |
| 57 | FK17 |  | >100 | | | |
| 58 ^b | FK3 |  | 40 | | 5 | 5.5 |
| 59 | FK13 |  | 70 | | | |
| 60 ^b | FK19 |  | 50-100 | 30 | 7.5 | 2.25 |

^aLos datos biológicos han sido obtenidos en el laboratorio del Dr. Lacal, IIB (Madrid). Los valores que figuran entre paréntesis han sido determinados por Laboratorios Knoll S.A. (Madrid). En general, los valores que aparecen a la derecha de cada columna expresan actividades interesantes. No obstante, todos los compuestos sintetizados mejoran la actividad del compuesto líder HC-3.

^bLos compuestos 58 y 60 han sido ensayados a nivel de toxicidad. Los valores se resumen y discuten en el capítulo de Discusión de resultados.



3.3- Diseño, síntesis y análisis espectroscópico-estructural de los compuestos pertenecientes al grupo B.

En este apartado se describen los compuestos 5 y 61 - 78 que se subdividen, de acuerdo con los criterios empleados para su diseño, en los tres subgrupos B₁ (Compuestos en los que el nitrógeno positivo forma parte de estructuras acíclicas 5, 61 - 63), B₂ (Compuestos en los que el nitrógeno positivo forma parte de heterociclos saturados 64 - 67) y B₃ (Compuestos en los que el nitrógeno positivo forma parte de heterociclos aromáticos 68 - 78). Todas estas moléculas tienen en común que pueden ser sintetizadas a partir de acetofenona.

Como se ha mencionado anteriormente, la molécula del hemicolinio HC-3 tiene una estructura simétrica que permite a los dos átomos de nitrógeno cargados positivamente situarse a una distancia de 14.5 Å en las conformaciones preferentes; esta distancia es la adecuada para provocar un bloqueo colinérgico a nivel de los receptores muscarínicos $M_1 - M_3$. Con la finalidad de explorar el sitio catalítico de la enzima colina quinasa, por un lado, y de tratar de evitar o disminuir los efectos secundarios que pueden provenir del bloqueo muscarínico, por otro, se ha considerado conveniente y necesario incluir en nuestro estudio una serie de moléculas provistas de estructuras que contengan la mitad de los átomos del hemicolinio y/o de sus derivados y análogos, es decir, investigar la potencia inhibitoria de la enzima colina quinasa en moléculas que contengan una sola cabeza catiónica. Algunas de estas moléculas han sido descritas en bibliografía^{90, 118}. Tal es el caso del compuesto HC-15 5, que representa la molécula mitad del HC-3 (véase Tabla 3.12).

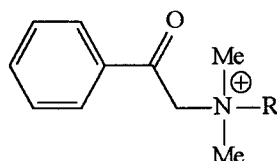
3.3.1- Compuestos en los que el nitrógeno positivo forma parte de estructuras acíclicas: Subgrupo B₁.

En este subgrupo se incluyen los compuestos 5, que ha sido previamente descrito por Schweler⁹⁰, y 61 - 63. Los criterios empleados para su estudio son los que previamente se han descrito para el subgrupo A₁ (véase apartado 3.2.1). Parece razonable pensar que este tipo de compuestos, así como los incluidos en los subgrupos B₂ y B₃, puedan suministrar información sobre lo que acontece a nivel de reconocimiento molecular entre ligando y enzima. En este sentido, la pregunta que se puede formular a priori puede ser la siguiente: ¿Se necesita la estructura completa del prototipo HC-3, que contiene dos cabezas polares cargadas positivamente, para completar el reconocimiento molecular con la enzima colina quinasa, o es suficiente una sola cabeza cationica?

El compuesto 61 representa la mitad de la molécula del compuesto 41 y es, al mismo tiempo, el derivado ramificado del compuesto 5 provisto de un grupo metilo sobre el carbono hidroxilado. El compuesto 62, que ha sido descrito por García y cols¹¹⁸, posee la mitad de la

estructura del compuesto 47 y es el homólogo superior del compuesto 5. En el compuesto 63, que representa la mitad de la molécula 51a, se ha sustituido el grupo hidroximetilo por el *gem*-dimetoximetilo para explorar el sitio activo desde el punto de vista del tamaño molecular y de la posibilidad de establecer enlaces de hidrógeno con la enzima. Las estructuras correspondientes a estos compuestos se muestran en la Tabla 3.12.

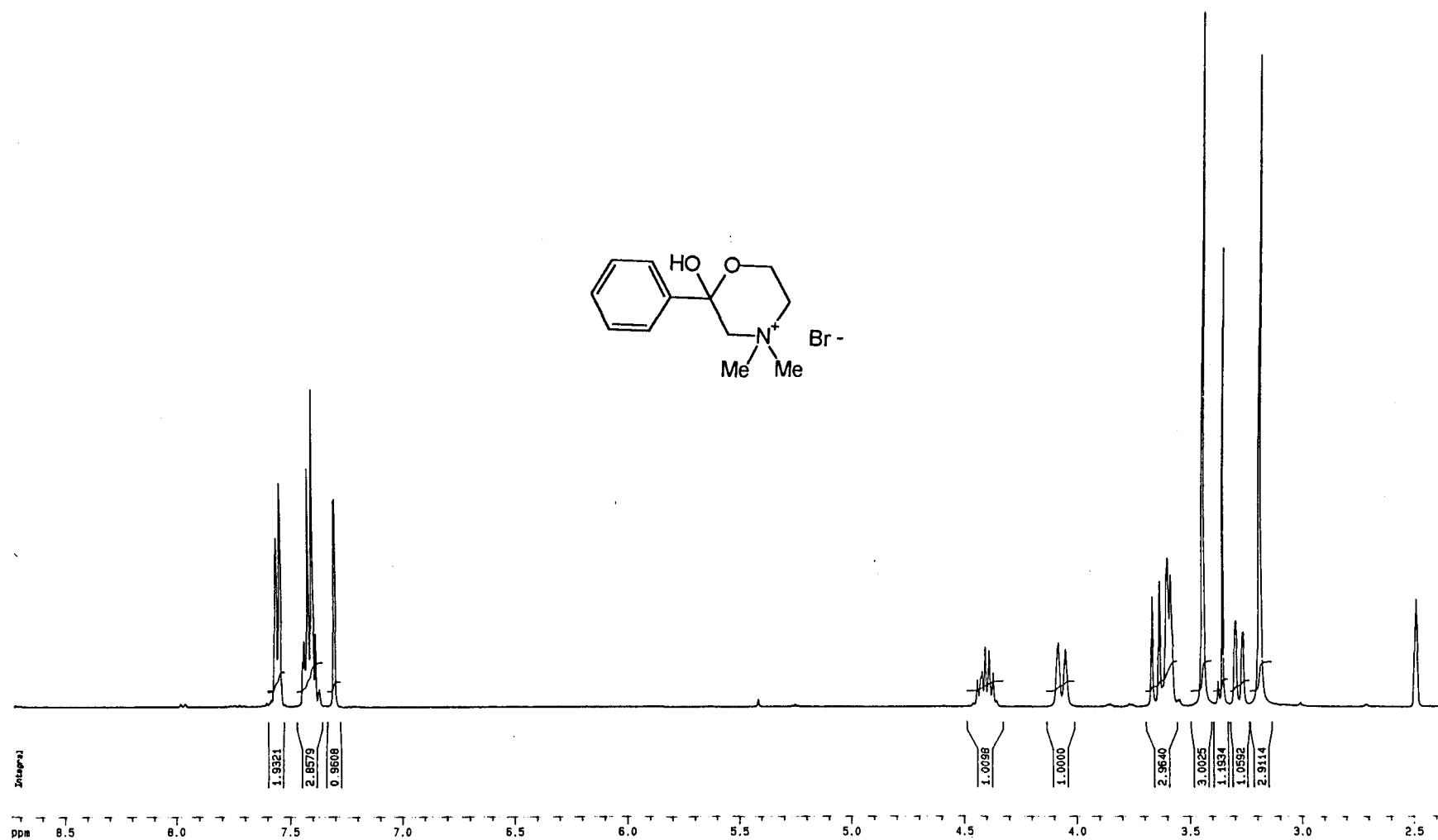
Tabla 3.12.- Estructura de los compuestos del subgrupo B₁.



| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|---|-----------|---|
| 5 | | 62 | |
| 61 | | 63 | |

3.3.1.1.- Análisis espectroscópico-estructural de los compuestos 5, 61 - 63.

Los datos espectroscópicos de esta familia de compuestos se muestran resumidos en las Tablas 3.13 (¹H-RMN) y 3.14 (¹³C-RMN). El análisis espectroscópico de estas moléculas muestra que los compuestos 5 y 61 adoptan, en las condiciones del experimento de RMN, preferentemente la estructura ciclocetálica provista de un anillo de 1,4-oxazinio. La estructura cíclica se puede apreciar en el espectro ¹H-RMN en el que se destaca la señal a 7,30 y 7,40 ppm correspondiente al proton del grupo hidroxilo de la función hemiacetálica. En el compuesto 5, como en su dímero el compuesto 1, los protones correspondientes a los grupos metileno del anillo de oxazinio no son equivalentes. Los protones aromáticos resuenan entre 8,00 y 7,50 ppm, en forma de multiplete.



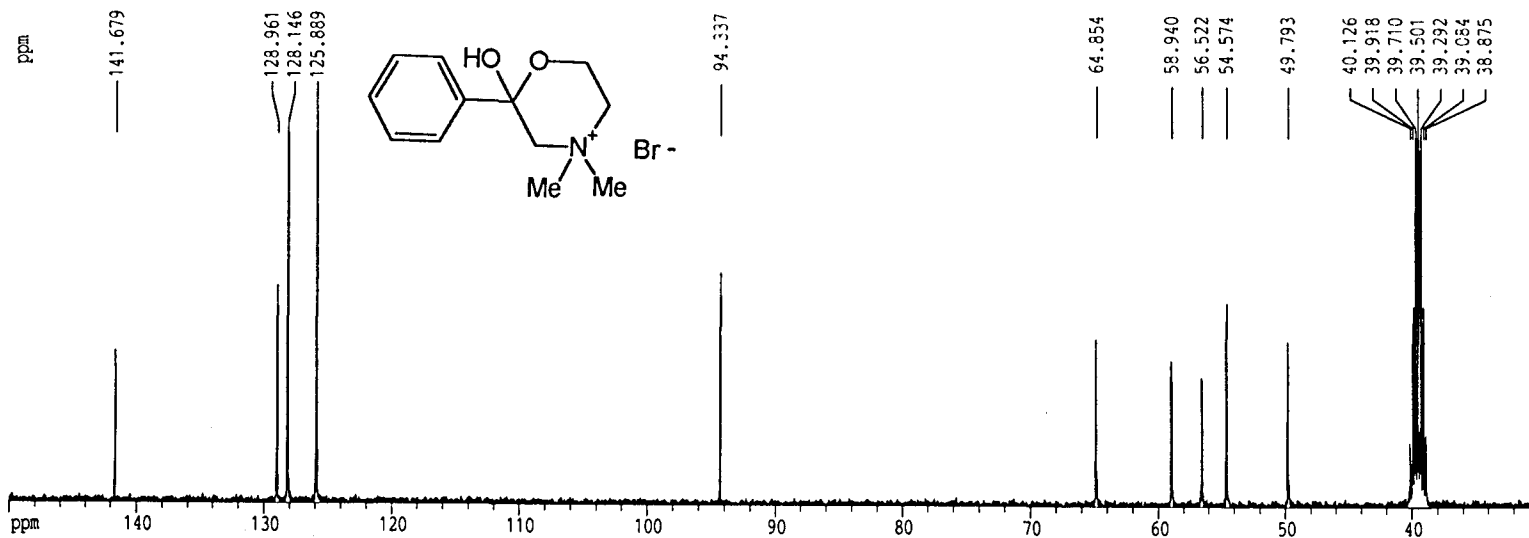
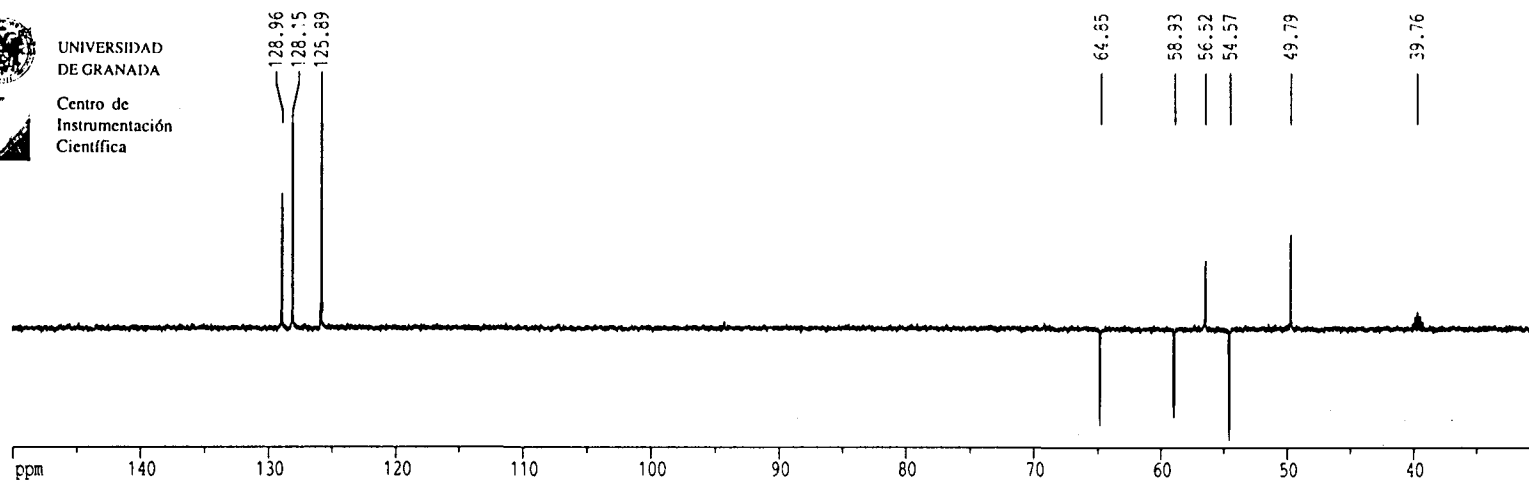
¹H-RMN-9: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-2-hidroxi-etildimetilamonio 5.



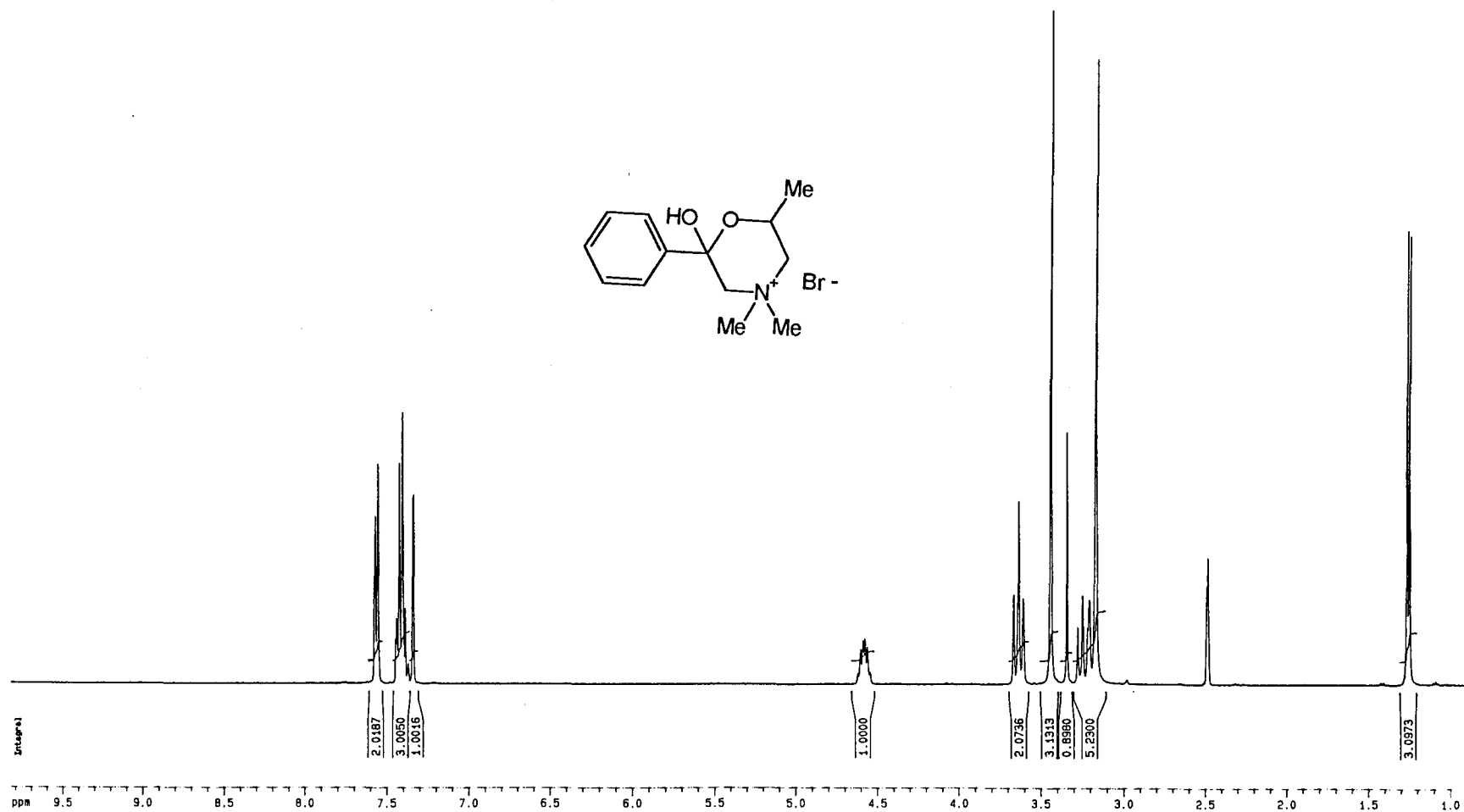
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



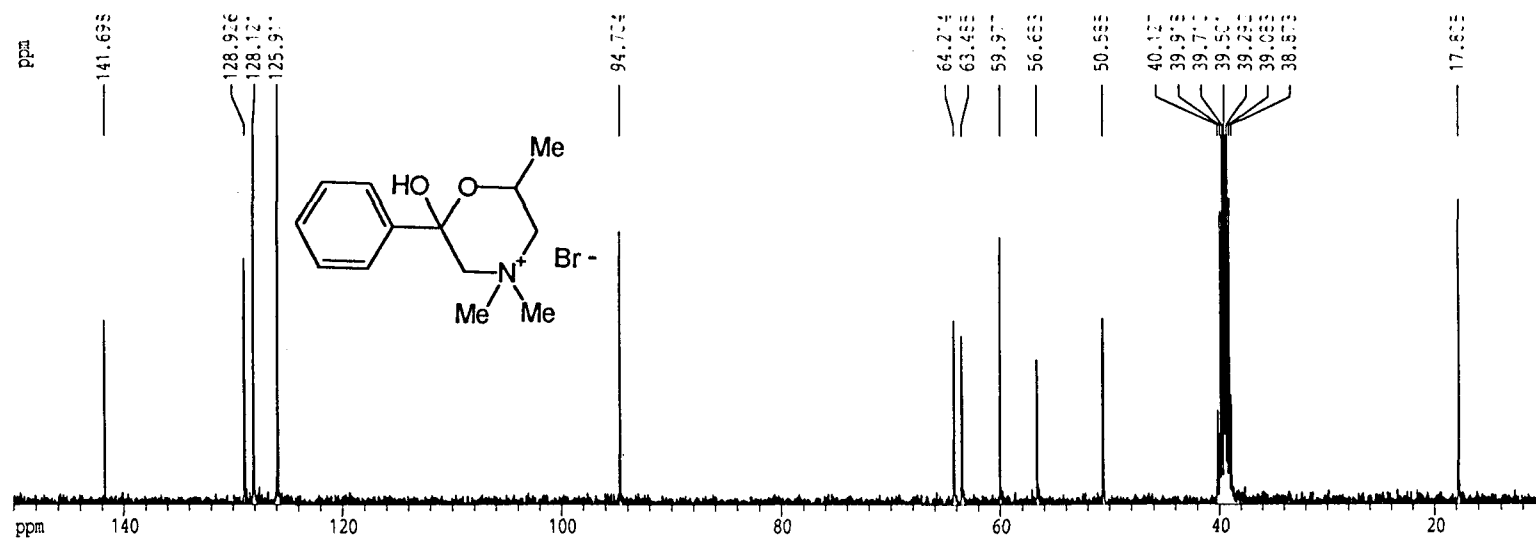
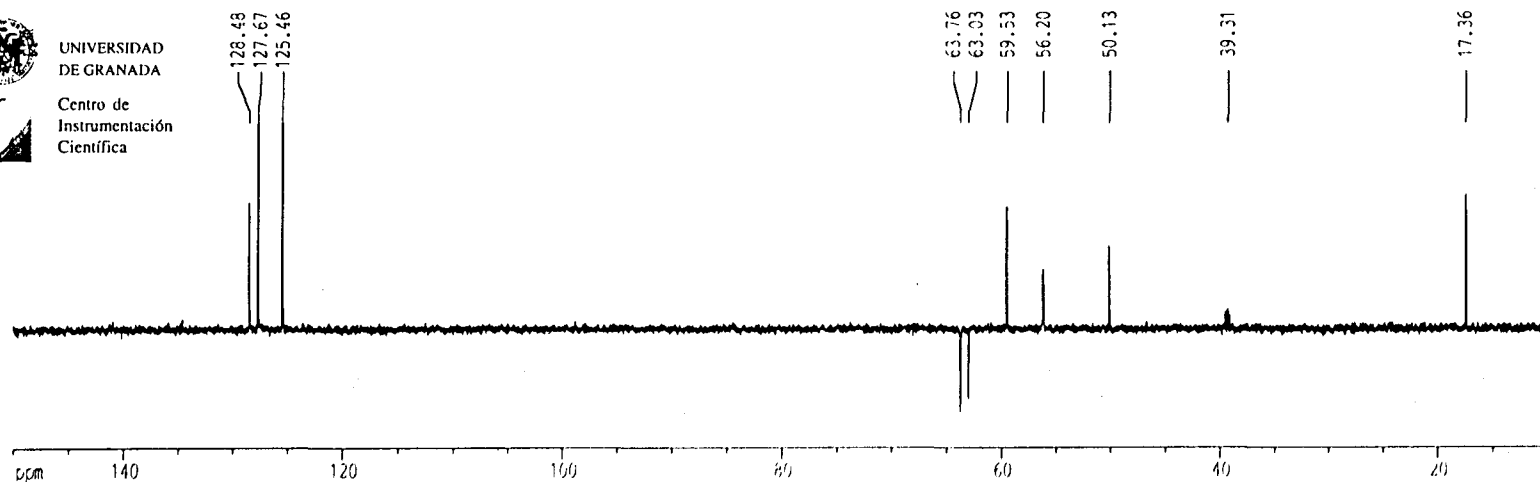
^{13}C -RMN-9: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-2-hidroxi-etildimetilamonio 5.



¹H-RMN-10: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-2-hidroxiopropildimetilamonio 61.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA
Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN-10: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-2-hidroxiopropildimetilamonio 61.

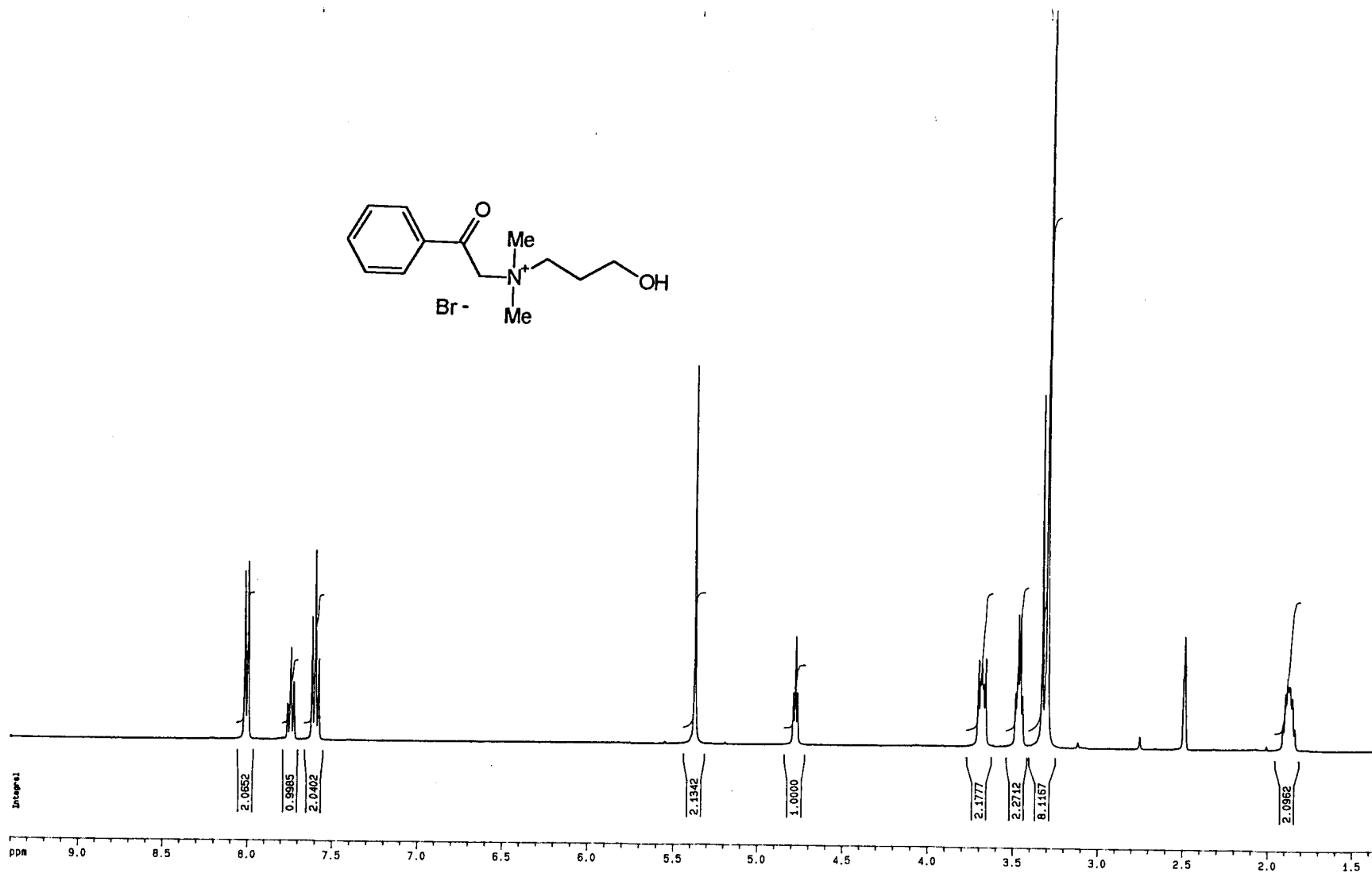
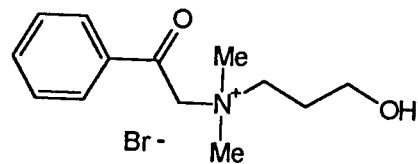
En el espectro ^{13}C -RMN se puede observar, de la misma forma que lo que acontece para el compuesto **62**, que no se forma el ciclocetal de siete miembros de estructura septanoide, puesto que la señal correspondiente al carbono carbonílico aparece a 191,46 ppm. Se debe recordar que en el compuesto **47** tampoco se observa la formación del ciclo oxazepínico.

Tabla 3.13.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) de los compuestos del subgrupo B_r

| Comp. ^a | H-2 | H-3 | H-4 | H-2' | H-1'' | H-2'' | N-Me |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|---------|
| 5 | 7,56, d | 7,42, m | | 4,40, m | 4,05, d | 3,60, d | 3,40, s |
| | <i>J</i> ; 7,97 | | | 3,65, m | <i>J</i> ; 13,32 | <i>J</i> ; 5,35 | 3,15, s |
| | | | | | 3,25, d | 3,25, d | |
| | | | | <i>J</i> ; 5,37 | <i>J</i> ; 12,94 | | |
| 61 | 7,56, d | 7,42, m | | 3,65, t | 3,20, t | 4,60, m | 3,45, s |
| | <i>J</i> ; 6,64 | | | <i>J</i> ; 11,26 | <i>J</i> ; 12,02 | 3,15, s | |
| 62 | 8,01, d | 7,60, t | 7,75, t | 5,38, s | 3,69, m | 1,87, m | 3,33, s |
| | <i>J</i> ; 7,68 | <i>J</i> ; 7,72 | <i>J</i> ; 7,88 | | | | 3,30, s |
| 63 | 7,98, d | 7,60, t | 7,74, t | 5,37, s | 3,70, d | 4,97, t | 3,41, s |
| | <i>J</i> ; 7,61 | <i>J</i> ; 7,76 | <i>J</i> ; 7,39 | | <i>J</i> ; 4,75 | <i>J</i> ; 4,76 | 3,25, s |

^aEn la Tabla se representa el equilibrio entre la forma carbonílica y la ciclocetálica para el compuesto **5** con la finalidad de mostrar la numeración empleada en la asignación espectroscópica.

También se puede observar en los espectros de los compuestos **5** y **61** señales a 94,34 y 94,70 ppm., respectivamente, que corresponden a los átomos de carbono cuaternario de la función hemicetálica, lo que confirma la estructura cíclica propuesta.



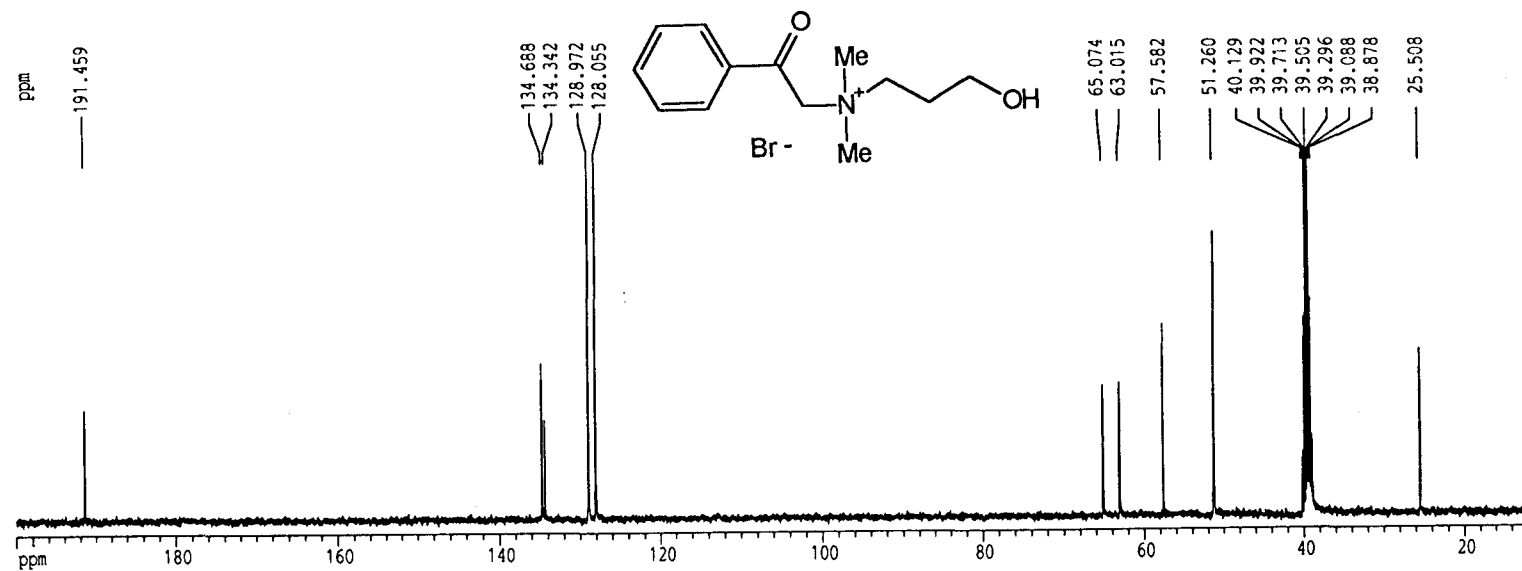
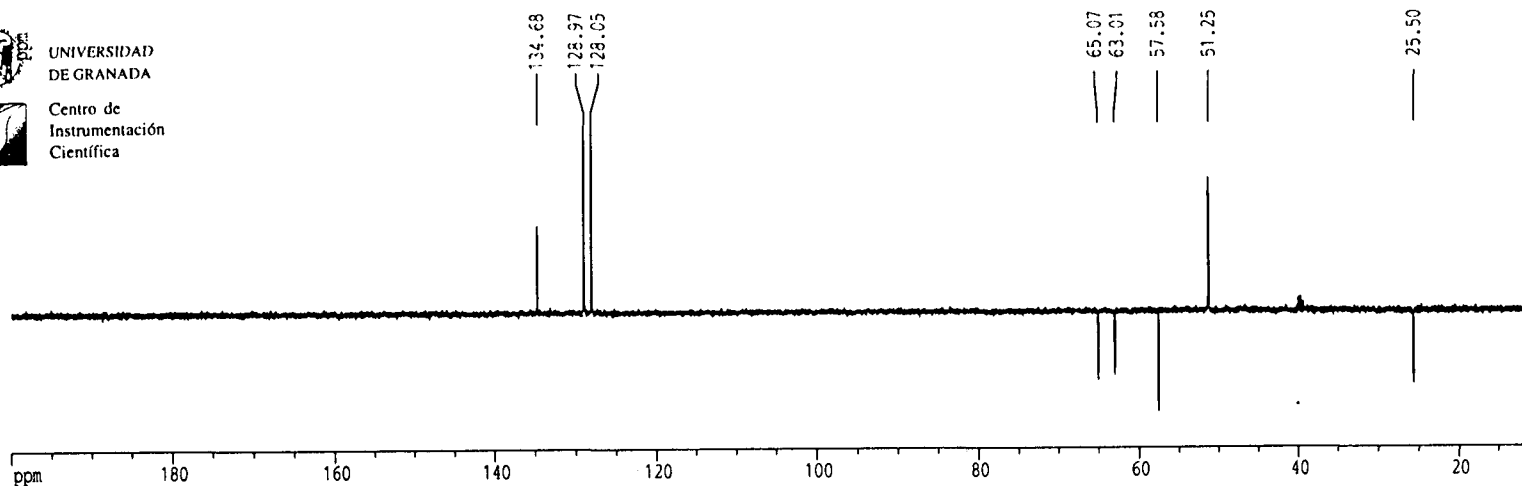
¹H-RMN-11: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-hidroxiopropildimetilamonio 62.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



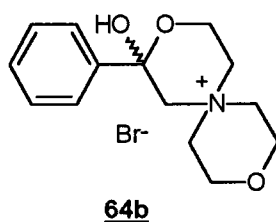
^{13}C -RMN-11: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-hidroxiopropildimetilamonio 62.

Tabla 3.14.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) ^{13}C -RMN de los compuestos del subgrupo B_r.

| comp. | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-1' | C-2' | C-1'' | C-2'' | N-Me |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|----------------|
| 5 | 141,68 | 128,96 | 125,89 | 128,15 | 94,34 | 64,85 | 58,94 | 54,57 | 56,52 49,79 |
| 61 | 141,70 | 128,93 | 125,91 | 128,12 | 94,70 | 64,21 | 63,48 | 59,97 | 56,65 50,58 |
| 62 | 134,34 | 134,68 | 128,05 | 128,97 | 191,46 | 65,07 | 63,01 | 25,51 | 51,25 |
| 63 | 134,33 | 134,60 | 127,89 | 129,02 | 191,25 | 65,63 | 63,09 | 98,17 | 53,98 |

3.3.2.- Diseño y análisis espectroscópico-estructural de compuestos provistos de un anillo heterocíclico saturado (Compuestos 64 - 67) , subgrupo B_r.

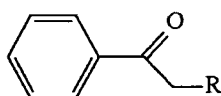
En este grupo se incluyen los cuatro compuestos 64 - 67. Tales compuestos pueden considerarse como derivados del prototipo HC-15 (5); así, el compuesto 64 deriva de 5 por anelación sobre los dos grupos metilo que sustituyen al átomo de nitrógeno cargado positivamente.



Esquema 3.8.- Estructura ciclocetálica para el compuesto 64.

Los tres compuestos restantes **65** - **67** pueden ser considerados como análogos cíclicos de **5** en los que el átomo de nitrógeno cargado positivamente y sus sustituyentes se intercambian por anillos de quinuclidinio diferentemente funcionalizados. Desde otro punto de vista, el compuesto **64** está provisto de una cadena hidroxietílica que le permitiría adoptar la estructura ciclocetálica **64b** (Esquema 3.8). Esta molécula también mimetiza a la molécula de colina y, por consiguiente, puede ser considerada como un análogo del sustrato de la enzima colina quinasa.

Tabla 3.15.- Estructura de los compuestos del subgrupo B₂



| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|---|-----------|---|
| 64 | | 66 | |
| 65 | | 67 | |

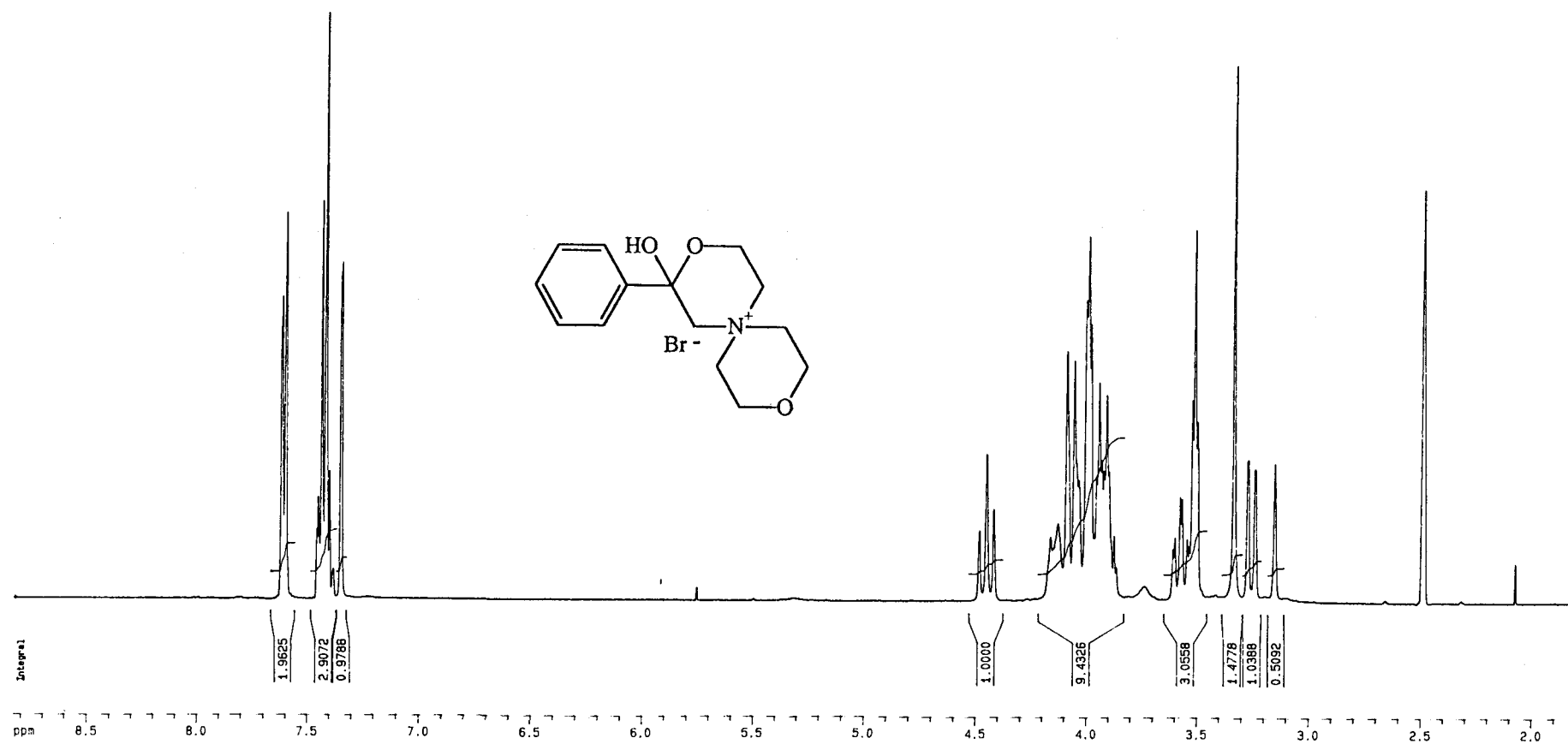
El compuesto **66** representa la mitad de la molécula del compuesto **56** mientras que **65**, representa su forma oxidada. La actividad biológica desarrollada por estas dos moléculas **65** y **66** puede informar tanto sobre la influencia del grado de oxidación del C-3 (que invierte el carácter donador-aceptor de hidrógeno) como sobre la influencia de la lipofilia en la actividad biológica. La Tabla 3.15 muestra las distintas estructuras de tales compuestos.

La estructura **67** se ha diseñado para dar solución a un problema farmacocinético observado en los compuestos **56** y **66**. Veamos, los ensayos de actividad inhibitoria de la molécula diana, la enzima colina quinasa, se llevan a cabo bajo dos modalidades experimentales distintas: la actividad *ex vivo* mide la capacidad de inhibir a la enzima aislada, purificada, de procedencia no humana, mientras que la actividad *in vitro* se refiere a la capacidad de inhibir a la enzima que está expresada o sobreexpresada en el interior del citosol celular de células humanas o no. Diferencias notables entre los valores de la actividad *ex vivo* e *in vitro*, como sucede en los compuestos **56** y **66**, puede estar relacionado, además de la diferencia de composición de las enzimas investigadas debido a sus orígenes diversos, a la facilidad o dificultad de cada uno de los compuestos para atravesar la membrana celular. Por otro lado, los compuestos aquí incluidos llevan cargas que dificultan el paso a través de las membranas citoplasmáticas. Para subsanar este problema, se ha sintetizado el compuesto **67** y otros análogos, mediante esterificación del grupo hidroxilo con ácido palmítico, según el modo operatorio descrito en la bibliografía¹²⁰. La cadena del ácido graso aumenta la lipofilia de la molécula y, por ello, permite al compuesto atravesar las membranas biológicas con más facilidad.

3.3.2.1.- Análisis espectroscópico-estructural de los compuestos **64** - **67**.

En las Tablas 3.16 (¹³C-RMN) y 3.17 (¹H-RMN) se muestran los datos espectroscópicos de los compuestos del subgrupo B₂.

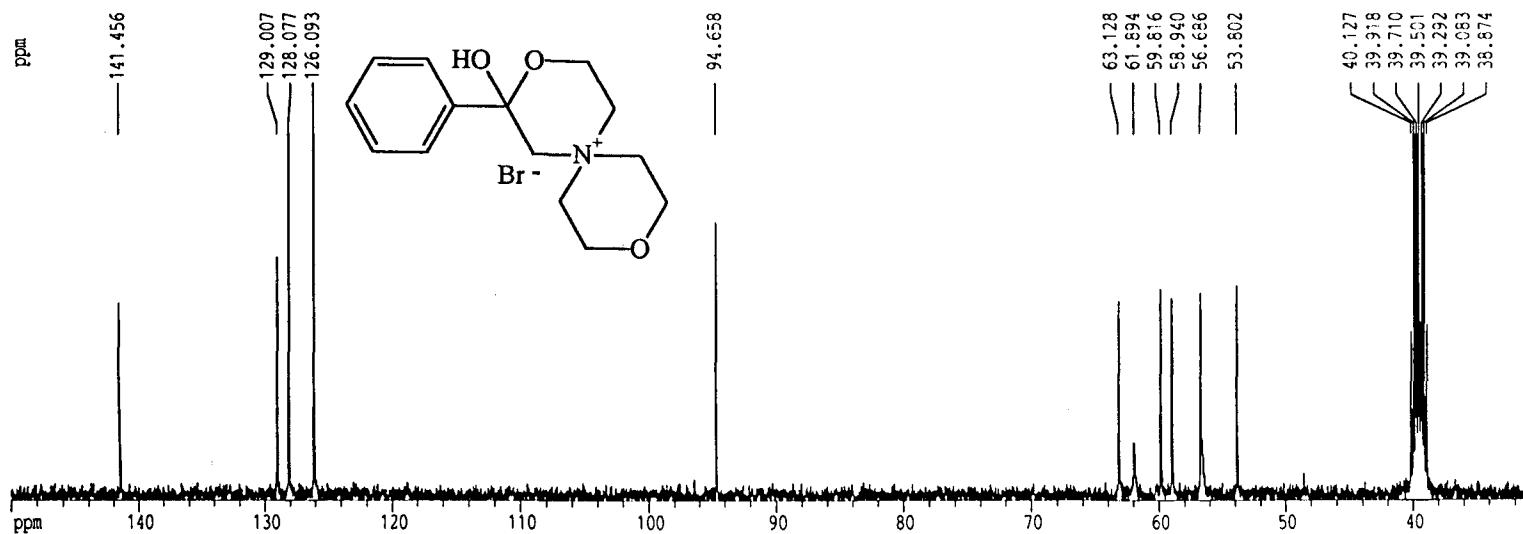
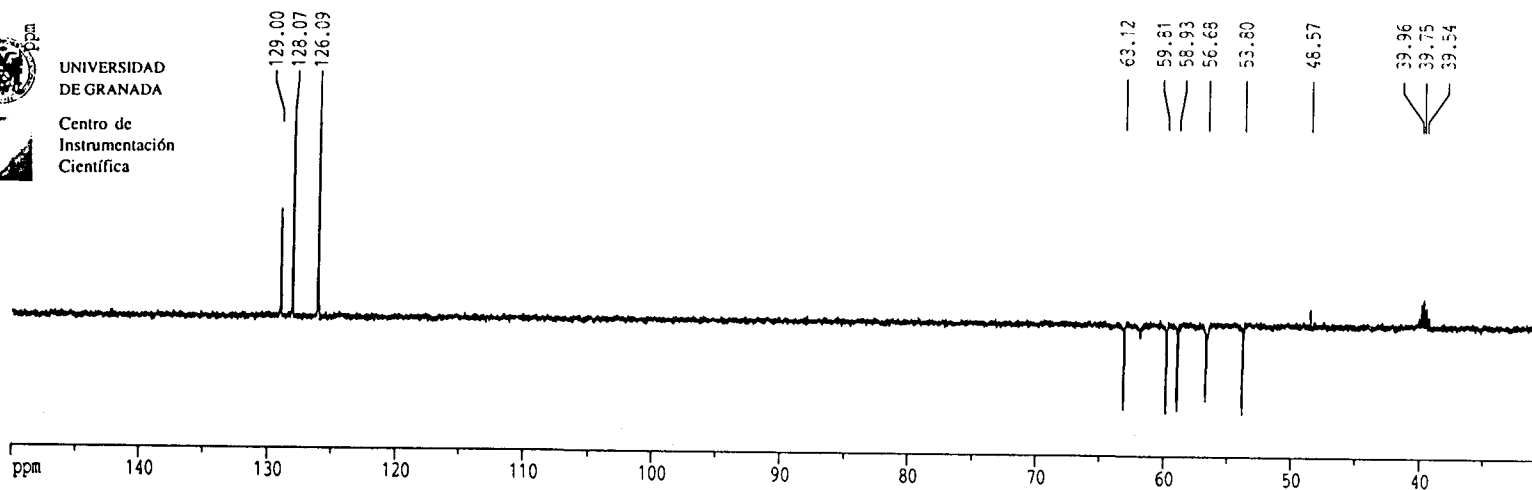
El análisis del espectro de ¹H-RMN del compuesto **64** muestra la ausencia de la señal cercana a 5,50 ppm que corresponde a los hidrógenos del grupo metileno (C-2'), adyacente al átomo de nitrógeno cuaternizado y, en segundo lugar, se constata la presencia de una señal a 7,35 ppm correspondiente al protón del grupo hidroxilo hemicetálico. Esto indica la preferencia por la estructura **64b** en las condiciones experimentales en que se realiza el experimento de RMN. Los protones del anillo de morfolinio resuenan entre 4,50 y 3,10 ppm originando señales complejas debido al solapamiento de los diferentes átomos de hidrógeno y de sus constantes de acoplamiento.



¹H-RMN-12: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-N-(2-hidroxi-etil) morfolinio 64.

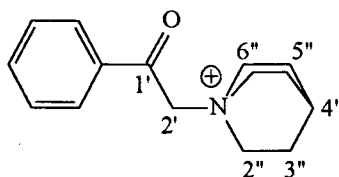


UNIVERSIDAD
DE GRANADA
Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN-12: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-N-(2-hidroxi-etil)morfolinio 64.

Tabla 3.16.- Desplazamientos químicos ^{13}C -RMN (δ , ppm) de los compuestos 64 - 67.

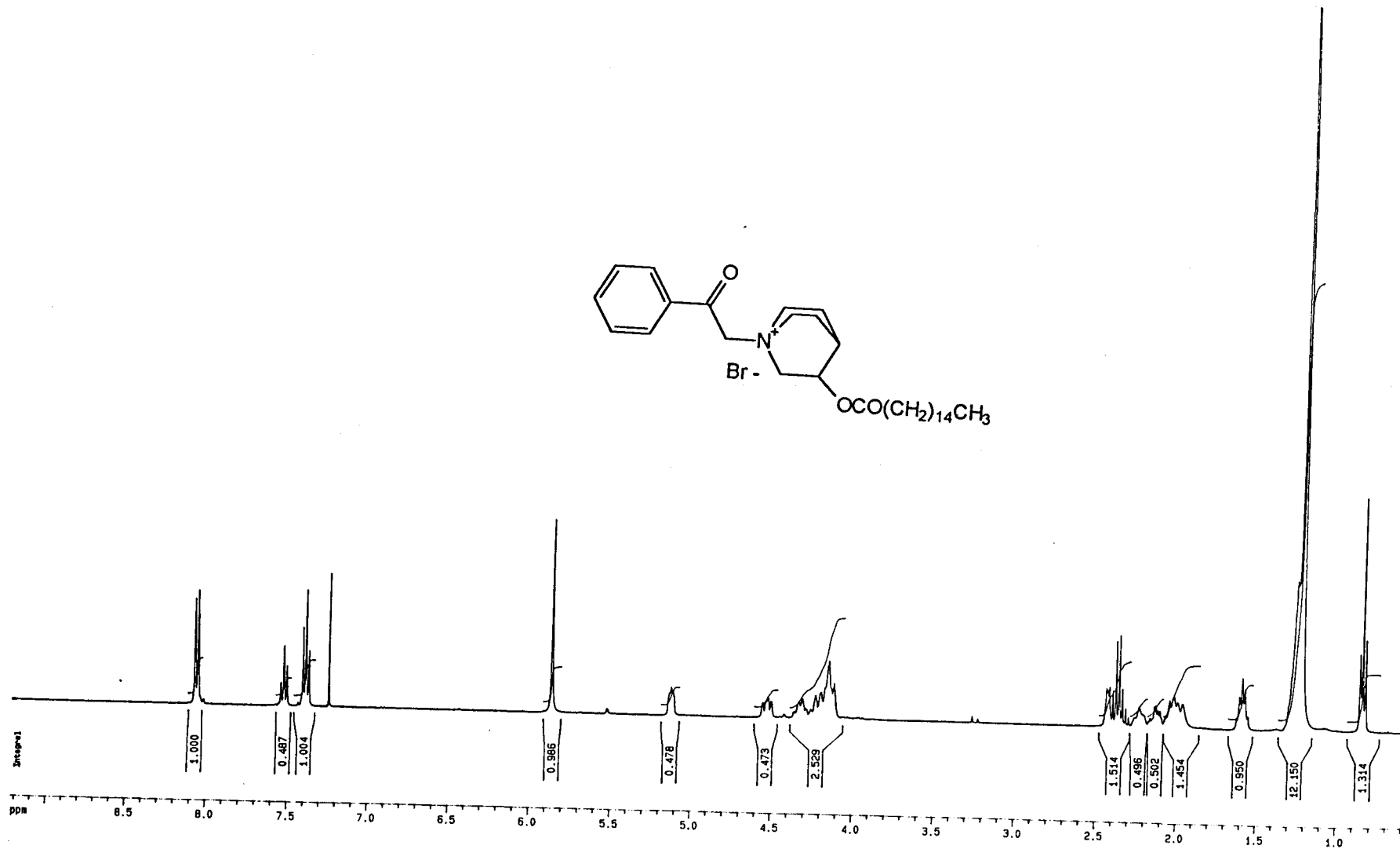


| Comp. | C-1' | C-2' | C-2'' | C-3'' | C-4'' | C-5'' | C-6'' |
|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| 64 | 94,66 | 63,13 | 61,89 | 59,82 | | | |
| 65 | 190,91 | 65,61 | 65,33 | 202,53 | 36,69 | 20,60 | 55,34 |
| 66 | 191,27 | 65,08 | 63,40 | 63,28 | 25,99 | 17,38 | 54,80 |
| | | | | | | 20,88 | 54,09 |
| 67 | 191,52 | 67,04 | 65,92 | 67,04 | 24,83 | 21,50 | 54,97 |
| | | | | | | 22,74 | |

Tabla 3.17.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) de los compuestos 65 - 67.

| Comp. | H-2' | H-2'' | H-3'' | H-4'' | H-5'' | H-6'' |
|-------|---------|----------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|---------|
| 65 | 5,45, s | 4,54, s | — | 2,75, t J; 3,10 | 2,32; 2,21 m | 3,95, m |
| 66 | 5,26, s | 3,91; 3,56 m | 4,14, m | 2,17, m | 2,08; 1,84 m | 3,70, m |
| 67 | 5,87, s | 4,54(He), m 4,33(Ha), m | 5,13, t J; 4,16 | 2,26, m | 2,37, m | 4,15, m |

El resto de las señales espectroscópicas son concordantes con las estructuras propuestas y no merecen comentarios especiales. Las señales de los átomos de hidrógeno de la cadena del palmitato resuenan entre 2,40 y 0,80 ppm. Los datos de espectroscopía ^{13}C -RMN son también concordantes con las estructuras propuestas y no existe ninguna particularidad que deba ser mencionada expresamente.



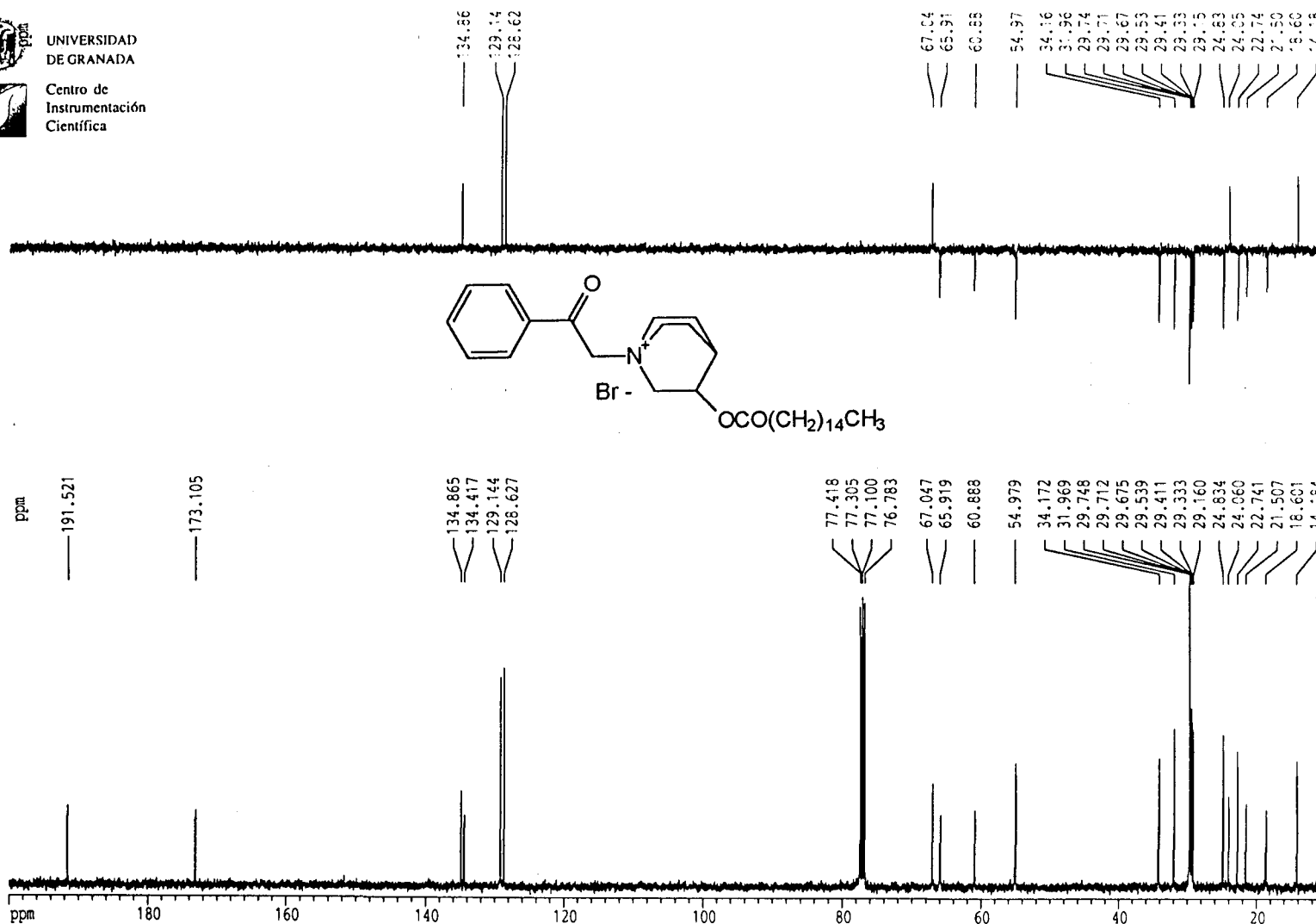
¹H-RMN-13: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-palmitoiloxiquinuclidinio 67.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



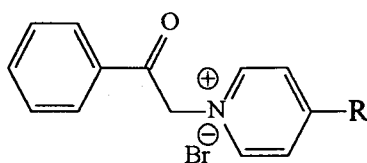
¹³C-RMN-13: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-palmitoiloxiquinuclidinio 67.

3.3.3.- Diseño y análisis espectroscópico-estructural de los análogos del prototipo HC-15 provistos con un anillo heterocíclico aromático: Subgrupo B₃.

Los once compuestos que se incluyen en este apartado 68 - 78 pueden ser considerados como análogos estructurales del prototipo HC-15 en los que el extremo polar de las moléculas está formado por una sal de iminio aromática. En la Tabla 3.18 y en el Esquema 3.9 se recogen las distintas estructuras correspondientes a estos compuestos.

Los compuestos 68 - 76 contienen un esqueleto común representado por el fenacilpiridinio 68⁹⁷, que representa la mitad de la molécula del compuesto 54. La mayor parte de los componentes del grupo se diferencian en la naturaleza química y electrónica del sustituyente situado en el carbono 4 del anillo de piridinio.

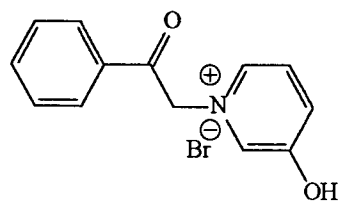
Tabla 3.18.- Estructura de los compuestos 68 - 76 (Subgrupo B₃).



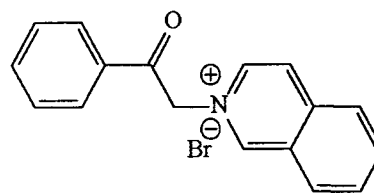
| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|--------------------|-----------|----------------------------------|
| 68 | H | 73 | NH ₂ |
| 69 | COMe | 74 | N(CH ₃) ₂ |
| 70 | CHNOH | 75 | Pirrolidino |
| 71 | CN | 76 | OH |
| 72 | CH ₂ OH | | |

Así, en los compuestos **69** - **72** la posición 4 de anillo heteroaromático está sustituida por diversos grupos carbonados que muestran efectos electrónatrayentes mientras que ésta posición está ocupada por grupos electrón donores en los compuestos **73** - **76**.

El compuesto **74** representa la mitad de la molécula del compuesto **58** y contiene un resto dimetilamino mientras que el compuesto **76**, que representa la molécula mitad del compuesto **57**, contiene un anillo de 4-piridinol. El análisis de la actividad inhibidora de estos compuestos podrá permitir el estudio de la influencia de la parte plana de la estructura y de la disposición electrónica de la molécula.



77



78

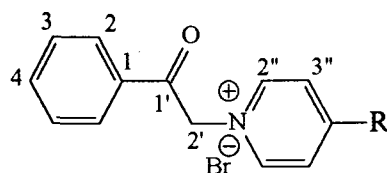
Esquema 3.9.- Estructura de los compuestos 77 y 78.

El compuesto **77** contiene un anillo de 3-hidroxipiridinio. Esta molécula es un análogo rígido y plano de la mitad de la molécula del HC-3, que mimetiza perfectamente la posición de grupo hidroxilo en el prototipo. El compuesto **78** contiene un anillo de isoquinolinio diseñado para explorar las dimensiones del sitio activo.

3.3.3.1.- Análisis espectroscópico estructural de los compuestos 68 - 78.

En las Tablas 3.19 ($^1\text{H-RMN}$) y 3.20 ($^{13}\text{C-RMN}$) se resumen las principales características espectroscópicas de los compuestos 68 - 78. El sistema de numeración adoptado está indicado en el esquema 3.10.

Analizando los datos de espectroscopia $^1\text{H-RMN}$ se comprueba que la naturaleza del sustituyente en posición 4 del anillo de piridinio (Esquema 3.11) influye ligeramente sobre los valores de desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno del grupo metileno ($\text{C-2}'$), que se apantallan ligeramente (alrededor de 0.5 ppm) cuando los sustituyentes son electrondonantes.



Esquema 3.10

En los compuestos 69 - 72 los grupos electrónattractores no influyen sobre los valores de los desplazamientos químicos de los protones piridínicos excepción hecha del compuesto 71 cuyo grupo 4-ciano provoca un desapantallamiento significativo de los átomos $\text{H-2}''$ y $\text{H-3}''$.

En los compuestos 73 - 76, provistos con sustituyentes electrondonores, las señales de los protones aromáticos se apantallan ligeramente. En el caso del compuesto 76, que posee la agrupación de sal de 4-hidroxipiridinio, se observa el desdoblamiento de las señales de cada hidrógeno piridínico; en principio se pensó que el desdoblamiento de señales puede ser consecuencia de la tautomería piridona - piridinol¹⁹⁹. Sin embargo, estudios más detallados de las señales espectroscópicas han mostrado que, en realidad, el producto obtenido es una mezcla de la 4-piridinol y el producto de reacción, que se encuentra en forma de 1-fenilacetil-4-piridona.

El análisis de los espectros de ^{13}C -RMN, muestra una concordancia con las estructuras propuestas. Asimismo, se observa una influencia de la naturaleza del 4-sustituyente del anillo de piridinio sobre los desplazamientos químicos de los átomos de carbono del anillo aromático.

Tabla 3.19.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) de los compuestos 68 - 78.

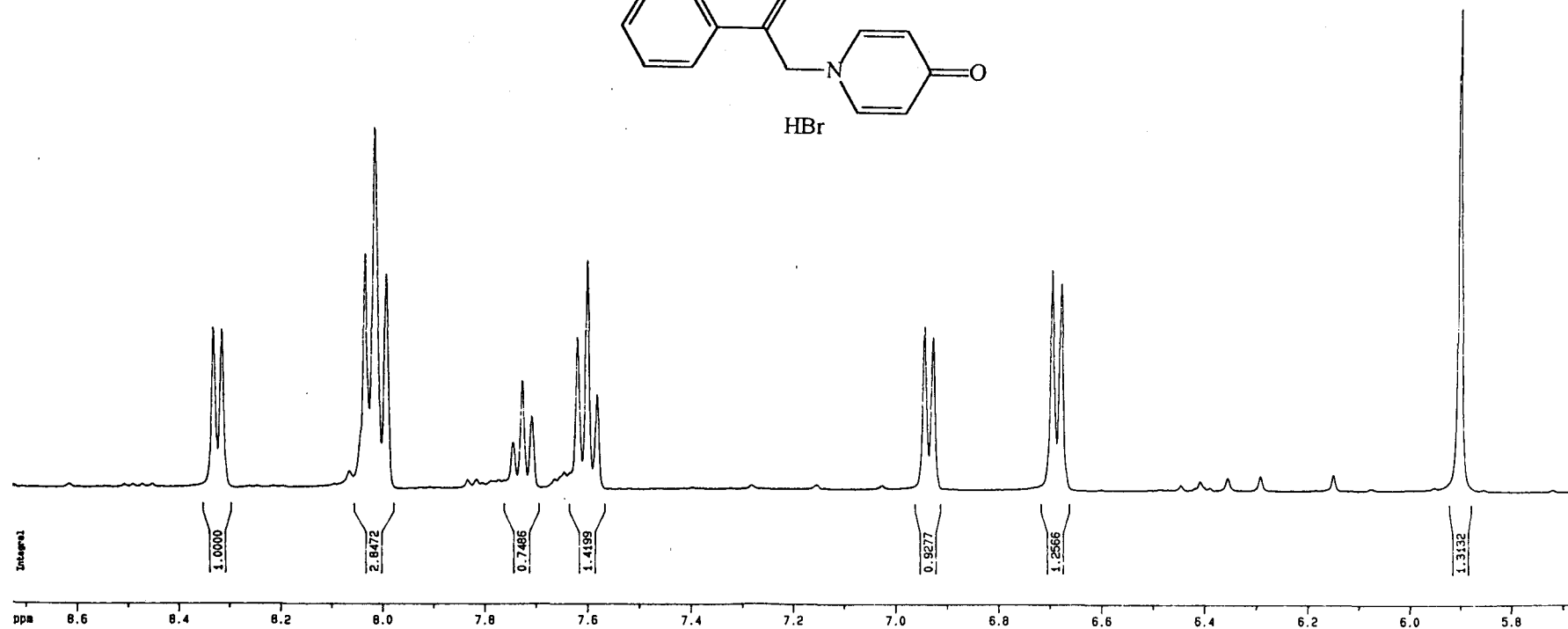
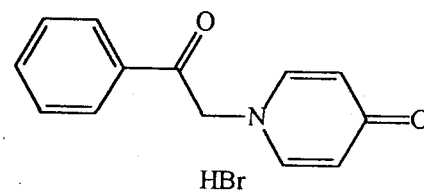
| Comp. | H-2 | H-3 | H-4 | H-2' | H-2'' | H-3'' | H-4'' |
|-------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 68 | 8,05, d <i>J</i> ; 7,53 | 7,64, t <i>J</i> ; 7,75 | 7,77, t <i>J</i> ; 7,40 | 6,54, s | 9,03, d <i>J</i> ; 5,82 | 8,30, t <i>J</i> ; 7,20 | 8,75, t <i>J</i> ; 7,81 |
| 69 | 8,06, d <i>J</i> ; 7,49 | 7,65, t <i>J</i> ; 7,76 | 7,78, t <i>J</i> ; 7,40 | 6,63, s | 9,25, d <i>J</i> ; 6,58 | 8,60, d <i>J</i> ; 6,61 | |
| 70 | 8,05, d <i>J</i> ; 7,54 | 7,64, t <i>J</i> ; 7,67 | 7,77, t <i>J</i> ; 7,40 | 6,47, s | 8,94, d <i>J</i> ; 6,68 | 8,30, d <i>J</i> ; 6,64 | |
| 71 | 8,05, d <i>J</i> ; 7,57 | 7,65, t <i>J</i> ; 7,67 | 7,78, t <i>J</i> ; 7,39 | 6,61, s | 9,30, d <i>J</i> ; 6,67 | 8,78, d <i>J</i> ; 6,62 | |
| 72 | 8,04, d <i>J</i> ; 7,59 | 7,64, t <i>J</i> ; 7,69 | 7,77, t <i>J</i> ; 7,39 | 6,47, s | 8,90, d <i>J</i> ; 6,47 | 8,15, d <i>J</i> ; 6,43 | |
| 73 | 8,00, d <i>J</i> ; 7,61 | 7,61, t <i>J</i> ; 7,70 | 7,73, t <i>J</i> ; 7,35 | 5,97, s | 8,08, d <i>J</i> ; 7,20 | 6,97, d <i>J</i> ; 7,30 | |
| 74 | 8,03, d <i>J</i> ; 7,53 | 7,63, t <i>J</i> ; 7,73 | 7,76, t <i>J</i> ; 7,37 | 6,03, s | 8,23, d <i>J</i> ; 7,59 | 7,13, d <i>J</i> ; 7,65 | |
| 75 | 8,02, d <i>J</i> ; 7,52 | 7,62, t <i>J</i> ; 7,65 | 7,74, d <i>J</i> ; 7,40 | 5,99, s | 8,18, d <i>J</i> ; 7,48 | 6,96, d <i>J</i> ; 7,46 | |
| 76 | 8,02, d <i>J</i> ; 7,70 | 7,60, t <i>J</i> ; 7,60 | 7,73, t <i>J</i> ; 7,40 | 5,90, s | 8,32, d <i>J</i> ; 6,80 | 6,69, d <i>J</i> ; 6,80 | |
| 77 | 8,04, d <i>J</i> ; 8,10 | 7,60, t <i>J</i> ; 7,68 | 7,74, t <i>J</i> ; 7,42 | 6,69, s | 8,75, s | — | 8,15, d <i>J</i> ; 7,12 |
| 78 | 8,11, d <i>J</i> ; 7,53 | 7,68, t <i>J</i> ; 7,63 | 7,81, t <i>J</i> ; 7,36 | 6,67, s | 8,75, d <i>J</i> ; 6,76 | 8,70, d <i>J</i> ; 6,76 | 8,40, d <i>J</i> ; 8,30 |

En el compuesto 70, se aprecia perfectamente el desapantamiento del carbono C-3" debido al efecto inductivo del acetaldehidoxima. Cuando el sustituyente es un grupo ciano, los carbonos C-3" y C-4" aparecen muy apantallados. Quizás, el grupo ciano actúa más bien como dador de electrones por efecto mesomérico que, como electrónatractor por efecto inductivo. En el compuesto 72, podemos apreciar el efecto inductivo del grupo carbinol, desde el momento que el C-4" está muy desapantallado. Este desapantamiento no ocurre en el compuesto 69 que contiene un grupo acetato.

Tabla 3.20.- Desplazamientos químicos ¹³C-RMN de los compuestos 68 - 78.

| Comp. | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-2' | C-2" | C-3" | C-4" |
|-------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| 68 | 133,52 | 134,74 | 128,27 | 129,16 | 66,26 | 146,41 | 127,86 | 146,29 |
| 69 | 133,48 | 134,80 | 128,31 | 129,19 | 66,50 | 147,79 | 125,74 | 148,93 |
| 70 | 133,52 | 134,68 | 128,29 | 129,10 | 65,77 | 146,42 | 145,20 | 149,07 |
| 71 | 133,32 | 134,89 | 128,34 | 129,20 | 67,11 | 147,63 | 130,72 | 127,85 |
| 72 | 133,53 | 134,63 | 128,19 | 129,08 | 65,56 | 145,48 | 124,08 | 163,66 |
| 73 | 133,82 | 134,44 | 128,12 | 129,05 | 62,66 | 144,21 | 109,06 | 158,87 |
| 74 | 133,83 | 134,42 | 128,09 | 129,05 | 62,38 | 143,25 | 107,39 | 155,99 |
| 75 | 133,82 | 134,34 | 128,02 | 128,98 | 62,40 | 143,17 | 107,94 | 153,13 |
| 76 | 133,94 | 134,34 | 128,08 | 129,03 | 62,45 | 144,57 | 115,77 | 174,68 |
| 77 | 133,56 | 134,43 | 128,24 | 129,09 | 66,38 | 137,28 | 156,55 | 134,65 |
| 78 | 133,57 | 134,81 | 128,34 | 129,21 | 66,20 | 137,49 | 136,36 | 137,24 |

En los compuestos 73 - 76, los carbonos C-3" están apantallados mientras los C-4" están muy desapantallados. Esto es debido a los grupos dadores de electrones por efecto mesomérico que enriquecen los carbonos C-3" en electrones y luego sus señales aparecen más a la derecha en el espectro.



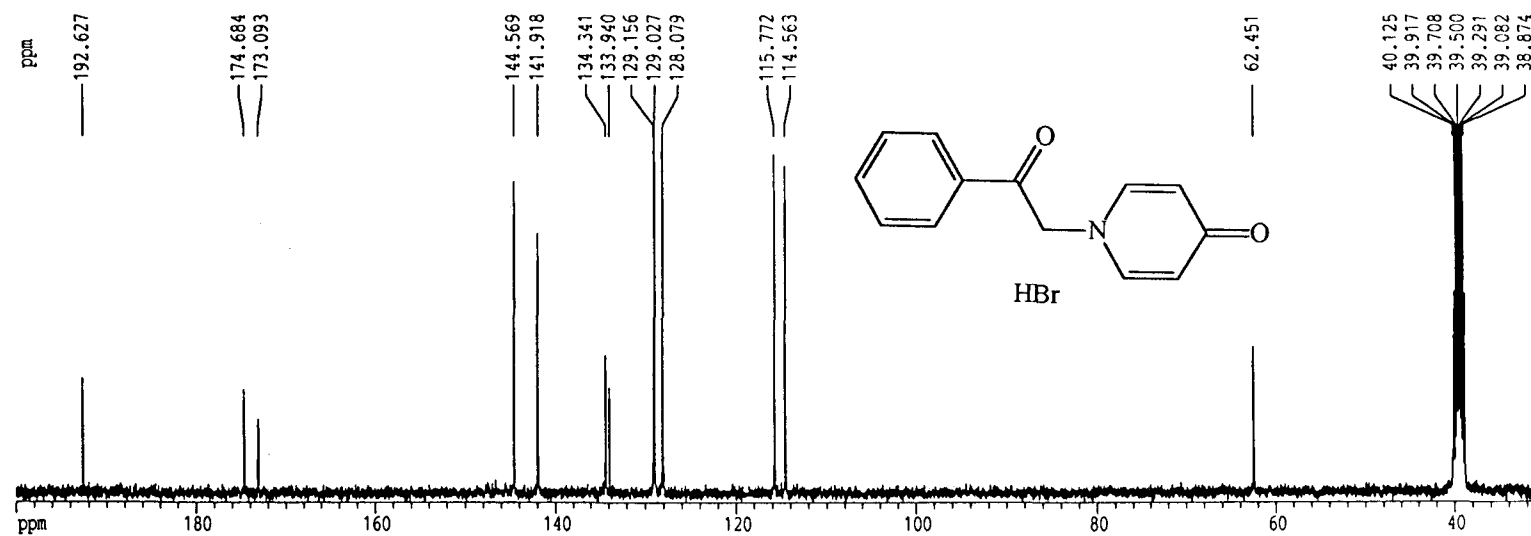
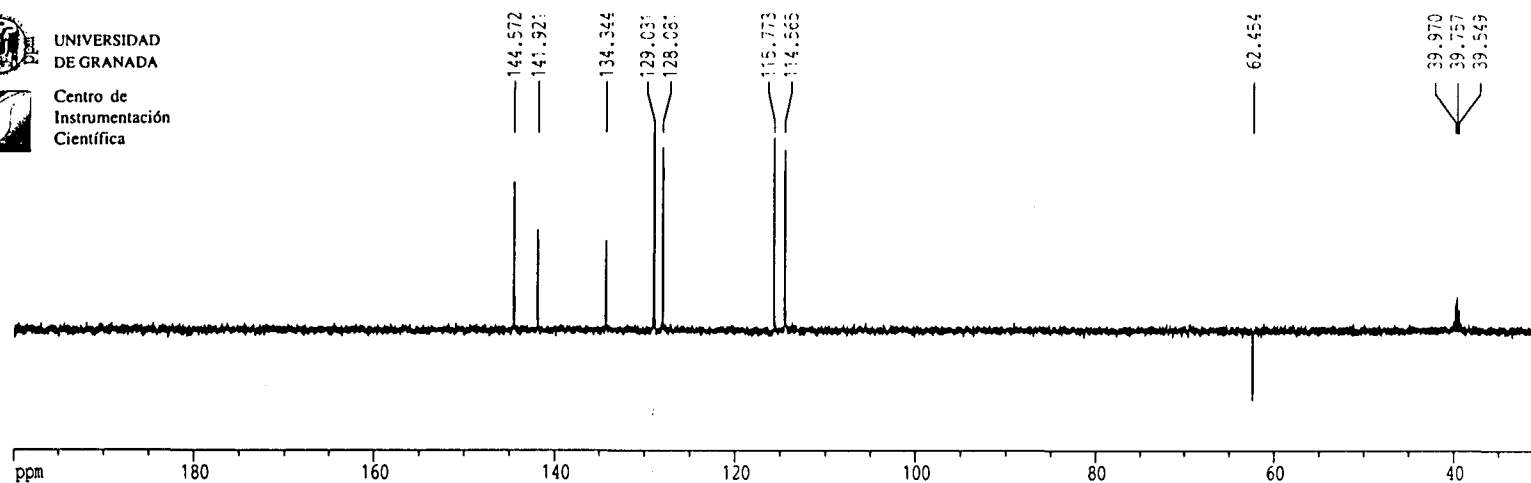
¹H-RMN-14: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-piridona 76.



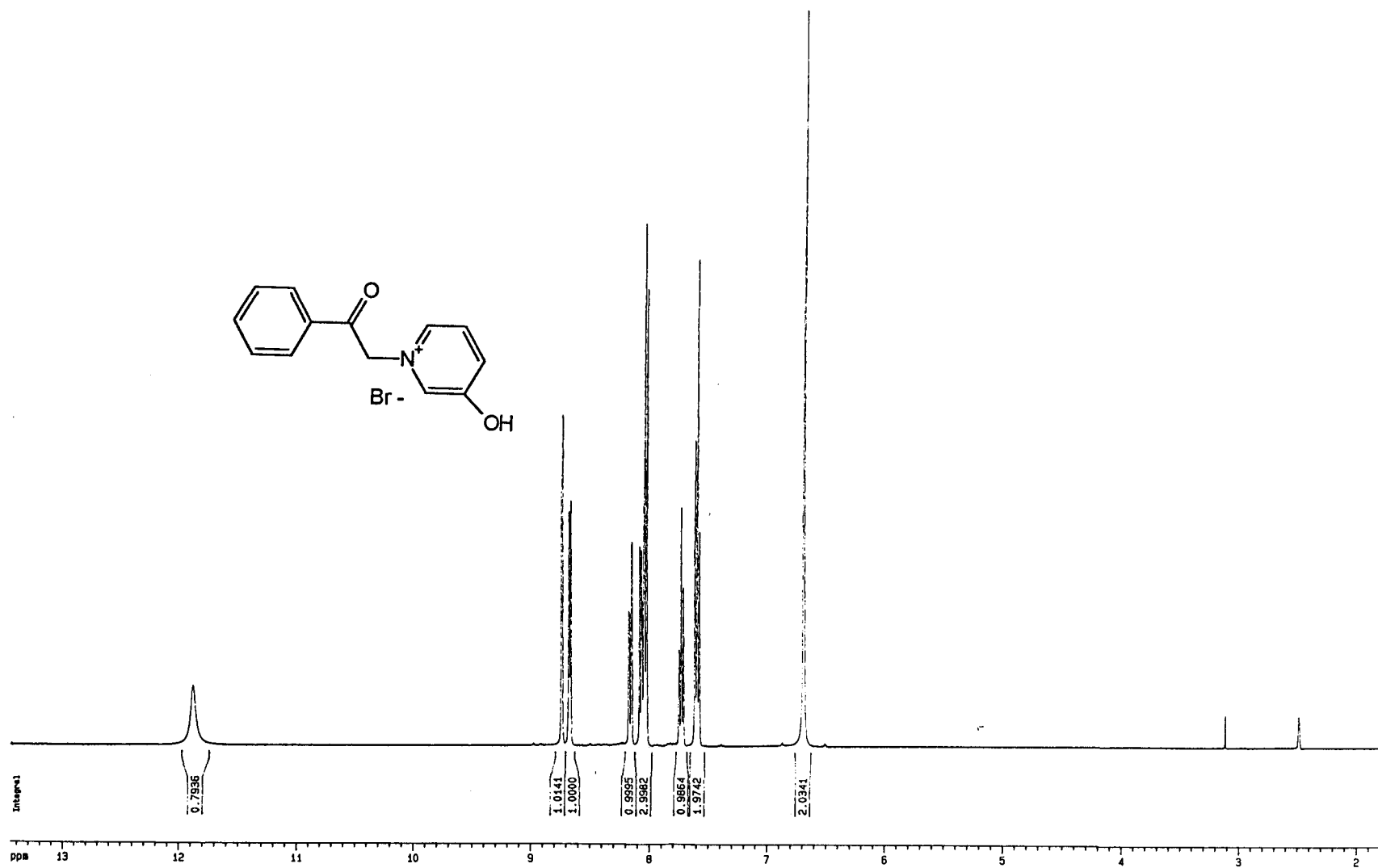
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



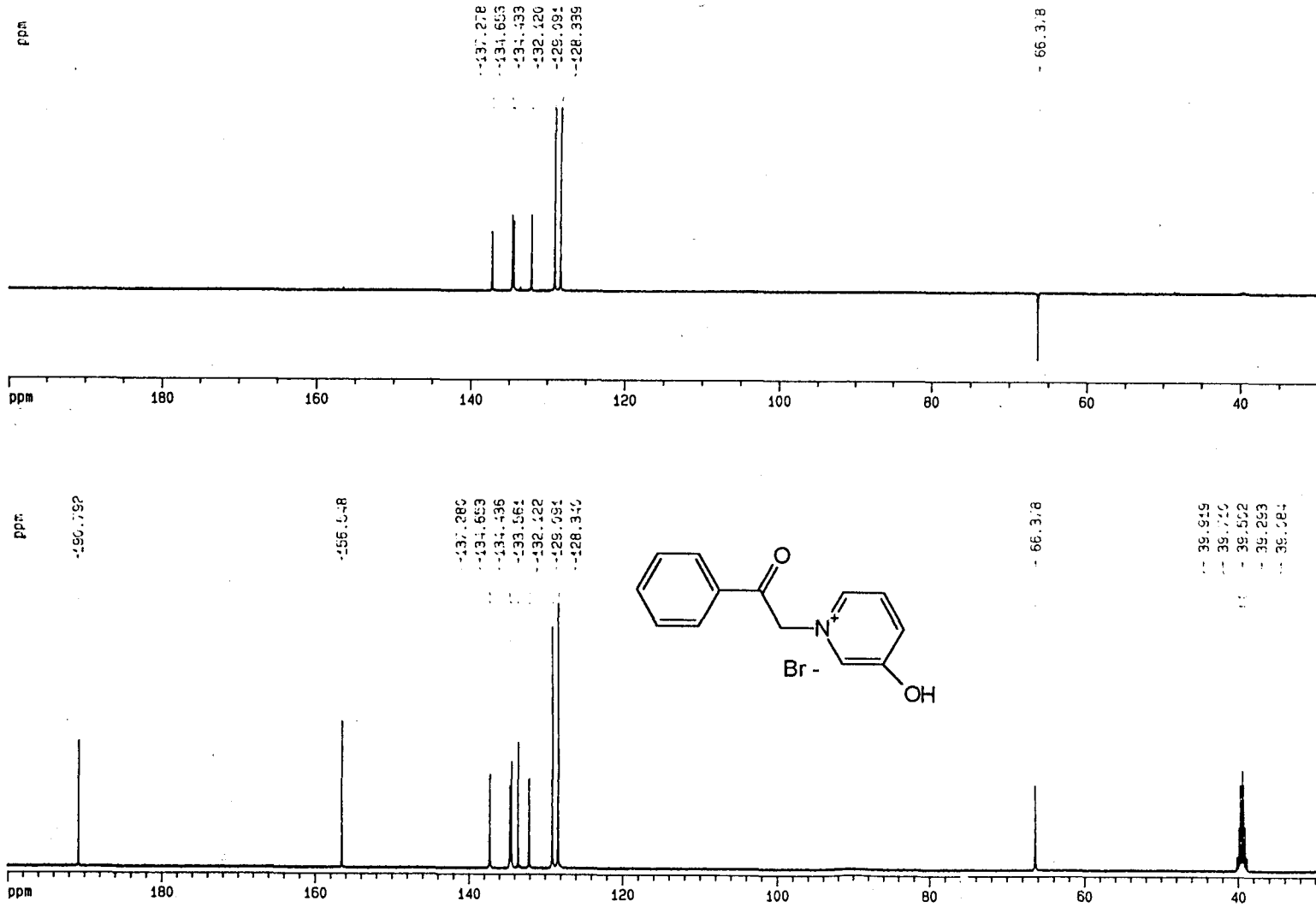
Centro de
Instrumentación
Científica



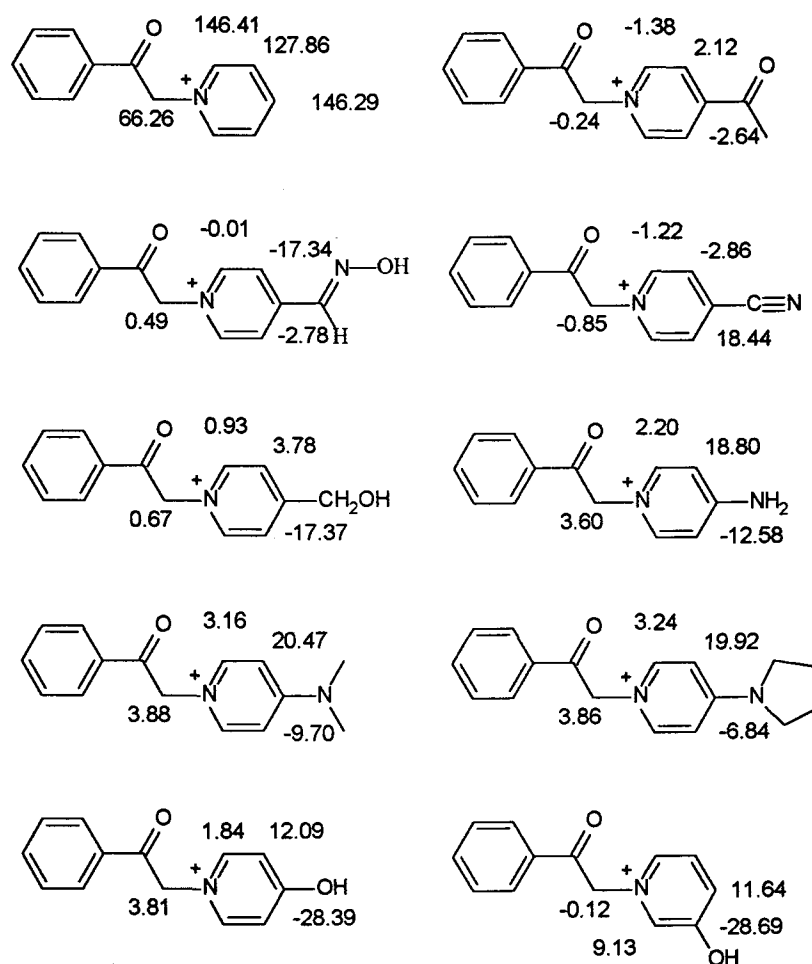
^{13}C -RMN-14: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-piridona 76.



¹H-RMN-15: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-hidroxipiridinio 77.



Analizando el espectro ^{13}C -RMN del compuesto 76, podemos confirmar su contaminación por 4-piridinol. También podemos confirmar que el equilibrio tautomérico no se efectúa en el compuesto 77 con un grupo hidroxilo en posición 3".

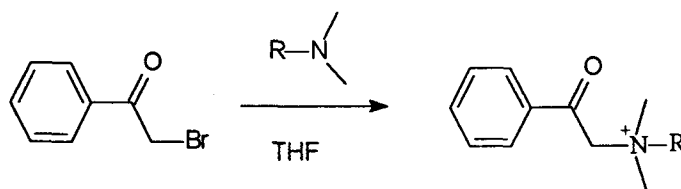


Esquema 3.11.- Diferencias en los desplazamientos químicos ^{13}C -RMN (δfenacilpiridinio - δfenacilpiridinio 4-sustituido) de los derivados de fenacilpiridinio.

En el Esquema 3.11 se representan las diferencias entre los valores de los desplazamientos químicos de C-2' y en los átomos de carbono del heterociclo piridínico de las sales de 1-fenacilpiridinio-4-sustituídos y los determinados para el compuesto no sustituido. Es de destacar que el valor del desplazamiento químico del átomo de carbono C-2' se ve notablemente influido por la naturaleza del 4-sustituyente. En general, los sustituyentes electrón-donantes apantallan a C-2'. No obstante, en la Discusión de Resultados se discutirá la correlación lineal encontrada entre el valor del desplazamiento químico de C-2' y la actividad antiproliferativa del compuesto dotado del tal sustituyente. No se ha calculado la correlación entre los valores de la actividad inhibitoria frente a colina quinasa *in vitro* (células HT-29) por no disponer en la actualidad de todos los valores de la propiedad biológica.

3.3.4.- Síntesis de los derivados pertenecientes al grupo B.

La síntesis de estos compuestos se lleva a cabo en una única etapa con la excepción de la del compuesto 67 que se describe en forma individualizada. La síntesis consiste en la condensación de 2-bromoacetofenona con la amina terciaria apropiada asequible comercialmente (Esquema 3.12). La reacción se efectúa en fase homogénea disolviendo previamente la bromoacetofenona en tetrahidrofurano.



Esquema 3.12.- Síntesis general de los compuestos del grupo B.

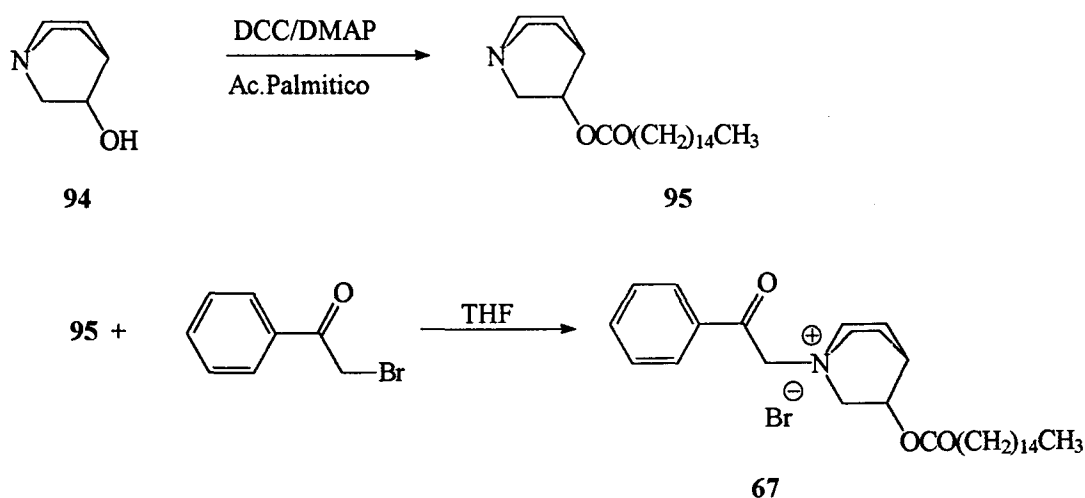
Aunque la síntesis de este tipo de compuestos se lleva a cabo a través de una química sencilla, la manipulación y purificación de los mismos es bastante difícil debido, principalmente, a dos causas: 1) por un lado, a la gran higroscopicidad de este tipo de compuestos y 2) a los problemas de solubilidad, que dificulta su recristalización. En general, la recristalización de los

crudos obtenido en las reacciones exige la búsqueda de un disolvente adecuado, que se lleva a cabo de manera similar al descrito para las moléculas pertenecientes al grupo A (véase apartado 3.2.4). En las síntesis de los compuestos **68** y **78** no se ha utilizado disolvente puesto que las aminas aromáticas piridina e isoquinoleína son líquidas a temperatura ambiente. En la síntesis del compuesto **65**, la 3-quinuclidinona es asequible bajo forma de clorhidrato. Por eso se requiere una etapa preliminar que consiste en la liberación de la base libre en medio alcalino.

Por otra parte, la síntesis del compuesto **67** ha sido llevada a cabo en 2 etapas (Esquema 3.13):

1) Esterificación de 3-hidroxiquinuclidina **94** por ácido palmítico. Esta reacción se efectúa utilizando cloroformo como disolvente. Los compuestos dicitohexilcarbodiimida y dimitilaminopiridina han sido utilizados como catalizadores. El compuesto **95** se purifica por recristalización en una mezcla de acetato de etilo/etanol; 3/1.

2) Condensación del 3-palmitato de quinuclidina **95** con 2-bromoacetofenona en tetrahidrofurano. Finalmente, el producto **67** se purifica por recristalización de la sal resultante en isopropanol.

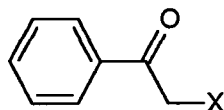


Esquema 3.13.- Síntesis del compuesto **67**.

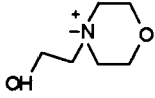
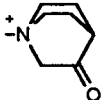
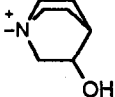
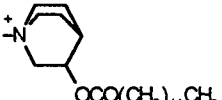

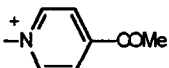
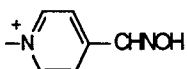
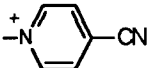
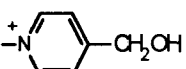
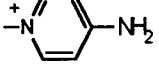
3.3.5.- Resultados biológicos: Actividades inhibitorias de colina quinasa *ex vivo*, *in vitro* y actividad antiproliferativa de los compuestos del grupo B.

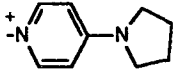
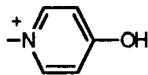
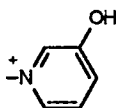
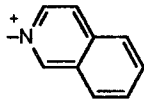
En la Tabla 3.21 se muestran los datos biológicos correspondientes a la actividades inhibitorias de los compuestos del grupo B frente a colina quinasa *ex vivo*, *in vitro* en células NIH 3T3 de ratón, *in vitro* en células humanas HT-29 y, finalmente, se muestran también las actividades antiproliferativas en células humanas tumorales de la línea HT-29 cuyas características se han citado previamente. El análisis de los valores de las diferentes actividades y la correlación estructura-actividad se discute en el apartado Discusión de resultados.

Tabla 3.21.- Valores de CI_{50} (μM) de la actividad inhibidora de colina quinasa *ex vivo*, *in vitro* NIH3T3 e *in vitro* HT-29 y de la actividad antiproliferativa en HT-29 de los compuestos del grupo B.

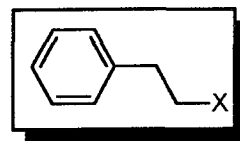


| Comp | Siglas | X | <i>Ex vivo</i> ChoK ^a levadura | <i>In vitro</i> ChoK NIH3T3 ^a | <i>In vitro</i> ChoK HT-29 ^a | <i>Antiprolif.</i> HT-29 ^a |
|------|---------------|---|---|--|---|--|
| 5 | FK35 HC-15 | | >100 | | | >100 |
| 61 | FK34 | | >100 | | | >100 |
| 62 | FK28 | | >100 | >100 | | >50 |
| 63 | FK37 | | >100 | | | >100 |

| Continúa Tabla 3.21 | | | | | | |
|---------------------|--------|---|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Comp. | Siglas | X | <i>Ex vivo</i> ChoK levadura | <i>In vitro</i> ChoK NIH 3T3 | <i>In vitro</i> ChoK HT-29 | <i>Antiprolif.</i> HT-29 |
| 64 | FK36 |  | >100 | >50 | | >100 |
| 65 | FK30 |  | >100 | | | >100 |
| 66 | FK26 |  | 45 | >100 | | >200 |
| 67 | FK29 |  | 55 | 20 | | 25-40 |
| 68 | FK56 |  | >100 | | | >50 |
| 69 | FK51 |  | >100 | | | >50 |
| 70 | FK57 |  | >100 | | | >50 |
| 71 | FK55 |  | 15 | | >50 | >50 |
| 72 | FK50 |  | >100 | | | 100 |
| 73 | FK54 |  | >100 | | | 25 |

| Continúa Tabla 3.21 | | | | | | |
|---------------------|--------|--|------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Comp. | Siglas | X | <i>Ex vivo</i> ChoK levadura | <i>In vitro</i> ChoK NIH 3T3 | <i>In vitro</i> ChoK HT-29 | <i>Antiprolif.</i> HT-29 |
| 75 | FK53 |  | >100 | | | 12 |
| 76 | FK52 |  | >100 | | | >50 |
| 77 | FK58 |  | >100 | | | >50 |
| 78 | FK32 |  | >100 | | | 90 |

^aLos datos biológicos han sido obtenidos en el laboratorio del Dr. Lacal, IIB (Madrid). En general, los valores que aparecen a la derecha de cada columna expresan actividades interesantes.



3.4.- Diseño, síntesis y análisis estructural de los análogos de hemicolinio pertenecientes al grupo C.

En este apartado se describe el diseño y la síntesis de los cinco compuestos **79 - 83** (Tabla 3.22); también se analizan sus estructuras determinadas por técnicas espectroscópicas de RMN. Estos compuestos contienen en común el esqueleto de feniletilo. La serie exploratoria está constituida por los cinco compuestos antes mencionados que, teniendo en común el esqueleto hidrocarbonado antes citado, se diferencian solamente en la naturaleza de la cabeza catiónica. Asimismo, todos ellos se sintetizan fácilmente a partir de bromuro de fenetilo.

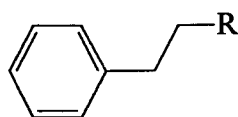
3.4.1.- Diseño de los compuestos 79- 83.

En la Tabla 3.22 se resumen las estructuras correspondientes a este grupo de compuestos. Como se ha mencionado anteriormente, el grupo C contiene solamente cinco moléculas. La razón para esta reducción del número de componentes del grupo hay que buscarla en los resultados de actividad biológica de los compuestos incluidos en los dos grupos precedentes. En efecto, allí se pone de manifiesto la necesidad de la agrupación 4-aminopiridinio, 4-(*N,N*-dimetilamino)piridinio, ó 4-(1-pirrolidino)piridinio para desarrollar interesantes actividades antiproliferativas, asociadas o no a interesantes actividades inhibitorias de colina quinasa, cuestión ésta que más adelante se discutirá. También se ha incluido el grupo 3-hidroxiquinuclidinio en la estructura de los compuestos de este grupo porque parece conferir a las moléculas que lo poseen una gran afinidad por la enzima colina quinasa; así, el compuesto 56 (FK21, $CI_{50} = 0.5\mu M$) es el más potente inhibidor de colina quinasa sintetizado aquí.

El compuesto 79, que contiene la misma cabeza catiónica que la de los compuestos líderes HC-3 y HC-15, puede considerarse como el producto de reducción de la molécula HC-15. El cambio del grupo carbonilo por metileno provoca, además del cambio en la funcionalidad química, un cambio conformacional que se traduce en una mayor flexibilidad conformacional. Sin embargo, la modificación estructural más importante inducida con este cambio es la pérdida total de la posibilidad de adquirir la forma ciclocetálica. Por otro lado, la molécula contiene en su estructura una unidad de colina que, como es bien conocido, es el sustrato de la enzima colina quinasa. Por lo tanto, este compuesto es un análogo del sustrato que puede ser un buen candidato *a priori* como inhibidor de la enzima.

El compuesto 80 es un análogo rígido del compuesto 79 y también puede considerarse como análogo del sustrato de la enzima, puesto que la estructura de colina está incluida en la estructura de 80 pero en una conformación fija. La inclusión de este compuesto parece justificada si se tiene en cuenta, como se ha dicho anteriormente, la alta afinidad *ex vivo* por la enzima colina quinasa de los compuestos 56 (FK21, grupo A) y 66 (FK26, grupo B).

Tabla 3.22.- Estructura de los compuestos 79- 83.

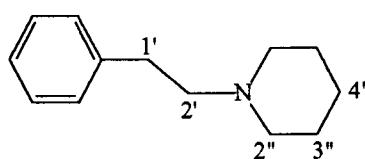


| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|---|-----------|---|
| 79 | | 81 | |
| 80 | | 82 | |
| | | 83 | |

La serie **81 - 83** representa al grupo de compuestos en los que la cabeza catiónica está formada por el grupo 4-aminopiridinio y derivados. La inclusión de este tipo de estructuras se debe a la observación hecha sobre la actividad antiproliferativa en células HT-29 en la serie de compuestos que constituye los grupos A y B. Por otro lado, en el compuesto **58** (FK3) se observa una alta afinidad por la enzima colina quinasa ($CI_{50} = 7.5 \mu\text{M}$). Posiblemente, el anillo de piridinio sustituido en 4 por una función nitrogenada pueda establecer interacciones electrónicas con anillos aromáticos contenidos en los aminoácidos de la proteína enzimática.

3.4.1.1.- Análisis espectroscópico-estructural de los compuestos 79 - 83.

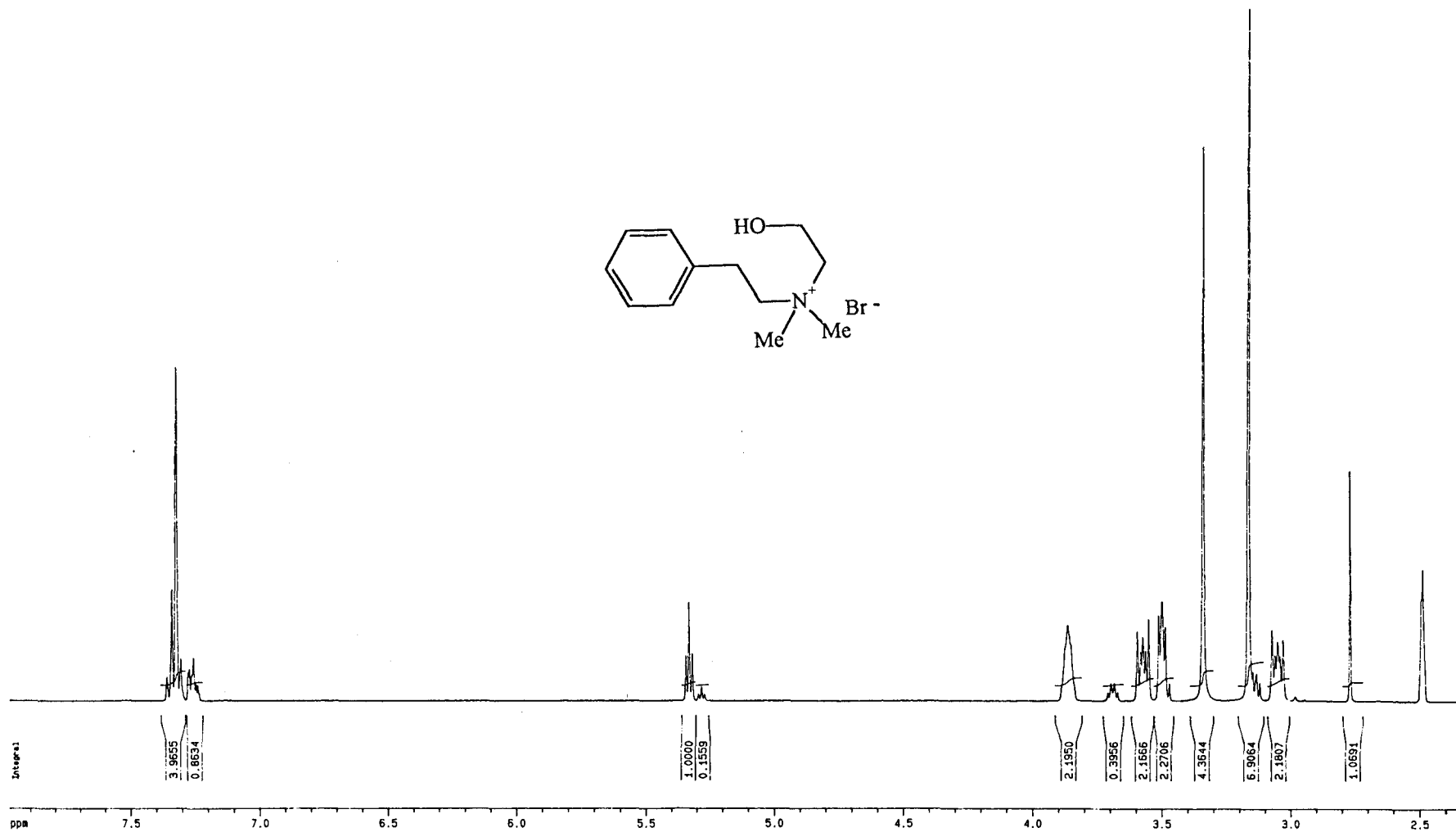
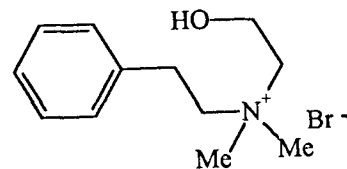
Tabla 3.23.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) de los compuestos 79 - 83.



| Compuesto | H-1' | H-2' | H-2'' | H-3'' |
|-----------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| 79 ^a | 3,05, t <i>J</i> ; 4,17 | 3,57, t <i>J</i> ; 4,15 | 3,86, m | 3,50, t <i>J</i> ; 4,80 |
| 80 | 3,00, m | 3,77, m | 3,50 (He), m 3,10 (Ha), m | 4,09, m |
| 81 | 3,07, t <i>J</i> ; 7,21 | 4,37, t <i>J</i> ; 7,20 | 8,10, d <i>J</i> ; 6,87 | 6,77, d <i>J</i> ; 7,22 |
| 82 | 3,10, t <i>J</i> ; 7,31 | 4,44, t <i>J</i> ; 7,29 | 8,27, d <i>J</i> ; 7,49 | 6,99, d <i>J</i> ; 7,53 |
| 83 | 3,10, t <i>J</i> ; 7,25 | 4,43, t <i>J</i> ; 7,26 | 8,23, d <i>J</i> ; 7,42 | 6,84, d <i>J</i> ; 7,42 |

^aH-2'' corresponde a H-1'' y H-3'' a H-2''.

En las Tablas 3.23 (¹H-RMN) y 3.24 (¹³C-RMN) se muestran resumidas las principales características espectroscópicas de este grupo de compuestos. Las señales correspondientes a los protones del anillo bencénico resuenan entre 7.35 y 7.10 ppm, en la forma conocida para un anillo bencénico monosustituido. La naturaleza de la cabeza catiónica no influye en estas señales. En general, los espectros son concordantes con las estructuras propuestas y no existe ninguna característica que deba ser especialmente destacada.



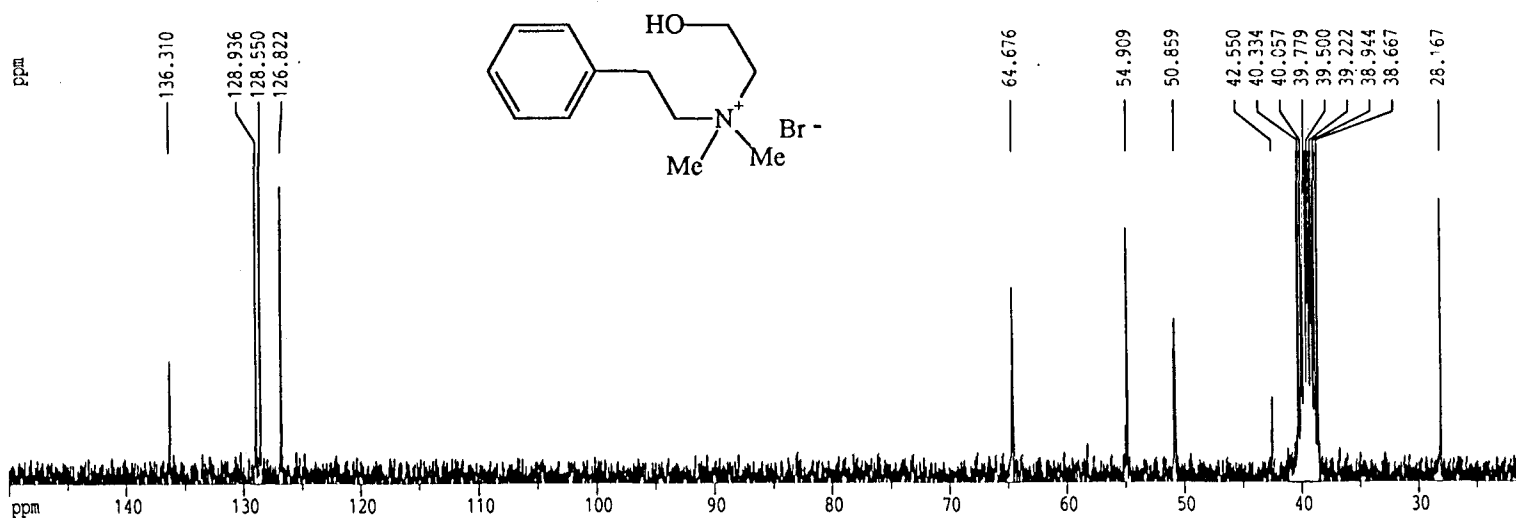
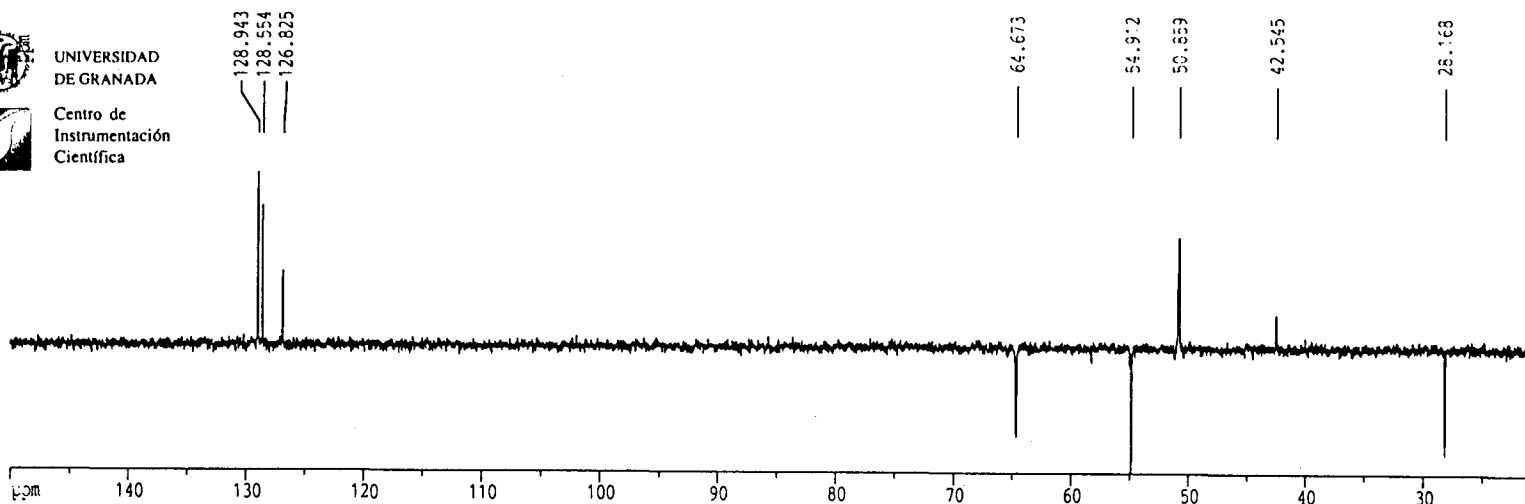
¹H-RMN-16: Bromuro de 1-(feniletil)-2-hidroxi-etildimetilamonio 79.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



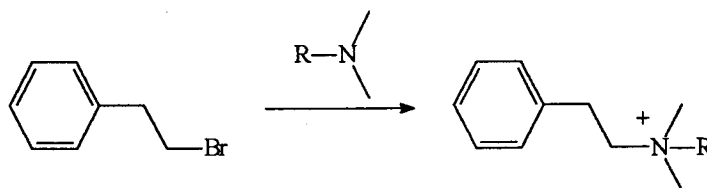
¹³C-RMN-16: Bromuro de 1-(feniletil)-2-hidroxietildimetilamonio 79.

Tabla 3.24.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) ^{13}C -RMN de los compuestos 79- 83.

| Comp. | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-1' | C-2' | C-2'' | C-3'' | C-4'' |
|-------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|
| 79 | 136,31 | 128,94 | 126,82 | 128,55 | 28,17 | 64,67 | 54,91 | 50,86 | — |
| 80 | 136,57 | 129,01 | 126,86 | 128,60 | 27,59 | 63,36 | 53,97 | 63,39 | 26,37 |
| 81 | 137,62 | 129,74 | 127,70 | 129,40 | 37,00 | 58,73 | 143,71 | 110,00 | 159,42 |
| 82 | 136,76 | 128,88 | 126,78 | 128,49 | 36,15 | 57,37 | 141,98 | 107,42 | 155,73 |
| 83 | 136,71 | 128,81 | 126,74 | 128,46 | 36,12 | 57,44 | 141,89 | 107,97 | 152,88 |

3.4.2.- Síntesis de los compuestos del grupo C.

Nuevamente la síntesis de esta familia de compuestos es bastante sencilla ya que se obtienen a través de la condensación de 2-bromoetilfenilo con la amina apropiada obtenida comercialmente o sintetizada en nuestro laboratorio. La reacción tiene lugar en fase homogénea, a temperatura ambiente y THF como disolvente. Los compuestos obtenidos deben ser posteriormente recristalizados en alcoholes adecuados tal y como se describe en la Parte Experimental.



Esquema 3.14.- Síntesis general de los compuestos del grupo C.

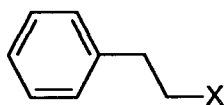
3.4.3.- Resultados biológicos.

Los compuestos pertenecientes a la familia C han sido ensayados como inhibidores de colina quinasa *in vitro* en células HT-29 y como agentes antiproliferativos frente a células HT-29. No se han determinado los valores de actividad inhibitoria de colina quinasa *ex vivo* ni *in vitro* en

células NIH 3T3. Ésto es debido a que cronológicamente estos compuestos fueron sintetizados cuando la investigación ya se encontraba muy avanzada y se conocía que los datos biológicos más interesantes son los que se determinan sobre el mismo tipo de células.

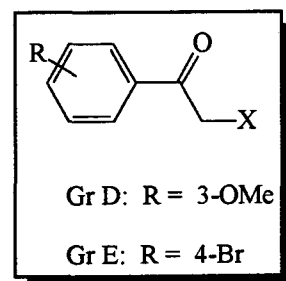
El análisis de los valores de las diferentes actividades y la correlación estructura-actividad se discute en el apartado Discusión de resultados.

Tabla 3.25.- Valores de CI_{50} (μM) de la actividad inhibidora de colina quinasa *ex vivo*, *in vitro* NIH3T3 e *in vitro* HT-29 y de la actividad antiproliferativa en HT-29 de los compuestos del grupo C.



| Compuesto | Siglas | X | <i>In vitro</i> ChoK HT-29 ^a | <i>Antiprolif.</i> HT-29 ^a |
|-----------|--------|---|--|--|
| 79 | FK70 | | | |
| 80 | FK61 | | >50 | >50 |
| 81 | FK69 | | | 13,5 |
| 82 | FK60 | | >50 | 10,25 |
| 83 | FK62 | | >50 | 5 |

^aLos datos biológicos han sido obtenidos en el laboratorio del Dr. Lacal, IIB (Madrid). En general, los valores que aparecen a la derecha de cada columna expresan actividades interesantes.



3.5.- Diseño, síntesis y determinación estructural de los compuestos pertenecientes a los grupos D y E.

3.5.1.- Consideraciones generales.

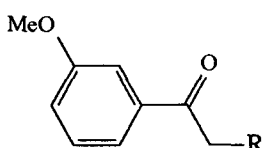
A la vista de los resultados biológicos obtenidos para los grupos A, B y C, parece aconsejable analizar lo que acontecería si en el anillo bencénico existiesen sustituyentes electrón-donantes o electrón-atrayentes. A tal efecto, se pensó introducir tres sustituyentes alternativamente: a) el grupo 3-metoxi, que es ligeramente electrón-donante, b) el grupo 4-metoxi, que muestra mayor poder activante y, c), el grupo 4-bromo, que es ligeramente desactivante.

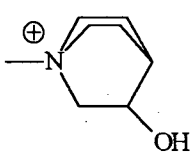
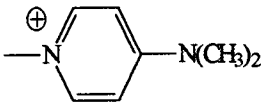
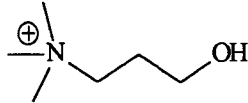
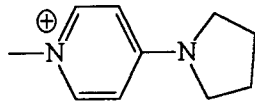
Las tres series de compuestos deben contener solo a las cabezas catiónicas que originan mayores actividades antiproliferativa y/o inhibitoria de colina quinasa en los grupos anteriormente estudiados. No obstante ser éstos nuestros planteamientos, se decidió no preparar la serie de compuestos que contienen el grupo 4-metoxi debido a la pérdida de actividad observada para los 3-metoxi-análogos.

Así, aquí se describen los compuestos **84 - 87**, constituyentes del **Grupo D** (véase Tabla 3.26) y los análogos **88 - 90**, que conforman el **Grupo E**, que se muestran en la Tabla 3.27.

3.5.2.- Diseño de los compuestos de los grupos D y E.

Tabla 3.26.- Estructura de los compuestos del grupo D.



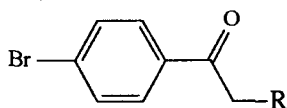
| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|---|-----------|---|
| 84 |  | 86 |  |
| 85 |  | 87 |  |

El compuesto **84** contiene la cabeza catiónica del 3-hidroxiquinuclidinio sustituida en posición 1 por el resto 3-metoxi-acetofenónico.

Como se ha visto anteriormente, tal cabeza catiónica origina, en general, compuestos que reconocen bien a la enzima colina quinasa (ChoK), aunque no se comportan como buenos agentes antiproliferativos, posiblemente debido a problemas de paso a través de membranas.

Por otro lado, los compuestos **86** y **87** contienen cabezas catiónicas 4-(*N,N*-dimetilamino)piridinio y 4-(1-pirrolidino)piridinio, respectivamente, que dan lugar a buenas actividades antiproliferativas frente a la línea tumoral HT-29 y, en algunos casos, éstas van acompañadas también de excelente poder inhibitorio de ChoK. Finalmente, el compuesto **85** se ha incluido de forma aleatoria en este estudio.

Tabla 3.27.- Estructuras de los compuestos del grupo E.



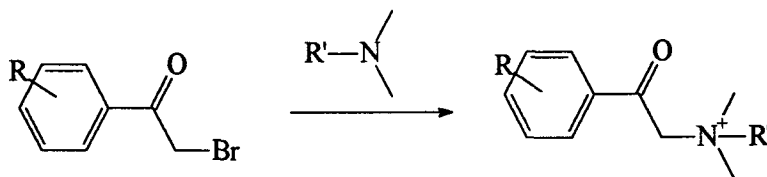
| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|--|-----------|--|
| 88 | <p>A piperidinium ring (six-membered ring with a positive charge on the nitrogen) with a hydroxyl group (-OH) at the 4-position.</p> | 89 | <p>A pyridinium ring (six-membered aromatic ring with a positive charge on the nitrogen) with a dimethylamino group (-N(CH₃)₂) at the 4-position.</p> |
| | | 90 | <p>A pyridinium ring (six-membered aromatic ring with a positive charge on the nitrogen) with a pyrrolidine ring (five-membered ring with a nitrogen) at the 4-position.</p> |

El diseño de los compuestos **88** - **90** se ha llevado a cabo utilizando los mismos criterios que los previamente citados.

3.5.3.- Síntesis de los compuestos pertenecientes a los grupos D y E.

Como viene siendo habitual, estos compuestos se obtienen a través de una sencilla reacción llevada a cabo entre la amina terciaria y un halogenuro de alquilo adecuado. Los halogenuros empleados son 3'-metoxi-2-bromoacetofenona (Grupo D) y 4'-2-dibromoacetofenona (Grupo E). Las aminas empleadas han sido las ya conocidas 3-hidroxiquinuclidina, 3-(*N,N*-dimetilamino)propanol, 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina y 4-(1-pirrolidino)piridina. Todas estas aminas son asequibles comercialmente.

En el Esquema 3.15 se muestra de forma simplificada el proceso sintético.



Esquema 3.15.- Síntesis general de los compuestos de los grupos D y E.

3.5.4.- Determinación estructural de los compuestos de los grupos D y E.

Las características espectrocópicas de los compuestos **84** - **87** se resumen y comparan en las Tablas 3.28 (¹H-RMN) y 3.29 (¹³C-RMN). Asimismo, en las Tablas 3.30 (¹H-RMN) y 3.31 (¹³C-RMN) se muestran las características espectroscópicas de los compuestos **88** - **90**. En general, los espectros descritos son concordantes con las estructuras propuestas.

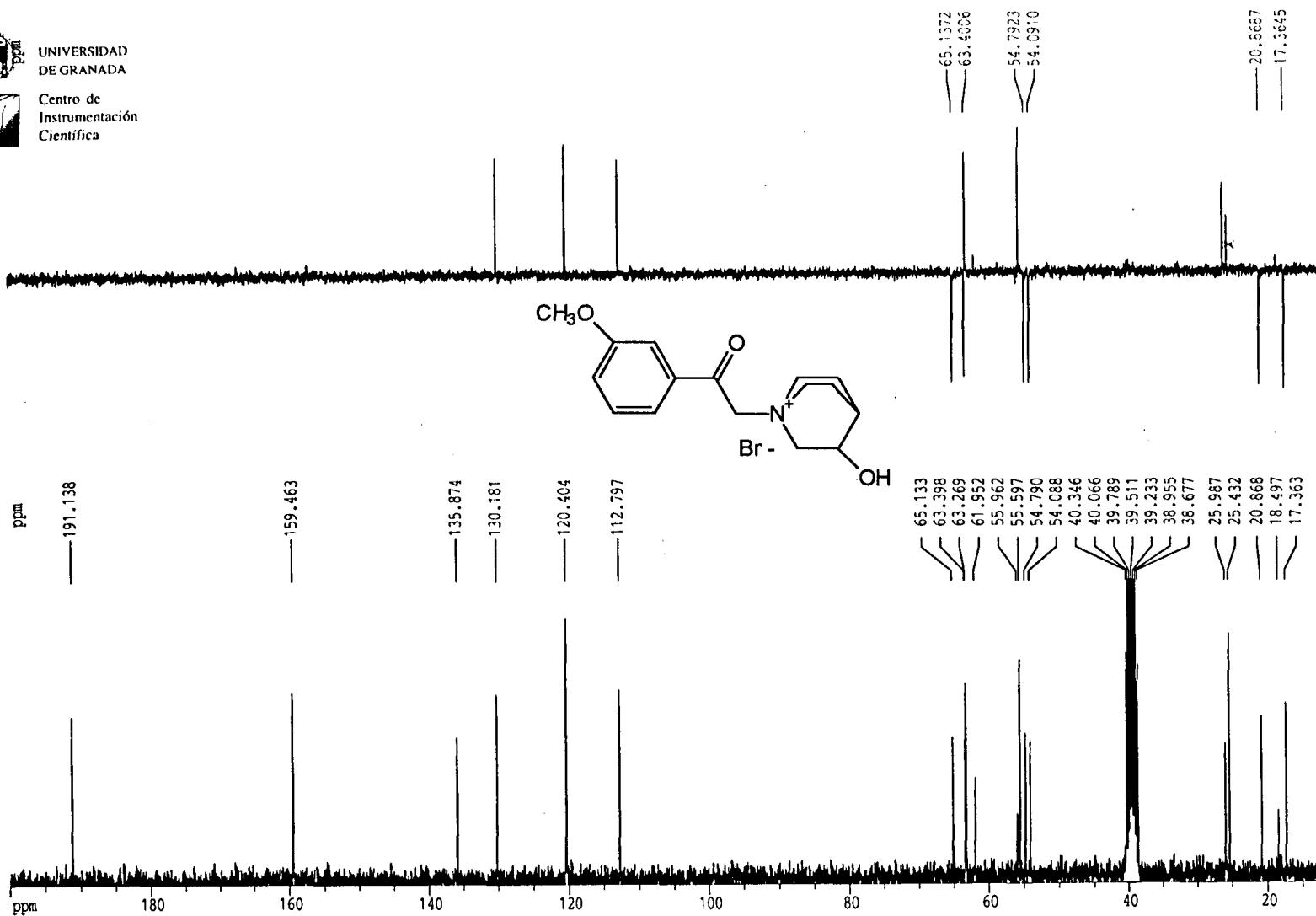
Las señales de los protones aromáticos aparecen entre 7,60 y 7,30 ppm como el típico multiplete que caracteriza a anillos bencénicos monosustituidos. Esta señal no se ve afectada por la naturaleza de la cadena lateral de los distintos compuestos. En el compuesto **84**, el protón del grupo hidroxilo resuena como doblete con un valor *J* de 3,40 Hz. El protón H-2" está más desapantallado comparado con el mismo átomo en el compuesto **85**. Esto, es debido a su cercanía al grupo hidroxilo.



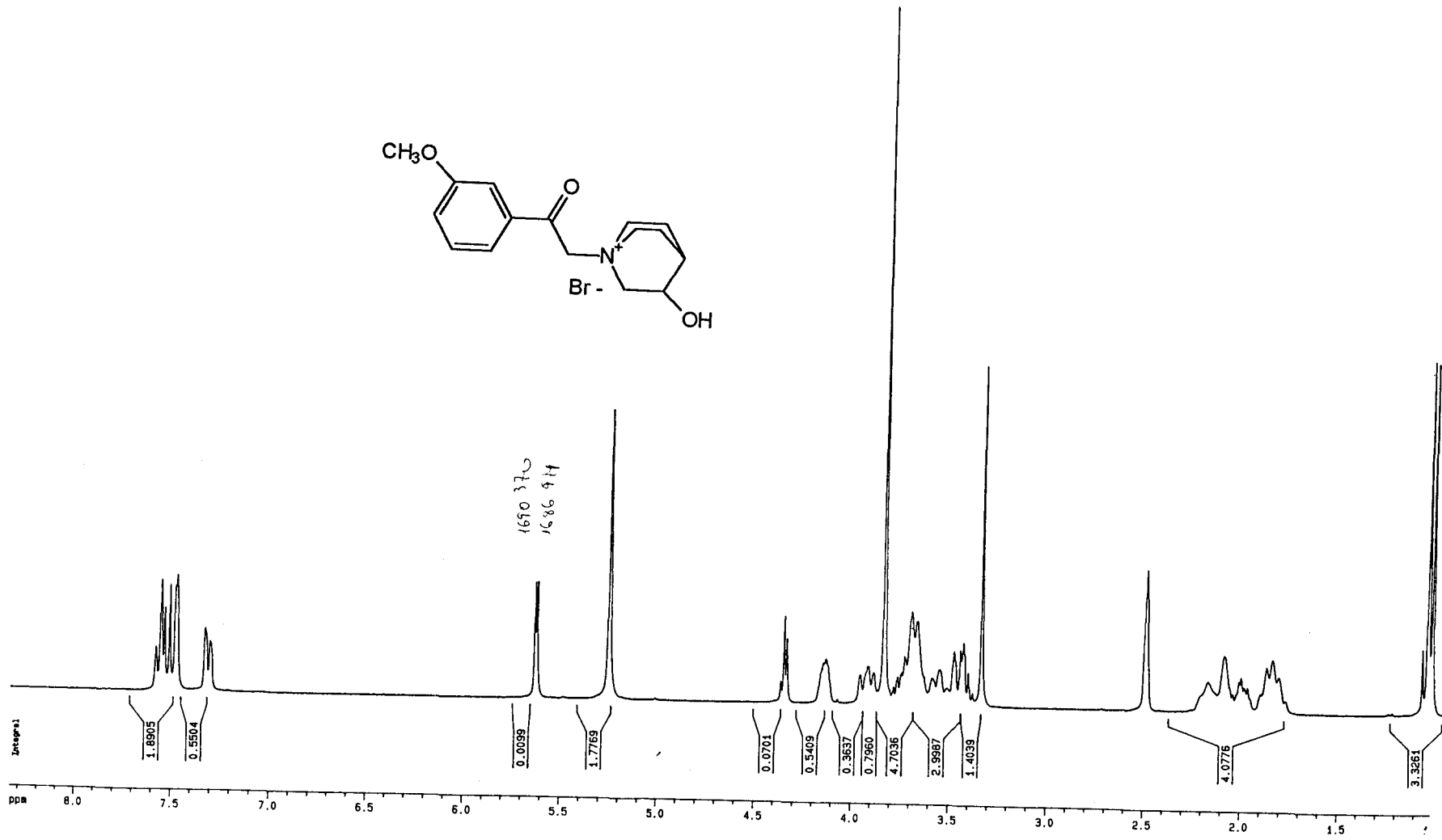
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN-17: Bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-3-hidroxiquinuclidinio 84.



¹H-RMN-17: Bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-3-hidroxiquinuclidinio 84.

Tabla 3.28.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) de los compuestos 84- 87.

| Compuesto | H-2' | H-2'' | H-3'' | H-4'' |
|-----------------------|---------|--|----------------------------|---------|
| 84 | 5,25, s | 3,92 (He), m <i>J</i> ; 11,48 3,57 (Ha), m <i>J</i> ; 11,11 | 4,14, m | 2,15, m |
| 85^a | 5,36, s | 3,68, m | 1,86, m | 3,35, m |
| 86 | 6,00, s | 8,20, d <i>J</i> ; 7,58 | 7,11, d <i>J</i> ; 7,60 | |
| 87 | 5,98, s | 8,18, d <i>J</i> ; 7,45 | 6,96, d <i>J</i> ; 7,51 | |

^aH-2" corresponde a H-1"; H-3" a H-2" y H-4" a H-3". El sistema de numeración es el mismo que el del grupo B.

Tabla 3.29.- Desplazamientos químicos ¹³C-RMN de los compuestos 84- 87.

| Comp | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 | C-2' | C-2'' | C-3'' | C-4'' |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| 84 | 135,9 | 130,2 | 159,5 | 120,4 | 112,8 | 120,4 | 63,4 | 65,1 | 63,3 | 54,8 |
| 85 | 135,7 | 130,2 | 159,5 | 120,6 | 112,7 | 120,5 | 62,9 | 65,1 | 25,5 | 57,6 |
| 86 | 135,2 | 130,3 | 159,5 | 120,5 | 112,7 | 120,2 | 62,5 | 143,2 | 107,3 | 155,9 |
| 87 | 135,2 | 130,3 | 159,5 | 120,5 | 112,7 | 120,2 | 62,5 | 143,2 | 108,0 | 153,1 |

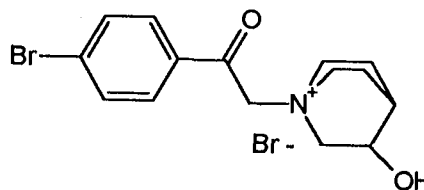
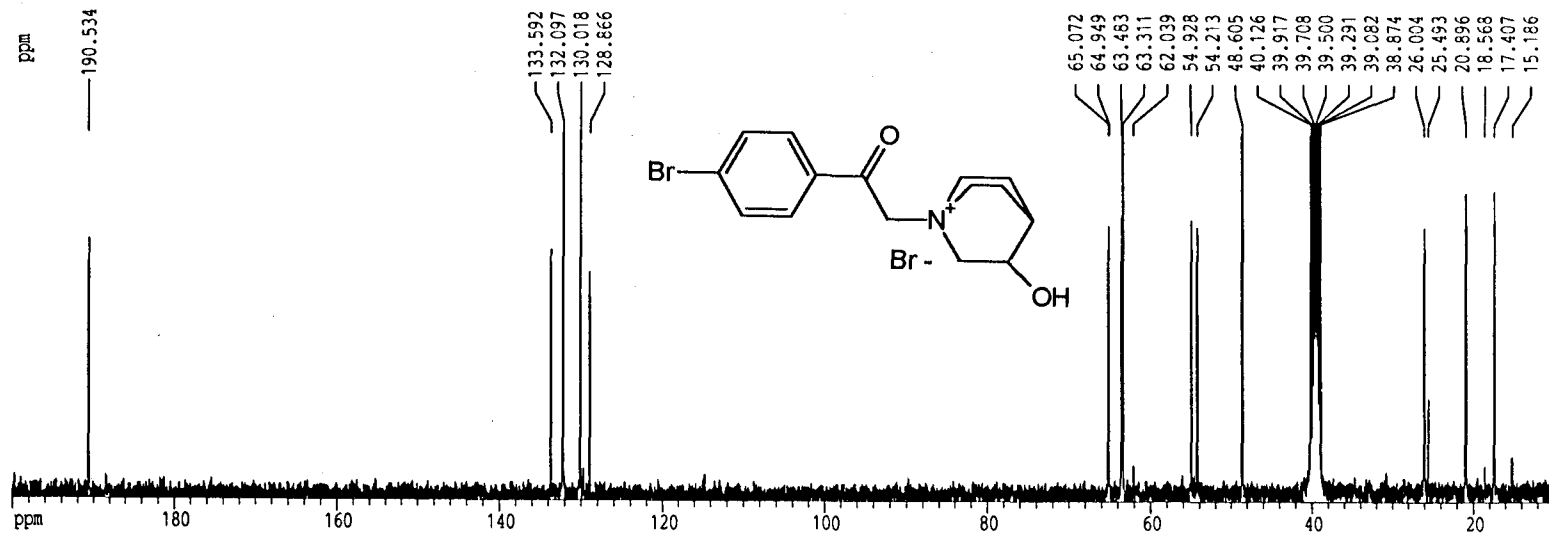
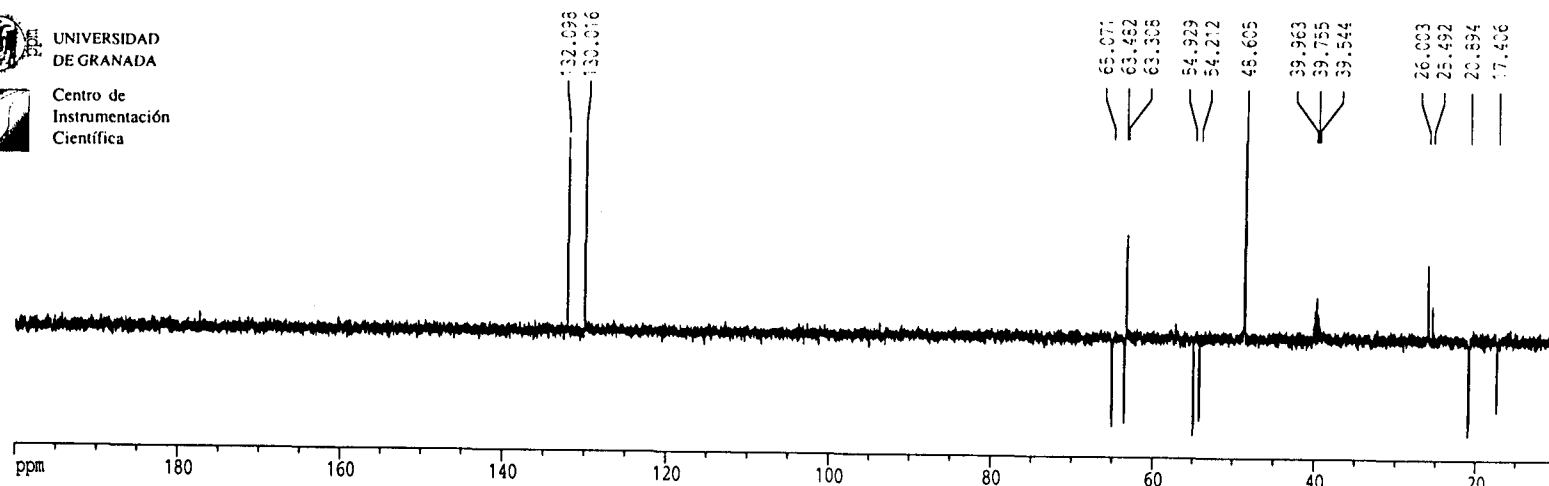
Al analizar los datos de ¹³C-RMN de estos compuestos no aparece ninguna característica que deba ser destacada sobre lo comentado en compuestos análogos pertenecientes a otros grupos previamente estudiados. Los espectros son concordantes con las estructuras propuestas.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica

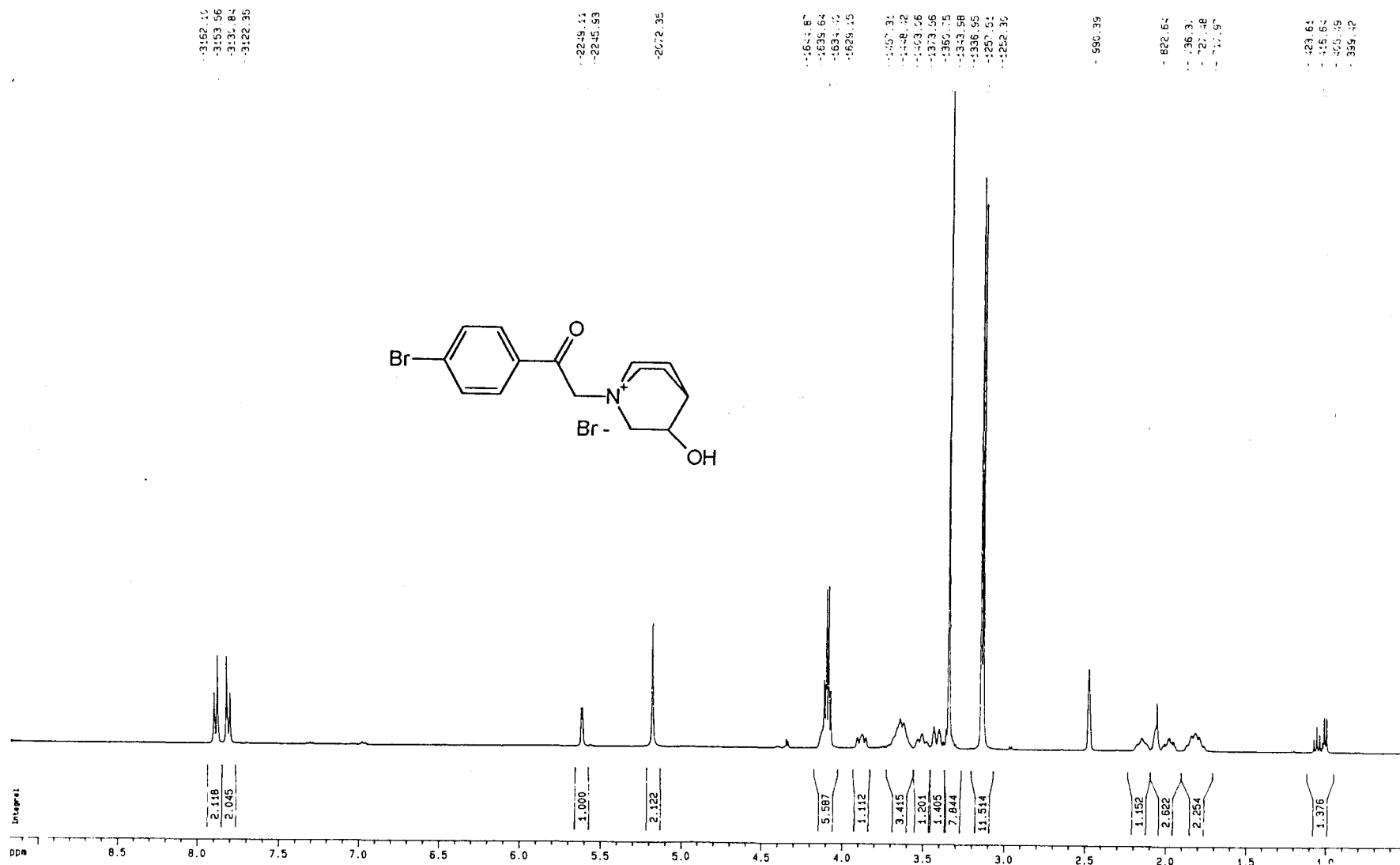


FOUAD KHALESS

138

PARTE TEÓRICA

¹³C-RMN-18: Bromuro de 1-[(4-bromofenil)carbonilmetil]-3-hidroxiquinuclidinio 88.



¹H-RMN-18: Bromuro de 1-[(4-bromofenil)carbonilmetil]-3-hidroxiquinuclidinio 88.

Tabla 3.30.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) de los compuestos 88- 90.

| Comp. | H-2 | H-3 | H-2' | H-2'' | H-3'' | H-4'' |
|-----------|----------------------------|---------|---------|--|----------------------------|---------|
| 88 | 7,82, d <i>J</i> , 8,54 | 7,89, d | 5,18, s | 3,88 (He), t <i>J</i> , 10,89 3,51 (Ha), t <i>J</i> , 10,85 | 4,09, m | 2,15, m |
| 89 | 7,84, d <i>J</i> , 8,51 | 7,94, d | 5,97, s | 8,18, d <i>J</i> , 7,55 | 7,11, d <i>J</i> , 7,54 | |
| 90 | 7,84, d <i>J</i> , 8,45 | 7,94, d | 5,95, s | 8,16, d <i>J</i> , 7,30 | 6,96, d <i>J</i> , 7,30 | |

El sistema de numeración adoptado corresponde al mismo del grupo B.

Tabla 3.31.- Desplazamientos químicos ^{13}C -RMN de los compuestos 88- 90.

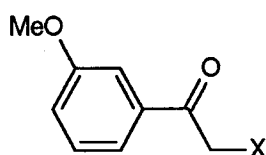
| Comp. | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-2' | C-2'' | C-3'' | C-4'' |
|-----------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| 88 | 133,59 | 132,10 | 130,02 | 128,87 | 63,31 | 65,07 | 63,48 | 48,60 |
| 89 | 132,90 | 132,16 | 130,04 | 128,50 | 62,31 | 143,21 | 107,40 | 156,01 |
| 90 | 132,90 | 132,11 | 129,98 | 128,43 | 62,33 | 143,14 | 107,96 | 153,14 |

3.5.5.- Actividades biológicas de los compuestos pertenecientes a los grupos D y E.

En la Tabla 3.32 se muestran los valores de CI_{50} (μM) para la actividad colina quinasa *ex vivo*, *in vitro* (sobre fibroblastos de ratón NIH 3T3), *in vitro* sobre células tumorales humanas HT-29 y potencia antiproliferativa de los compuestos aquí estudiados. Como viene sucediendo hasta el momento actual, no se dispone de todos los valores para todos los compuestos.

Los datos obtenidos se comentarán en el apartado de Discusión de resultados conjuntamente con los obtenidos para otros grupos.

Tabla 3.32.- Valores de CI_{50} (μM) de la actividad inhibidora de colina quinasa *ex vivo*, *in vitro* NIH3T3 e *in vitro* HT-29 y de la actividad antiproliferativa en HT-29 de los compuestos del grupo D

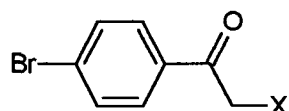


| Comp | Siglas | X | <i>Ex vivo</i> ChoK ^a levadura | <i>In vitro</i> ChoK NIH3T3 ^a | <i>In vitro</i> ChoK HT-29 ^a | <i>Antiprolif.</i> HT-29 ^a |
|------|--------|---|---|--|---|--|
| 84 | FK25 | | 10 | >100 | | >100 |
| 85 | FK27 | | >100 | >100 | | >50 |
| 86 | FK47 | | | | >50 | 20 |
| 87 | FK48 | | >100 | | | 21 |

^aLos datos biológicos han sido obtenidos en el laboratorio del Dr. Lacal, IIB (Madrid). En general, los valores que aparecen a la derecha de cada columna expresan actividades interesantes.

De la misma forma, en la Tabla 3.33 se muestran los resultados biológicos obtenidos para los compuestos del grupo D.

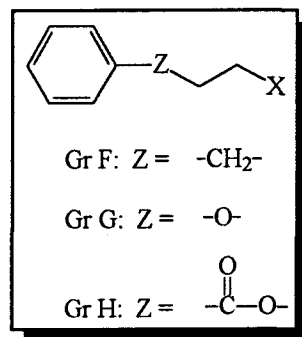
Tabla 3.33.- Valores de CI_{50} (μM) de la actividad inhibidora de colina quinasa *ex vivo*, *in vitro* NIH3T3 e *in vitro* HT-29 y de la actividad antiproliferativa en HT-29 de los compuestos del grupo E



| Comp | Siglas | X | <i>Ex vivo</i> ChoK ^a levadura | <i>In vitro</i> ChoK NIH3T3 ^a | <i>In vitro</i> ChoK HT-29 ^a | <i>Antiprolif.</i> HT-29 ^a |
|------|--------|---|---|--|---|--|
| 88 | FK44 | | 10 | >50 | | >50 |
| 89 | FK45 | | >100 | | | 5 |
| 90 | FK46 | | | | >50 | 6.5 |

^aLos datos biológicos han sido obtenidos en el laboratorio del Dr. Lacal, IIB (Madrid). En general, los valores que aparecen a la derecha de cada columna expresan actividades interesantes.

El análisis de los valores de las diferentes actividades y la correlación estructura-actividad se discute en el apartado Discusión de resultados.



3.6.- Diseño, síntesis y determinación estructural de los compuestos de los grupos F, G y H.

3.6.1.- Diseño, síntesis y determinación estructural de los compuestos del grupo F.

En este apartado se discute el diseño, la síntesis y la determinación estructural de los tres compuestos **91- 93**. Estos compuestos contienen en común el esqueleto del fenilpropilo y se sintetizan a partir del correspondiente 1-fenil-3-bromopropano.

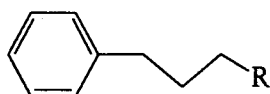
3.6.1.1.- Diseño de los compuestos **91- 93**.

La reducción del grupo carbonilo en los análogos estructurales que se corresponden con las estructuras tipo “mitad” del hemicolinio (grupo C) ha conducido al compuesto **83** (FK62)

que, sin ser buen inhibidor de la enzima colina quinasa, muestra una actividad antiproliferativa muy interesante ($CI_{50} = 5 \mu M$). La actividad de su análogo provisto de grupo carbonilo (75, FK53) es algo menos de la mitad ($CI_{50} = 12 \mu M$). Otros compuestos del grupo muestran actividades antiproliferativas análogas o también mayores que las de sus análogos del grupo B. Por todo ello, parece lógico llevar a cabo un proceso de homologación de los compuestos reducidos. El grupo F aquí estudiado, contiene a los tres compuestos 91 - 93 que son homólogos de los compuestos 66, 74 y 75, y que contienen las cabezas catiónicas previamente citadas (3-hidroxiquinuclidinio, 4-(*N,N*-dimetilamino)piridinio y 4-(1-pirrolidino)piridinio, respectivamente). Las estructuras se muestran en la Tabla 3.34.

La razón por la que se han seleccionados estas cabezas ya ha sido previamente citada y, por lo tanto, no se insistirá más en ella.

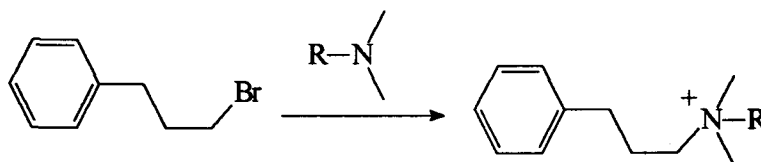
Tabla 3.34.- Estructura de los compuestos del grupo F.



| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|---|-----------|---|
| 91 | | 92 | |
| | | 93 | |

3.6.1.2.- Síntesis de los compuestos del grupo F.

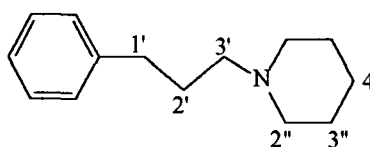
La síntesis involucra sendas reacciones llevadas a cabo entre 3-bromo-1-fenilpropano y las aminas 3-hidroxiquinuclidina, 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina y 4-(1-pirrolidino)piridina, asequibles comercialmente (véase Esquema 3.16).



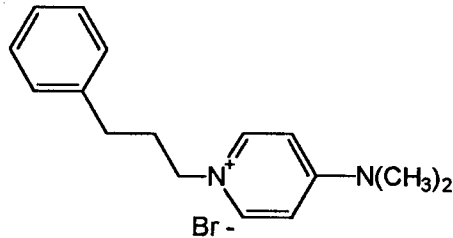
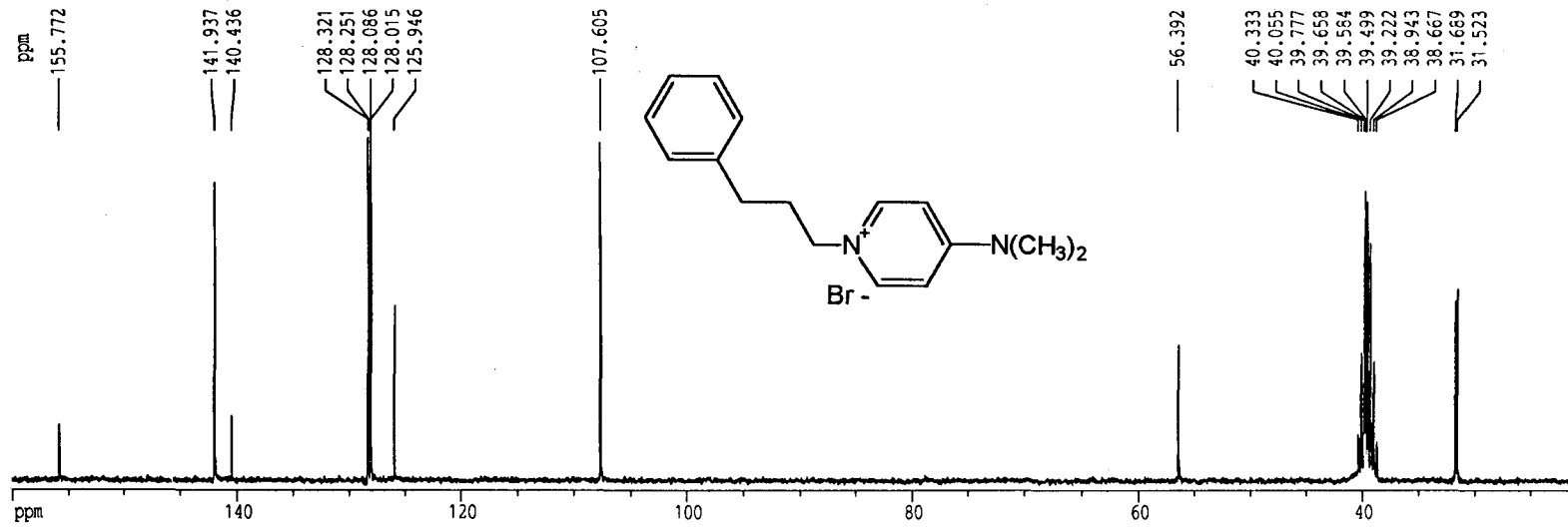
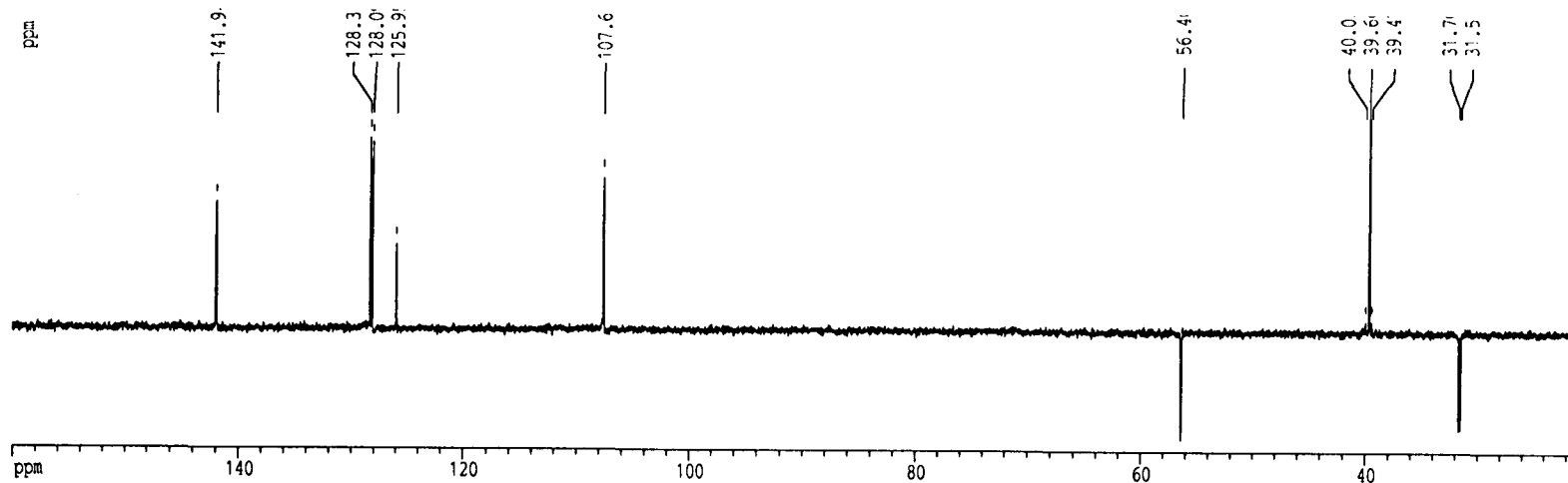
Esquema 3.16.- Síntesis general de los compuestos del grupo F.

3.6.1.3.- Elucidación estructural de los compuestos del grupo F.

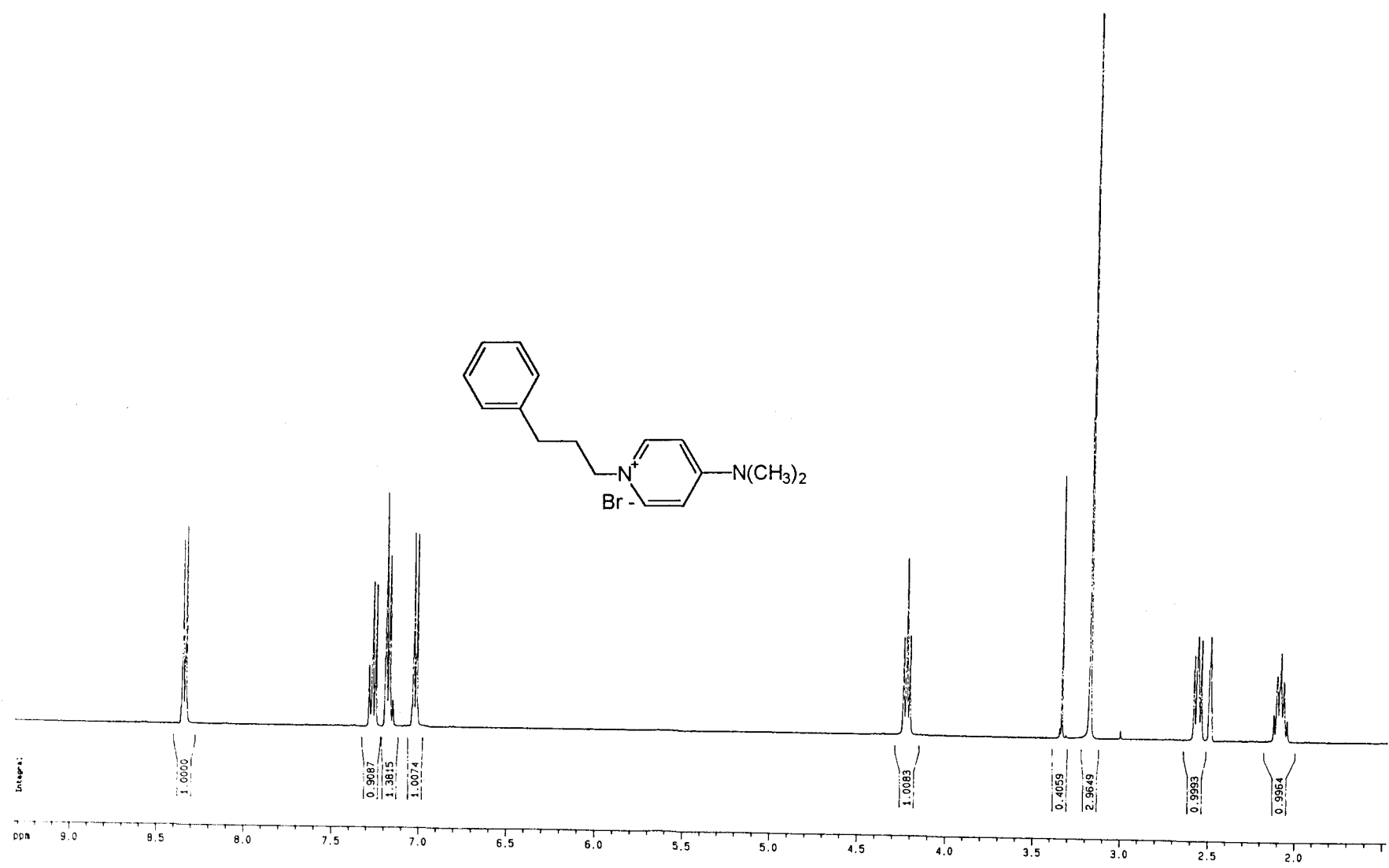
Tabla 3.35.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) de los compuestos 91- 93.



| Comp. | H-1' | H-2' | H-3' | H-2'' | H-3'' | H-4'' |
|-------|----------------------------|---------|----------------------------|---|----------------------------|---------|
| 91 | 2,57, t <i>J</i> ; 7,80 | 1,97, m | 3,20, t <i>J</i> ; 8,18 | 3,66 (He), t <i>J</i> ; 11,92 3,41(Ha), m | 4,04, m | 1,95, m |
| 92 | 2,56, t <i>J</i> ; 7,48 | 2,10, m | 4,22, t <i>J</i> ; 7,19 | 8,34, d <i>J</i> ; 7,63 | 7,03, d <i>J</i> ; 7,65 | |
| 93 | 2,56, t <i>J</i> ; 7,49 | 2,10, m | 4,22, t <i>J</i> ; 7,17 | 8,34, d <i>J</i> ; 7,40 | 6,80, d <i>J</i> ; 7,41 | |



¹³C-RMN-19: Bromuro de 1-(fenilpropil)-4-dimetilaminopiridinio 92.



¹H-RMN-19: Bromuro de 1-(fenilpropil)-4-dimetilaminopiridinio 92.

En las Tablas 3.35 ($^1\text{H-RMN}$) y 3.36 ($^{13}\text{C-RMN}$) se muestran las principales características espectroscópicas de los compuestos aquí estudiados. Como comentario adicional, baste decir que los átomos de hidrógeno de los tres grupos metílenos de la cadena acíclica son fácilmente distinguibles. Los desplazamientos químicos y demás características espectroscópicas de las cabezas catiónicas han sido ya muy comentadas y, por lo tanto, no se insistirá más en ello. Una situación análoga se tiene al considerar los espectros $^{13}\text{C-RMN}$.

Tabla 3.36.- Desplazamientos químicos $^{13}\text{C-RMN}$ de los compuestos 91 - 93.

| Comp. | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-1' | C-2' | C-3' | C-2'' | C-3'' | C-4'' |
|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|------|-------|-------|-------|
| 91 | 140,3 | 128,4 | 126,2 | 128,3 | 31,8 | 23,08 | 54,0 | 62,6 | 63,4 | 26,3 |
| 92 | 140,4 | 128,3 | 125,9 | 128,0 | 31,5 | 31,7 | 56,4 | 141,9 | 107,6 | 155,8 |
| 93 | 140,5 | 128,4 | 126,0 | 128,2 | 31,6 | 31,9 | 56,5 | 141,9 | 108,2 | 152,9 |

3.6.2.- Diseño, síntesis y determinación estructural de los compuestos pertenecientes al grupo G.

En este apartado se describen los cuatro compuestos 96 - 99. Los tres últimos contienen las cabezas catiónicas descritas en el apartado anterior. El compuesto 96, que contiene la cabeza catiónica constituida por *N*-metilpiperidinio se ha incluido de forma aleatoria con el objeto de contrastar sus actividades biológicas con otros análogos. Los cuatro compuestos tienen en común el esqueleto de fenoxietilo y pueden sintetizarse a partir de 1-fenoxi-2-bromoetano.

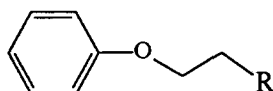
3.6.2.1.- Diseño de los compuestos 96 - 99.

Como se puede observar (Tabla 3.43), los compuestos 93 (FK40) y 92 (FK39) (Grupo F) muestran interesantísimas propiedades antiproliferativas frente a HT-29. En consecuencia,

parece lógico realizar algunas modificaciones moleculares sobre ellos e, incluso, considerarlos como *cabezas de serie* para el desarrollo de una nueva investigación. En esta Memoria se describe la modificación molecular que involucra un cambio isómero de grupo metileno por un átomo de oxígeno, dejando para posteriores investigaciones la consideración de los compuestos citados como cabezas de serie. De esta forma se pretende conseguir también un abaratamiento en los costes del producto y, al mismo tiempo, la inclusión de un heteroátomo puede permitir nuevas interacciones con otras dianas citosólicas.

Las estructuras de los compuestos de este grupo se muestran en la Tabla 3.37.

Tabla 3.37.- Estructura de los compuestos del grupo G.



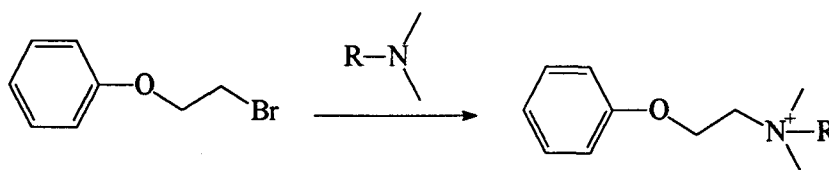
| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|---|-----------|---|
| 96 | | 98 | |
| 97 | | 99 | |

El compuesto 96 es un análogo de la colina que contiene un anillo piperidínico. Así, la cadena aminoetanólica ha sido sustituida por el citado anillo heterocíclico saturado.

El compuesto **97** también es un análogo rígido del sustrato de la enzima. Sobre las razones que se pueden esgrimir para la inclusión de dicha cabeza catiónica ya se ha escrito mucho en esta Memoria, situación que se vuelve a observar en los compuestos **98** y **99**.

3.6.2.2.- Síntesis de los compuestos del grupo G.

Como en los casos anteriores, la formación de estos compuestos involucra la formación de un compuesto de amonio o iminio cuaternario a partir de un halogenuro de alcoholo y una amina terciaria apropiada. En este caso, la síntesis se lleva a cabo por reacción entre 1-fenoxi-2-bromoetano y las aminas terciarias siguientes: *N*-metilpiperidina, 3-hidroxiquinuclidina, 4-(*N,N*-dimetil)piridina y 4-(1-pirrolidino)piridina (Esquema 3.17).



Esquema 3.17.- Síntesis general de los compuestos del grupo G.

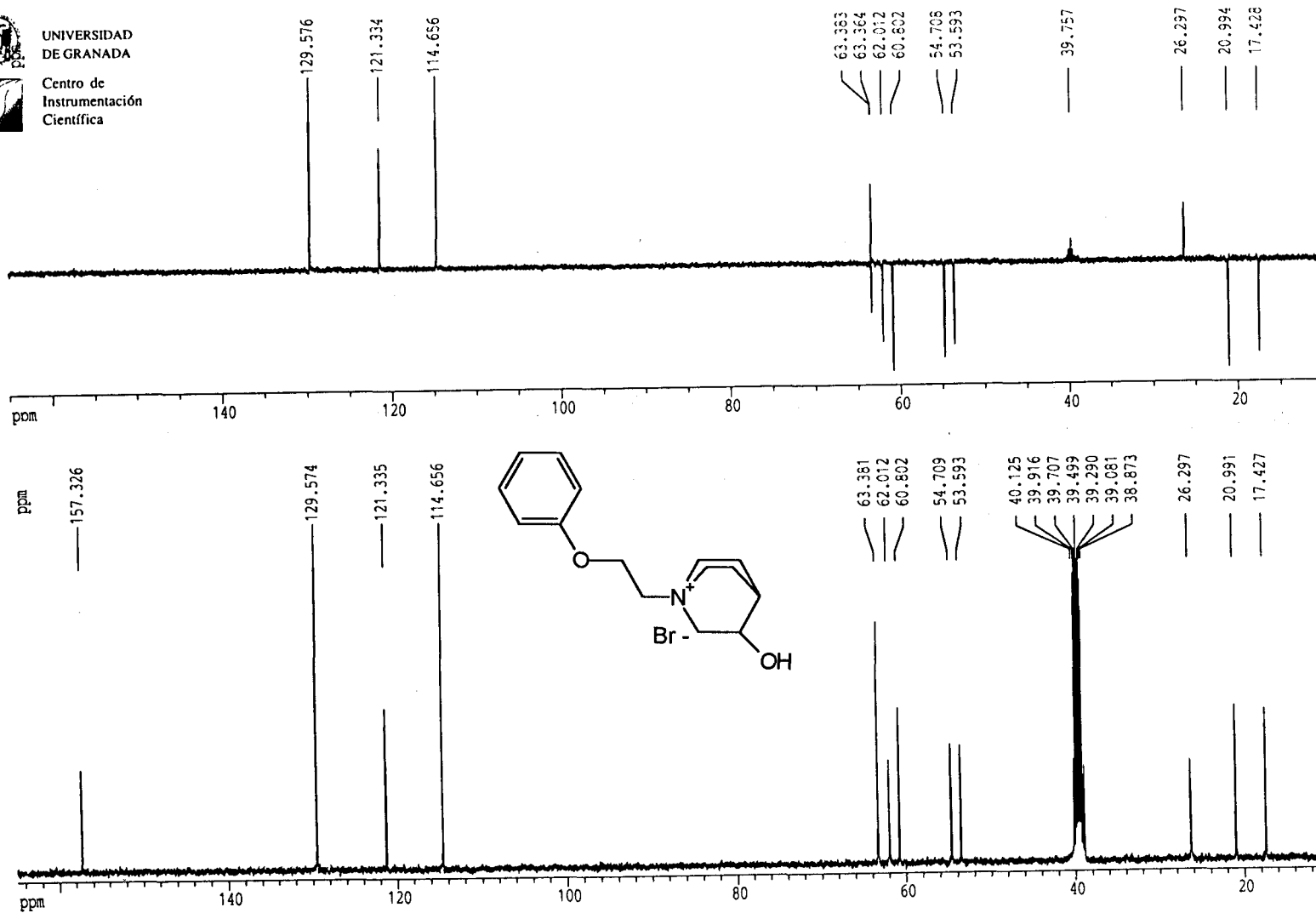
3.6.2.3.- Determinación estructural de los compuestos del grupo G.

En las Tablas 3.38 (¹H-RMN) y 3.39 (¹³C-RMN) se muestran resumidas las principales características espectroscópicas de los compuestos bajo estudio que, como puede ser visto, son completamente concordantes con las estructuras propuestas.

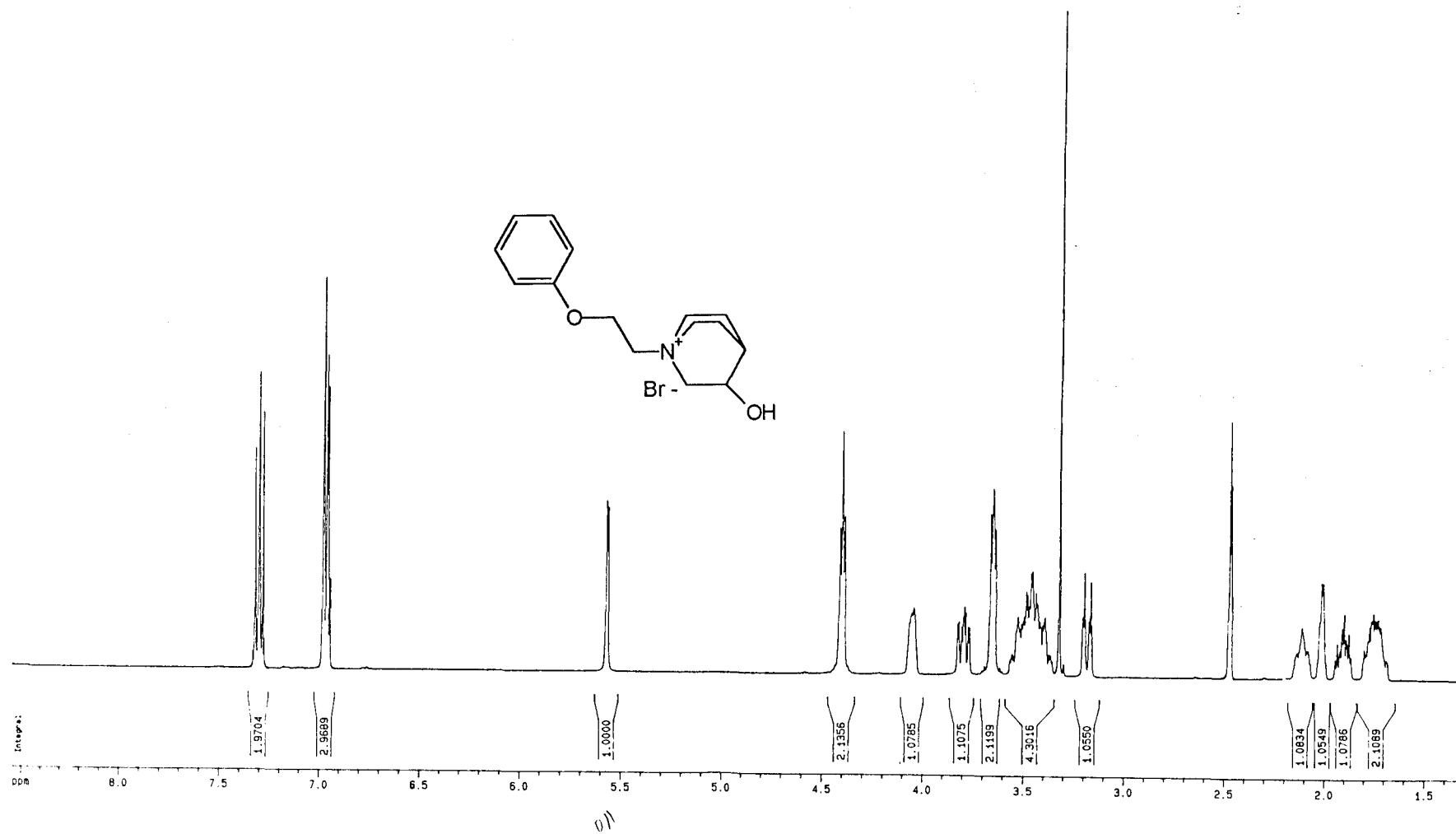


UNIVERSIDAD
DE GRANADA

Centro de
Instrumentación
Científica

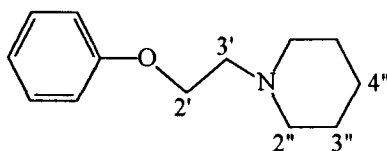


¹³C-RMN-20: Bromuro de 1-(fenoxtiel)-3-hidroxiquinuclidinio 97.



¹H-RMN-20: Bromuro de 1-(fenoxietil)-3-hidroxiquinuclidinio 97.

Tabla 3.38.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) de los compuestos 96- 99.



| Compuesto | H-2' | H-3' | H-2'' | H-3'' | H-4'' |
|-----------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|---------|
| 96 | 3,85, t <i>J</i> ; 4,75 | 4,46, t <i>J</i> ; 4,75 | 3,47, m | 1,82, m | 1,54, m |
| 97 | 3,65, t <i>J</i> ; 4,74 | 4,40, t <i>J</i> ; 4,64 | 3,80 (He), m 3,18 (Ha), m | 4,05, m | 2,11, m |
| 98 | 4,60, t <i>J</i> ; 4,80 | 4,30, t <i>J</i> ; 4,89 | 8,35, d <i>J</i> ; 7,63 | 7,05, d <i>J</i> ; 8,21 | |
| 99 | 4,33, t <i>J</i> ; 4,81 | 4,58, t <i>J</i> ; 5,02 | 8,34, d <i>J</i> ; 7,60 | 6,88, d <i>J</i> ; 7,56 | |

Tabla 3.39.- Desplazamientos químicos ^{13}C -RMN de los compuestos 96- 99.

| Comp | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-2' | C-3' | C-2'' | C-3'' | C-4'' |
|------|-------|-------|-------|-------|------|------|-------|-------|-------|
| 96 | 157,3 | 129,5 | 114,6 | 121,3 | 61,3 | 60,9 | 60,8 | 20,4 | 19,4 |
| 97 | 157,3 | 129,6 | 114,6 | 121,3 | 62,0 | 54,7 | 60,8 | 63,4 | 26,3 |
| 98 | 157,6 | 129,5 | 114,5 | 121,2 | 66,4 | 55,9 | 142,4 | 108,0 | 153,1 |
| 99 | 157,6 | 129,6 | 114,5 | 121,2 | 66,3 | 55,8 | 142,4 | 107,4 | 156,0 |

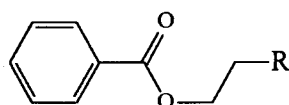
Las señales correspondientes a los átomos de carbono aromáticos del grupo fenilo aparecen entre 157,00 y 114,00 ppm y no se afectan por la naturaleza del heterociclo. El carbono C-2' que se encuentra junto al átomo de oxígeno está, lógicamente, más desapantallado cuando en la molécula coexisten dos anillos aromáticos.

3.6.3.- Diseño, síntesis, determinación estructural y valores de actividad de los compuestos pertenecientes al grupo H.

3.6.3.1.- Diseño y síntesis de los compuestos 100- 105.

Finalmente, se ha incluido también para su estudio algunos compuestos (Grupo H) en los que la principal novedad estructural consiste en unir la cabeza catiónica al anillo bencénico a través de un enlace lábil como es el formado por la agrupación éster.

Tabla 3.40.- Estructura de los compuestos del grupo H.

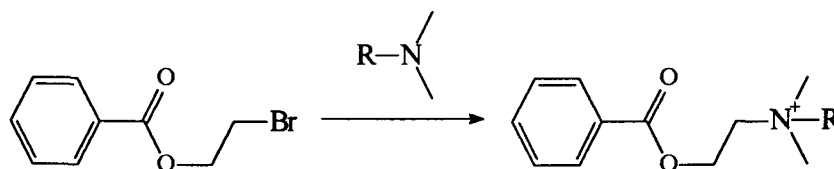


| Compuesto | R | Compuesto | R |
|-----------|---|-----------|---|
| 100 | | 103 | |
| 101 | | 104 | |
| 102 | | 105 | |

Aquí se describen los compuestos **100- 105** que tienen en común que pueden ser sintetizados a partir del 1-benzoxi-2-bromoetano. Las cabezas catiónicas de los seis compuestos aquí incluidos son las tres que se vienen estudiando sistemáticamente (3-hidroxiquinuclidinio, 4-(*N,N*-dimetilamino)piridinio y 4-(1-pirrolidino)piridinio) y otras tres que se han incluido de modo aleatorio. Las estructuras se muestran en la Tabla 3.40.

Resulta interesante destacar el compuesto **105**, que contiene como cabeza catiónica el grupo isoquinolinio. Su inclusión está relacionada con la gran actividad antiproliferativa desarrollada por el compuesto **60** (FK19, CI_{50} 2.25 μ M) y, al mismo tiempo, su buena actividad en el reconocimiento de la enzima *in vitro* (7.5 μ M). El resto de los compuestos responde a criterios ya sobradamente conocidos.

La síntesis de estos compuestos se ha llevado a cabo haciendo reaccionar 1-benzoxi-2-bromoetano con las aminas terciarias adecuadas, en forma análoga a lo descrito para los casos anteriormente citados (Esquema 3.18).

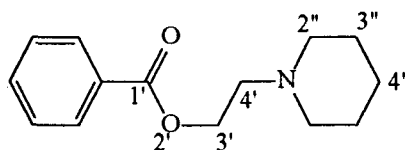


Esquema 3.18.- Síntesis general de los compuestos del grupo H.

3.6.3.2.- Determinación espectroscópico-estructural de los compuestos 100- 105.

Las estructuras de estos seis compuestos se han establecido, como en todos los casos anteriormente descritos, mediante análisis elemental y características espectroscópicas. En las Tablas 3.41 y 3.42 se describen las principales características en ¹H-RMN y ¹³C-RMN, respectivamente. En todos los casos estudiados los espectros y los valores analíticos son completamente concordantes con las estructuras propuestas y, por ello, no se discuten en este apartado.

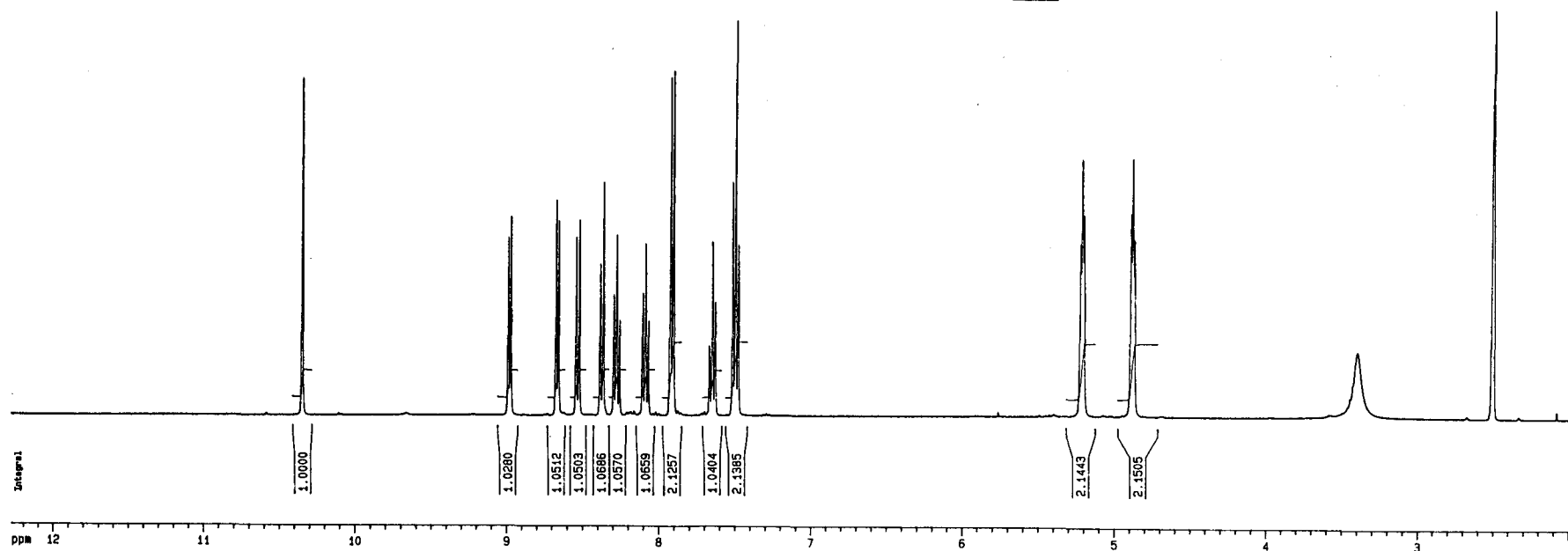
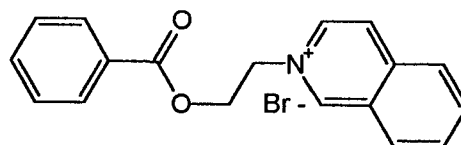
Tabla 3.41.- Desplazamientos químicos ^{13}C -RMN de los compuestos del grupo H.



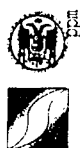
| Comp | C-2 | C-3 | C-4 | C-1' | C-3' | C-4' | C-2'' | C-3'' | C-4'' |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 100 | 133,6 | 128,8 | 129,3 | 165,1 | 58,50 | 65,57 | 62,78 | 54,85 | |
| 101 | 133,7 | 128,9 | 129,3 | 165,1 | 58,09 | 64,80 | 60,61 | 20,52 | 19,29 |
| 102 | 133,6 | 128,8 | 129,2 | 165,0 | 57,91 | 62,32 | 61,70 | 63,21 | 26,28 |
| 103 | 133,6 | 128,8 | 129,2 | 165,1 | 55,38 | 63,48 | 142,3 | 107,5 | 156,2 |
| 104 | 133,6 | 128,8 | 129,2 | 165,1 | 55,47 | 63,49 | 142,2 | 108,1 | 153,1 |
| 105 | 133,6 | 128,8 | 129,3 | 165,1 | 59,53 | 63,41 | 150,8 | 135,4 | 133,6 |

Tabla 3.42.- Desplazamientos químicos (δ , ppm) y constantes de acoplamiento de los compuestos del grupo H.

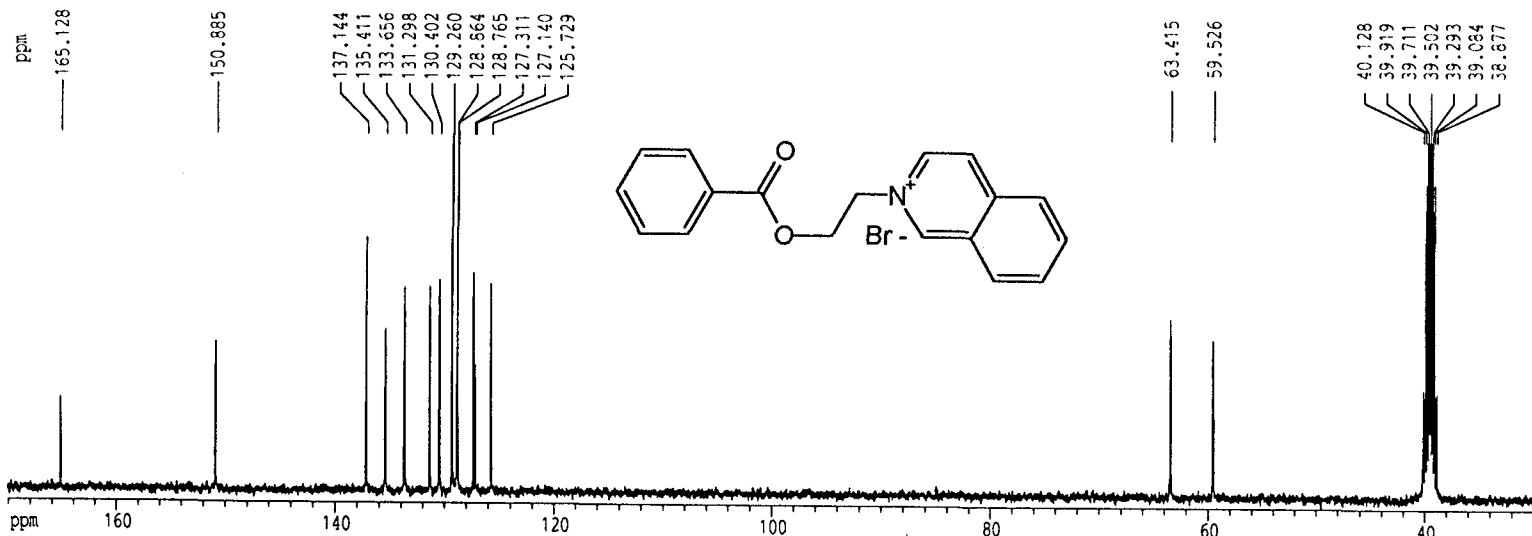
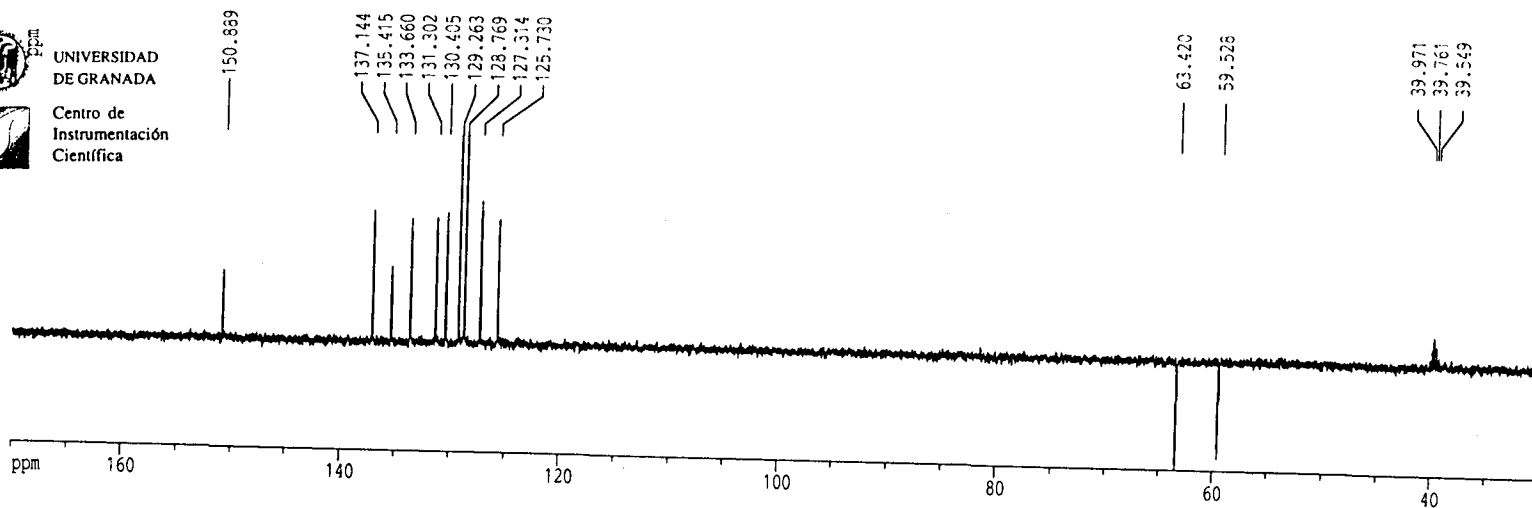
| Comp. | H-2 | H-3 | H-4 | H-3' | H-4' | H-2'' | H-3'' | H-4'' |
|-------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 100 | 8,01, d <i>J</i> ; 7,26 | 7,56, t <i>J</i> ; 7,63 | 7,70, t <i>J</i> ; 7,38 | 4,72, m | 3,90, m | 3,90, m | 3,59, t <i>J</i> ; 4,62 | |
| 101 | 7,99, d <i>J</i> ; 7,49 | 7,55, t <i>J</i> ; 7,67 | 7,69, t <i>J</i> ; 7,40 | 4,73, t <i>J</i> ; 4,28 | 3,89, t <i>J</i> ; 4,41 | 3,48, m | 1,83, m | 1,54, m |
| 102 | 8,01, d <i>J</i> ; 7,45 | 7,56, t <i>J</i> ; 7,65 | 7,69, t <i>J</i> ; 7,41 | 4,69, t <i>J</i> ; 4,12 | 3,73, t <i>J</i> ; 4,32 | 3,85 (He), m 3,59 (Ha), m | 4,08, m | 2,14, m |
| 103 | 7,93, d <i>J</i> ; 7,44 | 7,53, t <i>J</i> ; 7,67 | 7,67, t <i>J</i> ; 7,42 | 4,61, m | 4,61, m | 8,39, d <i>J</i> ; 7,47 | 6,91, d <i>J</i> ; 7,48 | |
| 104 | 7,93, d <i>J</i> ; 7,40 | 7,53, t <i>J</i> ; 7,68 | 7,67, t <i>J</i> ; 7,45 | 4,62, m | 4,62, m | 8,42, d <i>J</i> ; 7,61 | 7,07, d <i>J</i> ; 7,65 | |
| 105 | 7,92, d <i>J</i> ; 8,03 | 7,50, t <i>J</i> ; 7,68 | 7,65, t <i>J</i> ; 7,29 | 5,22, t <i>J</i> ; 4,61 | 4,88, t <i>J</i> ; 4,57 | 8,99, d <i>J</i> ; 6,82 | 8,67, d <i>J</i> ; 6,79 | 8,54, d <i>J</i> ; 8,32 |



$^1\text{H-RMN-21}$: Bromuro de 1-(benzoióxietil)isoquinolinio 105.



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Centro de Instrumentación Científica



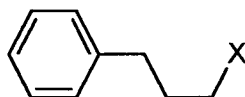
^{13}C -RMN-21: Bromuro de 1-(benzoiloxietil)isoquinolinio 105.

3.6.4.- Valores de las actividades biológicas de los compuestos pertenecientes a los grupos F-H.

En las Tablas 3.43, 3.44 y 3.45 se muestran tabulados los valores CI_{50} (μM) de la actividad inhibitoria de colina quinasa *ex vivo*, *in vitro* sobre células HT-29 y, finalmente, la actividad antiproliferativa frente a HT-29 de los compuestos pertenecientes a estos grupos.

El análisis de los valores de las diferentes actividades y la correlación estructura-actividad se discute en el apartado Discusión de resultados.

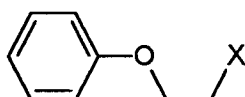
Tabla 3.43.- Valores de CI_{50} (μM) de la actividad inhibitoria de colina quinasa *ex vivo*, *in vitro* NIH3T3 e *in vitro* HT-29 y de la actividad antiproliferativa en HT-29 de los compuestos del grupo F.



| Comp | Siglas | X | <i>Ex vivo</i> ChoK ^a levadura | <i>In vitro</i> ChoK NIH3T3 ^a | <i>In vitro</i> ChoK HT-29 ^a | <i>Antiprolif.</i> HT-29 ^a |
|------|--------|---|---|--|---|--|
| 91 | FK38 | | >100 | | | >50 |
| 92 | FK39 | | | | >50 | 6.5 |
| 93 | FK40 | | | | >50 | 2.2 |

^aLos datos biológicos han sido obtenidos en el laboratorio del Dr. Lacal, IIB (Madrid). En general, los valores que aparecen a la derecha de cada columna expresan actividades interesantes.

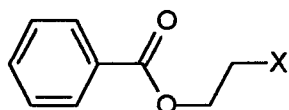
Tabla 3.44.- Valores de CI_{50} (μM) de la actividad inhibidora de colina quinasa *ex vivo*, *in vitro* NIH3T3 e *in vitro* HT-29 y de la actividad antiproliferativa en HT-29 de los compuestos del grupo G.



| Comp | Siglas | X | <i>Ex vivo</i> ChoK ^a levadura | <i>In vitro</i> ChoK NIH3T3 ^a | <i>In vitro</i> ChoK HT-29 ^a | <i>Antiprolif.</i> HT-29 ^a |
|------|--------|---|---|--|---|--|
| 96 | FK31 | | | | >50 | >50 |
| 97 | FK41 | | >100 | | | >50 |
| 98 | FK42 | | >100 | >100 | | 10.5 |
| 99 | FK43 | | | | >50 | 7.5 |

^aLos datos biológicos han sido obtenidos en el laboratorio del Dr. Lacal, IIB (Madrid). En general, los valores que aparecen a la derecha de cada columna expresan actividades interesantes.

Tabla 3.45.- Valores de CI_{50} (μM) de la actividad inhibidora de colina quinasa *ex vivo*, *in vitro* NIH3T3 e *in vitro* HT-29 y de la actividad antiproliferativa en HT-29 de los compuestos del grupo H.



| Comp | Siglas | X | <i>Ex vivo</i> ChoK ^a levadura | <i>In vitro</i> ChoK NIH3T3 ^a | <i>In vitro</i> ChoK HT-29 ^a | <i>Antiprolif.</i> HT-29 ^a |
|------|--------|---|---|--|---|--|
| 100 | FK66 | | | | | >50 |
| 101 | FK63 | | | | >50 | >50 |
| 102 | FK64 | | | | | >50 |
| 104 | FK67 | | | | | >50 |
| 103 | FK68 | | | | | >50 |
| 105 | FK65 | | | | | 55 |

^aLos datos biológicos han sido obtenidos en el laboratorio del Dr. Lacal, IIB (Madrid). En general, los valores que aparecen a la derecha de cada columna expresan actividades interesantes.

3.7.- Discusión de resultados.

3.7.1.- La enzima colina quinasa

La enzima colina quinasa humana (EC 2.7.1.32) es una proteína citoplasmática de 456 aminoácidos y 52.065 u.m.a de peso molecular. Su secuencia de aminoácidos, que ha sido determinada por Hosaka y cols¹²¹ en 1.992, es la representada en el Esquema 3.20.

Su función principal es regular la síntesis de fosfatidilcolina, uno de los fosfolípidos de membrana más importantes, debido a que cataliza la transformación de colina citosólica en fosforilcolina, un segundo mensajero putativo que, además de ser el paso inicial de la biosíntesis de fosfatidilcolina, muestra una intensa actividad mitogénica.

Mediante estudios de homología con otras enzimas obtenidas de diferentes fuentes se ha propuesto que el aminoácido Histidina 303 es el sitio activo de las diferentes colinas quininasas.

| | | | | |
|------------|------------|------------|------------|-------------|
| MKTKFCTGGE | AEPSPLGLLL | SCGSGSAAPA | PGVGQQRDAA | SDLESKQLAP |
| TAALALPPP | PLPLPLPLPQ | PPPPQPPADE | QPEPRARRRA | YLWCKEFLPG |
| AWRGLREDEF | HISVIRGGLS | NMLFQCCLPD | TTATLGDEPR | KVLLRLYGAI |
| LQMRSCNKEG | SEQAQKENEK | QGAEAMVLES | VMFAILAERS | LGPKLYGIFP |
| QGRLEQFIPS | RRLDTEELSL | PDISAEIAEK | MATFHGMKMP | FNKEPKWLFQ |
| TMEKYLKEVL | RIKFTEESRI | KKLHKLLSYN | LPLELENLRS | LLESTPSPVV |
| FCHNDCQEGN | ILLLEGRENS | EKQKLMLIDF | EYSSYNYRGF | DIGNHFCEWM |
| YDYSYEKYPF | FRANIRKYPT | KKQQLHFSS | YLPAFQNDFE | ONLSTEEKSII |
| KEEMLLEVNR | FALASHFLW | LWSIVQAKIS | SIEFGYMDYA | QARFDAYFHQ |
| KRKLGV | | | | |

Esquema 3.20.- Secuencia de la enzima colina quinasa en la que se muestra el aminoácido Histidina 303 como sitio activo.

Hasta el momento actual la enzima no ha sido cristalizada y, por lo tanto, su estructura tridimensional es desconocida. Por otro lado, la enzima tampoco ha sido modelizada por lo que no se ha propuesto ningún mecanismo para explicar su acción fosforilante.

3.7.2.- Relaciones estructura-actividad entre el prototipo HC-3 y sus derivados.

3.7.2.1.- Actividad inhibitoria *ex vivo* sobre colina quinasa de levaduras.

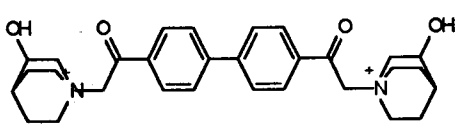
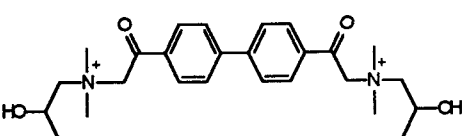
En las Tablas 3.11, 3.21, 3.25, 3.29, 3.33, 3.37, 3.41 y 3.45 se han resumido las diversas actividades de los compuestos aquí investigados. Las actividades se han expresado en forma de valores CI_{50} (μM) de sus diversas acciones sobre la enzima ChoK (inhibición *ex vivo* de la enzima procedente de levadura, inhibición *in vitro* de la enzima en fibroblastos de ratón NIH 3T3,

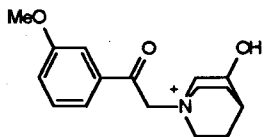
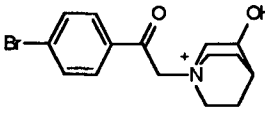
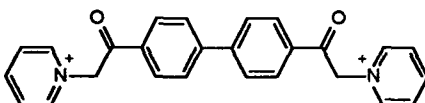
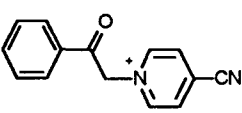
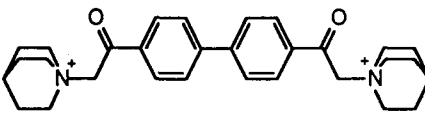
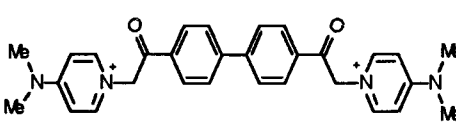
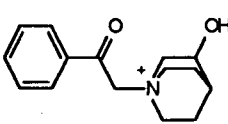
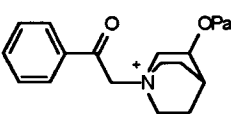
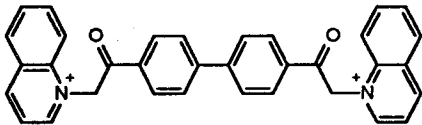
inhibición *in vitro* de colina quinasa en células humanas tipo HT-29) y, finalmente, de su actividad antiproliferativa frente a las mismas células tumorales humanas HT-29. Los compuestos se han agrupado en las familias A - H, de acuerdo con la materia prima de la que se parte para su síntesis. Esta forma de clasificar a los compuestos sintetizados permite estudiar la influencia de la naturaleza de la cabeza(s) catiónica(s) sobre los diferentes tipos de actividad biológica determinados ya que, dentro de cada grupo de compuestos, las variaciones estructurales afectan solamente a la naturaleza de la cabeza catiónica.

Tomando como base esta forma de organizar los resultados de la investigación, ha sido posible establecer algunas conclusiones sencillas sobre las correlaciones entre las estructuras de los compuestos sintetizados y las actividades desarrolladas por éstos, tal y como se describe a continuación.

En la Tabla 3.46 se muestran los valores CI_{50} para las actividades inhibitorias *ex vivo* e *in vitro* y actividad antiproliferativa de los compuestos más significativos, que aparecen ordenados según actividad ChoK *ex vivo* creciente.

Tabla 3.46.- Actividades inhibitorias *ex vivo* e *in vitro* y actividad antiproliferativa de los compuestos más significativos ordenados según actividad ChoK *ex vivo* creciente.

| Comp | Siglas | Tipo | Estructura* | ChoK <i>ex vivo</i> NIH3T3 | ChoK <i>in vitro</i> HT-29 | Antiprol HT-29 |
|------|--------|------|--|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| 56 | FK21 | A |  | 0.5 | >50 (>100) ^b | >50 |
| 41 | FK23 | A |  | 3.5 | (70) ^b | |

| Continúa Tabla 3.46 | | | | | | |
|---------------------|--------|------|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Comp | Siglas | Tipo | Estructura ^a | ChoK <i>ex vivo</i> NIH3T3 | ChoK <i>in vitro</i> HT-29 | <i>Antiprolif</i> HT-29 |
| 84 | FK25 | D |  | 10 | (>100) ^b | >100 |
| 88 | FK44 | E |  | 10 | >50 | >50 |
| 54 | FK7 | A |  | 13 | 22 (55) ^b | 5-20 |
| 71 | FK55 | B |  | 15 | >50 | >50 |
| 55 | FK22 | A |  | 30 | (80) ^b | |
| 58 | FK3 | A |  | 40 | 5 | 5.5 |
| 66 | FK26 | B |  | 45 | (>100) ^b | >200 |
| 67 | FK29 | B |  | 55 | 20 | 25-40 |
| 59 | FK13 | A |  | 70 | | |

| Continúa Tabla 3.46 | | | | | | |
|---------------------|--------------|------|-------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Comp | Siglas | Tipo | Estructura ^a | ChoK <i>ex vivo</i> NIH3T3 | ChoK <i>in vitro</i> HT-29 | <i>Antiprolif</i> HT-29 |
| 31 | FK12 | A | | 100 | | |
| 33d | FK6 | A | | 100 | | >50 |
| 1 | FK14 HC-3 | A | | 500 | (600) ^b | 2.500 |

^aLos contraiones son siempre Br⁻; ^bActividad inhibitoria de colina quinasa determinada en células NIH 3T3.

Un primer análisis rápido de las estructuras de los quince compuestos más activos frente a ChoK *ex vivo* conduce a la observación de que todos ellos son derivados del hemicolinio HC-3 o de su estructura “mitad” HC-15. Es decir, todos los compuestos que reconocen bien a la enzima colina quinasa *ex vivo* contienen la agrupación arilcarbonilmetil unida a diversas cabezas catiónicas. No son, en absoluto activos frente a la enzima, bajo estas condiciones experimentales, ninguno de los compuestos pertenecientes a los grupos C, F, G y H en los que el grupo arilcarbonilmetil se ha sustituido por ariletil, arilpropil, ariloxietil y benzoxietil, respectivamente.

Por otro lado, y aunque los tres compuestos más activos pertenecen al grupo A, es decir, contienen dos cabezas catiónicas, no parece que la existencia de las dos cabezas catiónicas sea un determinante para la actividad, ya que los compuestos 84 (Grupo D), 88 (Grupo E) y 71 (Grupo B) contienen solamente una cabeza polar y muestran actividades bastante importantes como inhibidores de colina quinasa. Este es un resultado que, aunque no obvio, puede parecer bastante lógico si se considera que el ligando natural de la enzima, la colina, contiene sólo una cabeza

catiónica. En consecuencia, uno de los objetivos principales de esta investigación es encontrar fármacos que presenten mayor afinidad química por la enzima que el propio ligando natural, la colina.

Si se comparan los valores CI_{50} encontrados para el prototipo **1** (500 μM ; HC-3, FK14) y para los compuestos **56** (0.5 μM ; FK21, 1.000 veces más activo que **1**), **41** (3.5 μM ; FK23, 143 veces más activo que **1**), **30** (7 μM ; FK8, 71 veces más activo que **1**), **54** (13 μM ; FK7, 38 veces más activo que el prototipo), **55** (30 μM ; FK22, 17 veces más activo que **1**) y **58** (40 μM ; FK3, 12,5 veces más activo que el prototipo), se llega a la conclusión obligada de que la presencia del grupo hidroxilo no es necesaria para que se desarrollen procesos de reconocimiento molecular entre la enzima y sus ligandos (véase compuestos **30**, **54**, **55** y **58**, que son más potentes que el propio prototipo) pero su presencia, sobre todo en determinadas estructuras, incrementa notablemente el citado poder de reconocimiento molecular (véase compuestos **56** y **41**). Un hipotético y probable mecanismo de la actividad fosforilante de la enzima podría ser el siguiente:

La enzima colina quinasa podría fijar a su ligando natural, la colina, en base a una fuerte interacción ion-ion (grupo trimetilalquilamonio de la colina y un aminoácido ácido que se encuentre cercano al sitio catalítico de la enzima) y completar el proceso de reconocimiento a través de la interacción entre el grupo hidroxilo de la colina y un aminoácido aceptor de protones, la Histidina 303, único aminoácido que se mantiene en todas las colinas quinastas de origen diferente. Finalmente, en el reconocimiento molecular de otros ligandos sintéticos, además de la interacción electrostática ion-ion y/o de la interacción con la histidina, pueden intervenir otras fuerzas debidas a interacciones con el resto de las moléculas (interacciones π - π entre anillos aromáticos, interacciones ion-ion entre la segunda cabeza catiónica y grupos carboxilatos de aminoácidos ácidos, etc).

En la Figura 3.1 se muestra gráficamente el hipotético proceso de reconocimiento molecular propuesto.

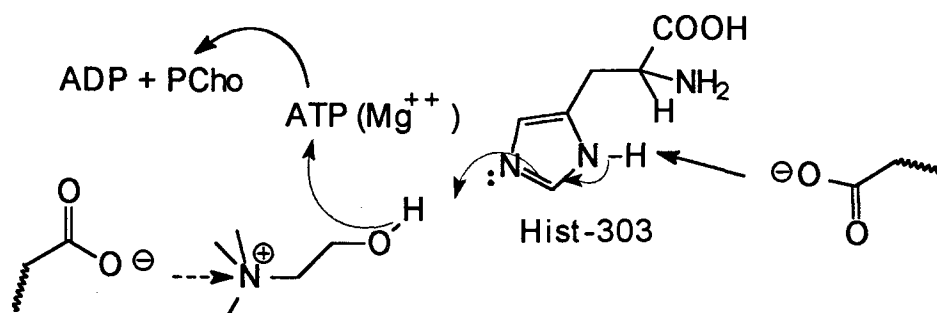


Figura 3.1.- Mecanismo propuesto para la fosforilación del ligando natural de colina quinasa.

Sobre la base de este hipotético mecanismo de reconocimiento molecular y de fosforilación de la molécula de colina, el sustrato natural de la enzima colina quinasa, se podría también explicar el proceso de reconocimiento molecular entre la enzima y sus inhibidores sintéticos, es decir, el mecanismo de inhibición competitiva de la enzima.

La estabilización del complejo ligando-enzima debe estar controlado por las siguientes interacciones:

1.- Interacción ion - ion debida a la proximidad de algún resto carboxilato. Esta interacción debe ser bastante fuerte y podría ser importante en el reconocimiento de compuestos tales como 30 (FK8), 54 (FK7) y 71 (FK55), entre otros.

2.- Interacción debida al enlace de hidrógeno entre grupo hidroxilo y el átomo de nitrógeno N-3 de la histidina. La basicidad del átomo N-3 de la histidina debe aumentar si otro grupo carboxilato arranca el protón del átomo N-1 histidínico. Este tipo de interacción, que sólo será posible en compuestos hidroxilados, en principio, debe ser responsable del proceso de fosforilación de la colina, que debe llevarse a cabo sólo si el complejo ATP/Mg⁺⁺ se encuentra ligado a la proteína en la cercanía del sitio catalítico.

3.- Podrán existir otros tipos de interacciones. Así, los compuestos con dos cabezas catiónicas deberán ser estabilizados adicionalmente a través de nuevas interacciones ion - ion. Asimismo, los restos aromáticos probablemente se estabilizarán mediante interacciones con otros restos aromáticos de la enzima (fenilalaninas, por ejemplo).

4.- Posiblemente, la interacción ion - ion pueda ser suficiente para mantener unidas a la enzima y a sus inhibidores; sin embargo, parece lógico asumir también que a través de otras interacciones adicionales se podrá conseguir un mejor acoplamiento entre los compuestos y, como consecuencia, una mayor actividad inhibitoria.

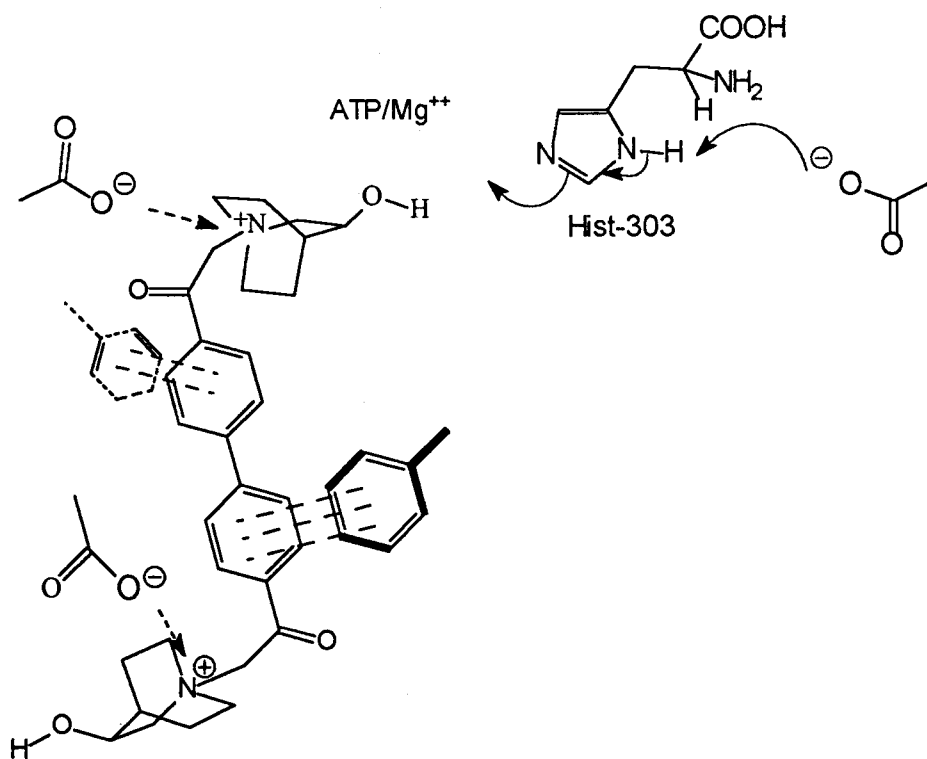


Figura 3.2.- Mecanismo hipotético de inhibición de la enzima colina quinasa por el compuesto 56 (FK21).

Así, el compuesto **56** podría ocupar exactamente el sitio de la colina y, además, completar el proceso de reconocimiento molecular en base a interacciones entre la enzima y el resto de la molécula que contiene, entre otros, una nueva cabeza catiónica y dos anillos aromáticos. Las diferencias de actividad *ex vivo* encontrada entre los compuestos **56** y **1** pueden, por lo tanto, ser interpretadas adecuadamente a través de este modelo.

En la figura 3.2 se muestra un hipotético modelo para el reconocimiento molecular entre enzima y el compuesto **56**.

El mecanismo propuesto permite justificar adecuadamente el reconocimiento químico y la afinidad entre la enzima y la colina, su ligando natural. Asimismo, también resulta adecuado para justificar la mayor afinidad del compuesto **56** por la enzima. No obstante, el modelo también tiene que interpretar otras correlaciones estructura-actividad encontradas, entre las que merecen destacarse las siguientes:

1) Los compuestos **80** (FK61, grupo C), **91** (FK38, grupo F), **97** (FK41, grupo G) y **102** (FK64, grupo H) no inhiben a la enzima *ex vivo*, a pesar de contener la misma cabeza catiónica (grupo 3-hidroxiquinuclidinio).

2) El hemicolinio **1** (FK14, HC-3) y su "molécula mitad" **5** (FK35, HC-15) muestran actividades bajísimas frente a la enzima colina quinasa *ex vivo* si se comparan con la desarrollada por el compuesto **56** (FK21).

3) El compuesto **41**, homólogo metilado del hemicolinio resulta, sin embargo, altamente afin a la enzima colina quinasa *ex vivo*, sin embargo, su "molécula mitad", **61** (FK34) no es activa.

Algunas de estas cuestiones pueden ser adecuadamente justificadas si se lleva a cabo el análisis conformacional de los compuestos involucrados.

3.7.2.2.- Análisis conformacional de diversos inhibidores de colina quinasa

El análisis conformacional de los compuestos **66** (FK26, Grupo B, $CI_{50} = 45\mu M$), que se considera activo, **80** (FK61, grupo C, $CI_{50} > 50\mu M$), **91** (FK38, grupo F, $CI_{50} > 100\mu M$), **97** (FK41, grupo G, $CI_{50} > 100\mu M$), que se pueden considerar como inactivos se ha realizado mediante el campo de fuerzas de TRIPOS¹²² implementado en el programa SYBYL¹²³, empleando las cargas generadas por el método de Gasteiger-Hückel^{124a-c}, y utilizando el método Powell para optimizar las diferentes estructuras. El análisis conformacional de los dos compuestos de estas familias dotados de mayor actividad (**84**, FK25, Grupo D, $CI_{50} = 10\mu M$, y **88**, FK44, Grupo E, $CI_{50} = 10\mu M$) no se han realizado porque pertenecen conformacionalmente a la misma familia del compuesto considerado activo y sólo se diferencian de él en la naturaleza de los sustituyentes sobre el anillo bencénico.

La conformación más estable se ha buscado mediante la utilidad GRIDSEARCH de Sybyl. Para ello se han girado todos los enlaces sencillos situados entre el resto de quinuclidina y el anillo bencénico a intervalos de 30° generándose $(360/30)^3$ conformaciones para los compuestos **66** y **80** y $(360/30)^4$ conformaciones para los compuestos **91** y **97**. Una vez eliminadas las restricciones de los ángulos torsionales se ha procedido a la minimización completa de dichas conformaciones obteniéndose los conformeros de mínima energía de cada molécula cuyas energías relativas son:

66: 20.649 Kcal/mol

80: 26.439 Kcal/mol

81: 25.438 Kcal/mol

97: 21.067 Kcal/mol

La Figura 3.3 (a y b) muestra dos visiones diferentes de la superposición de los conformeros más estables de los cuatro compuestos (en violeta, el compuesto activo **66**; en verde, el compuesto **80**; en azul, el compuesto **81** y, en rojo, el compuesto **97**). En la superposición se han hecho coincidir los restos de quinuclidina, presentes en todos los compuestos estudiados, y se ha comparado el sitio que ocupa el anillo bencénico.

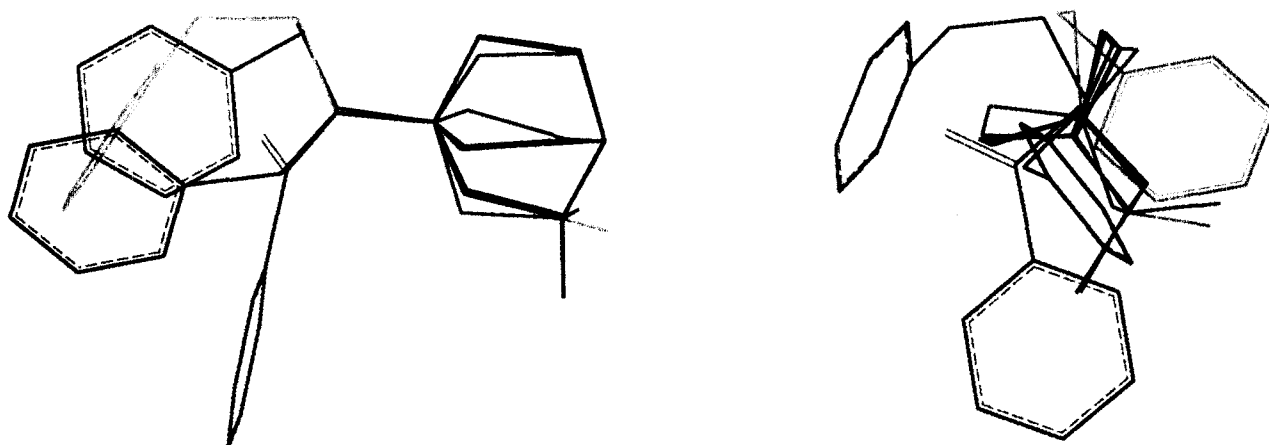


Figura 3.3.- Superposición de las conformaciones más estables de los compuestos 64 (violeta), 80 (verde), 81 (azul) y 97 (rojo). a) Proyección lateral (izquierda). b) Proyección frontal (derecha).

Como puede ser visto, existen diferencias significativas en la disposición espacial de los átomos entre el compuesto activo y los no activos. Así, la presencia del grupo carbonilo obliga a las moléculas que lo llevan a adoptar conformaciones más cerradas, entendiéndose por ello que existe un ángulo de torsión entre los anillos quinuclidínico y bencénico en torno a los 90° , mientras que en los compuestos inactivos, desprovistos de grupo carbonilo, las conformaciones preferentes son más estiradas y, en consecuencia, el ángulo de torsión entre los dos anillos se acerca notablemente a los 180° .

Una vez identificadas las conformaciones más estables y vista la superposición entre ellas, se ha procedido al estudio de las regiones espaciales ocupadas por el grupo fenilo en cada una de las cuatro moléculas, empleando para ello la metodología SEARCH de Sybyl. Los enlaces antes mencionados ha sido girados a intervalos de 10° , calculándose la energía de cada una de las conformaciones resultantes. Las conformaciones no viables, debido a repulsiones intramoleculares de Van der Waals, se han eliminado empleando un coeficiente de "bump" de 0.95. Por último, los mapas de puntos se han generado mediante la utilidad Sweep de Sybyl, empleando un intervalo de 5 Kcal/mol en las conformaciones consideradas. Los resultados se muestran en las figuras 3.4, 3.5 y 3.6. Los puntos que aparecen en las figuras antes citadas representan la posición espacial ocupada por el átomo de carbono del anillo bencénico situado en la posición *para* respecto a la cadena carbonada de la molécula.

La Figura 3.4 representa, desde los puntos de vista frontal y lateral, la distribución espacial comparada del grupo fenilo en los compuestos **66** (activo, violeta) y **80** (inactivo, verde). Se puede observar cómo en el mapa de puntos del primer compuesto (activo, violeta) existen tres regiones espaciales bien definidas que corresponde a conformaciones "dobladas" de la molécula, mientras que, en el segundo compuesto, existe una mayor densidad de puntos situada entre las tres áreas ocupadas por el compuesto **66**, que pertenecen a conformaciones más "extendidas" del compuesto **80**.

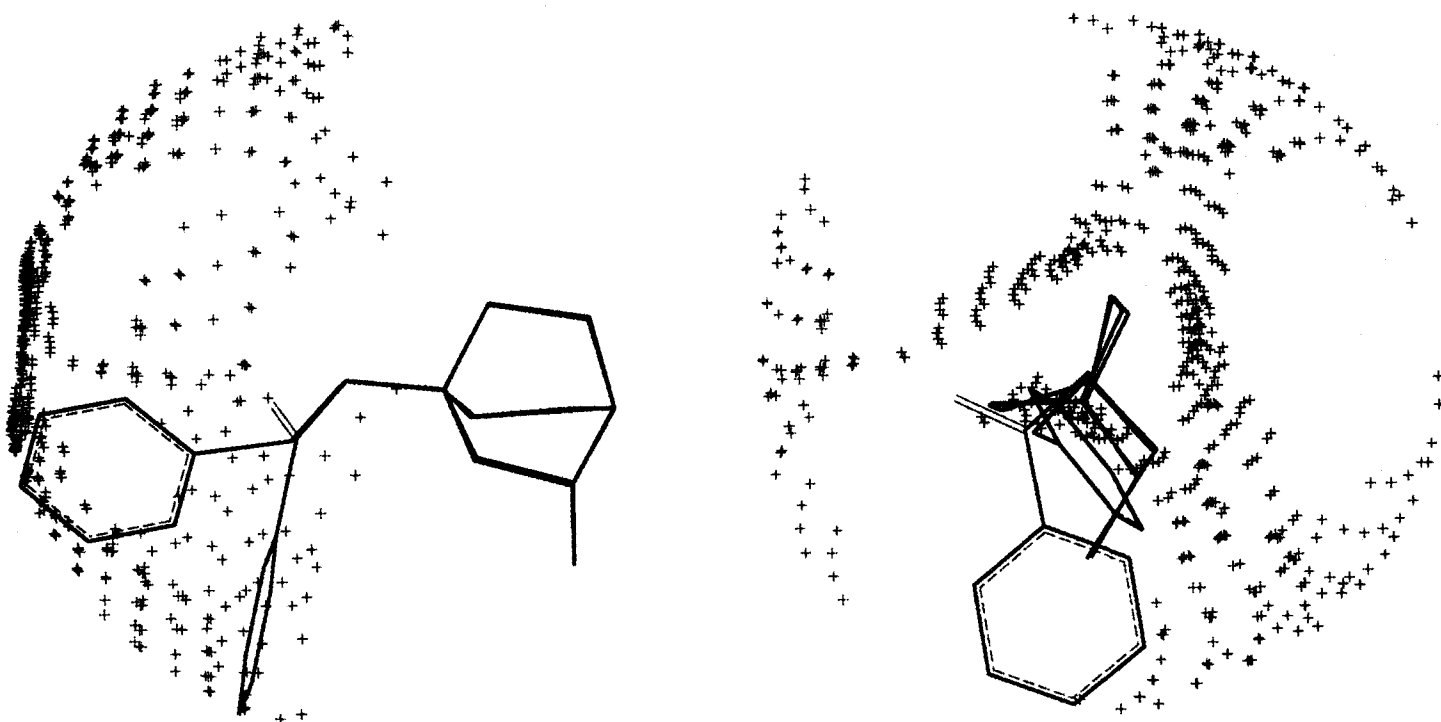


Figura 3.4.- Mapa de puntos representando la distribución espacial del carbono terminal del grupo fenilo de los compuestos 66 (violeta) y 80 (verde). a) Proyección lateral (izquierda). b) Proyección frontal (derecha).

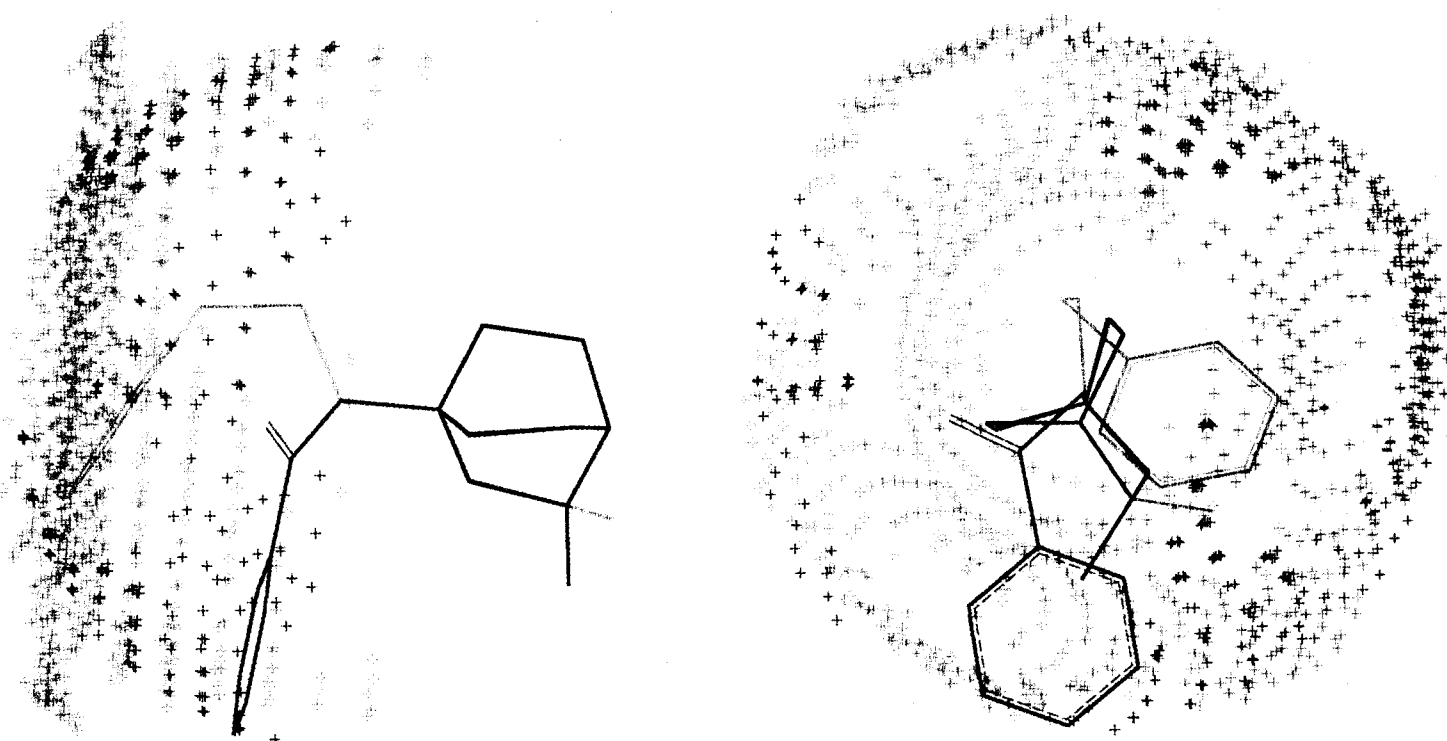


Figura 3.5.- Mapa de puntos representando la distribución espacial del carbono terminal del grupo fenilo de los compuestos 66 (violeta) y 81 (azul). a) Proyección lateral (izquierda). b) Proyección frontal (derecha).

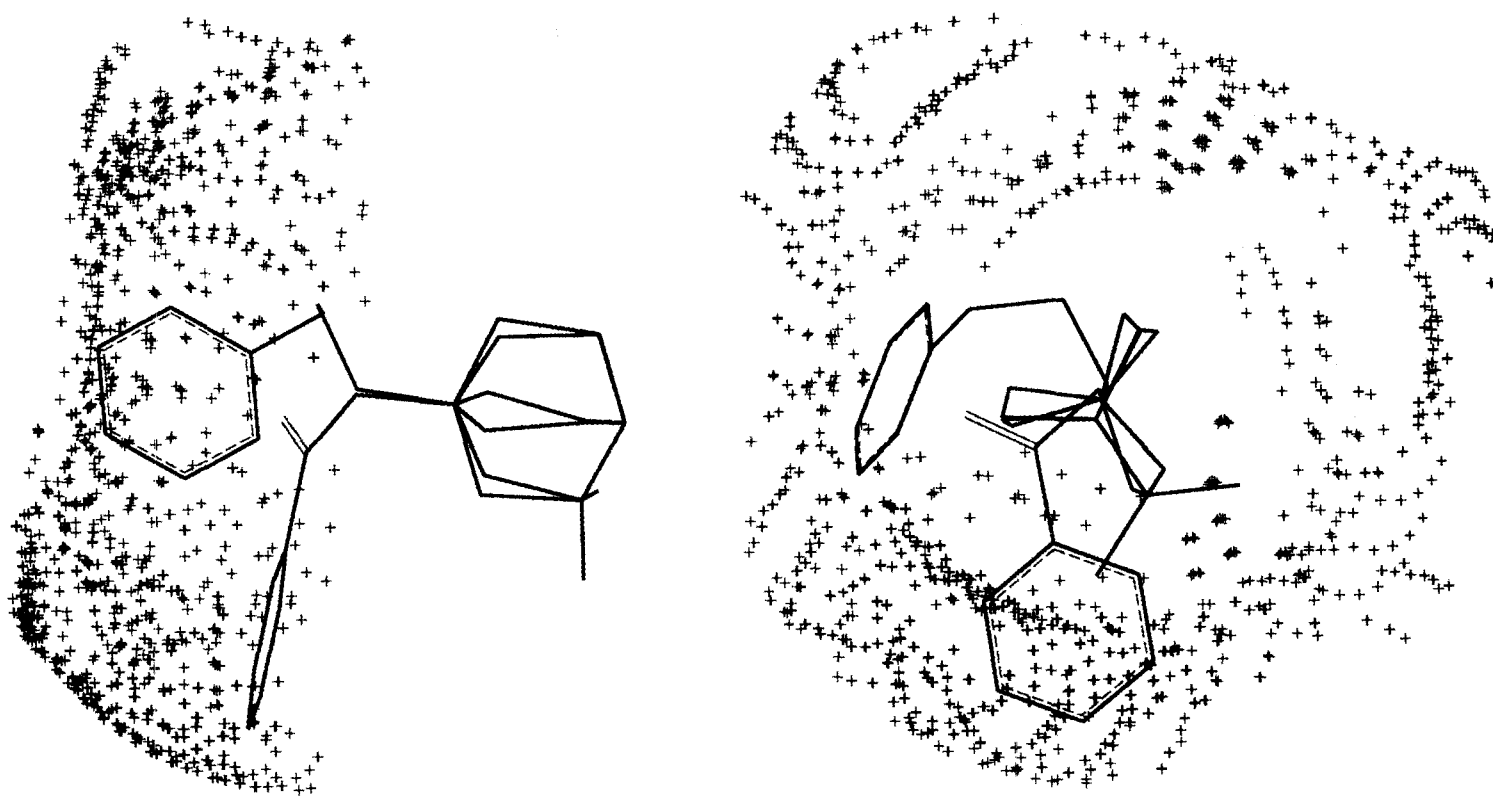


Figura 3.6.- Mapa de puntos representando la distribución espacial del carbono terminal del grupo fenilo de los compuestos 66 (violeta) y 97 (rojo). a) Proyección lateral (izquierda). b) Proyección frontal (derecha).

La Figura 3.5 representa las visiones frontal y lateral de los mapas de puntos comparados de los compuestos **66** (activo, violeta) y **81** (inactivo, azul). La visión lateral permite observar cómo el grupo fenilo en el compuesto inactivo se extiende más allá de las regiones de puntos del compuesto activo.

Finalmente, la Figura 3.6 representa los mapas de puntos de los compuestos **66** (activo, violeta) y **97** (inactivo, rojo), que es muy similar a la descrita anteriormente: el grupo fenilo se extiende más allá de las regiones ocupadas por él en el compuesto activo.

El análisis conformacional realizado para los compuestos **1** (HC-3) y **41** (FK23) utilizando el mismo método descrito anteriormente muestra que, tanto el fragmento $N^+-CH_2-CH_2-OH$ como el $N^+-CH_2-CH(Me)-OH$ muestran preferencias conformacionales en las que los átomos de nitrógeno y oxígeno se sitúan en disposiciones oblicuas, tal y como se representa en la figura 3.7.

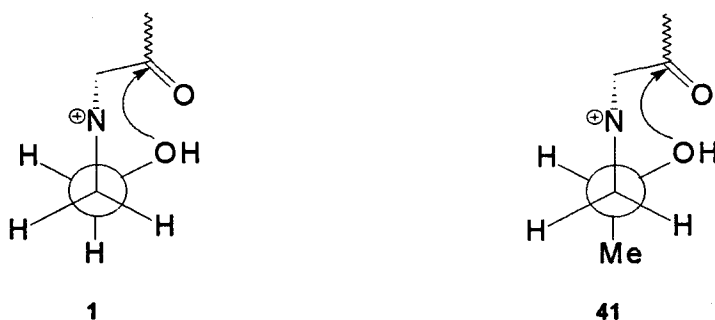


Figura 3.7.- Disposiciones espaciales preferentes de los fragmentos representados en las moléculas 1 y 41.

Como puede ser visto, los dos compuestos **1** y **41** tienden a adoptar sendas disposiciones oblicuas entre el grupo hidroxilo y el átomo de nitrógeno positivo. Este hecho podría interpretar la menor actividad inhibitoria frente a colina quinasa del compuesto **1** cuando se la compara con el derivado quinuclidínico **56**, que no puede adoptar dicha conformación. Sin embargo, ¿por qué el compuesto **41**, que adopta fácilmente la citada disposición oblicua, es muchísimo más activo que el prototipo **1**?

En efecto, parece poco razonable admitir que la presencia de dos grupos metilos (**41**) incremente, por razones estrictamente de interacciones de naturaleza hidrofóbicas, en 142 veces la actividad del prototipo **1** mientras que dos grupos quinuclidinios lo haga sólo 7 veces más.

Si el reconocimiento molecular enzima-ligando se llevase a cabo a través de la conformación antiperiplanar de los grupos nitrógeno cuaternario y grupo hidroxilo, el prototipo deberá modificar su conformación preferente para acoplarse a la enzima, lo que significará una energía libre conformacional apreciable del ligando. Una situación análoga se puede presentar en el compuesto **41**, ya que el grupo metilo adicional provoca una mayor tendencia del compuesto a adoptar conformaciones oblicuas como preferentes. Sin embargo, el compuesto **56** sólo puede existir en la conformación estirada. Sin embargo, los dos compuestos **1** y **41** muestran estabilidades análogas y, en consecuencia, la energía libre conformacional de los dos ligandos debe ser aproximadamente la misma.

Parece necesario introducir el factor estructural para interpretar la diferencia de actividad entre los dos derivados estudiados.

Una interpretación tentativa podría estar relacionada con la estabilidad de las formas cicloetálicas derivadas de los compuestos **1** y **41** (figura 3.8).

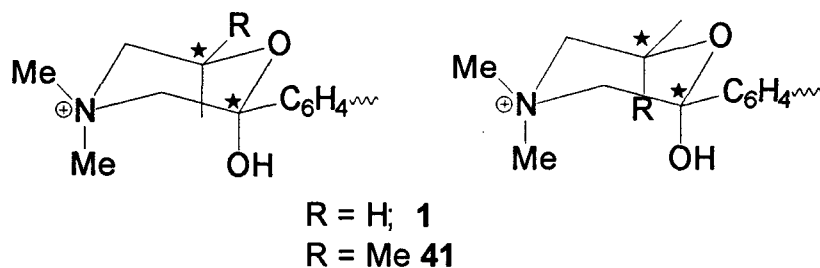
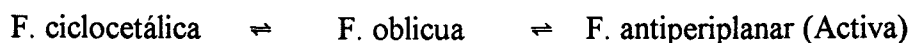


Figura 3.8.- Algunas formas ciclohexánicas de los compuestos **1** y **41**.

De acuerdo con esta hipótesis, la presencia de un grupo metilo adicional (racemato) en el compuesto **41** puede provocar una mayor inestabilidad termodinámica de su forma ciclohexánica al compararla con la del compuesto prototipo **1**. Así, podría ser más fácil revertir el equilibrio

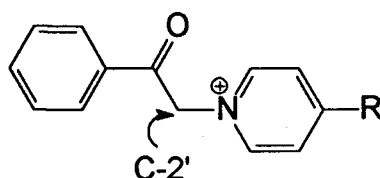


y adoptar la estructura correspondiente a la forma activa.

Esta hipótesis es sólo tentativa y, por lo tanto, no definitiva.

3.7.2.3.- Actividad inhibitoria de colina quinasa *ex vivo*. Correlaciones cuantitativas estructura actividad.

Dentro del grupo B se pueden caracterizar una serie de compuestos que responden a la fórmula general en la que R toma diversos valores (H, COMe, NH₂, etc.). Por otro lado, se ha



descrito anteriormente que existe una dependencia entre la naturaleza química del grupo R y el desplazamiento químico ^{13}C -RMN del átomo de carbono C-2', que depende fundamentalmente de las características electrónicas del grupo R. Así, podría resultar interesante correlacionar una propiedad estrictamente biológica, como el valor CI_{50} (μM) para la inhibición *ex vivo* de la enzima colina quinasa, y una propiedad de tipo estructural, como el valor de desplazamiento químico ^{13}C -RMN.

La actividad inhibitoria *ex vivo* de la enzima no depende de factores típicamente biológicos, puesto que la enzima se encuentra aislada y los compuestos no deben atravesar membranas citosólicas ni barreras biológicas de ningún tipo. El proceso depende solamente del reconocimiento molecular entre la enzima y sus ligandos.

En la Tabla 3.47 se muestran los valores de los desplazamientos químicos y de las actividades biológicas determinadas para los compuestos 68 - 75. Se ha excluido del cálculo al compuesto 76 ($\text{R} = -\text{OH}$) porque, como ya se mencionó previamente, las sales de 4-hidroxipiridinio adoptan esencialmente la estructuras de 4-oxo-dihidropiridinas.

Tabla 3.47.- Correlación entre la estructura química y la actividad inhibitoria de colina quinasa *ex vivo* de sales de 1-fenilcarbonilmetilpiridinio 4-sustituidas.

| Compuesto | Siglas | R | CI_{50} (μM) | $\log \text{CI}_{50}$ | $\Delta\delta_{\text{c-2}'}$ |
|-----------|--------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| 68 | FK56 | -H | 310 | 2.4914 | 0 |
| 69 | FK51 | -COMe | 260 | 2.4150 | -0.24 |
| 70 | FK57 | -CHNOH | 90 | 1.9542 | 0.49 |
| 71 | FK55 | -CN | 1300 | 3.1139 | -0.85 |
| 72 | FK50 | $-\text{CH}_2\text{OH}$ | 100 | 2.0000 | 0.67 |
| 73 | FK54 | $-\text{NH}_2$ | 25 | 1.3979 | 3.60 |
| 74 | FK33 | $-\text{NMe}_2$ | 10 | 1.0000 | 3.88 |
| 75 | FK53 | -Pirrolidino | 12 | 1.0792 | 3.86 |

Con estos datos se ha intentado ver si se encuentran correlacionados a través de una ecuación tipo

$$\log CI_{50} = k \cdot \delta + k'$$

El análisis de regresión lineal de los datos arroja la siguiente ecuación

$$\log CI_{50} = -0.3518 \delta + 2.4332$$

que muestra un coeficiente de correlación r de 0.9531 y un valor de r^2 de 0.9084 que, como puede ser visto, muestra una excelente correlación lineal entre los parámetros estudiados.

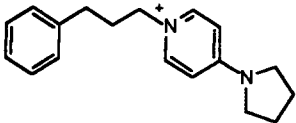
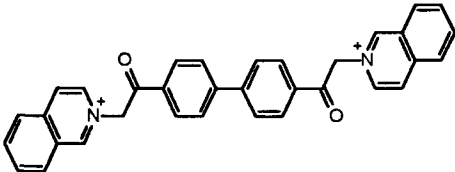
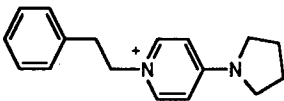
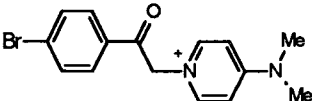
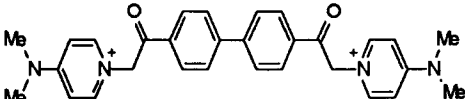
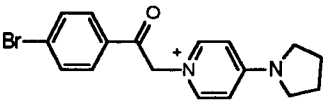
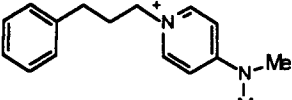
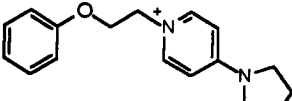
Un primer análisis de esta correlación permite sugerir que, al menos en este grupo de inhibidores de colina quinasa, la actividad inhibidora depende de los mismos parámetros electrónicos que los que afectan al valor de desplazamiento químico, de tal forma que, podría ser utilizada para predecir si el compuesto será o no activo simplemente constatando el valor de desplazamiento químico del átomo C-2'.

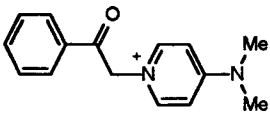
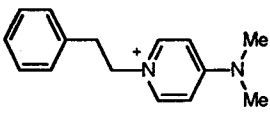
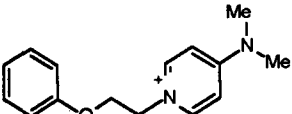
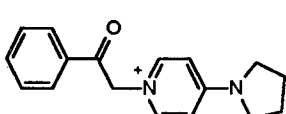
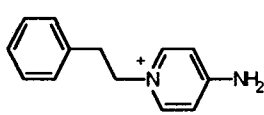
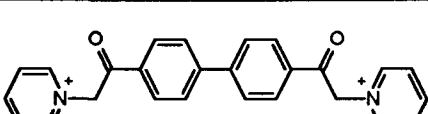
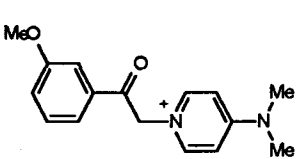
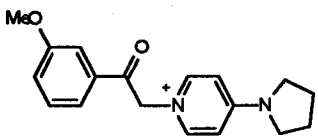
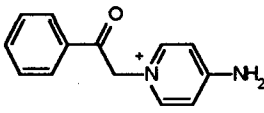
Por otro lado, los mayores valores de actividad biológica están correlacionados linealmente con la presencia de sustituyentes electrón-donantes en la posición 4 del anillo de piridinio.

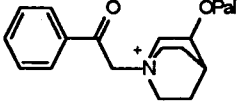
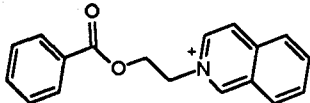
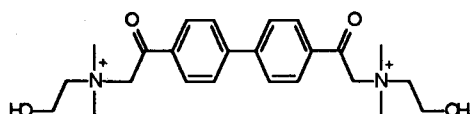
3.7.3.- Correlación entre la estructura y la actividad antiproliferativa frente a la línea tumoral humana HT-29

En la Tabla 3.48 se muestran las actividades desarrolladas por algunos de los compuestos aquí estudiados, que se encuentran ordenados según sus actividades antiproliferativas crecientes.

Tabla 3.48.- Actividades inhibitorias *ex vivo* e *in vitro* y actividad antiproliferativa de los compuestos más significativos ordenados según actividad antiproliferativa creciente.

| Comp | Siglas | Tipo | Estructura ^a | ChoK <i>ex vivo</i> NIH3T3 | ChoK <i>in vitro</i> HT-29 | Antiprol HT-29 |
|------|--------|------|---|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|
| 93 | FK40 | F |  | >50 | | 2.2 |
| 60 | FK19 | A |  | 50-100 | 7.5 (30) ^b | 2.25 |
| 83 | FK62 | C |  | | >50 | 5 |
| 89 | FK45 | E |  | >100 | | 5 |
| 58 | FK3 | A |  | 40 | 5 | 5.5 |
| 90 | FK46 | E |  | | >50 | 6.5 |
| 92 | FK39 | F |  | | >50 | 6.5 |
| 99 | FK43 | G |  | | >50 | 7.5 |

| Continúa Tabla 3.48 | | | | | | |
|---------------------|--------|------|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Comp | Siglas | Tipo | Estructura* | ChoK <i>ex vivo</i> NIH3T3 | ChoK <i>in vitro</i> HT-29 | <i>Antiprolif</i> HT-29 |
| 74 | FK33 | B |  | >100 | (100) ^b | 10 |
| 82 | FK60 | C |  | | >50 | 10.25 |
| 98 | FK42 | G |  | >100 | (>100) ^b | 10.5 |
| 75 | FK53 | B |  | >100 | | 12 |
| 81 | FK69 | C |  | | | 13.5 |
| 54 | FK7 | A |  | 13 | 22 | 5-20 |
| 86 | FK47 | D |  | | >50 | 20 |
| 87 | FK48 | D |  | >100 | >50 | 21 |
| 73 | FK54 | B |  | >100 | | 25 |

| Continúa Tabla 3.48 | | | | | | |
|---------------------|--------------|------|--|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|
| Comp | Siglas | Tipo | Estructura* | ChoK <i>ex vivo</i> NIH3T3 | ChoK <i>in vitro</i> HT-29 | Antiprolí HT-29 |
| 67 | FK29 | B |  | 55 | (20) ^b | 25-40 |
| 105 | FK65 | H |  | | | 55 |
| 1 | FK14 HC-3 | |  | 500 | (600) ^b | 2.500 |

*Los contraiones son siempre Br⁻; b.- Actividad inhibitoria de colina quinasa determinada en células NIH 3T3

Como puede ser visto, la investigación aquí contenida ha conducido a ocho compuestos que muestran valores de CI_{50} menor de $10 \mu M$ en su actividad antiproliferativa frente a la línea tumoral HT-29, un cáncer de colon humano que expresa el gen *Mdr1* y, por lo tanto, es muy resistente a la terapia antitumoral. Otros cinco compuestos desarrollan actividades comprendidas entre 10 y $13.5 \mu M$. A título de ejemplo se indica que el valor CI_{50} frente a esta línea tumoral para el 5-fluorouracilo, fármaco de primera elección en el cáncer de mama y algunos cánceres del tracto gastrointestinal, es de $10 \mu M$.

El análisis de los datos contenidos en esta Tabla permite afirmar lo siguiente:

1.- Las estructuras de los trece mejores compuestos sintetizados pertenecen a los grupos A (2 compuestos), B (2 compuestos), C (3 compuestos), E (2 compuestos), F (2 compuestos) y G 1 (compuesto), es decir, no existe, como en el caso de la actividad inhibitoria de colino quinasa *ex vivo*, una estructura preferente que sea necesaria para desarrollar la actividad antiproliferativa..

2.- Dos de los compuestos más activos (**60**, FK19, 2.25 μM y **58**, FK3, 5.5 μM) pertenecen al grupo A y, por lo tanto, se trata de moléculas con dos cabezas catiónicas que, si bien no inhiben satisfactoriamente a la colina quinasa *ex vivo*, si desarrollan valores de CI_{50} muy interesantes (7.5 y 5 μM , respectivamente) en sus actividades inhibitorias de colina quinasa *in vitro*, determinadas sobre las células tumorales HT-29. Este hecho debe estar relacionado con el paso a través de membranas de nuestros compuestos. Así, los dos compuestos mencionados, a pesar de sus dos cargas positivas, muestran estructuras fuertemente lipofílicas que les podrían facilitar el paso a través de la membrana citosólica

Este dato modificó la estrategia de los ensayos de inhibición de la colina quinasa. Durante buena parte de nuestra investigación se determinó la inhibición *ex vivo* de la colina quinasa para tratar de correlacionarla con la actividad antiproliferativa. Durante el curso de nuestras investigaciones se pudo comprobar que el compuesto **56** (FK21, $\text{CI}_{50} = 0.5 \mu\text{M}$), el más activo frente a colina quinasa *ex vivo* de los compuestos sintetizados, mostraba una actividad antiproliferativa casi nula. Una posible interpretación de este hecho puede estar relacionada con el paso a través de membranas citosólicas. El compuesto **56** no debe pasar bien esta barrera. En consecuencia, se tomó la decisión de modificar la estrategia de los ensayos de inhibición enzimática. A partir de este momento el método de inhibición *in vitro* sustituyó al de *ex vivo*. Mientras se puso a punto el método de inhibición de colina quinasa sobre células HT-29, las mismas que se emplean en los ensayos de actividad antiproliferativa, se utilizó el ensayo *in vitro* sobre fibroblastos de ratón, NIH 3T3, células perfectamente diferenciadas sobre las que se sobreexpresa el gen que codifica a la colina quinasa.

En algunos casos se dispone también de los valores CI_{50} determinados para los dos tipos de células. En estos últimos casos se comprueba que existe una correlación entre ellos, aunque normalmente: los compuestos que inhiben bien a la colina quinasa en células NIH 3T3 son también buenos inhibidores de la misma en células HT-29, aunque, normalmente, todos los compuestos ensayados doblemente inhiben mejor a la colina quinasa de las células transformadas HT-29.

3.- Doce de los trece compuestos más activos son sales de piridinio (once de ellos contienen solamente una cabeza catiónica) que presentan sustituyentes electrón-donantes en la posición 4 del anillo de piridinio. Como se ha visto anteriormente, ésta es la condición necesaria para desarrollar una buena actividad inhibitoria de colina quinasa *ex vivo*.

4.- Si se compara la actividad antiproliferativa del compuesto **93** (FK 40, $CI_{50} = 2.2 \mu M$) con la del compuesto isómero **99** (FK43, $CI_{50} = 7.5 \mu M$) se observa que, la disminución de la lipofilia que conlleva el cambio de $-CH_2-$ por $-O-$ provoca una pérdida parcial de actividad. Asimismo, si se compara la actividad del compuesto **93** (FK40, $CI_{50} = 2.2 \mu M$) con la del homólogo **83** (FK62, $CI_{50} = 5 \mu M$) se constata que el aumento de lipofilia conlleva también un aumento de la actividad antiproliferativa. La misma observación se puede constatar si se comparan las actividades de los compuestos **92** (FK39, $CI_{50} = 6.5 \mu M$) y **98** (FK42, $CI_{50} = 10.5 \mu M$). Finalmente, las actividades desarrolladas por los compuestos **75** (FK53, $CI_{50} = 12 \mu M$), **87** (FK48, $CI_{50} = 21 \mu M$) y **90** (FK46, $CI_{50} = 6.5 \mu M$) se podría deducir que los sustituyentes desactivantes del anillo bencénico aumentan la actividad antiproliferativa, aunque se debe tomar con mucha precaución ya que el átomo de bromo también incrementa notablemente la lipofilia del compuesto. En consecuencia, las dos posibilidades aquí contempladas se estudiarán en nuestro grupo.

5.- De los apartados anteriores se deduce que la actividad inhibitoria *ex vivo* de colina quinasa y la actividad antiproliferativa frente a HT-29 están controlados por el mismo factor estructural: los dos efectos se ven favorecidos por la presencia de grupos formados por sales de piridinio 4-sustituidas por grupos electrón-donantes. Sin embargo, la primera de las actividades muestra otros requerimientos estructurales (doble cabeza catiónica, grupos arilcarbonilmetil sobre el átomo N-1 de la piridina y presencia del grupo 3-hidroxiquinuclidinio) que podrían incidir negativamente en el paso a través de la membrana citosólica, necesario para que el compuesto desarrolle una actividad antiproliferativa. Obsérvese a este respecto en la tabla 3.46 cómo la casi totalidad de los compuestos que cumplen con estos requisitos estructurales muestran bajísimos valores de actividad inhibitoria de colina quinasa *in vitro*. Sin embargo, los compuestos cuya

cabeza catiónica está constituida por un anillo aromático de piridinio (**54**, FK7, $CI_{50} = 22 \mu\text{M}$ en HT.29 y $55 \mu\text{M}$ en NIH 3T3; **31**, FK19, $CI_{50} = 7.5 \mu\text{M}$ en HT-29 y $30 \mu\text{M}$ en NIH 3T3 y **58**, FK3, $CI_{50} = 5 \mu\text{M}$ en HT.29) muestran, en general, buena inhibición de la enzima *in vitro*. Por otro lado, el compuesto **67**, (FK29, $CI_{50} = 20 \mu\text{M}$ en HT.29) muestra también una buena capacidad de inhibir a la colina quinasa *in vitro*, posiblemente porque el grupo 3-hidroxiquinuclidinio se ha esterificado con ácido palmítico, aumentando con ello la lipofilia de la molécula y, por ende, su capacidad para atravesar membranas.

6.- En consecuencia, se puede concluir que todos los compuestos que muestran buenos valores de inhibición de la enzima *in vitro* muestran también buenas actividades antiproliferativas, aunque existe un segundo grupo de compuestos que son buenos agentes antiproliferativos sin ser buenos inhibidores de colina quinasa *in vitro*.

Al primer tipo de comportamiento pertenecen, entre otros, los compuestos **41**(FK23, $CI_{50} = 3.5 \mu\text{M}$ *ex vivo* y $70 \mu\text{M}$ en NIH 3T3, no se ha determinado su actividad antiproliferativa), **30** [FK8, $CI_{50} = 7 \mu\text{M}$ *ex vivo* y $90 \mu\text{M}$ en NIH 3T3, disponiendo de dos valores contradictorios de actividad antiproliferativa: $9 \mu\text{M}$ (Lab. Knoll) y $>100 \mu\text{M}$ (Lab. Dr. Lacal)], **55**, (FK22, $CI_{50} = 30 \mu\text{M}$ *ex vivo* y $80 \mu\text{M}$ en NIH 3T3, no determinada su actividad antiproliferativa), **54**, (FK7, $CI_{50} = 22 \mu\text{M}$ en HT.29 y $55 \mu\text{M}$ en NIH 3T3, $13 \mu\text{M}$ *ex vivo* y $5-20 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **58**, (FK3, $CI_{50} = 5 \mu\text{M}$ en HT.29 y $40 \mu\text{M}$ *ex vivo*, $5.5 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **60** (FK19, $CI_{50} = 7.5 \mu\text{M}$ en HT.29 y $30 \mu\text{M}$ en NIH 3T3, $50-100 \mu\text{M}$ *ex vivo*, $2.25 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa) y **67** (FK29, $CI_{50} = 55 \mu\text{M}$ *ex vivo*, $20 \mu\text{M}$ en NIH 3T3 y $25-40 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa).

Al segundo tipo de comportamiento pertenecen los compuestos **73** (FK54, $CI_{50} >100 \mu\text{M}$ en ensayo *ex vivo*, $25 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **75** (FK53, $CI_{50} >100 \mu\text{M}$ en ensayo *ex vivo*, $12 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **81** (FK69, $13.5 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **82** (FK60, $CI_{50} >50 \mu\text{M}$ en ensayo *in vitro* en HT-29, $10.25 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **83** (FK62, $CI_{50} >50 \mu\text{M}$ en ensayo *in vitro* en HT-29, $5 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **86**

(FK47, $CI_{50} > 500 \mu\text{M}$ en ensayo *in vitro* en HT-29, $20 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **87** (FK48, $CI_{50} > 100 \mu\text{M}$ en ensayo *ex vivo*, $21 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **89** (FK45, $CI_{50} > 100 \mu\text{M}$ en ensayo *ex vivo*, $5 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **90** (FK46, $CI_{50} > 50 \mu\text{M}$ en ensayo *in vitro* en HT-29, $6.5 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **92** (FK39, $CI_{50} > 50 \mu\text{M}$ en ensayo *in vitro* en HT-29, $6.5 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **93** (FK40, $CI_{50} > 500 \mu\text{M}$ en ensayo *in vitro* en HT-29, $2.2 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa), **98** (FK42, $CI_{50} > 100 \mu\text{M}$ en ensayo *ex vivo*, > 100 en ensayo *in vitro* en NIH 3T3, $10.5 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa) y, finalmente, **99** (FK43, $CI_{50} > 50 \mu\text{M}$ en ensayo *in vitro* en HT-29, $7.5 \mu\text{M}$ de actividad antiproliferativa).

7.- La constatación de que el trabajo desarrollado en esta Memoria ha permitido aislar un grupo de compuestos que son, al mismo tiempo, buenos inhibidores de colina quinasa *in vitro* y buenos agentes antitumorales dotados de actividad antiproliferativa frente a la línea tumoral HT-29, presta un claro apoyo a la hipótesis inicial de nuestro trabajo: **el bloqueo en la producción de fosforilcolina (PCho) a través de la inhibición de la enzima que interviene en su formación, la colina quinasa (ChoK), puede ya ser considerado como una nueva estrategia en el diseño de fármacos antitumorales selectivos.**

En la figura 3.9 se representa esquemáticamente una parte significativa del ciclo de la colina. En él se puede observar cómo la forma activa de la proteína p21ras, expresada en la figura como Ras- P_3 y que es codificada por oncogenes *ras* y otros miembros de familias relacionables, activa a la fosfolipasa PLD, que está involucrada en el desdoblamiento hidrolítico de la fosfatidilcolina (PC), constituyente de los fosfolípidos de membrana, en colina (Cho) y ácido fosfático (AP). El segundo mensajero putativo, la fosforilcolina (PCho), que se obtiene por la acción directa de la enzima colina quinasa (ChoK), juega un papel metabólico bien conocido que permite regenerar fosfatidilcolina (PC), y otro, en el que actúa como un segundo mensajero con intensa actividad mitogénica. El sistema enzimático involucrado en esta actividad mitogénica no es conocido.

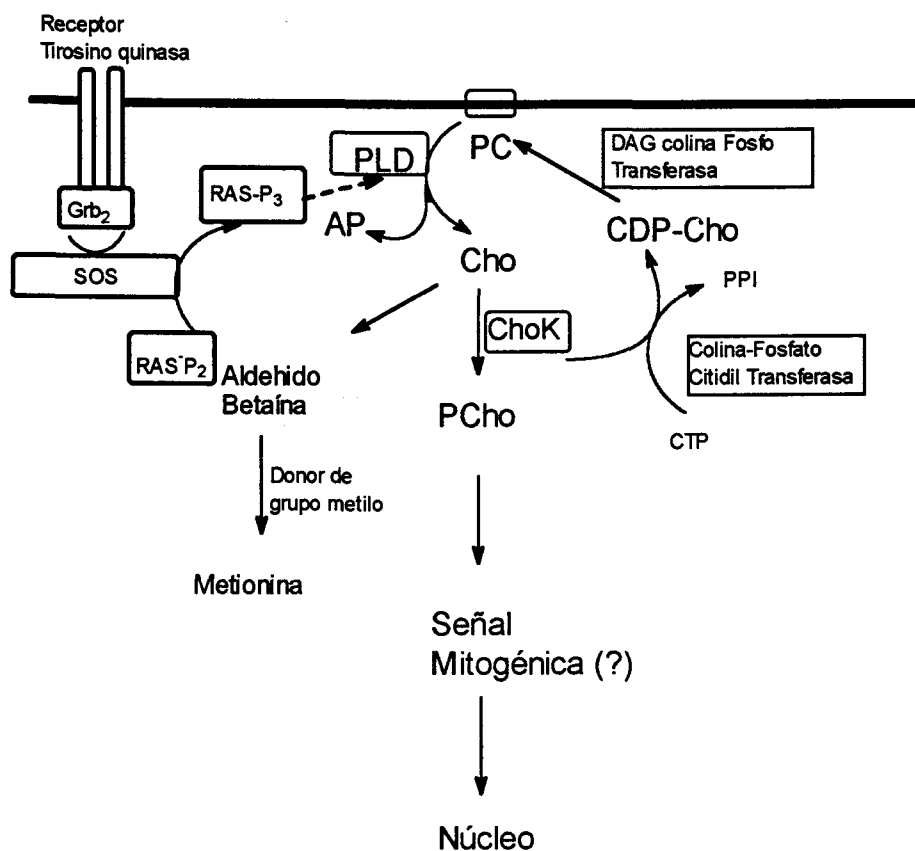


Figura 3.9.- Esquema representativo de la producción y usos del mensajero fosforilcolina (PCho) y de la posición de la enzima colina quinasa (ChoK).

En este sentido, los compuestos incluidos en el primer grupo de comportamiento deben actuar selectivamente sobre la fase de producción de fosforilcolina, mediante inhibición de la enzima colina quinasa.

Pero, ¿cómo interpretar la actividad antiproliferativa de los compuestos incluidos en el segundo grupo?

Una revisión de las estructuras de todos estos compuestos permite establecer que todos ellos están constituidos por una sola cabeza catiónica que forma parte de un anillo de piridinio sustituido en posición 4 con un grupo electrón-donante, una agrupación que debe mimetizar muy

bien la estructura de la colina ya que, como antes se ha descrito, los compuestos dotados con estas agrupaciones son buenos inhibidores de la colina quinasa *ex vivo*.

En la figura 3.10 se representan las representaciones esquemáticas de colina, fosforilcolina y el fragmento de piridinio-4-sustituido con grupos electrón-donantes en el que se observa un posible mimetismo entre la sal de piridinio y la fosforilcolina y/o colina.

Si se tiene en cuenta que los compuestos incluidos en este grupo no inhiben a la enzima colina quinasa, parece lógico pensar que podría existir un efecto mimético entre fosforilcolina y nuestros compuestos.

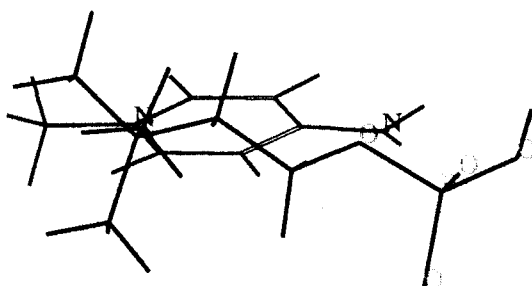


Figura 3.10.- Representación modelizada de la molécula de fosforilcolina (azul) y del compuesto *N*-metil-4-aminopiridinio (rojo) en la que se observa el posible efecto mimético entre ellos

Si se admite esta hipótesis como punto de partida, se puede también hipotetizar que los compuestos incluidos en el segundo tipo de comportamiento podrían actuar, no en la fase de producción de fosforilcolina, sino en la fase de uso de la misma como segundo mensajero putativo con actividad mitogénica.

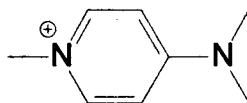
Expresado en otros términos, los compuestos incluidos en este segundo grupo podrían inhibir alguna de las enzimas, todavía desconocidas, involucradas en la transmisión de la señal mitogénica iniciada por fosforilcolina y que debe llegar al núcleo celular para que éste ordene la duplicación de su material genético.

En apoyo de esta hipótesis se tienen los siguientes hechos:

A) Todos los compuestos que caen dentro del segundo tipo de comportamiento llevan una sola cabeza catiónica.

B) La naturaleza del sustituyente unido al átomo de nitrógeno cuaternario no muestra gran influencia sobre la actividad antiproliferativa.

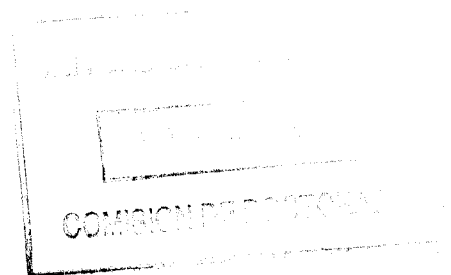
C) La actividad antiproliferativa parece estar asociada a la agrupación



que, de acuerdo con nuestra hipótesis, puede mimetizar al resto de fosforilcolina. Los tres sustituyentes de esta agrupación, debido a su tamaño, deben ser responsables de la acción antagonista de este tipo de compuestos, que se manifiesta a través de su actividad inhibitoria de alguna de las enzimas que controlan el uso de la fosforilcolina como segundo mensajero mitogénico.

Finalmente, es necesario mencionar que, si bien el primer grupo de compuestos, los *inhibidores selectivos de colina quinasa*, han sido el primer objetivo de nuestra investigación, ésta ha conducido a un segundo grupo de compuestos que podría denominarse **inhibidores de enzimas relacionadas con el uso de fosforilcolina como mitógeno**, y que, en nuestra opinión,

podrían resultar muy interesante, ya que la inhibición del uso de la fosforilcolina no debe involucrar al ciclo de la colina.



4.- PARTE EXPERIMENTAL

4.- PARTE EXPERIMENTAL

4.1.- Condiciones generales.

Los espectros de ^1H -RMN se han realizado en un aparato Bruker AM-300 ó Bruker ARX-400. Los datos se expresan en desplazamientos químicos δ (ppm). Las constantes de acoplamiento J se expresan en Hz (ciclos por segundo). La multiplicidad de las señales se indica mediante las siguientes abreviaturas: s, singlete; d, doblete; t, triplete y m, multiplete. Los espectros de ^{13}C -RMN se han realizado en un aparato Bruker AM-300 ó Bruker ARX-400. Cuando no se indica, se entiende que el espectro de ^1H ó ^{13}C -RMN ha sido realizado en $\text{DMSO-}d_6$, a 300,13 MHz y 75,78 MHz respectivamente.

Los análisis elementales (AE) se han realizado en un aparato Perkin Elmer 240 C o en un aparato Fisons Carlo-Eba EA 1108. Las muestras normalmente se secaron en una estufa Gallenkamp a presión reducida, con P_2O_5 en su interior, entre 40-50°C durante 16 horas.

Los puntos de fusión (P.f.) se han medido en un aparato Electrothermal Melting Point Apparatus y están sin corregir. La cromatografía en capa fina (ccf) se ha realizado en cromatofolios Merck AL de silicagel 60 F254. Como revelador se han utilizado vapores de yodo ó ácido sulfurico diluido, así como también mediante la observación en una lampara de UV. La cromatografía en columna se ha realizado utilizando Silicagel Merck 60 (70-230 mesh ASTM).

4.2.-Materias primas.

4.2.1.- Síntesis de 4,4'-di(bromoacetil)bifenilo 53a.

Se disuelve 10,8 g (0,07 mmoles) de bifenilo en 100 ml de disulfuro de carbono, se enfría sobre baño de hielo y se le adiciona 52 g (0.39 mmoles) de cloruro de aluminio en pequeñas cantidades y con agitación. A continuación se adiciona, gota a gota, al medio reaccionante 18,4 g (0,16 mmoles) de bromuro de bromoacetilo y la mezcla se calienta a reflujo (50°C) durante 4h. Pasado dicho tiempo, la mezcla se vierte sobre 1l de hielo picado que contiene 250 ml de metanol y 250 ml cloruro de hidrogeno a 35% . Se agita hasta pulverizar todo el sólido, se filtra, se lava varias veces con agua y se deja en la estufa a 80 °C durante 2 días. El producto se purifica disolviéndolo en acetona, calentando hasta ebullición, añadiendo una punta de espátula de carbono activo y filtrando sobre celita. Se concentra la disolución y se recrystaliza de *n*-butanol obteniéndose 10 g (0,016 moles) de producto cristalino amarillento. Rendimiento = 50%. P.f. 232 - 234 °C.

¹H-RMN (DMSO-*d*₆); δ (ppm) 8.10 (d, *J* = 8.5, 1H, H-3), 8.00 (d, *J* = 8.6, 1H, H-2), 5.00 (s, 2H, H-2').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆); 191.32 (C-1'), 143.55 (C-4), 133.60 (C-1), 129.49 (C-3), 127.45 (C-2), 34.03 (C-2').

4.2.2.- Síntesis de 4,4'-di(cloroacetil)bifenilo 53b.

Este compuesto se sintetiza utilizando el método descrito para la síntesis del compuesto anterior, reemplazando el bromuro de bromoacetilo por el cloruro de cloroacetilo. Rendimiento = 50%. P.f. 225-227 °C.

¹H-RMN (DMSO-*d*₆); δ (ppm) 8.10 (d, 2H, H-3), 8.00 (d, 2H, H-2), 5.10 (s, 2H, H-2').

4.2.3.-Síntesis de 3-quinuclidinopalmitato 95.

En 70 ml de cloroformo se disuelven, 0,57 g (2 mmoles) de ácido palmítico, 0,42 g (2 mmoles) de dicitclohexilcarbodiimida, 0,254 g (2 mmoles) de 3-hidroxiquinuclidina y una cantidad catalítica de dimetilaminopiridina. Se mantiene la reacción con agitación, a temperatura ambiente, durante 20 horas. Se filtra, se concentra a sequedad y se recristaliza de una mezcla de acetato de etilo/etanol 9:1, obteniéndose 0,7 g (1.91 mmoles) de polvo blanco cristalino. Rendimiento = 96%. P.f. 80 °C.

A.E.: (H₂₃H₄₂NO₂ 0.75H₂O)

Teórico C: 72.86, H: 11.83, N: 3.69

Obtenido C: 73.17, H: 12.12, N: 4.00

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 3.85 (m, 1H, H-3"), 3.65 (m, 1H, H-4"), 2.37 (t, J= 7.72, 2H, CO-CH₂), 1.50-1.95 (m, 20H, H_{quinu}), 1.00-1.40 (m, 28H, H_{palmitato}), 0.85 (t, J= 7.04, 3H, CH₃-CH₂).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 174.24 (O-C=O), 56.29 (C-3'), 49.73 (C-4'), 36.06 (C-2'), 33.35 (CO-CH₂), 30.96 (C-5' y C-6'), 29.77- 22.77 (14C_{palmitato}), 14.20 (CH₃-CH₂).

4.3.-Método general de síntesis de derivados del 4,4'-(diacetil)bifenilo: Grupo A.

En 10 ml de tetrahidrofurano, se disuelven 0,5 mmoles de di(bromo/cloroacetil)bifenilo, se le adiciona 1 mmol de amina correspondiente. Se agita a temperatura ambiente hasta aparición de un precipitado. Se filtra, se lava con éter etílico y se recristaliza de alcohol.

4.3.1.- Síntesis de dicloruro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis-*N*-metil pirrolidinio (32, FK2).

Punto de fusión(P.f.): > 300 °C

Disolvente de recristalización(D.R.): Etanol

Rendimiento(Rdto.): 82% (Obtenido 0,36 g)

Análisis Elemental (A.E.): (C₂₆H₃₄N₂O₂Cl₂. 2,5 H₂O)

Teórico C: 59.86, H: 7.46, N: 5.35

Obtenido C: 60.26, H: 7.07, N: 4.99

¹H-RMN (DMSO-*d*₆): 8.15 (d, *J* = 8.57, 4H, H-3 y H-5), 8.05 (d, *J* = 8.58, 4H, H-2 y H-6), 5.50 (s, 4H, H-2'), 3.80 (m, 8H, H-2" y H-5"), 3.26 (s, 6H, 2 *N*-CH₃), 2.15 (m, 8H, H-3" y H-4").

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆): 191.24 (C-1'), 143.78 (C-4), 133.97 (C-1), 128.80 (C-3 y C-5), 127.43 (C-2 y C-6), 66.93 (C-2'), 65.13 (C-2" y C-6"), 49.16 (CH₃-*N*), 21.23 (C-3" y C-5")

4.3.2.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(4-dimetil amino)piridinio (58, FK3).

P.f. : > 300 °C

D.R.: *i*-PrOH/EtOH 5:1

Rdto: 83.4% (obtenido 0.27 g)

A.E. : (C₃₀H₃₂N₄O₂Br₂. 0,5 H₂O)

Teórico C: 55.48, H: 5.12, N: 8.62

Obtenido C: 55.73, H: 5.19, N: 8.25

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.15 (d, $J = 8.49$, 4H, H-3 y H-5), 8.12 (d, $J = 7.33$, 4H, H-2" y 6"), 8.07 (d, $J = 8.53$, 4H, H-2 y H-6), 6.92 (d, $J = 7.43$, 1H, H-3" y H-5"), 6.03 (s, 4H, H-2'), 3.34 (s, 6H, 2 $N\text{-CH}_3$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6): 192.07 (C-1'), 158.90 (C-4"), 144.23 (C-2" y C-6"), 143.84 (C-4), 133.56 (C-1), 128.95 (C-3 y C-5), 127.62 (C-2 y C-6), 109.10 (C-3" y C-5"), 62.72 (C-2'), 39.83 ($\text{CH}_3\text{-N}$).

4.3.3.- Síntesis de dicloruro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(etildimetil amonio) (33b, FK5).

P.f. : > 300 °C

D.R.: EtOH

Rdto : 66% (obtenido 0.35 g)

A.E. : ($\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$)

Teórico C: 57.82, H: 7.78, N: 5.66

Obtenido C: 58.12, H: 7.36, N: 6.06

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8.15 (d, $J = 8.5$, 4H, H-3 y H-5), 8.03 (d, $J = 8.5$, 4H, H-2 y H-6), 5.49 (s, 4H, H-2'), 3.71 (c, $J = 7.0$, 4H, H-1"), 3.36 (s, 6H, 2 $N\text{-CH}_3$), 3.30 (s, 6H, 2 $N\text{-CH}_3$), 1.30 (t, $J = 7.2$, 3H, H-2").

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6): 191.93 (C-1'), 143.94 (C-4), 134.19 (C-1), 128.94 (C-3 y C-5), 127.53 (C-2 y C-6), 64.58 (C-2'), 60.30 (C-2" y C-6"), 50.56 ($N\text{-CH}_3$), 8.06 (C-3" y C-5")

4.3.4.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(butildimetilamonio) (33d, FK6).

P.f. : > 300 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 73.5% (obtenido 0.44 g)

A.E. : (C₂₈H₄₂N₂O₂Br₂)

Teórico C: 59.19, H: 7.07, N: 4.74

Obtenido C: 55.86, H: 6.78, N: 4.67

¹H-RMN(DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.14 (d, *J* = 8.4, 4H, H-3 y H-5), 8.04 (d, *J* = 8.4, 4H, H-2 y H-6), 5.40 (s, 4H, H-2'), 3.62 (t, *J* = 8.2, 4H, H-1"), 3.31 (s, 12H, CH₃-*N*), 1.71 (m, 4H, H-2"), 1.31 (m, 4H, H-3"), 0.92 (t, *J* = 7.25, 6H, H-4").

¹³C-RMN(DMSO-*d*₆): 191.1 (C-1'), 143.95 (C-4), 134.11 (C-1), 128.91 (C-3), 127.53 (C-2), 64.95 (C-2'), 64.59 (C-2"), 51.27 (*N*-CH₃), 23.86 (C-3"), 19.12 (C-4"), 13.40 (C-5")

4.3.5.- Síntesis de dibromuro de 1,1'[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis[(2,2-dimetoxietil)dimetilamonio] (51a, FK10).

P.f. : >300 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 100% (obtenido 0.31 g)

A.E. : (C₂₈H₄₂N₂O₆Br₂)

Teórico C: 50.76, H: 6.27, N: 4.3

Obtenido C: 50.79, H: 6.19, N: 4.36

¹H-RMN(DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.12 (d, *J* = 8.60, 4H, H-3 y H-5), 8.05 (d, 4H, H-2 y H-6), 5.42 (s, 4H, H-2'), 5.03 (t, *J* = 4.60, 2H, H-2"), 3.83 (d, *J* = 4.50, 4H, H-1"), 3.44 (s, 12H, 4 *N*-

CH₃), 3.27 (s, 12H, 4 O-CH₃).

¹³C-RMN(DMSO-*d*₆): 190.81 (C-1'), 143.84 (C-4), 134.05 (C-1), 128.70 (C-3 y C-5), 127.57 (C-2 y C-6), 98.22 (C-3"), 65.69 (C-2'), 63.09 (C-2"), 54.01 (CH₃-N), 53.37 (CH₃-O).

4.3.6.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis[(2,2-dietoxietil)dimetilamonio] (51b, FK11).

P.f. : 163-165 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 86% (obtenido 0.62 g)

A.E. : (C₃₂H₅₀N₂O₆Br₂ · 1,5H₂O)

Teórico C: 51.54, H: 7.16, N: 3.75

Obtenido C: 51.44, H: 7.06, N: 3.78

¹H-RMN(DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8.12 (d, *J* = 8.60, 4H, H-3 y H-5), 8.05 (d, *J* = 8.70, 4H, H-2 y H-6), 5.42 (s, 4H, H-2'), 5.06 (t, *J* = 4.60, 2H, H-2"), 3.83 (d, *J* = 4.42, 4H, H-1"), 3.56 (m, 8H, CH₂-CH₃), 3.43; 3.33 (s, 12H, N-CH₃), 0.98 (t, *J* = 7.01, 12H, CH₃-CH₂).

¹³C-RMN(DMSO-*d*₆): 190.66 (C-1'), 143.81 (C-4), 133.98 (C-1), 128.70 (C-3 y C-5), 127.54 (C-2 y C-6), 96.54 (C-2"), 65.80 (C-2'), 63.61 (C-1"), 62.34 (CH₂CH₃), 53.50 (CH₃-N), 14.83 (CH₃-CH₂).

4.3.7.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(*N*-metil morfolinio) (31, FK12).

P.f. : 260-262 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 66% (obtenido 0.3 g)

A.E.: (C₂₆H₃₄N₂O₄Br₂ · 2 H₂O)

Teórico C: 49.20, H: 6.00, N: 4.70

Obtenido C: 49.03, H: 5.95, N: 5.10

¹H-RMN(DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.15 (d, *J* = 8.6, 4H, H-3 y H-5), 8.03 (d, *J* = 8.4, 4H, H-2 y H-6), 5.58 (s, 4H, H-2'), 3.80 (m, 8H, H-2''), 3.74 (m, 8H, H-3''), 3.46 (s, 6H, *N*-CH₃).

¹³C-RMN(DMSO-*d*₆) 190.75 (C-1'), 143.95 (C-4), 134.23 (C-1), 128.96 (C-3 y C-5), 127.52 (C-2 y C-6), 63.35 (C-2'), 60.42 (C-2''), 59.83 (C-3''), 47.46 (*N*-CH₃).

4.3.8.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(2-hidroxi etildimetilamonio) (1, FK14).

P.f. : 178-180 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 83.5(obtenido 0.3 g)

AE (C₂₄H₃₄N₂O₄Br₂ · 0,75 H₂O)

Teórico C: 47.90, H: 6.20, N: 4.66

Obtenido C: 47.50, H: 6.50, N: 4.50

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.77 (d, *J* = 8.4, 4H, H-3 y H-5), 7.64 (d, *J* = 8.4, 4H, H-2 y H-6), 7.38 (d, *J* = 1.69, 2H, OH), 4.43 (m, *J* = 5.4, 2H, H-2''e), 4.09 (d, *J* = 13.2, 2H, H-2'e), 3.68 (d, *J* = 12.93, 2H, H-2'a), 3.60 (m, 4H, H-1''), 3.45 (s, 6H, *N*-CH₃-e), 3.32 (d, *J* = 11.57, 2H, H-2''a), 3.18 (s, 6H, *N*-CH₃-a).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 141.07 (C-4), 139.91 (C-1), 126.61 (C-3 y C-5), 126.47 (C-2 y C-6), 94.29 (C-OH), 64.78 (C-2'), 58.98 (C-2''), 56.60 (*N*-CH₃), 54.63 (C-1''), 49.84 (*N*-CH₃).

4.3.9.- Síntesis de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis-4-piridona (57, FK17).

P.f. : > 300 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 81.5% (obtenido 0.25 g)

A.E. : (C₂₆H₂₂N₂O₄Br₂. 2,5 H₂O)

Teórico C: 49.48, H: 4.30, N: 4.43

Obtenido C: 49.35, H: 4.01, N: 4.68

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.45 (d, *J* = 7.3, 4H, H-2" y H-6"), 8.16 (d, *J* = 8.5, 4H, H-3 y H-5), 8.06 (d, *J* = 8.5, 1H, H-2 y H-6), 7.09 (d, *J* = 7.3, 4H, H-3" y H-5"), 6.09 (s, 4H, H-2').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 191.98 (C-1'), 173.68 (C-4"), 145.38 (C-2" y C-6"), 143.83 (C-4), 133.59 (C-1), 128.94 (C-3 y C-5), 127.62 (C-2 y C-6), 115.33 (C-3" y C-5"), 62.96 (C-2').

4.3.10.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis isoquinolinio (60, FK19).

P.f. : > 300 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 93% (Obtenido 0.3 g)

A.E. : (C₃₄H₂₆N₂O₂Br₂. 0,5H₂O)

Teórico C: 61.55, H: 4.10, N: 4.22

Obtenido C: 61.15, H: 4.30, N: 4.47

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 10.09 (s, 2H, H-8"), 8.79 (d, *J* = 6.80, 2H, H-2"), 8.71 (d, *J* = 6.90, 2H, H-3"), 8.57 (d, *J* = 8.10, 2H, H-7"), 8.44 (d, *J* = 8.30, 2H, H-4"), 8.34 (t, *J* = 8.30, 4H, H-5" y H-6"), 8.27 (d, *J* = 8.60, 4H, H-3 y H-5), 8.16 (d, *J* = 8.50, 4H, H-2 y H-6), 6.73 (s, 4H, H-2').

^{13}C -RMN (DMSO- d_6) 190.55 (C-1'), 151.69 (C-8''), 144.08 (C-4), 137.49 (C-2''), 136.33 (C-3''), 133.36 (C-1), 131.39 (C-7''), 130.59 (C-4''), 129.14 (C-5''), 127.76 (C-3 y C-5), 127.40 (C-2 y C-6), 126.85 (C-8''-C=C-7''), 126.50 (C-3''-C=C-4''), 66.12 (C-2').

4.3.11.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(3-hidroxi quinuclidinio) (56, FK21).

P.f. : 280-282 °C

D.R. : MeOH/EtOH

Rdto.: 66% (Obtenido 0.21 g)

A.E. : (C₃₀H₃₈N₂O₄Br₂. 1,5 H₂O)

Teórico C: 53.18, H: 6.13, N: 4.13

Obtenido C: 53.49, H: 6.09, N: 3.87

^1H -RMN (DMSO- d_6) δ (ppm) 8.11 (d, $J = 8.45$, 4H, H-3 y H-5), 8.04 (d, $J = 8.55$, 4H, H-2 y H-6), 5.66 (d, $J = 2.27$, 2H, OH), 5.30 (s, 4H, H-2'), 4.15 (m, 2H, H-3''), 3.97 (t, $J = 11.02$, 2H, H-2''e), 3.72 (m, 8H, H-6), 3.58 (t, $J = 11.05$, 2H, H-2''a), 2.19 (m, 2H, H-4''), 2.02; 1,85 (m, 8H, H-5'').

^{13}C -RMN (DMSO- d_6) 190.90 (C-1'), 143.90 (C-4), 134.31 (C-1), 128.91 (C-3 y C-5), 127.59 (C-2 y C-6), 65.15 (C-2'), 63.47 (C-2''), 63.33 (C-3''), 54.90; 54.18 (C-6''), 26.04 (C-4''), 20.92; 17.43 (C-5'').

4.3.12.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)] bis quinuclidinio (55, FK22).

P.f. : 275-276 °C

D.R. : EtOH/*i*-PrOH

Rdto.: 69.5% (Obtenido 0.21 g)

A.E. : (C₃₀H₃₈N₂O₂Br₂· 0,5 H₂O)

Teórico C: 57.24, H: 6.42, N: 4.46

Obtenido C: 57.46, H: 6.58, N: 4.25

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.15 (d, *J* = 8.40, 4H, H-3 y H-5), 8.03 (d, 4H, H-2 y H-6), 5.21 (s, 4H, H-2'), 3.74 (t, *J* = 7.6, 12H, H-2''), 2.15 (m, 2H, H-4''), 1.96 (m, 12H, H-3'').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 190.83 (C-1'), 143.85 (C-4), 134.43 (C-1), 128.83 (C-3 y C-5), 127.50 (C-2 y C-6), 65.28 (C-2'), 54.85 (C-2''), 23.21 (C-3''), 18.83 (C-4'').

4.3.13.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(2-hidroxi propildimetilamonio) (41, FK23).

P.f. : 197-198 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.25 g)

A.E. : (C₂₆H₃₈N₂O₄Br₂· 1 H₂O)

Teórico C: 50.33, H: 6.49, N: 4.51

Obtenido C: 50.11, H: 6.80, N: 4.31

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.79 (d, *J* = 8.0, 4H, H-3 y H-5), 7.65 (d, 4H, H-2 y H-6), 7.40 (d, *J* = 2.0, 2H, OH), 4.62 (m, 2H, H-2''), 3.65 (dd, *J* = 13.1, 4H, H-2'), 3.46 (s, 6H, *N*-CH₃-e), 3.32 (s, 6H, *N*-CH₃-a), 3.26 (m, 2H, H-1''e), 3.22 (m, 2H, H-1''a), 1.28 (d, *J* = 6.2, 6H, CH₃-CH).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 141.02 (C-4), 139.92 (C-1), 126.54 (C-3 y C-5), 126.41 (C-2 y C-6), 94.60 (C-1'), 64.16 (C-2'), 63.53 (C-2''), 60.00 (C-3''), 56.74 (*N*-CH₃), 50.64 (*N*-CH₃), 17.75 (CH₃-CH).

4.3.14.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(3-hidroxi propildimetilamonio) (47, FK24).

P.f. : > 300 °C

D.R.: MeOH

Rdto.: 72% (Obtenido 0.25 g)

A.E. : (C₂₆H₃₈N₂O₄Br₂)

Teórico C: 51.83, H: 6.35, N: 4.65

Obtenido C: 51.65, H: 6.24, N: 4.26

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.14 (d, *J* = 8.6, 4H, H-3 y H-5), 8.05 (d, *J* = 8.7, 4H, H-2 y H-6), 5.42 (s, 4H, H-2'), 3.71 (m, 4H, H-1"), 3.48 (m, 4H, H-3"), 3.33 (s, 6H, *N*-CH₃), 1.89 (m, 4H, H-2").

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 191.02 (C-1'), 143.93 (C-4), 134.10 (C-1), 128.87 (C-3 y C-5), 127.53 (C-2 y C-6), 65.11 (C-2'), 63.01 (C-2"), 57.57 (C-4"), 51.31 (*N*-CH₃), 25.50 (C-3").

4.3.15.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis piridinio (54, FK7).

A 5 ml de piridina, se añaden 0.2 g de 4,4'-di(2-bromoacetil)bifenilo con agitación manteniendo la reacción a temperatura ambiente hasta aparición de un precipitado. A continuación se filtra, se lava con éter y se recristaliza de etanol obteniéndose 0.26 g (0.47 mmoles) de polvo amarillo. Rendimiento = 94%. P.f. > 300 °C.

A.E. : (C₂₆H₂₂N₂O₂Br₂ · 1 H₂O)

Teórico C: 54.56, H: 4.22, N: 4.89

Obtenido C: 54.94, H: 3.87, N: 4.60

$^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm) 9.09 (d, $J = 5.64$, 4H, H-2" y H-6"), 8.76 (t, $J = 7.80$, 2H, H-4"), 8.30 (t, $J = 7.20$, 4H, H-3" y H-5"), 8.21 (d, $J = 8.40$, 4H, H-3 y H-5), 8.13 (d, $J = 8.47$, 4H, H-2 y H-6), 6.63 (s, 4H, H-2').

$^{13}\text{C-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$) 190.41 (C-1'), 146.47 (C-2" y C-6"), 146.32 (C-4"), 144.04 (C-4), 133.32 (C-1), 129.04 (C-3" y C-5"), 127.79 (C-3 y C-5), 127.66 (C-2 y C-6), 66.32(C-2').

4.3.16.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bisquinolinio (59, FK13).

A 5 ml de quinoleína recién destilada, se adicionan 0.2 g (0.5 mmoles) de 4,4'-di(bromoacetil)bifenilo con agitación manteniendo la reacción a temperatura ambiente hasta aparición de un precipitado. A continuación se filtra, se lava con éter y se recristaliza de etanol obteniéndose 0.33 g (0.49 mmoles) de un sólido naranja oscuro. Rendimiento = 98%. P.f. >300 °C.

A.E.: ($\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2\text{Br}_2$)

Teórico C: 60.72, H: 4.19, N: 4.16

Obtenido C: 60.62, H: 4.09, N: 4.22

$^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ (ppm) 9.62 (d, $J = 7.0$, 2H, H-2"), 9.47 (d, $J = 8.3$, 2H, H-4"), 8.57 (d, $J = 8.3$, 2H, H-8"), 8.49 (d, $J = 9.0$, 2H, H-5"), 8.36 (d, $J = 5.8$, 2H, H-3"), 8.31 (d, $J = 8.6$, 4H, H-3 y H-5), 8.24 (t, $J = 8.90$, 2H, H-7"), 8.17 (d, $J = 8.50$, 4H, H-2 y H-6), 8.07 (t, $J = 3.6$, 2H, H-6"), 7.14 (s, 4H, H-2').

$^{13}\text{C-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$) 190.40 (C-1'), 150.97 (C-2"), 148.62 (C-3"), 144.21 (C-4), 138.63 (C-1), 135.92 (C-8"), 130.63 (C-4"), 129.97 (C-3 y C-5), 129.51 (C-2 y C-6), 127.65 (C-7"), 122.15 (C-5"), 119.15 (C-6"), 63.31 (C-2').

4.3.17.- Síntesis de dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(*N*-metil piperidinio) (30, FK8).

En un matraz de 100 ml, conteniendo 10 ml de una mezcla de THF/H₂O 7/3, se le adiciona 0,2 g de 4,4'-di(cloroacetil)bifenilo y un exceso de *N*-metilpiperidina. Se mantiene la reacción en agitación, a temperatura ambiente, hasta disolución de los reactivos. Se seca en el rotavapor y se recristaliza de etanol, obteniéndose 0.19 g de un sólido amarillo. Rendimiento = 98%. P.f. > 300 °C.

A.E.: (C₃₄H₂₆N₂O₂Br₂)

Teórico C: 60.72, H: 4.19, N: 4.16

Obtenido C: 60.62, H: 4.09, N: 4.22

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.17 (d, *J* = 8.44, 4H, H-3 y H-5), 8.03 (d, 4H, H-2 y H-6), 5.57 (s, 4H, H-2'), 3.82, 3.65 (m, 8H, H-2''), 3.35 (s, 6H, *N*-Me), 1.89 (m, 8H, H-3''), 1.60 (m, 4H, H-4'').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 191.39 (C-1'), 143.92 (C-4), 134.45 (C-1), 129.09 (C-3 y C-5), 127.51 (C-2 y C-6), 61.39 (C-2''), 54.11 (C-3''), 47.79 (*N*-Me), 23.26 (C-4'').

4.4.-Método general de síntesis de derivados de acetofenona Grupo B.

En 5 ml de tetrahidrofurano, se disuelven 0.2 g (1 mmole) de 2-bromoacetofenona y se adiciona, bajo agitación, la amina correspondiente manteniéndose la reacción a temperatura ambiente hasta aparición de un precipitado. Se filtra, se lava con éter y se recristaliza del correspondiente alcohol.

4.4.1.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-hidroxiquinuclidinio (66, FK26).

P.f. : 259 °C

D.R. : MeOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.26 g)

A.E. : (C₁₅H₁₉NO₂Br)

Teórico C: 55.05, H: 6.46, N: 4.29

Obtenido C: 55.30, H: 6.22, N: 4.35

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.99 (d, *J* = 7.68, 2H, H-2), 7.74 (t, *J* = 7.37, 1H, H-4), 7.60 (t, *J* = 7.69, 2H, H-3), 5.63 (d, *J* = 3.30, 1H, OH), 5.26 (s, 2H, H-2'), 4.14 (m, 1H, H-3''), 3.91 (t, *J* = 10.68, 1H, H-2''e), 3.70 (m, 4H, H-6''), 3.56 (t, *J* = 11.31, 1H, H-2''a), 2.17 (m, 1H, H-4''), 2.08 (m, 2H, H-5''), 1.84 (m, 2H, H-5'').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 191.27 (C-1'), 135.27 (C-2), 134.79 (C-1), 129.53 (C-4), 128.45 (C-3), 65.08 (C-2'), 63.40 (C-2''), 63.28 (C-3''), 54.80 (C-6''), 54.09 (C-6''), 25.99 (C-4''), 20.88 (C-5''), 17.38 (C-5'').

**4.4.2.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-hidroxiopropildimetilamonio
(62, FK 28).**

P.f. : 135 °C

D.R. : *n*-BuOH

Rdto.: 92% (Obtenido 0.28 g)

A.E. : (C₁₃H₂₀NO₂Br)

Teórico C: 51.66, H: 6.67, N: 4.63

Obtenido C: 51.52, H: 6.74, N: 4.68

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.01 (d, *J* = 7.68, 2H, H-2), 7.75 (t, *J* = 7.38, 1H, H-4), 7.60 (t, *J* = 7.72, 2H, H-3), 5.38 (s, 2H, H-2'), 4.78 (t, *J* = 4.96, 1H, OH), 3.69 (m, 2H, H-1"), 3.46 (m, *J* = 5.38, 2H, H-3"), 3.30 (s, 6H, CH₃-*N*), 1.87 (m, 2H, H-2").

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 191.46 (C-1'), 134.69 (C-2), 134.34 (C-1), 128.97 (C-4), 128.05 (C-3), 65.07 (C-2'), 63.01 (C-2"), 57.58 (C-4"), 51.26 (*N*-CH₃), 25.51 (C-3")

**4.4.3.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-dimetilaminopiridinio
(74, FK33).**

P.f. : 220 - 222 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.26 g)

A.E. : (C₁₅H₁₇N₂OBr. 0,25 H₂O)

Teórico C: 55.30, H: 5.41, N: 8.60

Obtenido C: 55.40, H: 5.32, N: 8.73

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.23 (d, *J* = 7.59, 2H, H-2"), 8.03 (d, *J* = 7.53, 2H, H-2), 7.76 (t, *J* = 7.37, 1H, H-4), 7.61 (t, *J* = 7.7, 2H, H-3), 7.13 (d, *J* = 7.65, 2H, H-3"), 6.03 (s, 2H, H-2'), 3.22 (s, 3H, *N*-CH₃).

^{13}C -RMN(DMSO- d_6) 192.39 (C-1'), 155.99 (C-4''), 143.24 (C-2''), 134.42 (C-2), 133.83 (C-1), 129.05 (C-4), 128.09 (C-3), 107.39 (C-3''), 62.38 (C-2'), 39.83 (N-CH₃)

4.4.4.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-2-hidroxiopropildimetilamonio (61, FK34).

P.f. : 221 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 82% (Obtenido 0.25 g)

A.E. : (C₁₃H₂₀NO₂Br. 0,25 H₂O)

Teórico C: 50.90, H: 6.73, N: 4.56

Obtenido C: 50.62, H: 6.64, N: 4.59

^1H -RMN (DMSO- d_6) δ (ppm) 7.60-7.40 (m, 5H, H_{arom}), 7.30 (d, J = 1.82, 1H, OH), 4.59 (m, 1H, H-2''), 3.64 (t, J = 11.99, 2H, H-1''), 3.45 (s, 3H, N-CH₃-e), 3.25 (t, J = 12.02, 2H, H-2'), 3.17 (s, 3H, N-CH₃-a), 1.26 (d, J = 6.27, 3H, CH₃-CH).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6) 141.70 (C-1), 128.92 (C-2), 128.12 (C-4), 125.91 (C-3), 94.70 (C-1'), 64.21 (C-2'), 63.48 (C-2''), 59.98 (C-3''), 56.65 (N-CH₃), 50.58 (N-CH₃), 17.80 (CH₃-CH)

4.4.5.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-2-hidroxiöldimetilamonio (5, FK35).

P.f. : 227 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 83% (Obtenido 0.24 g)

A.E. : (C₁₂H₁₈NO₂Br)

Teórico C: 50.01, 6.29, N: 4.86

Obtenido C: 49.82, 6.28, N: 4.85

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ 7.56 (d, $J = 7.97$, 2H, H-2), 7.42 (m, 3H, H-3 y H-4), 7.31 (d, $J = 1.96$, 1H, OH), 4.40 (m, $J = 7.08$, 1H, H-2"e), 4.07 (d, $J = 13.32$, 1H, H-2'e), 3.65 (d, $J = 12.95$, 1H, H-2'a), 3.59 (m, $J = 5.37$, 2H, H-1"), 3.44 (s, 3H, N-CH₃-e), 3.32 (d, $J = 11.57$, 1H, H-2"a), 3.19 (s, 3H, N-CH₃-a).

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6) 141.68 (C-1), 128.96 (C-2), 128.14 (C-4), 125.89 (C-3), 94.34 (C-1'), 64.85 (C-2'), 58.94 (C-2"), 56.52 (N-CH₃), 54.57 (C-3"), 49.79 (CH₃-N).

4.4.6.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-N-2-hidroxiethylmorfolinio (64, FK36).

P.f. : 223-5 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 83% (Obtenido 0.26 g)

A.E. : (C₁₄H₂₀NO₃Br. 0,25 H₂O)

Teórico C: 50.23, H: 6.17, N: 4.18

Obtenido C: 49.96, H: 6.13, N: 4.31

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ 7.61 (d, $J = 7.88$, 2H, H-2), 7.43 (m, 3H, H-3 y H-4), 7.35 (d, $J = 1.79$, 1H, OH), 4.50-3.10 (m, 14H, H_{dimorfolinio}).

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6) 141.46 (C-1), 129.0 (C-2), 128.07 (C-4), 126.09 (C-3), 94.66 (C-1'), 63.13 (C-2'), 59.82 (C-2"), 58.94 (C-2"), 56.69 (C-3"), 53.80(C-3").

4.4.7.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-2,2-dimetoxietildimetilamonio (63, FK37).

P.f. : 231 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 78% (Obtenido 0.24 g)

A.E. : (C₁₄H₂₂NO₃Br)

Teórico C: 50.60, H: 6.67, N: 4.21

Obtenido C: 50.33, H: 6.76, N: 4.25

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ 8.01 (d, *J* = 7.68, 2H, H-2), 7.75 (t, *J* = 7.88, 1H, H-4), 7.60 (t, *J* = 7.72, 2H, H-3), 5.37 (s, 2H, H-2'), 4.97 (t, *J* = 4.76, 1H, H-2''), 3.70 (d, *J* = 4.75, H-1''), 3.41 (s, 6H, CH₃-N), 3.25 (s, 6H, CH₃-O).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 191.25 (C-1'), 134.60 (C-2), 134.33 (C-1), 129.02 (C-4), 127.89 (C-3), 98.17 (C-3''), 65.63 (C-2'), 63.09 (C-2''), 53.98 (CH₃-N), 53.33 (CH₃-O).

4.4.8.-Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-hidroximetilpiridinio (72, FK50).

P.f. : 205 °C

D.R. : MeOH/EtOH

Rdto.: 81% (Obtenido 0.25 g)

A.E. : (C₁₄H₁₄NO₂Br. 0,25 H₂O)

Teórico C: 53.77, H: 4.67, N: 4.48

Obtenido C: 54.08, H: 4.67, N: 4.49

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.90 (d, *J* = 6.47, 2H, H-2''), 8.15 (d, *J* = 6.47, 2H, H-3''), 8.04 (d, *J* = 7.59, 2H, H-2), 7.77 (t, *J* = 7.39, 1H, H-4), 7.64 (t, *J* = 7.69, 2H, H-3), 6.47 (s, 2H, H-2'), 6.00 (s, 1H, OH), 4.86 (s, 2H, CH₂-OH).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 190.87 (C-1'), 163.66 (C-4''), 145.48 (C-2''), 134.63 (C-2), 133.53 (C-1), 129.07 (C-4), 128.19 (C-3), 124.07 (C-3''), 65.56 (C-2'), 61.30 (CH₂-OH)

4.4.9.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-acetilpiridinio (69, FK51).

P.f. : 219 - 221 °C

D.R. : MeOH/EtOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.25 g)

A.E. : (C₁₅H₁₄NO₂Br. 0,25 H₂O)

Teórico C: 55.48, H: 4.50, N: 4.30

Obtenido C: 55.73, H: 4.31, N: 4.26

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 9.25 (d, *J* = 6.58, 2H, H-2"), 8.60 (d, *J* = 6.61, 2H, H-3"), 8.06 (d, *J* = 7.49, 2H, H-2), 7.78 (t, *J* = 7.40, 1H, H-4), 7.65 (t, *J* = 7.76, 2H, H-3), 6.63 (s, 2H, H-2'), 2.76 (s, 3H, CH₃-CO).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 195.61 (CO-CH₃), 190.43 (C-1'), 148.93 (C-4"), 147.79 (C-2"), 134.80 (C-2), 133.48 (C-1), 129.19 (C-4), 128.31 (C-3), 125.74 (C-3"), 66.50 (C-2'), 27.48 (CH₃-CO).

4.4.10.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-piridona (76, FK52).

P.f. : 210 °C

D.R. : MeOH/EtOH

Rdto.: 85% (Obtenido 0.27 g)

A.E. : (C₁₃H₁₂NO₂Br)

Teórico C: 53.08, H: 4.11, N: 4.76

Obtenido C: 52.70, H: 4.39, N: 4.70

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.32 (d, *J* = 6.8, 2H, H-2"), 8.02 (d, *J* = 7.7, 2H, H-2), 8.00 (d, *J* = 8.8, 2H, H-3"), 7.73 (t, *J* = 7.4, 1H, H-4), 7.60 (t, *J* = 7.6, 2H, H-3), 6.94 (d, *J* = 6.8, 2H, H-2"), 6.69 (d, *J* = 7.2, 2H, H-3"), 5.90 (s, 2H, H-2').

^{13}C -RMN (DMSO- d_6) 192.63 (C-1'), 174.68 (C-4''), 173.09 (C-4''), 144.47 (C-2''), 141.92 (C-2''), 134.34 (C-2), 133.94 (C-1), 129.03 (C-4), 128.08 (C-3), 115.77 (C-3''), 114.56 (C-3''), 62.45 (C-2').

4.4.11.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-(1-pirrolidino) piridinio (75, FK53).

P.f. : 258 °C

D.R. : MeOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.28 g)

A.E. : (C₁₇H₁₉N₂OBr. 0,16 H₂O)

Teórico C: 58.29, H: 5.56, N: 8.00

Obtenido C: 58.24, H: 5.29, N: 7.84

^1H -RMN (DMSO- d_6) δ (ppm) 8.18 (d, $J = 7.48$, 2H, H-2''), 8.02 (d, $J = 7.52$, 2H, H-2), 7.74 (t, $J = 7.40$, 1H, H-4), 7.62 (t, $J = 7.65$, 2H, H-3), 6.96 (d, $J = 7.46$, 2H, H-3''), 5.99 (s, 2H, H-2'), 3.52 (t, $J = 6.56$, 2H, H-2_{pirr}), 2.00 (t, $J = 6.54$, 2H, H-3_{pirr}).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6) 192.36 (C-1'), 153.13 (C-4''), 143.17 (C-2''), 134.34 (C-2), 133.82 (C-1), 128.98 (C-4), 128.02 (C-3), 107.94 (C-3''), 62.40 (C-2'), 48.33 (C-2_{pirr}), 24.63 (C-3_{pirr}).

4.4.12.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-aminopiridinio (73, FK54).

P.f. : > 300 °C

D.R. : MeOH/EtOH

Rdto.: 85% (Obtenido 0.25 g)

A.E. : (C₁₃H₁₂NO₂Br)

Teórico C: 51.26, H: 4.65, N: 9.96

Obtenido C: 51.10, H: 4.39, N: 9.68

^1H -RMN (DMSO- d_6) δ (ppm) 8.30 (s, 2H, NH₂), 8.10 (d, $J = 7.2$, 2H, H-2''), 8.00 (d, $J = 7.6$, 2H, H-2), 7.70 (t, $J = 7.4$, 1H, H-4), 7.60 (t, $J = 7.7$, 2H, H-3), 6.90 (d, $J = 7.3$, 2H, H-3''), 6.00 (s, 2H, H-2').

^{13}C -RMN (DMSO- d_6) 192.41 (C-1'), 158.87 (C-4''), 144.21 (C-2''), 134.44 (C-2), 133.82 (C-1), 129.05 (C-4), 128.12 (C-3), 109.06 (C-3''), 62.66 (C-2').

4.4.13.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-cianopiridinio (71, FK55).

P.f. : 223 °C

D.R. : MeOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.23 g)

A.E. : (C₁₃H₁₁N₂OBr)

Teórico C: 52.80, H: 3.92, N: 9.47

Obtenido C: 52.89, H: 3.57, N: 9.28

^1H -RMN (DMSO- d_6) δ (ppm) 9.30 (d, $J = 6.67$, 2H, H-2''), 8.80 (d, $J = 6.62$, 2H, H-3''), 8.05 (d, $J = 7.57$, 2H, H-2), 7.78 (t, $J = 7.39$, 1H, H-4), 7.65 (t, $J = 7.67$, 2H, H-3), 6.61 (s, 2H, H-2').

^{13}C -RMN (DMSO- d_6) 189.89 (C-1'), 147.63 (C-2''), 134.89 (C-2), 133.32 (C-1), 130.72 (C-3''), 129.20 (C-4), 128.34 (C-3), 127.85 (C-4''), 114.86 (C \equiv N), 67.11 (C-2').

4.4.14.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-hidroxiiminoformilpiridinio (70, FK57)

P.f. : 235-6 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 79% (Obtenido 0.27 g)

A.E. : (C₁₄H₁₃N₂O₂Br)

Teórico C: 51.26, H: 4.17, N: 8.60

Obtenido C: 51.31, H: 3.97, N: 8.34

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 12.91 (s, 1H, HC=N), 8.94 (d, *J* = 6.68 2H, H-2"), 8.46 (s, 1H, OH), 8.30 (d, *J* = 6.64, 2H, H-3"), 8.05 (d, *J* = 7.54, 2H, H-2), 7.77 (t, *J* = 7.40, 1H, H-4), 7.64 (t, *J* = 7.67, 2H, H-3), 6.47 (s, 2H, H-2').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 190.72 (C-1'), 149.07 (C-4"), 146.42 (C-2"), 145.20 (C-3"), 134.68 (C-2), 133.51 (C-1), 129.10 (C-4), 128.29 (C-3), 123.76 (C=N), 65.77 (C-2').

4.4.15.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-hidroxipiridinio (77, FK58).

P.f. : 212 - 4 °C

D.R. : MeOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.35 g)

A.E. : (C₁₃H₁₂NO₂Br)

Teórico C: 53.08, H: 4.11, N: 4.76

Obtenido C: 52.89, H: 3.95, N: 4.56

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 11.90 (s, 1H, OH), 8.75 (s, 1H, H-2"), 8.68 (d, *J* = 5.84, 2H, H-6"), 8.15 (d, *J* = 7.12, 1H, H-4"), 8.08 (t, *J* = 6.88, 1H, H-5"), 8.04 (d, 2H, *J* = 8.10, 2H, H-2) 7.74 (t, *J* = 7.42, 1H, H-4), 7.60 (t, *J* = 7.68, 2H, H-3), 6.69 (s, 2H, H-2').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 190.79 (C-1'), 156.55 (C-3"), 137.28 (C-2"), 134.65 (C-6"), 134.43 (C-2), 133.56 (C-1), 132.12 (C-4"), 129.09 (C-4), 128.34 (C-3), 66.38 (C-2').

4.4.16.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-palmitoiloxiquinuclidinio (67, FK29).

En un tubo cerrado conteniendo una disolución de 0.366 g (1mmol) de 3-palmitato de quinuclidina **95** en 10 ml de tetrahidrofurano, se le adiciona 0.2 g (1mmol) de 2-bromoacetofenona. Se mantiene la reacción a 60 °C hasta aparición de un precipitado (alrededor de 12 horas) y, transcurrido dicho tiempo, se filtra, se lava con éter y se recrystaliza de isopropanol obteniéndose 0.56 g (0.99 mmoles) de polvo blanco. Rendimiento = 99 %. P.f.- 180 °C.

A.E. : (C₃₁H₅₀NO₃Br)

Teórico C: 63.90, H: 8.92, N: 2.40

Obtenido C: 63.51, H: 8.99, N: 2.54

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.07 (d, *J* = 7.40, 2H, H-2), 7.53 (t, *J* = 7.38, 1H, H-4), 7.40 (t, *J* = 7.87, 2H, H-3), 5.87 (s, 2H, H-2'), 5.13 (t, *J* = 4.16, 1H, H-3"), 4.54 (m, 1H, H-2"e), 4.33 (m, 1H, H-2"a), 4.15 (m, 4H, H-6"), 2.37 (m, 4H, H-5"), 2.26 (m, 1H, H-4"), 2.00 (m, 2H, OCO-CH₂), 1.23 (m, 24H, H_{palmitato}), 0.85 (t, *J* = 6.56, 3H, CH₃-CH₂).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 191.52 (C-1'), 173.10 (O-C=O), 134.86 (C-2), 134.42 (C-1), 129.14 (C-4), 128.63 (C-3), 67.04 (C-3"), 65.91 (C-2'), 60.88 (C-2"), 54.97 (C-6"), 34.17 (CO-CH₂), 31.96- 21.50 (12C_{palmitato}), 24.05 (C-4"), 18.60 (C-5"), 14.18 (CH₃-CH₂).

4.4.17.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-oxoquinuclidinio (65, FK30).

En 10 ml de agua destilada, se disuelven 0.28 g (2mmoles) de carbonato potásico y 0.32 g (2mmoles) de cloridrato de 3-quinuclidinona. Se agita durante 30 minutos y se lava 3 veces con 15 ml de cloroformo. La capa clorofórmica se decanta y se seca sobre sulfato sodico anhidro. Una vez seca la solución, se concentra a sequedad y el sólido resultante se disuelve en 8 ml de THF,

adicionando con agitación 0.3 g (1,5 mmoles) de 2-bromoacetofenona. La reacción se mantiene, a temperatura ambiente, hasta aparición de un precipitado, se filtra, se lava con éter y se recrystaliza de una mezcla de metanol/etanol (1/1) obteniéndose 0.38 g (1.17 mmoles) de un polvo blanco cristalino. Rendimiento = 78 %. P.f. 235°C.

A.E. : (C₁₅H₁₈NO₂Br)

Teórico C: 54.80, H: 5.67, N: 4.26

Obtenido C: 54.98, H: 5.56, N: 4.26

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.02 (d, *J* = 7.66, 2H, H-2), 7.75 (t, *J* = 7.37, 1H, H-4), 7.62 (t, *J* = 7.74, 2H, H-3), 5.45 (s, 2H, H-2'), 4.55 (s, 2H, H-2''), 3.95 (m, 4H, H-6''), 2.75 (t, *J* = 3.1, 1H, H-4''), 2.32 (m, 2H, H-5''), 2.21 (m, 2H, H-5'').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 202.53 (C-3''), 190.91 (C-1'), 134.80 (C-2), 134.32 (C-1), 129.03 (C-4), 128.12 (C-3), 65.60 (C-2'), 65.33 (C-2''), 55.34 (C-6''), 36.69 (C-4''), 20.60 (C-5'').

4.4.18.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)isoquinolinio (78, FK32).

A 5 ml de isoquinoleína se le adicionan, bajo agitación, 0.2 g (1mmol) de 2-bromoacetofenona y se mantiene la reacción, a temperatura ambiente, hasta aparición de un precipitado. Se filtra, se lava con éter y se recrystaliza de etanol, obteniéndose 0.28 g (0.85mmoles) de un polvo de color naranjado. Rendimiento = 85 %. P.f. 241°C

A.E. : (C₁₇H₁₄NOBr)

Teórico C: 59.74, H: 4.57, N: 4.11

Obtenido C: 59.34, H: 4.29, N: 4.50

^1H -RMN (DMSO- d_6) δ (ppm) 10.06 (s, 1H, H-8"), 8.75 (d, $J = 6.76$, 1H, H-2"), 8.70 (d, $J = 6.76$, 1H, H-3"), 8.55 (d, 1H, $J = 8.3$, 1H, H-7"), 8.42 (d, $J = 8.3$, 1H, H-4"), 8.33 (t, $J = 7.34$, 1H, H-6"), 8.12 (d, $J = 7.53$, 3H, H-2 y H-5"), 7.81 (t, $J = 7.4$, 1H, H-4), 7.68 (t, $J = 7.63$, 2H, H-3), 6.70 (s, 2H, H-2').

^{13}C -RMN (DMSO- d_6) 190.98 (C-1'), 151.71 (C-8"), 137.49 (C-2"), 136.36 (C-3"), 134.81 (C-2), 133.57 (C-1), 131.42 (C-7"), 130.63 (C-4"), 129.21 (C-4), 128.34 (C-3), 127.43 (C-6"), 125.48 (C-5"), 66.12 (C-2').

4.4.19.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)piridinio (68, FK56).

A 5 ml de piridina, se le adicionan con agitación 0.2 g (1mmol) de 2-bromoacetofenona manteniéndose la reacción, a temperatura ambiente, hasta aparición de un precipitado. Se filtra, se lava con éter y se recristaliza de etanol obteniéndose 0.24 g (0.86 mmoles) de un polvo de color naranjado. Rendimiento = 86 %. P.f. 195 - 196 °C

A.E. : (C₁₃H₁₂NOBr. 0,25 H₂O)

Teórico C: 55.23, H: 4.45, N: 4.95

Obtenido C: 54.86, H: 4.43, N: 5.02

^1H -RMN (DMSO- d_6) δ (ppm) 9.03 (d, $J = 5.83$, 2H, H-2"), 8.75 (t, $J = 7.81$, 1H, H-4"), 8.30 (t, 1H, $J = 7.2$, 2H, H-"), 8.05 (d, $J = 7.53$, 2H, H-2), 7.77 (t, $J = 7.40$, 1H, H-4), 7.70 (t, $J = 7.75$, 2H, H-3), 6.54 (s, 2H, H-2').

^{13}C -RMN (DMSO- d_6) 190.73 (C-1'), 146.41 (C-2"), 146.29 (C-4"), 134.74 (C-2), 133.52 (C-1), 129.16 (C-4), 128.27 (C-3), 127.86 (C-3"), 66.26 (C-2').

4.5.- Método general para la síntesis de derivados de fenetilo: Grupo C.

A 8 ml de tetrahidrofurano, conteniendo 1 mmol de la amina correspondiente, se adiciona bajo agitación 0.5 ml de 2-bromoetilfenilo en exceso. Se mantiene la reacción, a temperatura ambiente, hasta aparición de un precipitado. Se filtra, se lava con éter y se recristaliza del correspondiente alcohol.

4.5.1- Síntesis del bromuro de 1-(feniletíl)-4-dimetilaminopiridinio (82, FK60).

P.f. : 90 °C

D.R. : *i*-PrOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.45 g)

A.E. : (C₁₅H₁₉N₂Br. 1,5 H₂O)

Teórico C: 53.89, H: 6.63, N: 8.38

Obtenido C: 53.82, H: 6.78, N: 8.51

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.27 (d, *J* = 7.49, 1H, H-2"), 7.30- 7.20 (m, 5H, H_{arom}), 6.99 (d, *J* = 7.53, 1H, H-3"), 4.44 (t, *J* = 7.29, 2H, H-2'), 3.15 (s, 6H, CH₃-N), 3.10 (t, *J* = 7.31, 2H, H-1').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 155.73 (C-4"), 141.98 (C-2"), 136.76 (C-1), 128.88 (C-2), 128.49 (C-4), 126.78 (C-3), 107.42 (C-3"), 57.37 (C-2'), 39.71 (CH₃-N), 36.16 (C-1').

4.5.2.- Síntesis del bromuro de 1-(fenetil)-3-hidroxiquinuclidinio (80, FK61).

P.f. : 220 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.45 g)

A.E. : (C₁₅H₂₁NOBr)

Teórico C: 57.88, H: 6.80, N: 4.50

Obtenido C: 57.63, H: 6.51, N: 4.19

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.30- 7.20 (m, 5H, H_{arom}), 5.59 (d, *J* = 3.52, 1H, OH), 4.09 (m, 1H, H-3"), 3.77 (t, *J* = 9.0, 2H, H-2'), 3.50 (m, 1H, H-2"e), 3.40 (m, 4H, H-6"), 3.10 (d, *J* = 3.0, 1H, H-2"a), 3.00 (t, *J* = 9.0, 2H, H-1'), 2.13 (m, 1H, H-4"), 2.10- 1.70 (m, 4H, H-5").

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 136.57 (C-1), 129.01 (C-2), 128.60 (C-4), 126.86 (C-3), 63.39 (C-3"), 63.36 (C-2'), 62.60 (C-2"), 53.97 (C-6"), 52.67 (C-6"), 27.78 (C-1'), 26.37 (C-4"), 20.90 (C-5"), 17.38 (C-5").

4.5.3.- Síntesis del bromuro de 1-(fenetil)-4-(1-pirrolidino)piridinio (83, FK62).

P.f. : 116 - 8 °C

D.R. : *i*-PrOH

Rdto.: 95% (Obtenido 0.3 g)

A.E. : (C₁₇H₂₁N₂Br. 0,75 H₂O)

Teórico C: 58.87, H: 6.54, N: 8.08

Obtenido C: 59.02, H: 6.65, N: 8.44

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.23 (d, *J* = 7.42, 2H, H-2"), 7.30 - 7.20 (m, 5H, H_{arom}), 6.84 (d, *J* = 7.42, 2H, H-3"), 4.43 (t, *J* = 7.24, 2H, H-2'), 3.45 (t, *J* = 6.63, 4H, H-2_{pirr}), 3.10 (t, *J* = 7.25, 2H, H-1'), 1.97 (t, *J* = 6.64, 4H, H-3_{pirr}).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 152,88 (C-4"), 141.89 (C-2"), 136.71 (C-1), 128.81 (C-2), 128.46 (C-4), 126.74 (C-3), 107.97 (C-3"), 57.44 (C-2'), 48.21 (C-2_{pirr}), 36.12 (C-1'), 24.57 (C-3_{pirr}).

4.5.4.- Síntesis del bromuro de 1-(fenetil)-4-aminopiridinio (81, FK69).

P.f. : 252 - 4 °C

D.R. : *i*-PrOH

Rdto.: 85% (Obtenido 0.24 g)

A.E. : (C₁₃H₁₅N₂Br. 0,25 H₂O)

Teórico C: 55.03, H: 5.46, N: 10.00

Obtenido C: 55.23, H: 5.38, N: 9.88

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.10 (d, *J* = 6.87, 2H, H-2"), 7.30- 7.20 (m, 5H, H_{arom}), 6.77 (d, *J* = 7.22, 2H, H-3"), 4.37 (t, *J* = 7.20, 2H, H-2'), 3.07 (t, *J* = 7.21, 2H, H-1').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 159,42 (C-4"), 143.71 (C-2"), 137.62 (C-1), 129.74 (C-2), 129.41 (C-4), 127.70 (C-3), 110.00 (C-3"), 58.74 (C-2'), 37.00 (C-1').

4.5.5.- Síntesis del bromuro de 1-(fenetil)-2-hidroxietildimetilamonio de (79, FK70).

P.f. : 232 °C

D.R. : *i*-PrOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.3 g)

A.E. : (C₁₅H₁₉N₂Br. 1,5 H₂O)

Teórico C: 52.56, H: 7.35, N: 5.10

Obtenido C: 52.18, H: 7.26, N: 4.84

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.30 - 7.20 (m, 5H, H_{arom}), 5.33 (t, *J* = 5.03, 1H, OH), 3.86 (m, 2H, H-1"), 3.57 (t, *J* = 4.15, 2H, H-2'), 3.50 (t, *J* = 4.68, 2H, H-2"), 3.15 (s, 6H, CH₃-N), 3.05 (t, *J* = 4.17, 2H, H-1').

^{13}C -RMN (DMSO- d_6) 136.31 (C-1), 128.94 (C-2), 128.55 (C-4), 126.82 (C-3), 64.68 (C-2''), 54.91 (C-2'), 42.54 (CH_3 -N), 28.16 (C-1').

4.6.- Método general de síntesis de derivados de 3-metoxiacetofenona: Grupo D.

A 8 ml de tetrahidrofurano conteniendo 0.23 g (1mmol) de 3'-metoxi 2-bromo acetofenona, se adiciona con agitación 1 mmol de la correspondiente amina. Se mantiene la reacción a temperatura ambiente hasta aparición de un precipitado, Se filtra, se lava con éter y se recristaliza de alcohol.

4.6.1- Síntesis del bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-3-hidroxiquinuclidinio (84, FK25).

P.f. : 165 °C

D.R. : EtOH/*i*-PrOH

Rdto.: 98% (Obtenido 0.34 g)

A.E. : (C₁₆H₂₂NO₃Br)

Teórico C: 53.94, H: 6.22, N: 3.97

Obtenido C: 53.93, H: 6.39, N: 3.97

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.60 - 7.40 (m, 4H, H_{arom}), 5.63 (d, *J* = 3.40, 1H, OH), 5.25 (s, 2H, H-2'), 4.14 (m, 1H, H-3"), 3.92 (t, *J* = 11.48, 1H, H-2"e), 3.83 (s, 3H, CH₃-O), 3.68 (m, 4H, H-6), 3.57 (t, *J* = 11.11, 1H, H-2"a), 2.17 (m, 1H, H-4"), 2.08 (m, 2H, H-5"), 1.83 (m, 2H, H-5").

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 191.14 (C-1'), 159.46 (C-3), 135.87 (C-1), 130.18 (C-2), 120.40 (C-5), 112.80 (C-6), 65.13 (C-2'), 63.40 (C-3"), 63.27 (C-2"), 55.60 (CH₃-O), 54.79 (C-6"), 54.09 (C-6"), 25.98 (C-4"), 20.87 (C-5"), 17.36 (C-5").

4.6.2- Síntesis del bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-3-hidroxiopropil dimetilamonio (85, FK27).

P.f. : 145 °C

D.R. : MeOH/EtOH

Rdto.: 95% (Obtenido 0.3 g)

A.E. : (C₁₄H₂₂NO₃Br. 1,5 H₂O)

Teórico C: 50.60, H: 6.67, N: 4.21

Obtenido C: 50.49, H: 6.61, N: 3.98

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.65 - 7.35 (m, 4H, H_{arom}), 5.36 (s, 2H, H-2'), 4.79 (s, 1H, OH), 3.84 (s, 3H, CH₃-O), 3.68 (m, 2H, H-1"), 3.35 (m, 2H, H-3"), 3.29 (s, 6H, CH₃-N), 1.86 (m, 2H, H-2").

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 191.34 (C-1'), 159.49 (C-3), 135.67 (C-1), 130.25 (C-2), 120.60 (C-5), 120.48 (C-4), 112.76 (C-6), 65.12 (C-2'), 62.91 (C-2"), 57.59 (C-4"), 55.62 (CH₃-O), 51.30 (CH₃-N), 25.52 (C-3").

4.6.3- Síntesis del bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-4-dimetilamino piridinio (86, FK47).

P.f. : 270 - 2 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.47 g)

A.E. : (C₁₆H₁₉N₂O₂Br)

Teórico C: 54.71, H: 5.45, N: 7.97

Obtenido C: 54.61, H: 5.56, N: 8.11

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.20 (d, *J* = 7.58, 2H, H-2"), 7.61 (d, *J* = 7.67, 1H, H-4), 7.54 (t, *J* = 7.81, 1H, H-5), 7.49 (s, 1H, H-2), 7.32 (d, *J* = 8.06, 1H, H-6), 7.11 (d, *J* = 7.6, 1H,

H-3"), 6.00 (s, 2H, H-2'), 3.83 (s, 3H, CH₃-O), 3.21 (s, 6H, CH₃-N).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 192.25 (C-1'), 159.52 (C-3), 155.99 (C-4"), 143.22 (C-2"), 135.18 (C-1), 130.30 (C-2), 120.52 (C-4), 120.24 (C-6), 112.72 (C-5), 107.39 (C-3"), 62.48 (C-2'), 55.56 (CH₃-O), 39.97 (CH₃-N).

4.6.4- Síntesis del bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-4-(1-pirrolidino) piridinio (87, FK48).

P.f. : 257 - 9 °C

D.R. : MeOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.27 g)

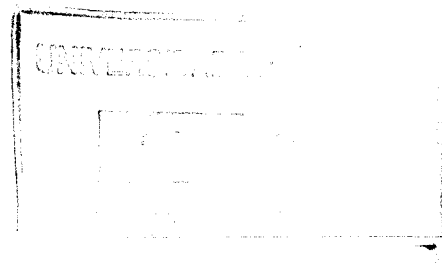
A.E. : (C₁₈H₂₁N₂O₂Br)

Teórico C: 57.30, H: 5.61, N: 7.42

Obtenido C: 57.10, H: 5.66, N: 7.53

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.18 (d, *J* = 7.45, 2H, H-2"), 7.61 (d, *J* = 7.70, 1H, H-4), 7.54 (t, *J* = 7.82, 1H, H-5), 7.49 (s, 1H, H-2), 7.32 (d, *J* = 8.11, 1H, H-6), 6.96 (d, *J* = 7.51, 2H, H-3"), 5.98 (s, 2H, H-2'), 3.83 (s, 3H, CH₃-O), 3.52 (t, *J* = 6.58, 4H, H-3_{pirr}), 2.01 (t, *J* = 6.58, 4H, H-3_{pirr}).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 192.32 (C-1'), 159.52 (C-3), 153.14 (C-4"), 143.19 (C-2"), 135.19 (C-1), 130.30 (C-2), 120.52 (C-4), 120.24 (C-6), 112.71 (C-5), 108.00 (C-3"), 62.55 (C-2'), 55.56 (CH₃-O), 48.38 (C-2_{pirr}), 24.69 (C-3_{pirr}).



4.7.- Método general de síntesis de derivados de 4-bromoacetofenona: Grupo E.

A 0.28 g (1 mmol) de 2,4'-dibromoacetofenona, disueltos en 8 ml de tetrahidrofurano se adiciona bajo agitación, 1 mmol de la amina correspondiente. A continuación se mantiene la reacción, a temperatura ambiente, hasta aparición de un precipitado. Por último, se filtra, se lava con éter y se recristaliza de alcohol.

4.7.1- Síntesis del bromuro de 1-[(4-bromofenil)carbonilmetil]-3-hidroxiquinuclidinio (88, FK44).

P.f. : 279 - 280 °C

D.R. : MeOH

Rdto.: 82% (Obtenido 0.35 g)

A.E. : (C₁₅H₁₈NO₂Br)

Teórico C: 44.58, H: 4.48, N: 3.46

Obtenido C: 44.59, H: 4.83, N: 3.51

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.89 (d, *J* = 8.54, 2H, H-3), 7.82 (d, *J* = 8.49, 2H, H-2), 5.62 (d, *J* = 3.18, 1H, OH), 5.18 (s, 2H, H-2'), 4.09 (m, 1H, H-3''), 3.88 (t, *J* = 10.89, 1H, H-2''e), 3.72 (m, 4H, H-6), 3.51 (t, *J* = 10.85, 1H, H-2''a), 2.15 (m, 1H, H-4''), 2.02 (m, 2H, H-5''), 1.82 (m, 2H, H-5'').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 190.53 (C-1'), 133.59 (C-4), 132.10 (C-3), 130.02 (C-2), 128.87 (C-1), 65.07 (C-2'), 63.48 (C-3''), 63.31 (C-2''), 54.93 (C-6''), 54.21 (C-6''), 25.49 (C-4''), 20.90 (C-5''), 17.41 (C-5'').

4.7.2- Síntesis del bromuro de 1-[(4-bromofenil)carbonilmetil]-4-dimetilamino piridinio (89, FK45).

P.f. : 253 - 5 °C

D.R. : MeOH

Rdto.: 81% (Obtenido 0.26 g)

A.E. : (C₁₅H₁₆N₂OBr · 1 H₂O)

Teórico C: 43.08, H: 4.33, N: 6.70

Obtenido C: 42.68, H: 4.50, N: 6.81

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.18 (d, *J* = 7.55, 2H, H-2"), 7.94 (d, *J* = 8.51, 2H, H-3), 7.84 (d, *J* = 8.47, 2H, H-2), 7.11 (d, *J* = 7.54, 2H, H-3"), 5.97 (s, 2H, H-2'), 3.21 (s, 6H, CH₃-*N*).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 191.77 (C-1'), 156.01 (C-4"), 143.20 (C-2"), 132.91 (C-4), 132.16 (C-3), 130.04 (C-2), 128.50 (C-1), 107.40 (C-3"), 62.31 (C-2'), 39.76 (CH₃-*N*).

4.7.3- Síntesis del bromuro de 1-[(4-bromofenil)carbonilmetil]-4-(1-pirrolidino) piridinio (90, FK46).

P.f. : 280 - 2 °C

D.R. : MeOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.37 g)

A.E. : (C₁₇H₁₈N₂OBr)

Teórico C: 47.91, H: 4.25, N: 6.57

Obtenido C: 47.81, H: 4.36, N: 6.74

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.16 (d, *J* = 7.30, 2H, H-2"), 7.94 (d, *J* = 8.45, 2H, H-3), 7.84 (d, *J* = 8.40, 2H, H-2), 6.96 (d, *J* = 7.30, 2H, H-3"), 5.95 (s, 2H, H-2'), 3.51 (t, *J* = 6.48, 4H, H₂_{pirr}), 2.00 (t, *J* = 6.46, 4H, H-3_{pirr}).

^{13}C -RMN (DMSO- d_6) 191.77 (C-1'), 153.14 (C-4"), 143.14 (C-2"), 132.90 (C-4), 132.11 (C-3), 129.98 (C-2), 128.53 (C-1), 107.96 (C-3"), 62.33 (C-2'), 48.34 (C-2_{pit}).

4.8.- Metodo general de síntesis de derivados de fenilpropilo: Grupo F.

A 8 ml de tetrahidrofurano conteniendo 0.2 g (1 mmol) de 3-bromopropilfenilo, se adiciona con agitación 1 mmol de la amina apropiada. Se mantiene la reacción, a temperatura ambiente, hasta aparición de un precipitado. Se filtra, se lava con éter y se recristaliza de alcohol.

4.8.1- Síntesis del bromuro de 1-(fenilpropil)-3-hidroxiquinuclidinio 91 (FK38).

P.f. : 145 - 7 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 76% (Obtenido 0.21 g)

A.E. : (C₁₆H₂₃NOBr. 0,25 H₂O)

Teórico C: 58.31, H: 7.18, N: 4.25

Obtenido C: 58.72, H: 7.57, N: 4.36

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.30 - 7.20 (m, 5H, H_{arom}), 5.56 (s, 1H, OH), 4.04 (m, 1H, H-3"), 3.66 (t, *J* = 11.92, 1H, H-2"e), 3.41 (m, 1H, H-2"a), 3.35 (m, 4H, H-6"), 3.20 (t, *J* = 8.18, 2H, H-3'), 2.57 (t, *J* = 7.80, 2H, H-1'), 2.09 (m, 1H, H-4"), 1.97 (m, 2H, H-2'), 1.87 (m, 2H, H-5"), 1.71 (m, 2H, H-5").

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 140.34 (C-1), 128.40 (C-2), 128.27 (C-4), 126.18 (C-3), 63.38 (C-3"), 62.57 (C-3'), 53.98 (C-2"), 52.63 (C-6"), 31.78 (C-1'), 26.33 (C-4"), 23.08 (C-2'), 20.92 (C-5"), 17.38 (C-5").

4.8.2.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilpropil)-4-dimetilaminopiridinio 92 (FK39).

P.f. : 190 - 1 °C

D.R. : *i*-PrOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.25 g)

A.E. : (C₁₆H₂₁N₂Br. 0,16 H₂O)

Teórico C: 59.26, H: 6.63, N: 8.64

Obtenido C: 59.37, H: 6.61, N: 8.64

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.34 (d, *J* = 7.63, 1H, H-2"), 7.30 - 7.20 (m, 5H, H_{arom}), 7.03 (d, *J* = 7.65, 1H, H-3"), 4.22 (t, *J* = 7.20, 2H, H-3'), 3.17 (s, 6H, CH₃-N), 2.56 (t, *J* = 7.48, 2H, H-1'), 2.10 (m, 2H, H-2').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 155,77 (C-4"), 141.94 (C-2"), 140.44 (C-1), 128.32 (C-2), 128.09 (C-4), 125.95 (C-3), 107.60 (C-3"), 56.39 (C-3'), 39.60 (CH₃-N), 31.70 (C-1'), 31.52 (C-2').

4.8.3.- Síntesis del bromuro de 1-(fenilpropil)-4-(1-pirrolidino)piridinio (93, FK40).

P.f. : 106 - 8 °C

D.R. : *i*-PrOH

Rdto.: 75% (Obtenido 0.25 g)

A.E. : (C₁₈H₂₃N₂Br. 1,16 H₂O)

Teórico C: 58.69, H: 6.93, N: 7.60

Obtenido C: 58.72, H: 6.84, N: 7.74

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.34 (d, *J* = 7.40, 2H, H-2"), 7.30 - 7.20 (m, 5H, H_{arom}), 6.88 (d, *J* = 7.41, 2H, H-3"), 4.22 (t, *J* = 7.17, 2H, H-3'), 3.48 (t, *J* = 6.56, 4H, H-2_{pirr}), 2.56 (t, *J* = 7.49, 2H, H-1'), 2.08 (m, 2H, H-2'), 1.99 (t, *J* = 6.71, 4H, H-3_{pirr}).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 152,95 (C-4"), 141.98 (C-2"), 140.52 (C-1), 128.40 (C-2), 128.66 (C-4), 126.02 (C-3), 108.25 (C-3"), 56.49 (C-3'), 48.26 (C-2_{pirr}), 31.87 (C-1'), 31.58 (C-2'), 24.67 (C-3_{pirr}).

4.9.- Metodo general de síntesis de derivados de fenetol: Grupo G.

A una disolución de 0.201 g (1 mmol) de 2-bromofenetol en 8 ml de tetrahidrofurano, se adiciona con agitación 1 mmol de la correspondiente amina, manteniéndose la reacción, a temperatura ambiente, hasta aparición de un precipitado. Posteriormente se filtra, se lava con éter y se recristaliza de alcohol.

4.9.1- Síntesis del bromuro de 1-(fenoxietil)-N-metilpiperidinio (96, FK31).

P.f. : 126 - 8 °C

D.R. : *i*-PrOH

Rdto.: 85% (Obtenido 0.26 g)

A.E. : (C₁₄H₂₂NOBr. 0,75 H₂O)

Teórico C: 53.62, H: 7.49, N: 4.46

Obtenido C: 53.62, H: 7.82, N: 4.56

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.32 (t, *J* = 7.64, 2H, H-3), 7.00 (m, 3H, H-2 y H-4), 4.46 (t, *J* = 4.75, 2H, H-3'), 3.85 (t, *J* = 4.75, 2H, H-2'), 3.47 (m, 4H, H-2''), 3.16 (s, 3H, CH₃-N), 1.82 (m, 4H, H-3''), 1.54 (t, 2H, H-4'').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 157.33 (C-1), 129.52 (C-2), 121.27 (C-4), 114.64 (C-3), 61.32 (C-3'), 60.95 (C-2''), 60.79 (C-2'), 47.90 (CH₃-N), 20.10 (C-3''), 19.30 (C-4'').

4.9.2.- Síntesis del bromuro de 1-(fenoxietil)-3-hidroxiquinuclidinio (97, FK41).

P.f. : 160 - 1 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 84% (Obtenido 0.28 g)

A.E. : (C₁₅H₂₁NO₂Br. 0,16 H₂O)

Teórico C: 54.55, H: 6.58, N: 4.24

Obtenido C: 54.87, H: 6.95, N: 4.38

¹H-RMN(DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.31 (t, *J* = 7.71, 2H, H-3), 6.97 (m, 3H, H-2 y H-4), 5.56 (d, *J* = 3.52, 1H, OH), 4.40 (t, *J* = 4.64, 2H, H-3'), 4.05 (m, 1H, H-3''), 3.80 (m, 1H, H-2''e), 3.65 (t, *J* = 4.74, 2H, H-2'), 3.47 (m, 4H, H-6''), 3.18 (m, 1H, H-2''a), 2.11 (m, 1H, H-4''), 1.90 (m, 2H, H-5''), 1.75 (m, 2H, H-5'').

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 157.33 (C-1), 129.57 (C-2), 121.33 (C-4), 114.66 (C-3), 63.38 (C-3''), 62.01 (C-3'), 60.80 (C-2''), 54.71 (C-6''), 53.59 (C-6''), 26.30 (C-4''), 20.99 (C-5''), 17.43 (C-5'').

4.9.3.- Síntesis del bromuro de 1-(fenoxietil)-4-dimetilaminopiridinio (98, FK42).

P.f. : 140 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.26 g)

A.E. : (C₁₅H₁₉N₂OBr. 1,25 H₂O)

Teórico C: 52.10, H: 6.26, N: 8.15

Obtenido C: 51.77, H: 6.30, N: 8.21

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.35 (d, *J* = 7.63, 2H, H-2''), 7.26 (t, *J* = 7.84, 1H, H-3), 7.04 (d, *J* = 7.65, 2H, H-3''), 6.93 (t, *J* = 7.35, 2H, H-4), 6.88 (d, *J* = 8.21, 2H, H-2), 4.58 (t, *J* = 4.91, 2H, H-3'), 4.33 (t, *J* = 4.87, 2H, H-2'), 3.16 (s, 6H, CH₃-N).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 157.60 (C-1), 155.96 (C-4''), 142.44 (C-2''), 129.55 (C-2), 121.21 (C-4), 114.50 (C-3), 107.45 (C-3''), 66.32 (C-3'), 55.83 (C-2'), 39.73 (CH₃-N).

4.9.4.- Síntesis del bromuro de 1-(fenoxietil)-4-(1-pirrolidino)piridinio (99, FK43).

P.f. : 165 - 6 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 76% (Obtenido 0.26 g)

A.E. : (C₁₇H₂₁N₂OBr. 1 H₂O)

Teórico C: 55.59, H: 6.31, N: 7.62

Obtenido C: 55.44, H: 6.18, N: 7.71

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.34 (d, *J* = 7.60, 2H, H-2"), 7.30 - 7.00 (m, 5H, H_{arom}), 6.88 (d, *J* = 7.56, 2H, H-3"), 4.58 (t, *J* = 5.02, 2H, H-3'), 4.33 (t, *J* = 4.81, 2H, H-2'), 3.48 (t, *J* = 6.92, 4H, H-2_{pirr}), 2.00 (t, *J* = 6.69, 4H, H-3_{pirr}).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 157.62 (C-1), 153.10 (C-4"), 142.44 (C-2"), 129.58 (C-2), 121.21 (C-4), 114.47 (C-3), 108.05 (C-3"), 66.36 (C-3'), 55.89 (C-2'), 48.29 (C-2_{pirr}), 24.65 (C-3_{pirr}).

4.10.- Metodo general de síntesis de derivados de benzoato de etilo: Grupo H.

A 8 ml de tetrahidrofurano conteniendo 1 mmol de amina apropiada, se adiciona con agitación 0.35 ml de 2-bromoetilbenzoato. Se mantiene la reacción, a temperatura ambiente, hasta aparición de un precipitado. Se filtra, se lava con éter y se recristaliza del correspondiente alcohol.

4.10.1.- Síntesis del bromuro de 1-(benzoiloxietil)-2-(hidroxietil)dimetilamonio (100, FK66).

P.f. : 133 - 5 °C

D.R. : *i*-PrOH

Rdto.: 77% (Obtenido 0.25 g)

A.E. : (C₁₇H₁₄NOBr)

Teórico C: 48.38, H: 6.35, N: 4.34

Obtenido C: 48.62, H: 6.28, N: 4.21

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.01 (d, *J* = 7.26, 2H, H-2), 7.70 (t, *J* = 7.38, 1H, H-4), 7.56 (t, *J* = 7.63, 2H, H-3), 5.35 (t, *J* = 4.87, 1H, OH), 4.72 (m, 2H, H-3'), 3.90 (t, *J* = 7.27, 4H, H-4' y H-2''), 3.59 (t, *J* = 4.62, 2H, H-3''), 3.24 (s, 6H, CH₃-N).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 165.10 (C-1'), 133.58 (C-2), 129.28 (C-4), 129.12 (C-1), 128.77 (C-3), 65.57 (C-3'), 62.73 (C-2''), 58.51 (C-4'), 54.85 (C-3''), 51.41 (CH₃-N).

4.10.2- Síntesis del bromuro de 1-(benzoiloxietil)-*N*-metilpiperidinio (101, FK63).

P.f. : 150 - 1 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 80% (Obtenido 0.26 g)

A.E. : (C₁₄H₂₂NO₂Br)

Teórico C: 53.17, H: 7.01, N: 4.43

Obtenido C: 53.42, H: 7.12, N: 4.56

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 7.99 (d, *J* = 7.49, 2H, H-2), 7.69 (t, *J* = 7.40, 1H, H-4), 7.55 (t, *J* = 7.67, 2H, H-3), 4.73 (t, *J* = 4.28, 2H, H-3'), 3.89 (t, *J* = 4.41, 2H, H-4'), 3.48 (m, 4H, H-2"), 3.18 (s, 3H, CH₃-*N*), 1.83 (m, 4H, H-3"), 1.54 (m, 2H, H-4").

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 165.15 (C-1'), 133.67 (C-2), 129.28 (C-4), 129.15 (C-1), 128.87 (C-3), 64.80 (C-3'), 61.61 (C-2"), 58.08 (C-4'), 47.63 (CH₃-*N*), 20.52 (C-3"), 19.29 (C-4").

4.10.3.- Síntesis del bromuro de 1-(benzoiloxietil)-3-hidroxiquinuclidinio (102, FK64).

P.f. : 199 - 201 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 75% (Obtenido 0.25 g)

A.E. : (C₁₆H₂₂NO₃Br. 0,25 H₂O)

Teórico C: 53.27, H: 6.28, N: 3.88

Obtenido C: 53.51, H: 6.26, N: 3.89

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.01 (d, *J* = 7.45, 2H, H-2), 7.69 (t, *J* = 7.41, 1H, H-4), 7.56 (t, *J* = 7.65, 2H, H-3), 5.59 (d, *J* = 3.41, 1H, OH), 4.69 (t, *J* = 4.12, 2H, H-3'), 4.08 (m, 1H, H-3"), 3.85 (m, 1H, H-2"e), 3.73 (t, *J* = 4.32, 2H, H-4'), 3.59 (m, 1H, H-2"a), 3.51 (m, 4H, H-6"), 2.14 (m, 1H, H-4"), 1.93 (m, 4H, H-5"), 1.77 (m, 4H, H-5").

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 165.04 (C-1'), 135.06 (C-2), 129.25 (C-4), 129.15 (C-1), 128.79 (C-3), 63.62 (C-3'), 63.32 (C-3"), 61.70 (C-2"), 57.91 (C-4'), 54.56 (C-6"), 53.22 (C-6"), 26.28 (C-4"), 20.99 (C-5"), 17.39 (C-5").

4.10.4.- Síntesis del bromuro de 1-(benzoiloxietil)-4-(1-pirrolidino)piridinio (103, FK68).

P.f. : 185 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 75% (Obtenido 0.28 g)

A.E. : (C₁₈H₂₁N₂O₂Br. 0,25 H₂O)

Teórico C: 56.62, H: 5.67, N: 7.33

Obtenido C: 56.24, H: 5.54, N: 7.52

¹H-RMN (DMSO-*d*₆) δ (ppm) 8.39 (d, *J* = 7.47, 2H, H-2"), 7.93 (d, *J* = 7.44, 2H, H-2), 7.67 (t, *J* = 7.42, 1H, H-4), 7.53 (t, *J* = 7.67, 2H, H-3), 6.91 (d, *J* = 7.48, 2H, H-3"), 4.61 (m, 4H, H-3' y H-4'), 3.47 (t, *J* = 6.63, 4H, H-2_{pirr}), 1.98 (m, 4H, H-3_{pirr}).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆) 165.14 (C-1'), 153,11 (C-4"), 142.26 (C-2"), 133.58 (C-2), 129.16 (C-4), 128.94 (C-1), 128.75 (C-3), 108.14 (C-3"), 63.49 (C-3'), 55.47 (C-4'), 48.26 (C-2_{pirr}), 24.55 (C-3_{pirr}).

4.10.5.- Síntesis del bromuro de 1-(benzoiloxietil)-4-dimetilaminopiridinio (104, FK67).

P.f. : 188 - 190 °C

D.R. : EtOH

Rdto.: 75% (Obtenido 0.25 g)

A.E. : (C₁₆H₂₀N₂O₂Br. 0,33 H₂O)

Teórico C: 53.72, H: 5.86, N: 7.83

Obtenido C: 53.36, H: 5.60, N: 8.22

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ (ppm) 8.42 (d, $J = 7.61$, 2H, H-2"), 7.93 (d, $J = 7.40$, 2H, H-2), 7.67 (t, $J = 7.45$, 1H, H-4), 7.53 (t, $J = 7.68$, 2H, H-3), 7.07 (d, $J = 7.65$, 2H, H-3"), 4.62 (m, 4H, H-3' y H-4'), 3.16 (s, 6H, $\text{CH}_3\text{-N}$).

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6) 165.10 (C-1'), 155.90 (C-4"), 142.30 (C-2"), 135.57 (C-2), 129.16 (C-4), 128.88 (C-1), 128.76 (C-3), 107.55 (C-3"), 63.48 (C-3'), 55.38 (C-4'), 39.70 ($\text{CH}_3\text{-N}$).

4.10.6.- Síntesis del bromuro de 1-(benzoiloxietil)isoquinolinio (105, FK65).

A 5 ml de isoquinoleína, se le adiciona con agitación 0.35 ml (2mmol) de 2-bromoetilbenzoato manteniéndose la reacción, a temperatura ambiente, hasta aparición de un precipitado. A continuación se filtra, se lava con éter y se recristaliza de etanol obteniéndose 0.7 g (1.95 mmoles) de un polvo de color naranjado. Rendimiento = 98 %. Pf. 166 - 8 °C.

A.E. : ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{NO}_2\text{Br}$, 0,25 H_2O)

Teórico C: 59.60, H: 4.58, N: 3.86

Obtenido C: 59.78, H: 4.48, N: 3.84

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) δ (ppm) 10.35 (s, 1H, H-8"), 8.99 (d, $J = 6.82$, 1H, H-2"), 8.67 (d, $J = 6.79$, 1H, H-3"), 8.54 (d, $J = 8.32$, 1H, H-7"), 8.38 (d, $J = 8.29$, 1H, H-4"), 8.28 (t, $J = 8.00$, 1H, H-6"), 8.09 (t, $J = 7.72$, 1H, H-5"), 7.92 (d, $J = 8.03$, 2H, H-2), 7.65 (t, $J = 7.49$, 1H, H-4), 7.50 (t, $J = 7.68$, 2H, H-3), 5.22 (t, $J = 4.61$, 2H, H-3'), 4.88 (t, $J = 4.57$, 2H, H-4').

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6) 165.13 (C-1'), 150.88 (C-8"), 137.14 (C-2"), 135.41 (C-3"), 133.65 (C-2), 131.29 (C-7"), 130.40 (C-4"), 129.26 (C-4), 128.86 (C-1), 128.77 (C-3), 127.31 (C-6"), 125.73 (C-5"), 63.41 (C-3'), 59.52 (C-4').

4.11.- Ensayos biológicos.

4.11.1.- Inhibición de la actividad de la colina quinasa

La inhibición de la producción de *PCho* se puede conseguir mediante la inhibición de la enzima colina quinasa (ChoK). Los compuestos que se han sintetizado son inhibidores de la colina quinasa. Para medir su actividad se han empleado tanto sistemas *ex vivo* (en tubo de ensayo, libre de células) como *in vitro* (en células vivas intactas). En la actualidad se disponen de diversos métodos alternativos y fiables para la determinación de la actividad de la colina quinasa *ex vivo* o la determinación de los niveles intracelulares de *PCho* (análisis *in vitro*). A continuación se detallan, como ejemplos, un método para cada análisis:

4.11.1.1.- Ensayo *ex vivo* de inhibidores de la colina quinasa.

En nuestro ensayo utilizamos, por su sencillez y economía, colina quinasa de levaduras comercializada por diversas firmas. Se puede utilizar también colina quinasa de células de mamíferos, incluyendo humanos. El procedimiento experimental es como se describe a continuación:

“- Se prepara el tampón de reacción 10X (1M Tris pH 8,0, 100 mM MgCl₂ y 2 mM (¹⁴C)-metil-Colina (20 μCi/ml), ATP 100 mM)

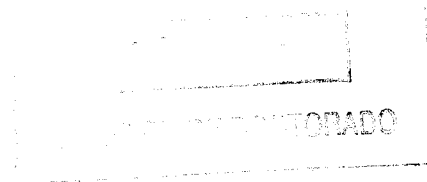
- Se prepara una solución de colina quinasa de levadura (50 mU/ml) a partir de una preparación comercial de 1U/ml.

- Se preparan las distintas concentraciones de los compuestos a analizar, con una concentración de 5X en agua.

- Se mezclan 20 ml del buffer de reacción + 10 μl del compuesto (o agua en los controles) + 10 μl agua + 10 μl colina quinasa.

- Se incuba 45 min. a 37°C.

- Se detiene la reacción añadiendo 10 μl EDTA 500 mM y se mantienen las muestras en hielo.



4.11.2.- Ensayo de inhibición de la proliferación celular.

Las células ($3 \cdot 10^4$ /pocillo) se sembraron en placas con 24 pocillos y se incubaron 24 horas en DMEM adicionado de 10% de NCS. A continuación las células se lavaron con el tampon TD y se incubaron en DMEM adicionado de la cantidad adecuada de serum y diferentes concentraciones del inhibidor de colina quinasa. Transcurridos tres días, se aspiraron los pocillos y se adicionaron medios frescos donde se incubaron las células otros tres días. Las células restantes en cada pocillo se cuantificaron utilizando un metodo modificado del cristal violeta¹²⁵. Las células se lavaron con el tampon TD y se fijaron con una solución al 1% de glutaraldehido durante 15 minutos. Despues de lavar de nuevo con el tampon TD, los nucleos de las células se tinieron con una solución al 1% de cristal violeta durante 30 minutos y se lavaron con agua distilada. La capa adsorbida se resuspendió en una solución de acido acético al 10% y se determinó la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro. El análisis estadístico del efecto de cada inhibidor de la colina quinasa se realizó con el test student.

5.- CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

1ª.- La hipótesis de partida de este trabajo, formulada como “**la inhibición de la enzima colina quinasa es una nueva aproximación al diseño de fármacos selectivos con actividad antitumoral**”, ha quedado plenamente confirmada tras la realización de esta Tesis Doctoral, que ha dado origen, junto con otras investigaciones del grupo, a una patente internacional (PCT) de la Universidad de Granada. Quince de los compuestos diseñados y sintetizados han resultado ser buenos inhibidores de la citada enzima en ensayos realizados *ex vivo*.

2ª.- Los compuestos que muestran mayor afinidad química *ex vivo* por la enzima colina quinasa son derivados de hemicolinio HC-3 y/o de su molécula “mitad” HC-15; es decir, todos

ellos son *N*-arilcarbonilmetil derivados de diferentes cabezas catiónicas, entre las que cabe mencionar la formada principalmente por la agrupación 3-hidroxiquinuclidinio. Tal grupo mimetiza muy bien a la molécula de colina, sustrato natural de la enzima. Sin embargo, los derivados *N*-ariletíl-, *N*-arilpropil-, *N*-ariloxietil- y *N*-arilbenzoxietil- de las citadas cabezas catiónicas resultan inactivos como inhibidores de la enzima colina quinasa.

3ª.- Se propone por primera vez un mecanismo justificativo de la fosforilación de la molécula de colina mediante la acción de la enzima colina quinasa, ATP y Mg^{++} . El aminoácido clave en esta acción fosforilante es, como se ha propuesto anteriormente, la histidina 303. El sitio activo debe estar formado por, además del aminoácido histidina, un aminoácido ácido (provisto de grupo carboxilato adicional) en la proximidad del sitio catiónico, que debe estabilizar la carga positiva de la molécula de colina, y, al menos, otro aminoácido ácido (provisto de grupo carboxilato adicional) en la cercanía de la molécula de histidina 303. Este último grupo carboxilato debe provocar un aumento de la basicidad del átomo de nitrógeno imidazólico. En estas condiciones resultaría posible el intercambio de un protón entre colina e histidina 303, paso previo a la fosforilación. Las interacciones enzima-sustrato propuestas por nosotros tienen diversos orígenes, siendo más importantes la interacción ion-ion y la debida al enlace de hidrógeno que se establece entre colina e histidina. Obviamente, deberá existir una energía debida a la entropía, que no se ha considerado en la Memoria pero que, como siempre, debe tener una extraordinaria importancia.

4ª.- Se han obtenido compuestos que son mucho más activos que el prototipo de partida frente a colina quinasa *ex vivo*. Así, si se comparan los valores CI_{50} encontrados para el prototipo **1** (500 μM ; HC-3, FK14) y para los compuestos **56** (0.5 μM ; FK21, 1.000 veces más activo que **1**), **41** (3.5 μM ; FK23, 143 veces más activo que **1**), **30** (7 μM ; FK8, 71 veces más activo que **1**), **54** (13 μM ; FK7, 38 veces más activo que el prototipo), **55** (30 μM ; FK22, 17 veces más activo que **1**) y **58** (40 μM ; FK3, 12,5 veces más activo que el prototipo), se llega a la conclusión obligada de que la presencia del grupo hidroxilo no es necesaria para que exista una gran afinidad entre la enzima y sus ligandos (véase compuestos **30**, **54**, **55** y **58**, que son más potentes que el propio prototipo), aunque su presencia en el anillo de quinuclidina incrementa notablemente la

afinidad química por la enzima (véase compuestos 56 y 41). Esta conclusión implícitamente conlleva admitir que la forma activa de los inhibidores de colina quinasa es la forma hidroxicarbonílica acíclica y no la cicloetálica. Así se ha podido interpretar las diferencias de actividades encontradas entre el modelo y alguno de sus derivados.

5ª.- Las diferencias de actividad *ex vivo* encontradas entre los *N*-arilcarbonilmetil derivados y sus análogos *N*-ariletil-, *N*-arilpropil-, *N*-ariloxietil- y *N*-arilbenzoxietil-derivados se ha podido justificar en base a las diferencias conformacionales encontradas entre ellos. Así, mientras que los compuestos activos muestran preferencias por las conformaciones en las que el anillo bencénico y el anillo heterocíclico se sitúan en disposiciones casi perpendiculares, los compuestos inactivos muestran preferencias por conformaciones más estiradas. De esta forma, podemos sugerir que el sitio activo de la enzima muestra restricciones estéricas muy severas que obligan a los ligandos sintéticos a tomar conformaciones muy cerradas, entendiéndose por ello lo antes mencionado, es decir, que el anillo bencénico y el anillo heterocíclico se sitúan en disposiciones casi perpendiculares. En esta conclusión se entiende por conformaciones preferentes todas las que se encuentran en un rango de 5 Kcal/mol respecto a la conformación de mínima energía. A tal efecto se ha incluido aquí las gráficas de la distribución conformacional que apoyan nuestra conclusión.

6ª.- No todos los compuestos que poseen buena afinidad por la enzima colina quinasa *ex vivo* muestran buena actividad antiproliferativa. Esto es debido, muy probablemente, a que en algunos casos existen problemas de paso a través de la membrana citosólica ya que la acción se tiene que llevar a cabo en el interior del citosol. Sin embargo, en los casos en los que ha sido posible, debido a la dinámica con que se ha llevado la investigación, se ha encontrado que ***todos los compuestos que presentan buena afinidad química por la enzima, en ensayos realizados in vitro, tanto en células NIH 3T3 como en HT-29, muestran también buena actividad antiproliferativa frente a la línea celular HT-29 que muestra niveles altos de colina quinasa debido a su transformación por oncogenes ras.*** Este es, posiblemente, una de las conclusiones más importantes de esta Tesis Doctoral, puesto que constituye la base del desarrollo de una nueva estrategia selectiva en el diseño de fármacos antitumorales.

7^a.- La investigación desarrollada en esta Memoria ha permitido también encontrar un grupo importante de moléculas que, a pesar de no ser inhibidores de colina quinasa, muestran buenas actividades antiproliferativas frente a la línea tumoral HT-29. Todos estos compuestos son derivados de la estructura de 4-amino(o derivados)piridinio sustituidos en *N*-1 por grupos diferentes del arilcarbonilmetilo. En un estudio de semejanza molecular hemos encontrado que el fragmento 4-aminopiridinio mimetiza bien a la molécula de fosforilcolina. Por todo ello, concluimos que este grupo de compuestos químicos **podrían actuar bloqueando el uso de fosforilcolina como segundo mensajero con actividad mitogénica.**

8^a.- Resumiendo, la investigación desarrollada en esta Memoria ha permitido constatar que la inhibición selectiva de la producción de fosforilcolina mediante bloqueo de la enzima colina quinasa, por un lado, y acción antagonista de los efectos mitogénicos de la fosforilcolina, por otro lado, pueden ser consideradas como dos nuevas estrategias para el diseño de fármacos antiproliferativos selectivos.

6.- BIBLIOGRAFÍA

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- (1) De Vita, V. T.; Helman, S. y Rosenberg, S. A.; *Cancer, Principles and practice of Oncology*, 4th edición. JB Lippincott Com., Philadelphia, USA, 1993.
- (2) MacDonald, J.S.; Haller, D. G. y Mayer, R. J.; *Manual Of Oncologic Therapeutics*, 3rd edition. JB Lippincott Com., Philadelphia, USA, 1995.
- (3) Kerr, D. J. y Workman, P.; *New Molecular for Cancer Chemoterapy*. CRC press, Boca Raton, Florida, USA, 1994.
- (4) Lacal, J. C.; Moscat, J. y Aaronson, S. A.; *Nature*, 330, 269, 1987.
- (5) Macara, I.; *Mol. Cell. Biol.*; 10, 325, 1989.
- (6) Lacal, J. C.; *Mol. Cell. Biol.*; 10, 333, 1990.
- (7) Teergaden; D.; Taparowsky, E. J. y Kent, C.; *J. Biol. Chem.*, 265, 16638, 1990.
- (8) Cuadrado, A.; Carnero, A.; Dolfi, F.; Jimenez, B. y Lacal, J. C.; *Oncogene*, 8, 2959, 1993.
- (9) Carnero, A.; Cuadrado, A.; Del Peso, L. y Lacal, J. C.; *Oncogene*, 9, 1387, 1994.
- (10) Jimenez, B.; Del Peso, L.; Montaner, S.; Esteve, B. y Lacal, J. C.; *J. Cell. Biochem.*, 57, 141, 1995.
- (11) Ratman, S. y Kent, C.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 323, 313, 1995.
- (12) Pelech, S. L. y Vance, D. E.; *Biochem. Biophys. Acta*, 779, 217, 1984.
- (13) Bhakoo, K. K.; Williams, S. R.; Florian, C. L.; Land, H. y Noble, M. D.; *Cancer Res.*, 56, 4630, 1996.
- (14) Cannon, J. G.; *Med. Res. Rev.*, 14, 5, 505, 1994.
- (15) Hamza, M.; Lloveras, J.; Ribbes, G. y Soula, G.; *Biochem. Pharm.*, 32, 12, 1893, 1983.
- (16) Vance, D. E. y Vance; J. E. Eds.; *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, New

comprehensive Biochemistry, vol. 20, Elsevier science, New York, 1991.

(17) Kohei, H.; Tsotomu kodaki y Satochi, Y.; *J. Biochem. Chem.*, 264, 4, 2053, 1989.

(18) Cantor, C. R. y Schimmel, R. R.; *Biophysical chemistry*, Ed. Freeman and co.; New York, 1980.

(19) Gurr, M. I. y Harwood, J. L. ; *Lipid Biochemistry*, 4ª Ed, Chapman & Hall, London, 1990.

(20) Braquet, P.; Touqui, L.; Shen, T. Y. y Vargaftig, B. B. ; *Pharmacol. Rev*, 39, 97, 1987.

(21) Mead, J. F.; Alfin-Slter, R. B.; Howton, D. R. y Pepjak, G.; *Lipid; Chemistry, Biochemistry and Nutricion*, Ed. Plenum-Press, New York, 1986.

(22) Exton, J. H.; *J. Biol. Chem.*, 265, 1, 1990.

(23) Pelech, S. L. y Vance, D. E.; *Tibs.*, 14, 28, 1989.

(24) Billah, M. M. y Anthes, J. C.; *Bioch. J.*, 269, 281, 1990.

(25) Stryer, L.; *Bioquimica*, Ed. Reverté, Universidad de Stanford 1990.

(26) Christopher, R. M. y Robert, M. B.; *J. Biol. Chem.*, 269, 20, 14776, 1994.

(27) Waechter, C. J. y colbs.; *J. Biol. Chem.*, 244, 3419, 1969.

(28) Carman, G. M. y Henry, S. A.; *Ann. Rev. Biochem.*, 58, 635, 1989.

(29) Kent, C.; *Ann. Rev. Biochem.*, 64, 315, 1995.

(30) White, M. J.; Lopes, J. M. y Henry, S. A.; *Adv. Microb. Physiol.*, 32, 1, 1991.

(31) Ridgeway, N. D.; *Phosphatidilcoline metab.*, Ed. Devance ; 103, Boca Raton, Fl: CRC. 1989.

(32) Yang, E. K. y colbs.; *Biochem. J.*, 256, 821, 1988.

(33) Wittenberg, J. y Kornberg, A.; *J. Biol. Chem.*, 202, 431, 1953.

(34) Kennedy, E. P. y Weiss, S. B.; *J. Biol. Chem.*, 222, 193, 1956.

- (35) Infante, J. P.; *Biochem. J.*, 167, 847, 1977.
- (36) Vance, D. E. y Choy, P. C.; *Tibs.*, 4, 145, 1979.
- (37) Meyer, E. M.; Engel, D. A. y Cooper, J. R.; *Neurochem. Res.*, 7, 749, 1982.
- (38) Barbacid, M.; *Eur. J. Clin. Invest.*, 20, 225, 1990.
- (39) Vogelstein, B. y Kinzler, K. W.; *Trends in Genetics*, 9, 4, 138, 1993.
- (40) Paradigm, J. M.; *Bishop in Genes and Development*, 9, 11, 1309, 1995.
- (41) Cooper, G. M.; *Oncogenes*, Jones and Bartlett Publishers, Boston, 1995.
- (42) Wernberg, R. A.; *Investigación y ciencia*, Nov. 1996.
- (43) Varmus, H. E.; *Ann. Rev. Genet.*, 18, 553, 1984.
- (44) Tabin, C. J. y colbs.; *Nature*, 300, 143, 1982.
- (45) Massagué, J.; *Ann. Rev. cell. Biol.*, 6, 597, 1990.
- (46) Leal, F.; Williams, L. T.; Robbins, K. C. y Aaronson, S. A.; *Science*, 230, 327, 1985.
- (47) Zhan, X.; Bates, B.; Hu, X. y Goldfarb, M.; *Mol. Cell. Biol.*, 8, 3487, 1988.
- (48a) Yarden, Y. y Ullrich, A.; *Ann. Rev. Biochem.*, 57, 443, 1988.
- (48b) Schlessinger, J. y Ullrich, A.; *Neuron*, 9, 383, 1992.
- (49) Douglas, R. L.; *Ann. Rev. Biochem.*, 62, 851, 1993.
- (50) Thomas, S. M. y colbs.; *Cell*, 68, 1031, 1992.
- (51) Wood, K. W.; Sarnecki, C.; Roberts, T. M. y Blenis, J.; *Cell*, 68, 1041, 1992.
- (52) Leever, S. J. y Marshall, C. J.; *EMBO J.*, 11, 569, 1992.
- (53) Taparowsky, E.; Shimizu, K.; Goldfarb, M. y Wigler, M.; *Cell*, 34, 581 1983.
- (54) Tainsky, M. A.; Shamanski, F. L.; Blair, D. y Vande Woude, G.; *Mol. Cell. Biol.*, 7, 1280 1987.

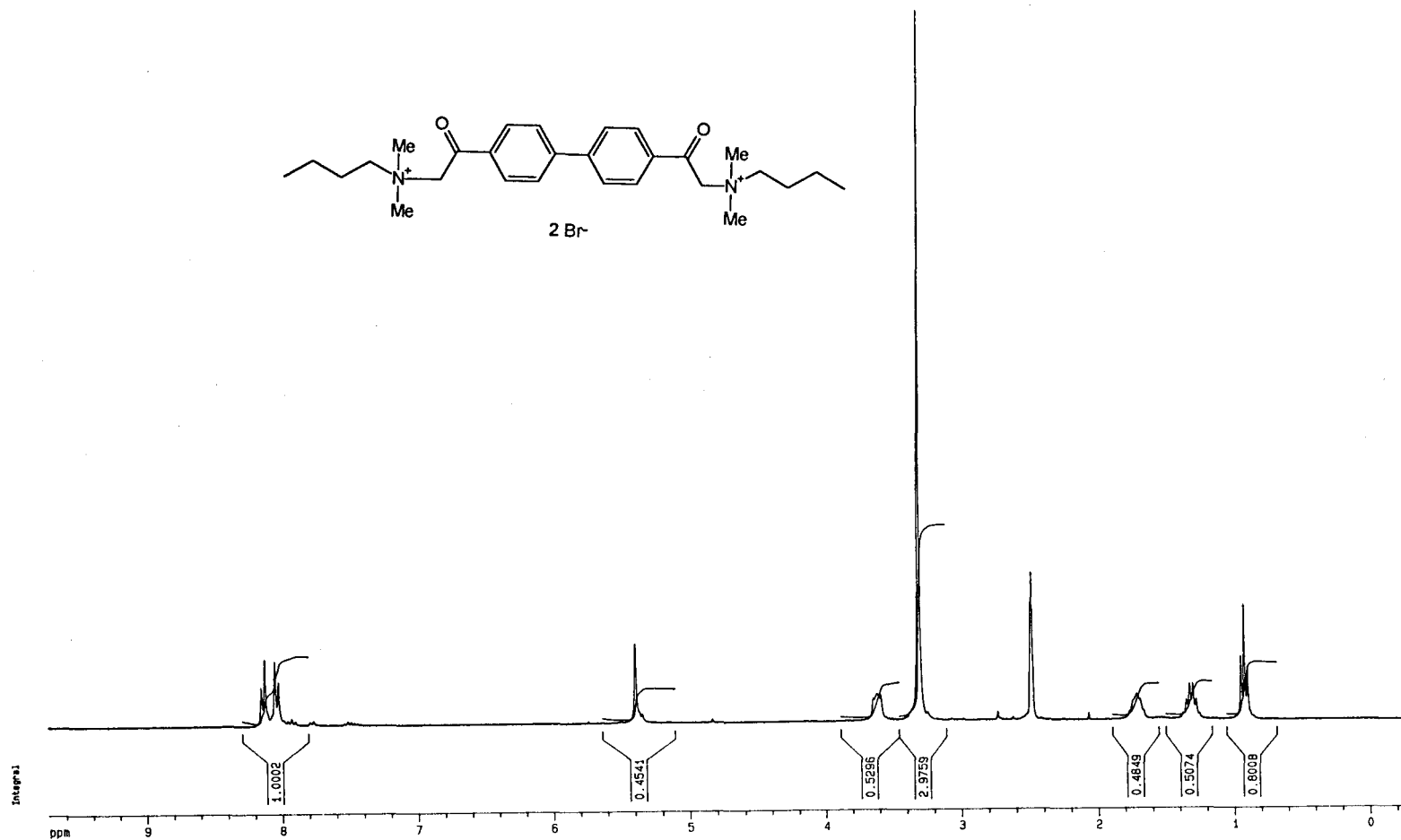
- (55) Barbacid, M.; *Ann. Rev. Biochem.*, 56, 779, 1987.
- (56) Bos, J. L.; *Cancer Res.*, 49, 4682, 1989.
- (57) Rodenhuis, S.; *Semin. Cancer Biol.*, 3,241, 1992.
- (58) Beitel, G. J.; Clark, S. G. y Horvitz, H. R.; *Nature*, 348, 503, 1990.
- (59) Katoaka, T. y colbs.; *Cell*, 37, 437, 1984.
- (60) Hagag, N.; Halegova, S. y Viola, M.; *Nature*, 319, 680, 1986.
- (61) Hall, A.; *Science*, 249, 635, 1990.
- (62) Bourne, H. R.; Sanders, D. A. y Mc Cormick, F.; *Nature*, 348, 125, 1990.
- (63) Trahey, M. y Mc Cormic, F.; *Science*, 238, 542, 1987.
- (64) Settlemany, J. y colbs.; *Nature*, 69, 539, 1992.
- (65) Warden, C. H. y Friedkin, M.; *Biochim. Biophys. Acta*, 792, 270, 1984.
- (66) Warden, C. H y Friedkin, M.; *J. Biol. Chem.*, 260, 6006, 1985.
- (67) Teegarden, D.; Taparowsky, E. J. y Kent, C.; *J. Biol. Chem.*, 265, 6042, 1990.
- (68) Del peso, L. y colbs.; *Bases Moleculares Del Cáncer y sus Aplicaciones Clinicas*, 91, 1996.
- (69) Berridge, H. J.; *Nature*, 361, 315, 1993.
- (70) Nishizuka, Y.; *Science*, 258, 607, 1992.
- (71) Carnero, A. y Lacal, J. C.; *Mol. Cell. Biol.*, 15, 1094, 1995.
- (72) Ansell, G. B. y Spanner, S. G.; *J. Neurochem.*, 22, 1153, 1974.
- (73) Lloveras, J.; Hamza, M.; Chap, H. y Douste-Blazy, L.; *Biochem. Pharm.*, 34, 22, 3987, 1985.
- (74) Reinhardt, R. R. y Wecker, L.; *J. Biol. Chem.*, 259, 12, 7446, 1984.
- (75) Chijiwa, T. y colbs.; *J. Biol. Chem.*, 265, 9, 5267, 1990.

- (76) Wieprecht, M.; Wieder, T. y Geilen, C. C.; *Biochem. J.*, 297, 241, 1994.
- (77) Long, J. P. y Schweler, F. W. ; *J. A. Ph. A. Sci. Ed.*, 43, 79, 1954.
- (78) Barker, L. A. y Mittag, T. W. ; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 192, 86, 1975.
- (79) Reitzel, N. I. y Long, J. P. ; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 127, 15, 1959.
- (80) Gardiner, J. E. ; *J. Physiol.*, 138, 1957.
- (81) Wilson y Gisvold's; *Textbook Of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, Ninth edition, JB Lippincott Com., Philadelphia, USA, 1991.
- (82) Gardiner, J. E. ; *Biochem. J.*, 81, 297, 1961.
- (83) Rodrigez, G. De Lores Amaiz ; Zieher, I. M. y De Robertis, E. ; *J. Neurochem.*, 17, 221, 1970.
- (84) Glavinovic, M. ; Ropert, N. ; Kinjevic, K. y Collier, B. ; *Neuroscience*, 9, 319, 1983.
- (85) Sweiry, J. H. y Yudielevic, D. I. ; *J. Physiol.*, 366, 251, 1985.
- (86) Parsons, S. M. y Rogers, G. A. ; *Annu. Rev. Med. Chem.*, 28, 247, 1993.
- (87) Bhattacharyya, T. K. y colbs.; *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 66, 590, 1985.
- (88) Rodriguez de Lores Arnaiz, G.; Zieher, I. M. y De Robertis, E.; *J. Neurochem.*, 17, 221, 1970.
- (89) Cromwell, N. R. y Tsou, K. C. ; *J. A. Chem. Soc.*, 71, 993, 1949.
- (90) Schweler, F. W. ; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 115, 127, 1955.
- (91) Nyanda, A. M. ; *Ph. D. Tesis*, University of Iowa, Iowa City, IA, 1986.
- (92) Di Augustine, R. P. y Haarstad, V. B. ; *Biochem. Pharmacol.*, 19, 559, 1970.
- (93) Cannon, J. G. ; Lee, T. M-L., Nyalda, A. M., Bhattacharyya, B. y Long, J. P.; *Drug Design and Delivery*, I, 209, 1987.

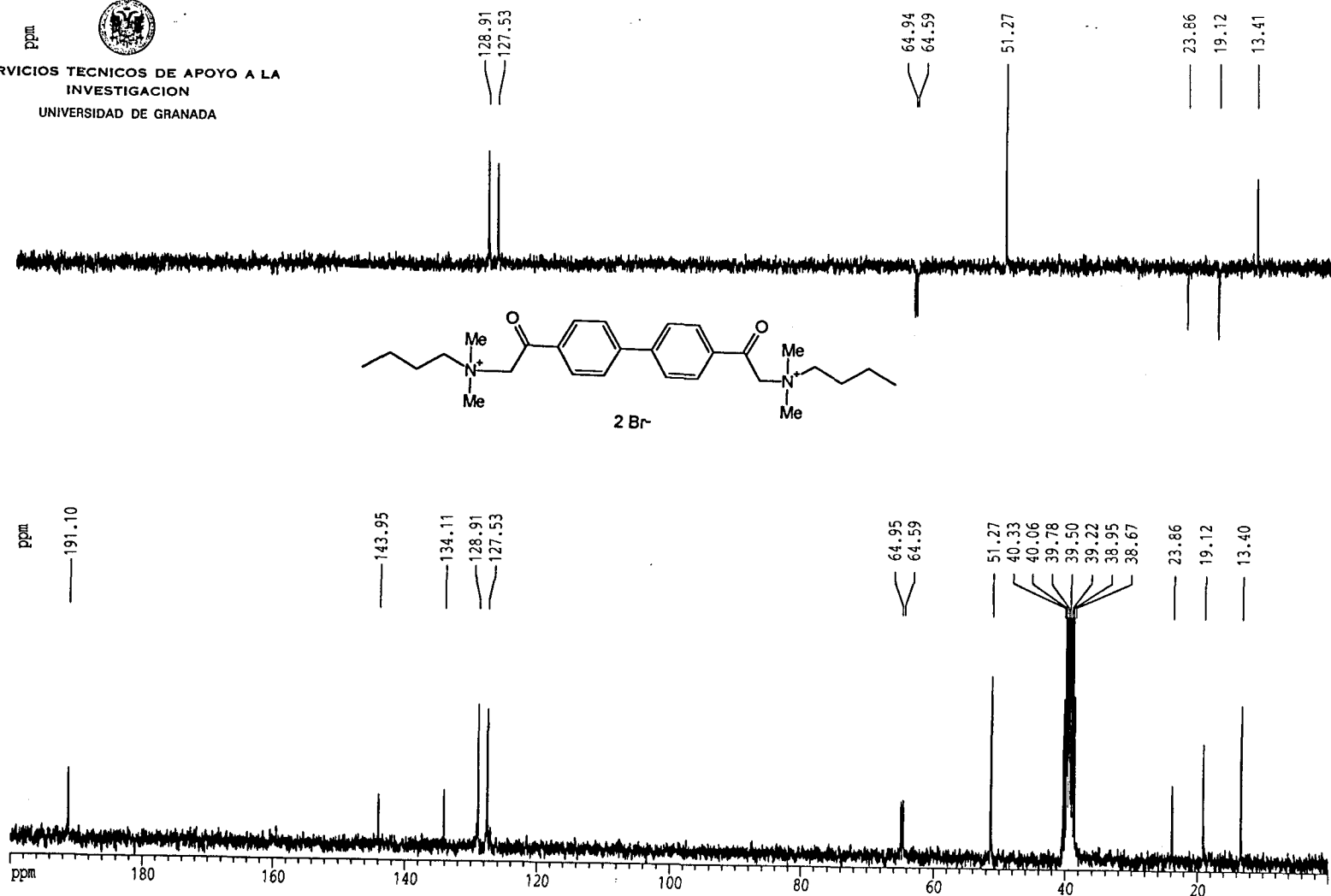
- (94) Chatterjee, T. K. ; Long, J. P. ; Cannon, J. K. y Bhatnagar, R. K. ; *Eur. J. Pharmacol.*, 149, 241, 1988.
- (95) Sterling, G. H. y colbs.; *J. Neurochem.*, 46, 1170, 1986.
- (96) Leo, B. H.; Stelly, T. C.; Colucci, W. J.; Garcia, J. G.; Gandour, R. D. y Quinn, D. M.; *Chem. Res. Toxicol.*, 5, 411, 1992.
- (97) Long, J. P.; Evans, C. T. y Wong, S.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 155, 223, 1967.
- (98) Domer, F. R.; Chihal, D. M.; Charles, H. C. y Rege, A. B.; *J. Med. Chem.*, 20, 59, 1977.
- (99) Smart, L. A., *J. Med. Chem.*, 26, 104, 1983.
- (100) Cannon, J. G. y colbs.; *Pharm. Res.*, 5, 359, 1988.
- (101) Homsworth, B. A.; *Eur. J. Pharmacol.*, 15, 91, 1971.
- (102) Powers, M. F.; Kruger, S. y Schueler, F. W.; *J. Pharm. Sci.*, 51, 27, 1962.
- (103) Domer, F. R.; Chihal, D. M.; Charles, H. C. y Koch, R. C.; *J. Med. Chem.*, 23, 541, 1980.
- (104) Marshall, F. N. y Long, J. P.; *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 127, 236, 1959.
- (105) Shreeve, S. M.; Veitch, G. B. A. y Hemsworth, B. A.; *J. Med. Chem.*, 27, 734, 1984.
- (106) Bove, F. C. y Haarstad, V. B.; *Eur. J. Pharmacol.*, 57, 149, 1979.
- (107) Gylys, K. H y Jenden, D. J.; *Life Science*, 58 1937, 1996.
- (108) Maysinger, D. y colbs.; *Neurochem. Int.*, 15, 531, 1989.
- (109) Benz, F. W. y Long, J. P.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 166, 255, 1969.
- (110) Cannon, J. G.; Sahin, M. F.; Long, J. P.; Flynn, J. R. y Bhatnagar, R. K.; *J. Med. Chem.*, 33, 577, 1990.
- (111) Benz, F. W. y Long, J. P.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 168, 315, 1969.
- (112) Harris, I. W.; Stitcher, D. I. y Heyl, W. C.; *Life Sci.*, 30, 1867, 1982.

- (113) Bhattacharyya, B.; Sokoll, M. D.; Cannon, J. G. y Long, J. P.; *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 288, 136, 1987.
- (114) Cannon, J. G.; Sahin, M. F.; Bhatnagar, R. K.; Flynn, J. R. y Long, J. P.; *J. Med. Chem.*, 34, 1582, 1991.
- (115) Liang, C. Y.; *Ph.D. Thesis*, University of Iowa, Iowa City, IA, 1993.
- (116) Chiou, C. Y. y Long, J. P.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 167, 344, 1969.
- (117) Haastrad, V. B; Domer, F. R et al.; *J. Med. Chem.*, 19, 6, 760, 1976.
- (118) Garcia, J. G.; Fronczek, F. R.; y Gandour, R. D.; *Bioorg. & Med. Chem. Let.*, 2, 2, 157, 1992.
- (119) Katritzky, A. R. y Lagowski, J. M.; 1, 339, 1963.
- (120) Meanwell, N. y colbs.; *J. Med. Chem.*, 36, 3871, 1993.
- (121) Hosaka, K; Tanaka, S.; Nikawa, J. L. y Yamashita, S.; *FEBS Lett.*, 304, 209, 1992.
- (122) Clark, M.; Cramer III, R. D. y Van Opdenbosch; *J. Comput. Chem.*, 10, 982, 1989.
- (123) El programa *Sybyl* esta comercializado por Tripos, INC; 1699 S., Hanley Road, St Louis, Missouri (USA).
- (124a) Gasteiger, J. y Marsili, M.; *Tetrahedron*, 36, 3219, 1980.
- (124b) Gasteiger, J. y Marsili, M.; *Org.Magn. Reson.*, 15, 353, 1981.
- (124c) Marsili, M. y Gasteiger, J.; *Croat. Chem.Acta*, 53, 601, 1980.
- (125) Gillies, R. J. Didier, N. y Denton, M.; *Anal. Biochem.*, 159, 109, 1986.

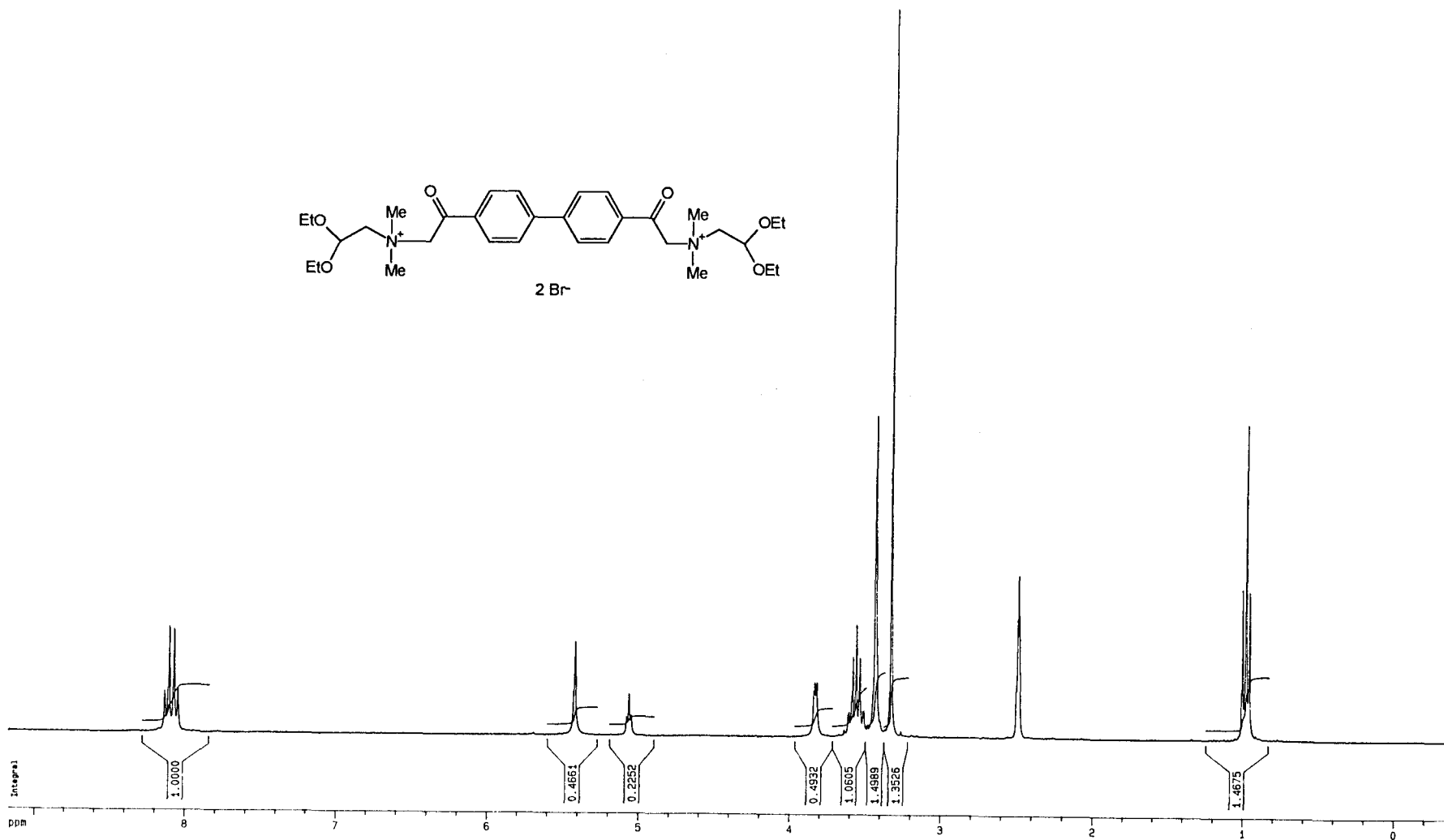
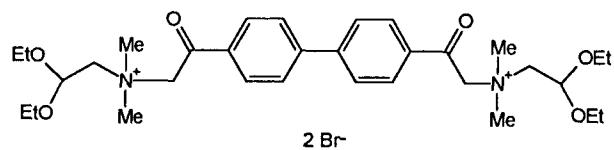
7.- APÉNDICE 1



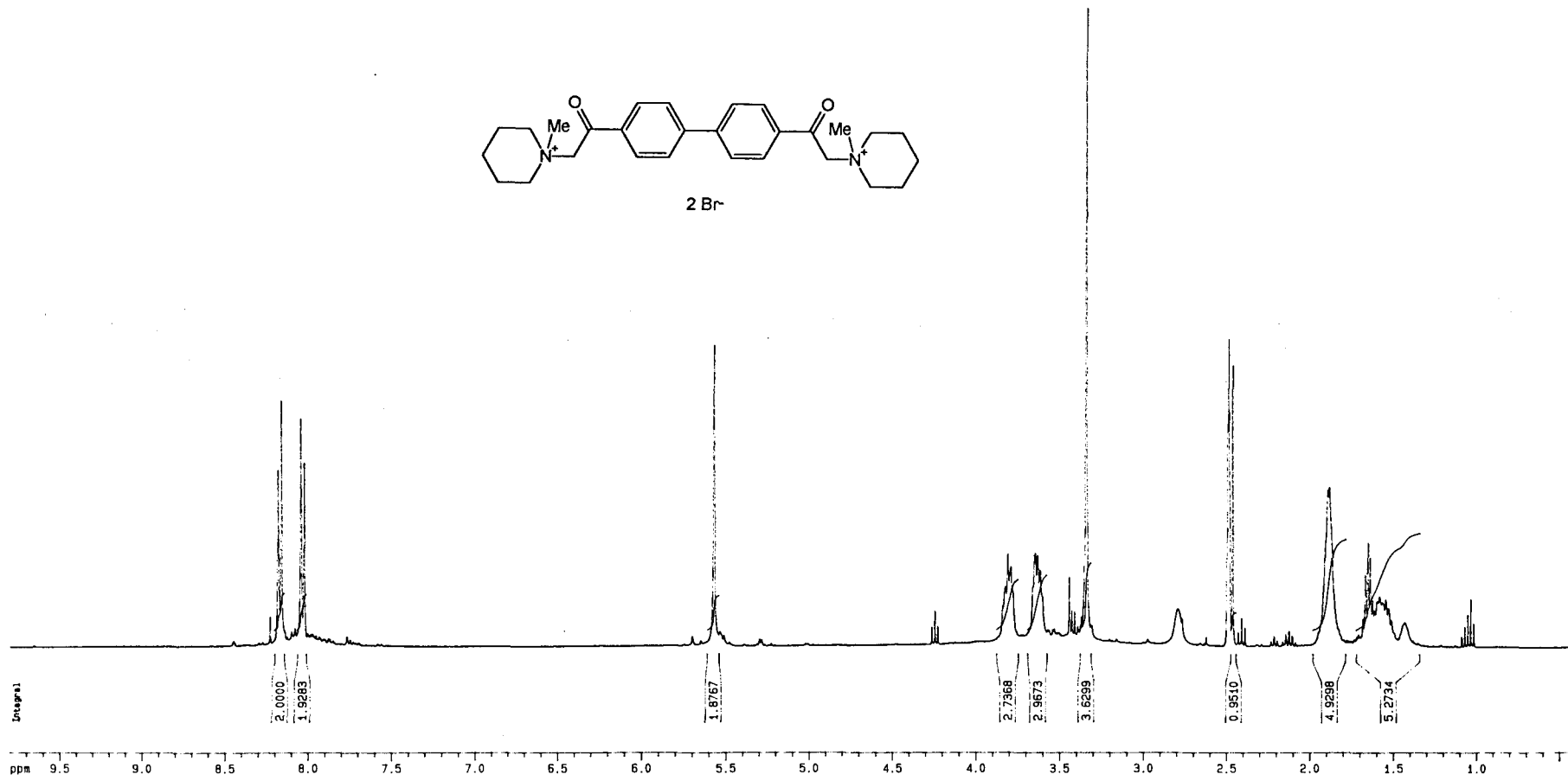
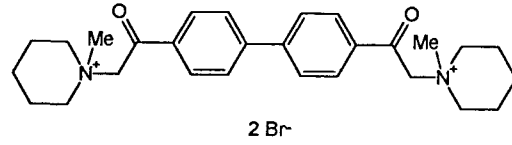
¹H-RMN 22: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(butildimetilamonio) 33d.



¹³C-RMN 22: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(butildimetilamonio) 33d.



¹H-RMN 23: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis[(2,2-dietoxietil)dimetilamonio] 51b.



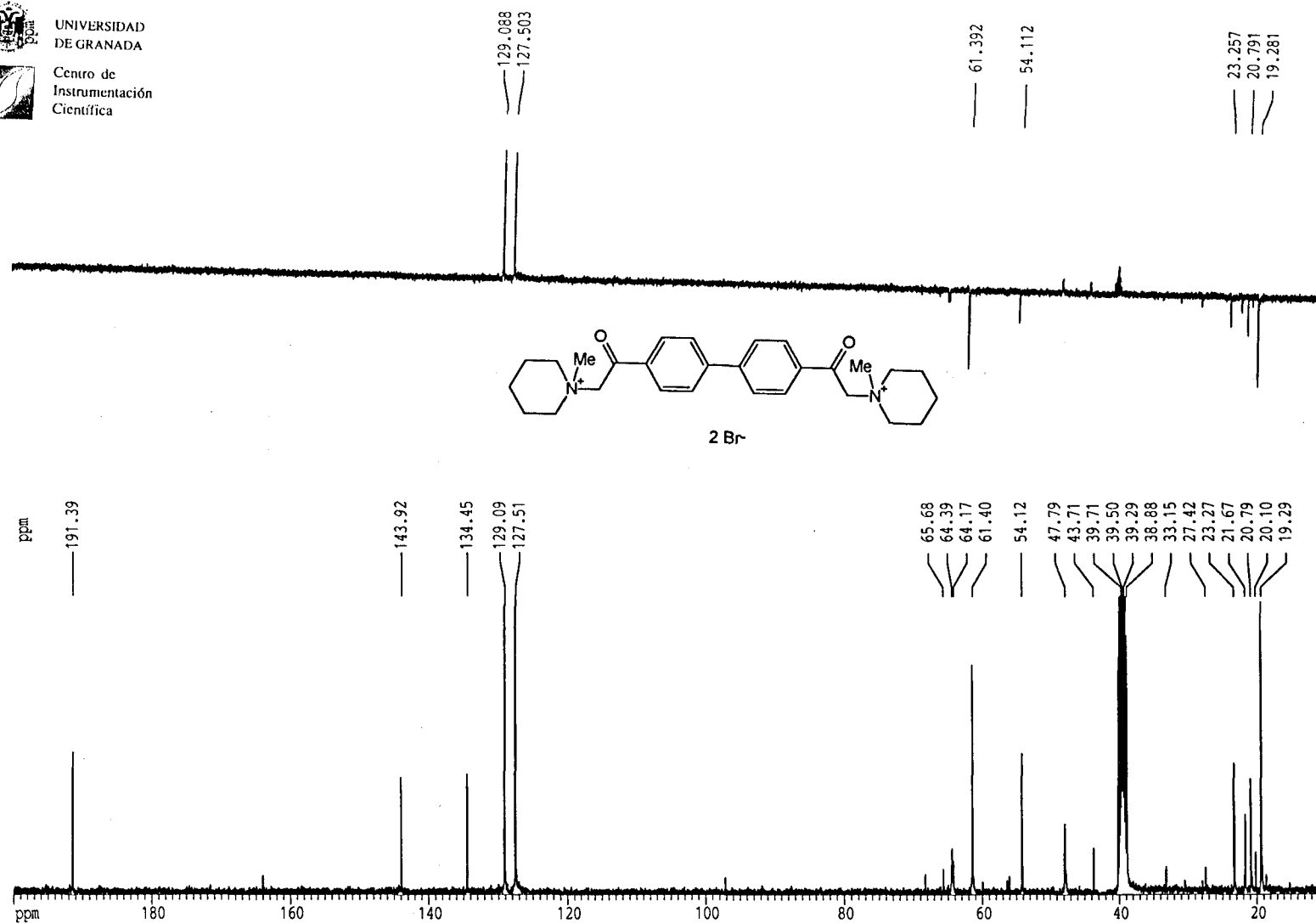
¹H-RMN 24: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(*N*-metilpiperidinio) 30.



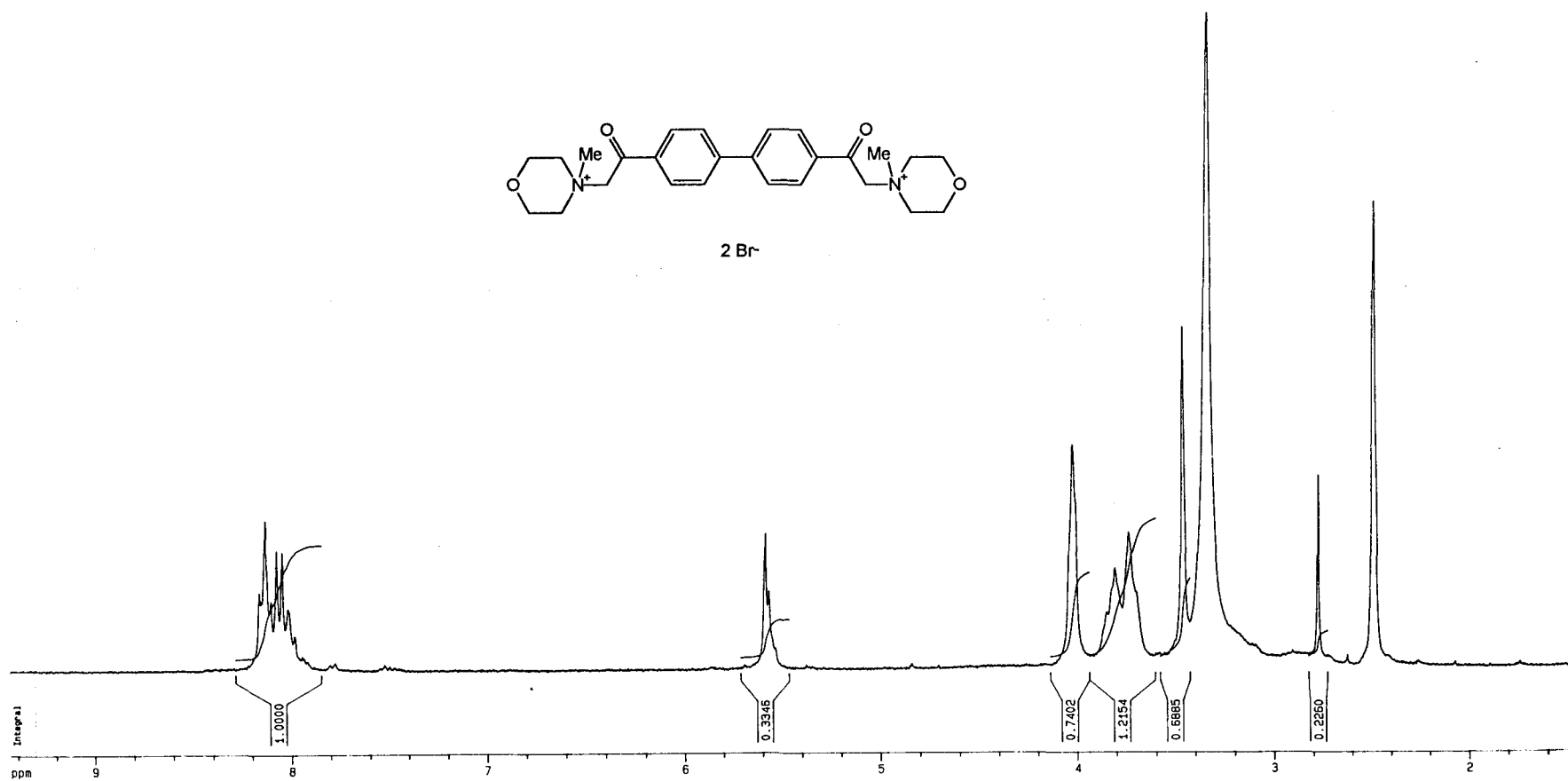
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



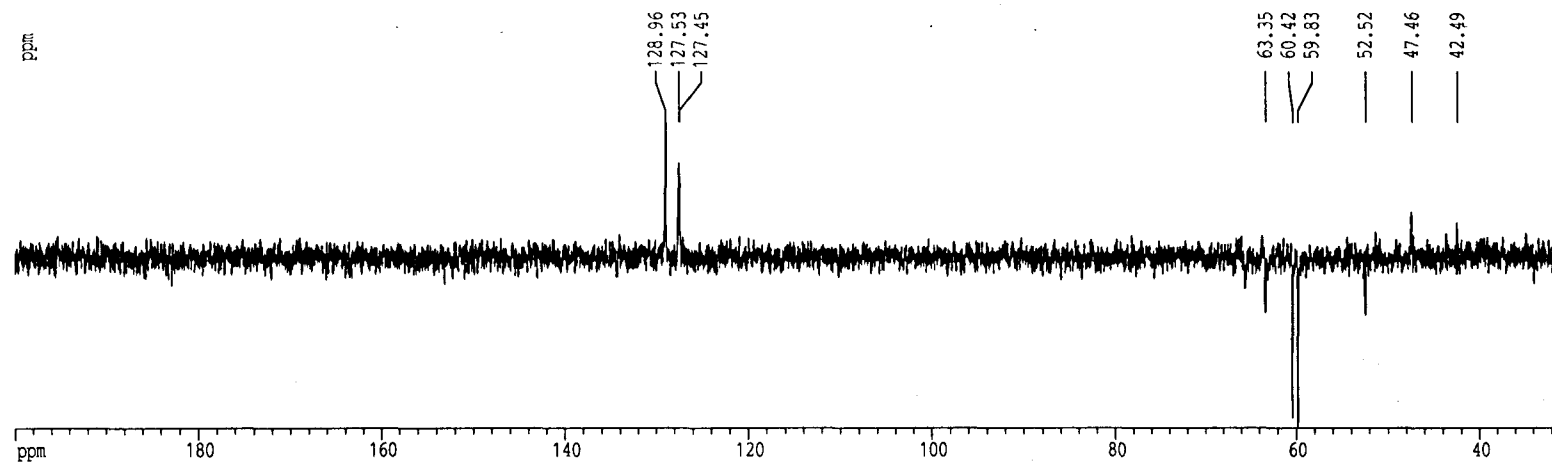
Centro de
Instrumentación
Científica



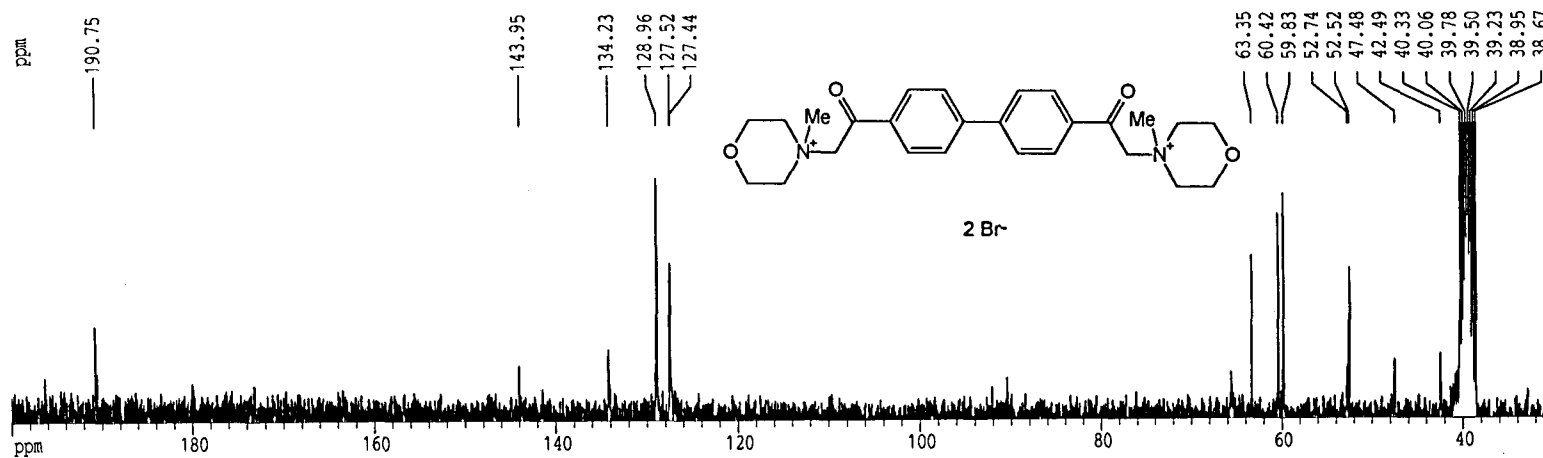
¹³C-RMN 24: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(*N*-metilpiperidinio) 30.



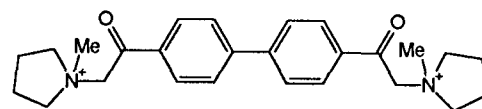
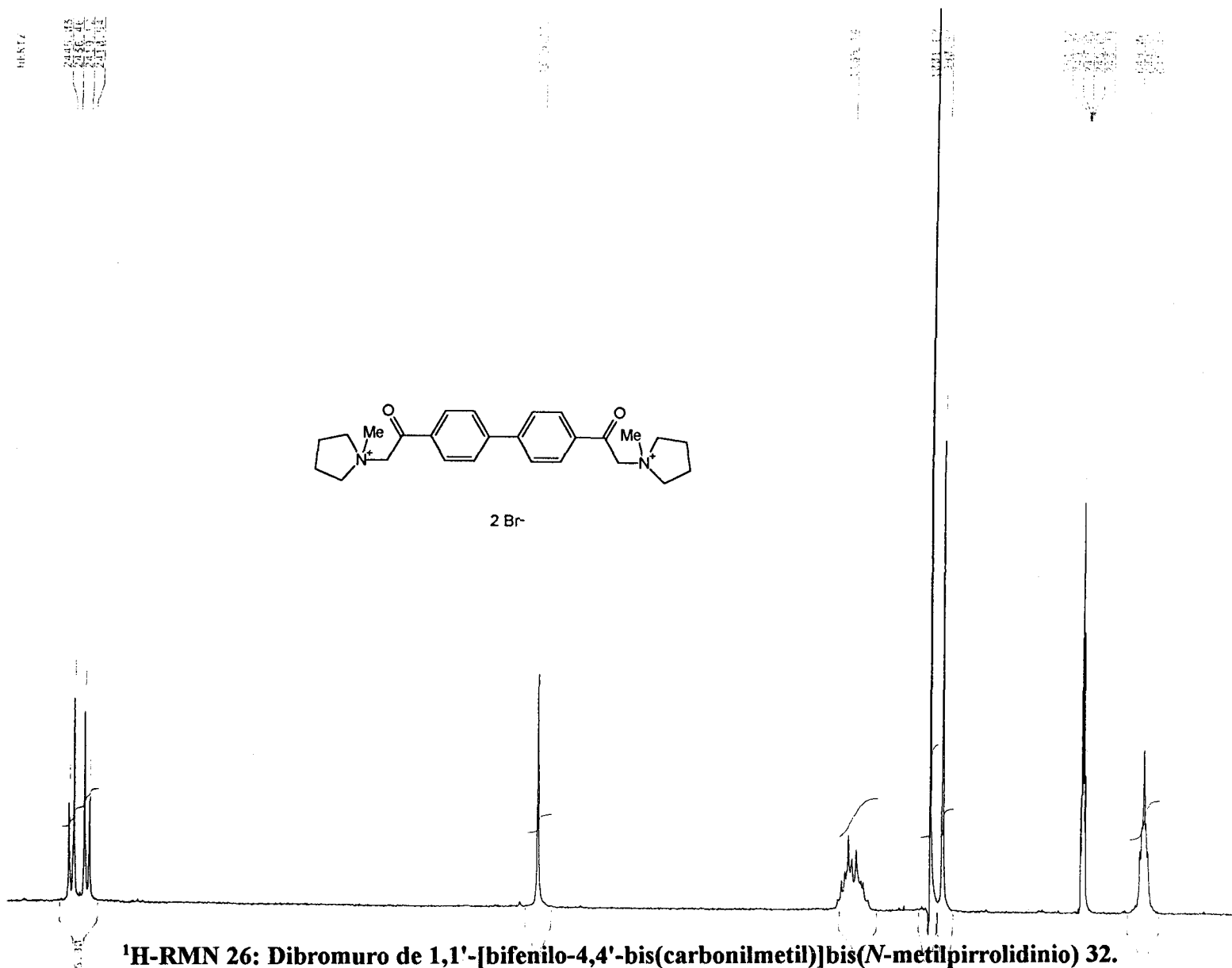
¹H-RMN 25: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(*N*-metilmorfolinio) 31.

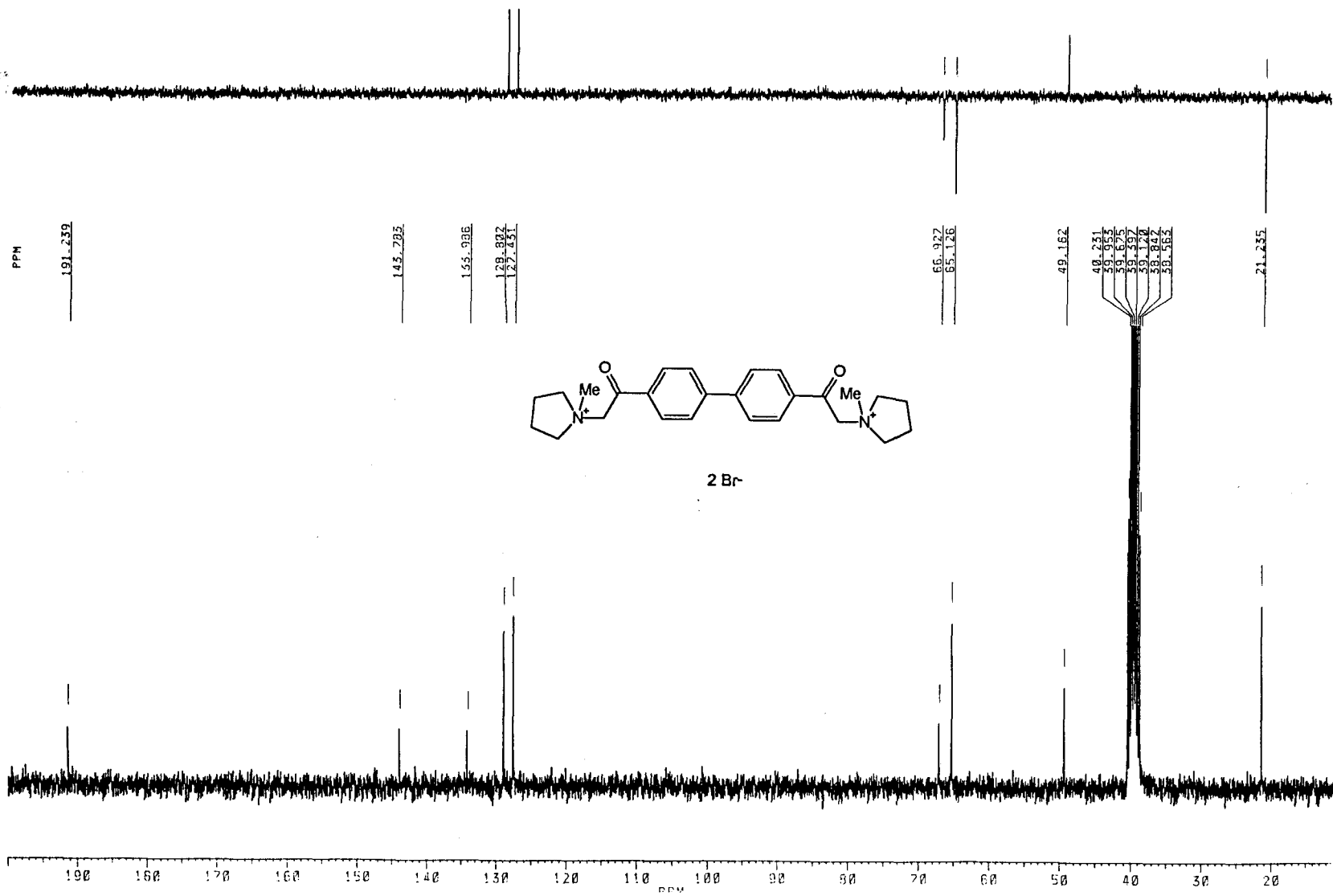


FK-12

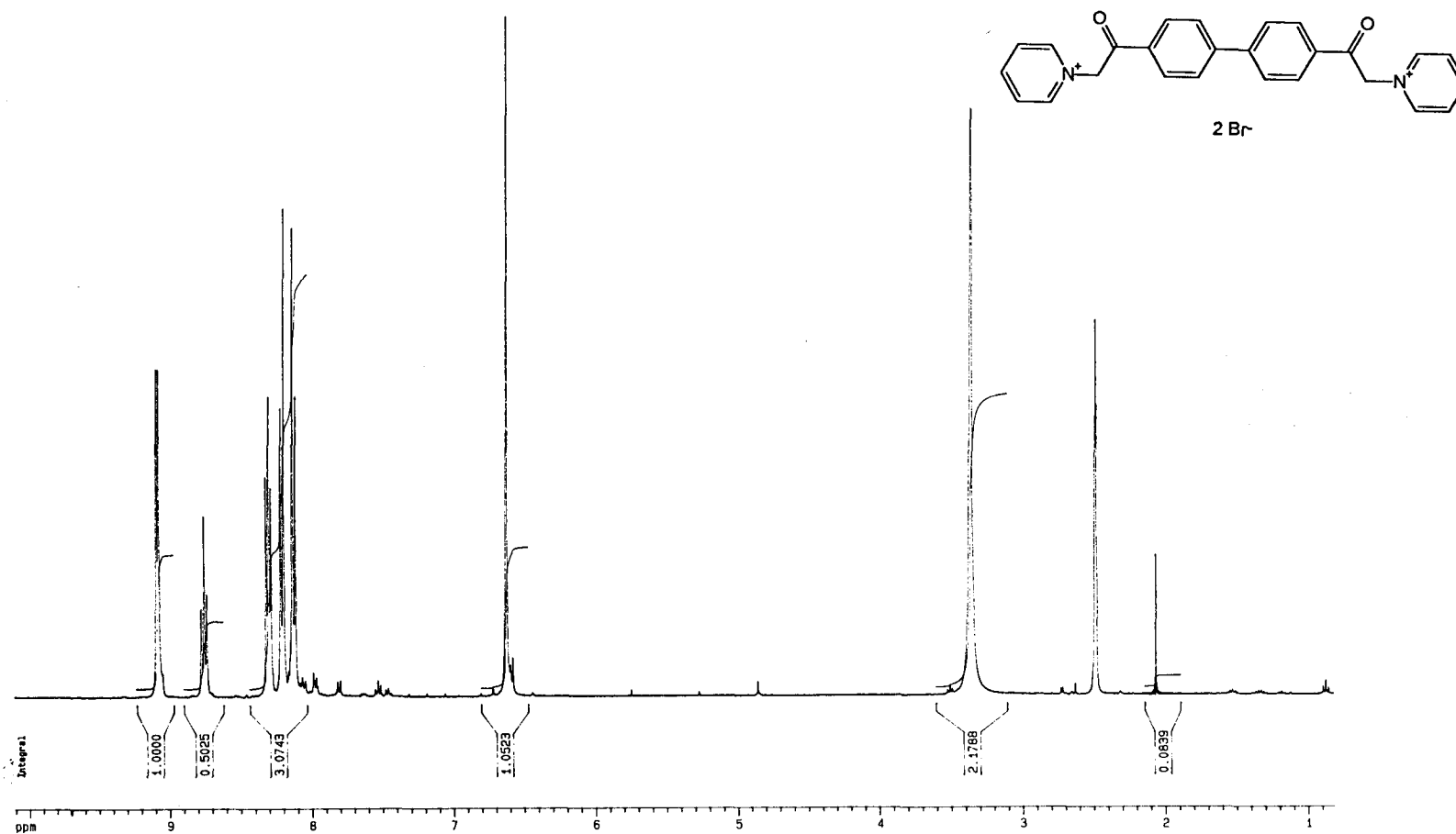


¹³C-RMN 25: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(*N*-metilmorfolinio) 31.

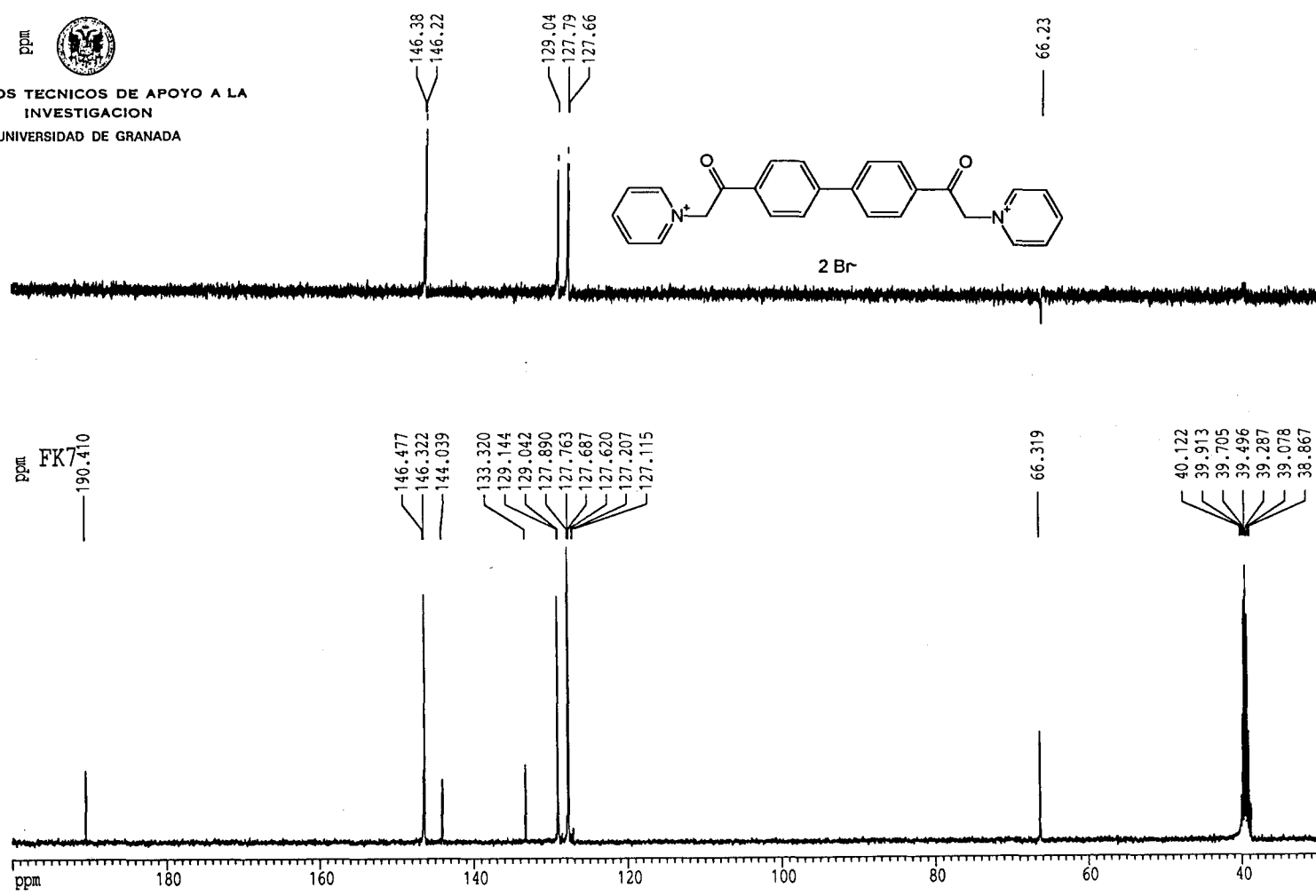
2 Br⁻**¹H-RMN 26: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(*N*-metilpirrolidinio) 32.**



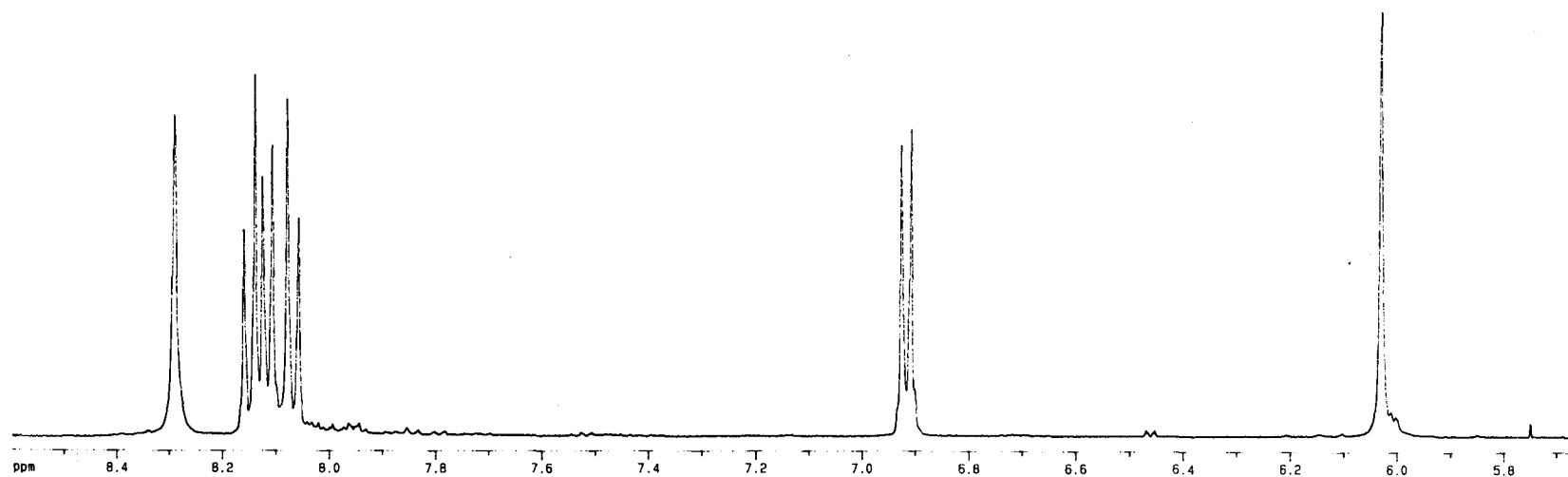
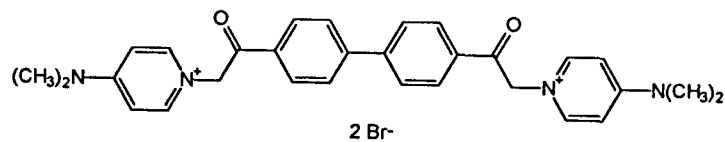
¹³C-RMN 26: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(*N*-metilpirrolidinio) 32.



¹H-RMN 27: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bispiridinio 54.



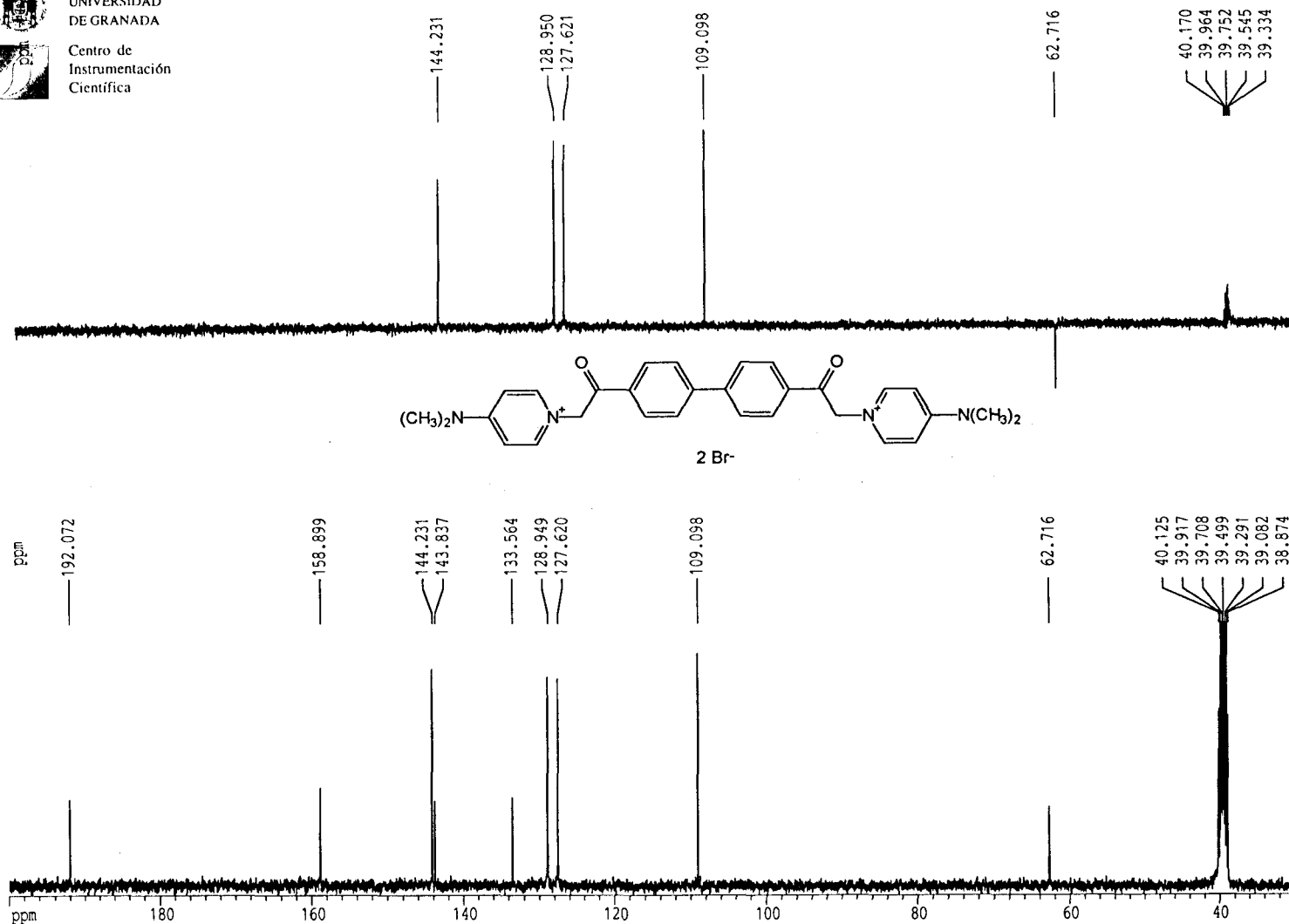
¹³C-RMN 27: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bispiridinio 54.



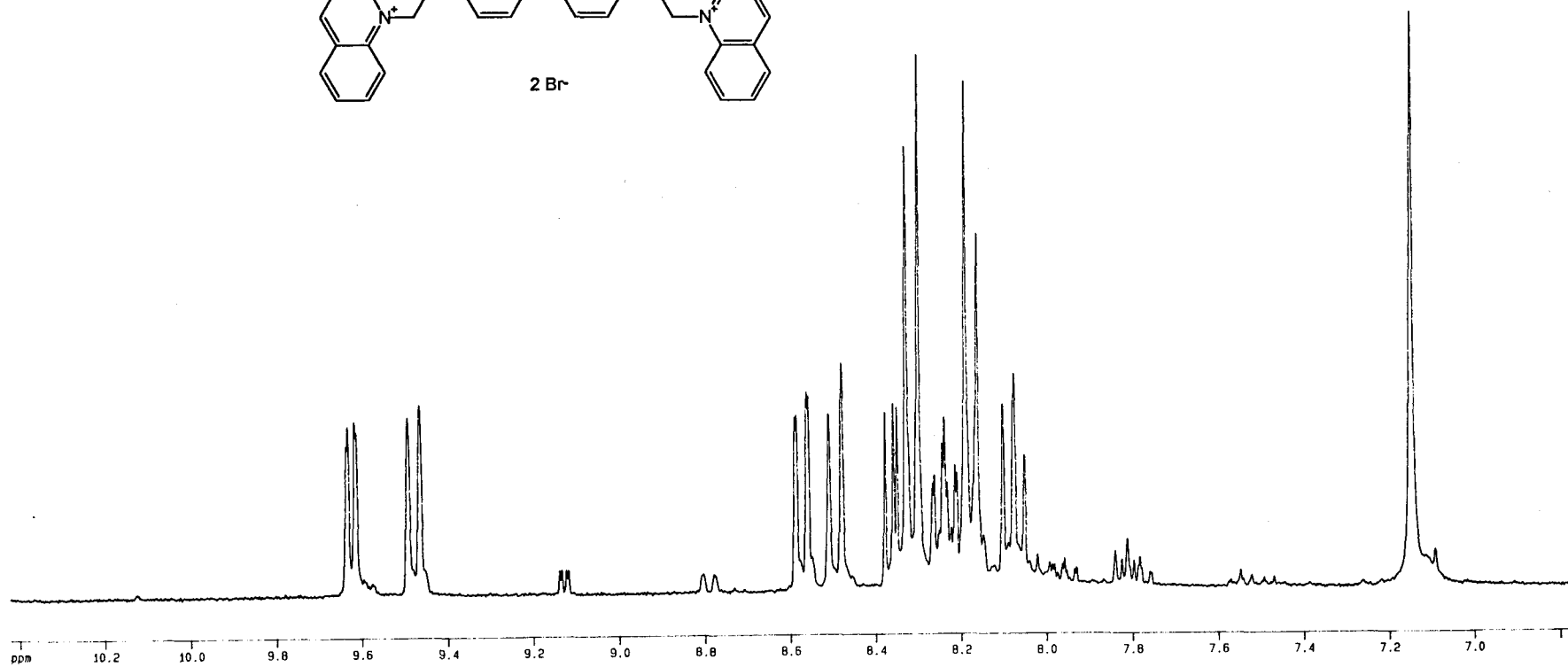
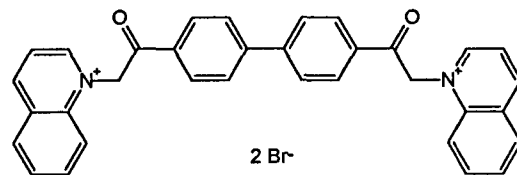
¹H-RMN 28: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(4-dimetilamino)piridinio 58.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA
Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN 28: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bis(4-dimetilamino)piridinio 58.



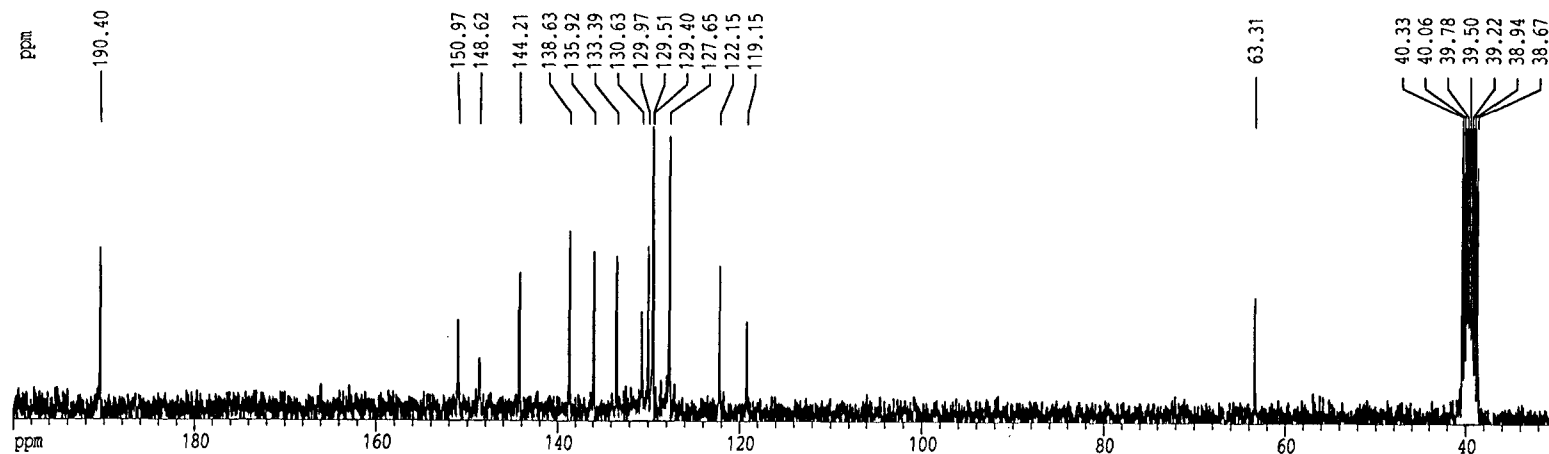
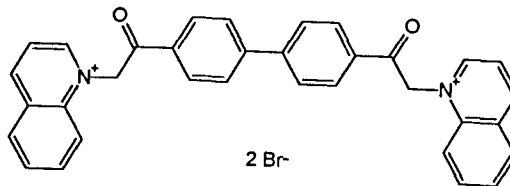
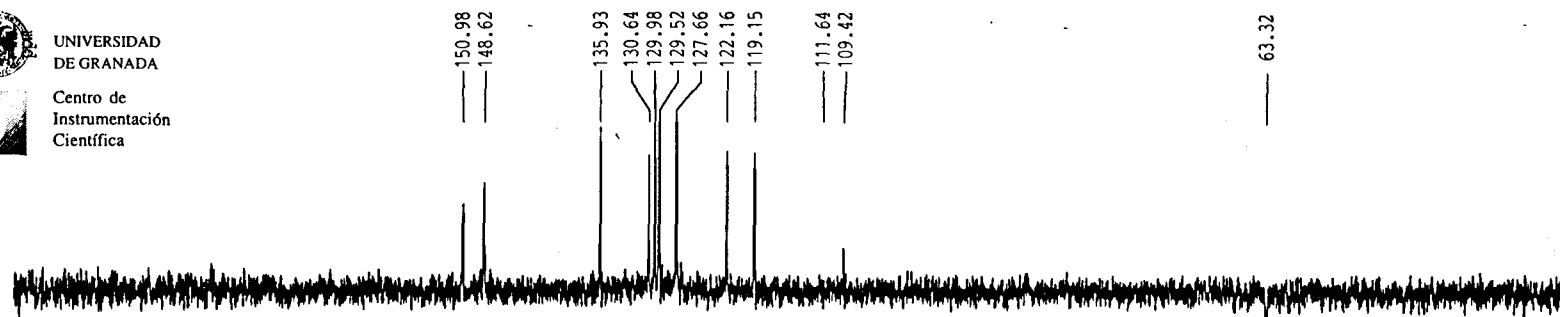
¹H-RMN 29: Dibromuro de 1,1'-[bifeno-4,4'-bis(carbonilmetil)]bisquinolinio 59.



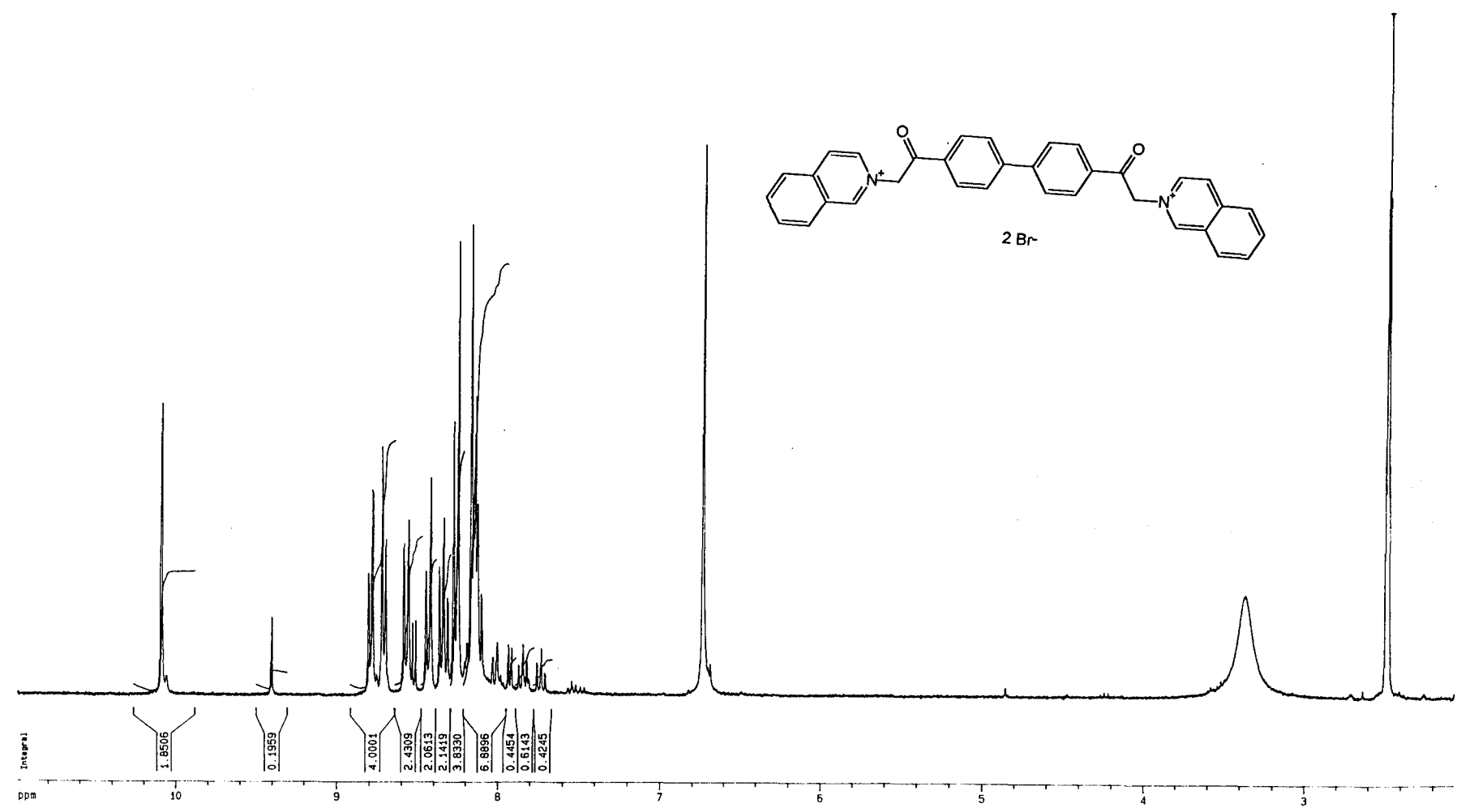
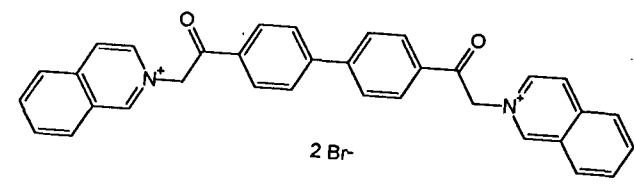
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



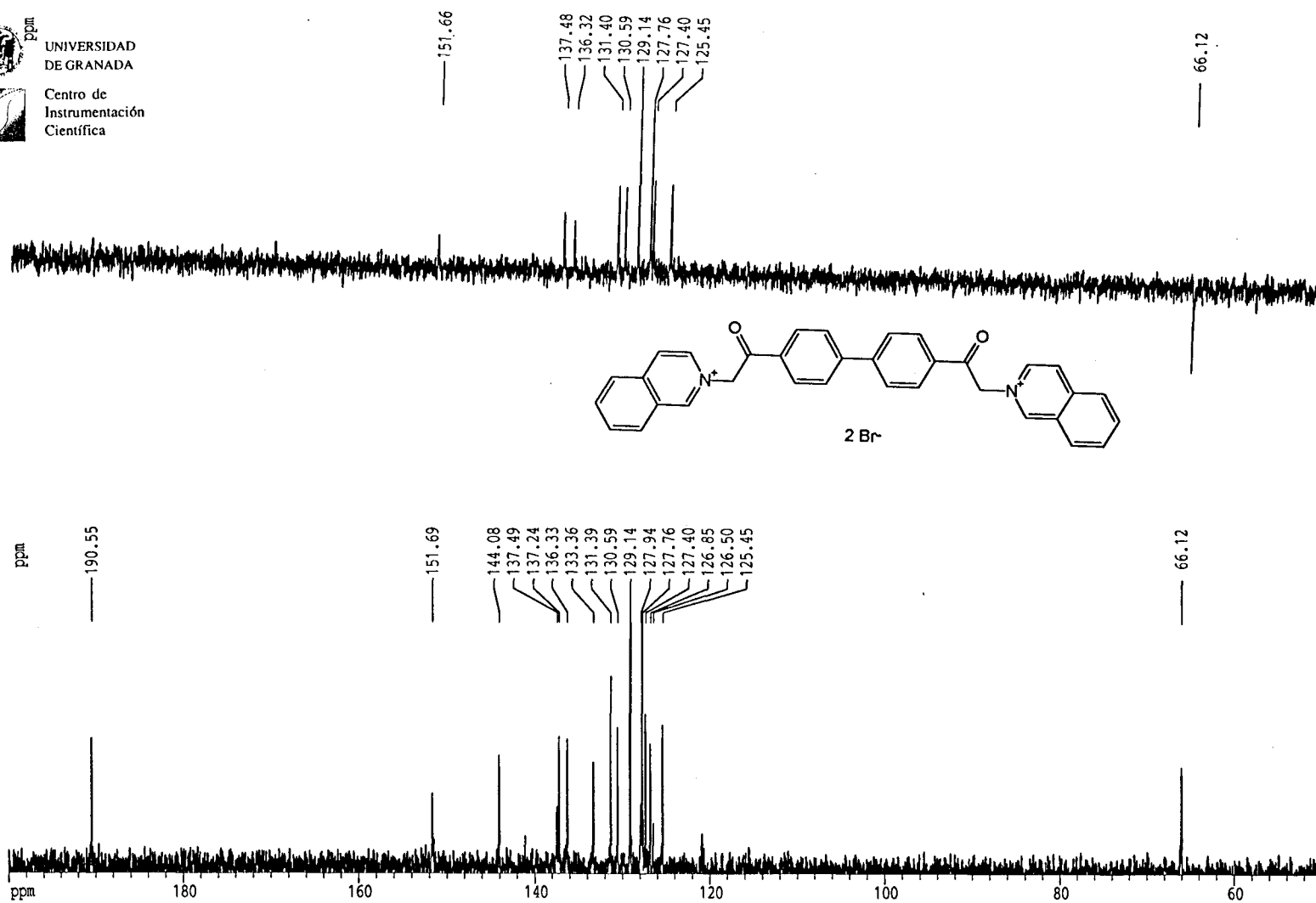
Centro de
Instrumentación
Científica



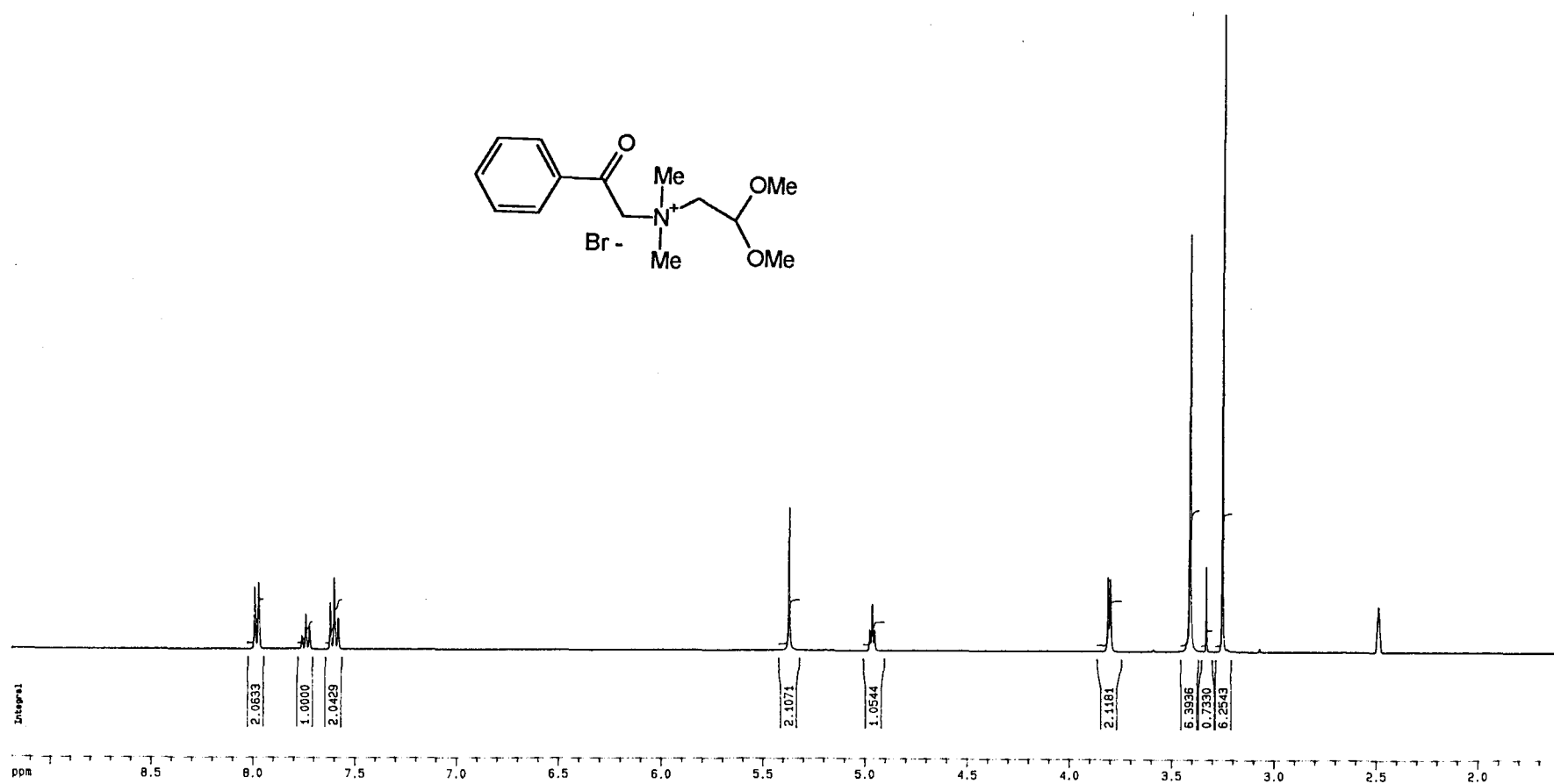
^{13}C -RMN 29: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bisquinolinio 59.



¹H-RMN 30: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bisoquinolinio 60.



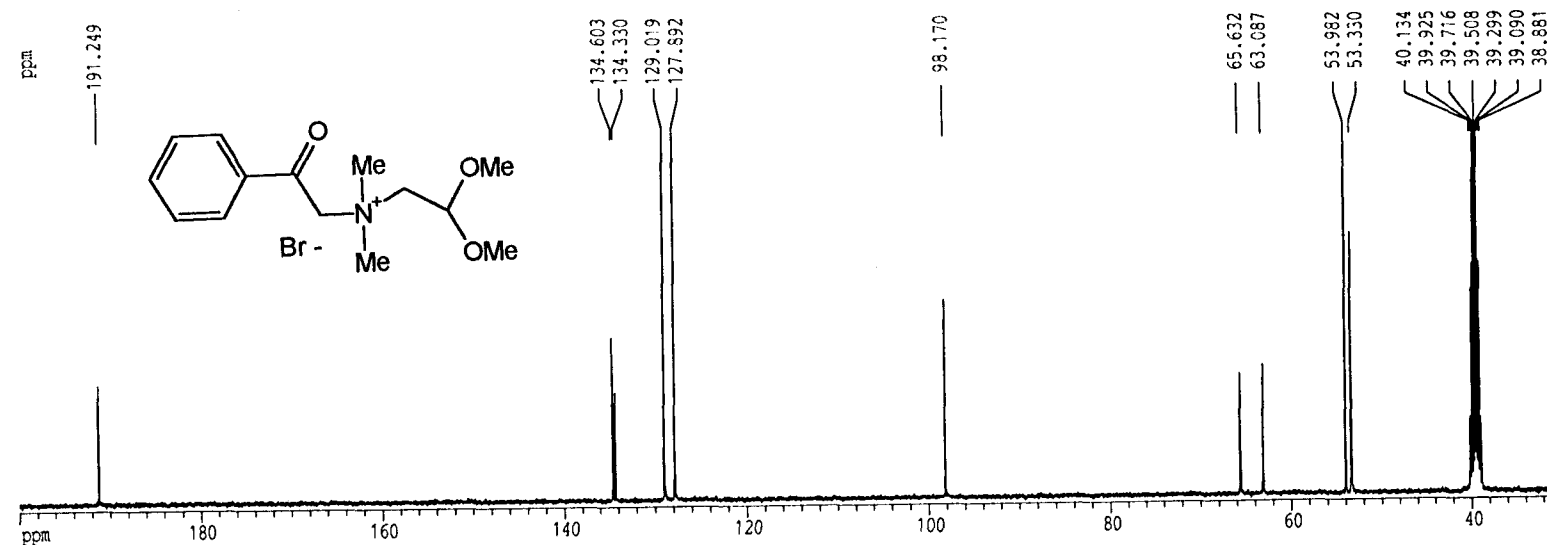
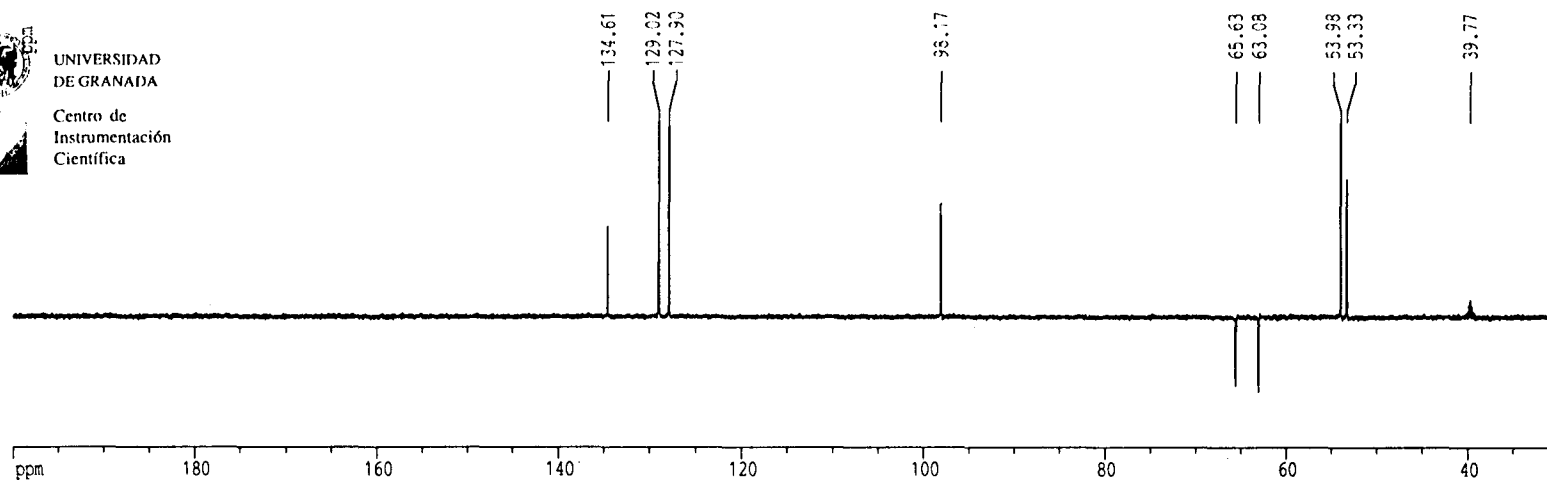
¹³C-RMN 30: Dibromuro de 1,1'-[bifenilo-4,4'-bis(carbonilmetil)]bisoquinolinio 60.



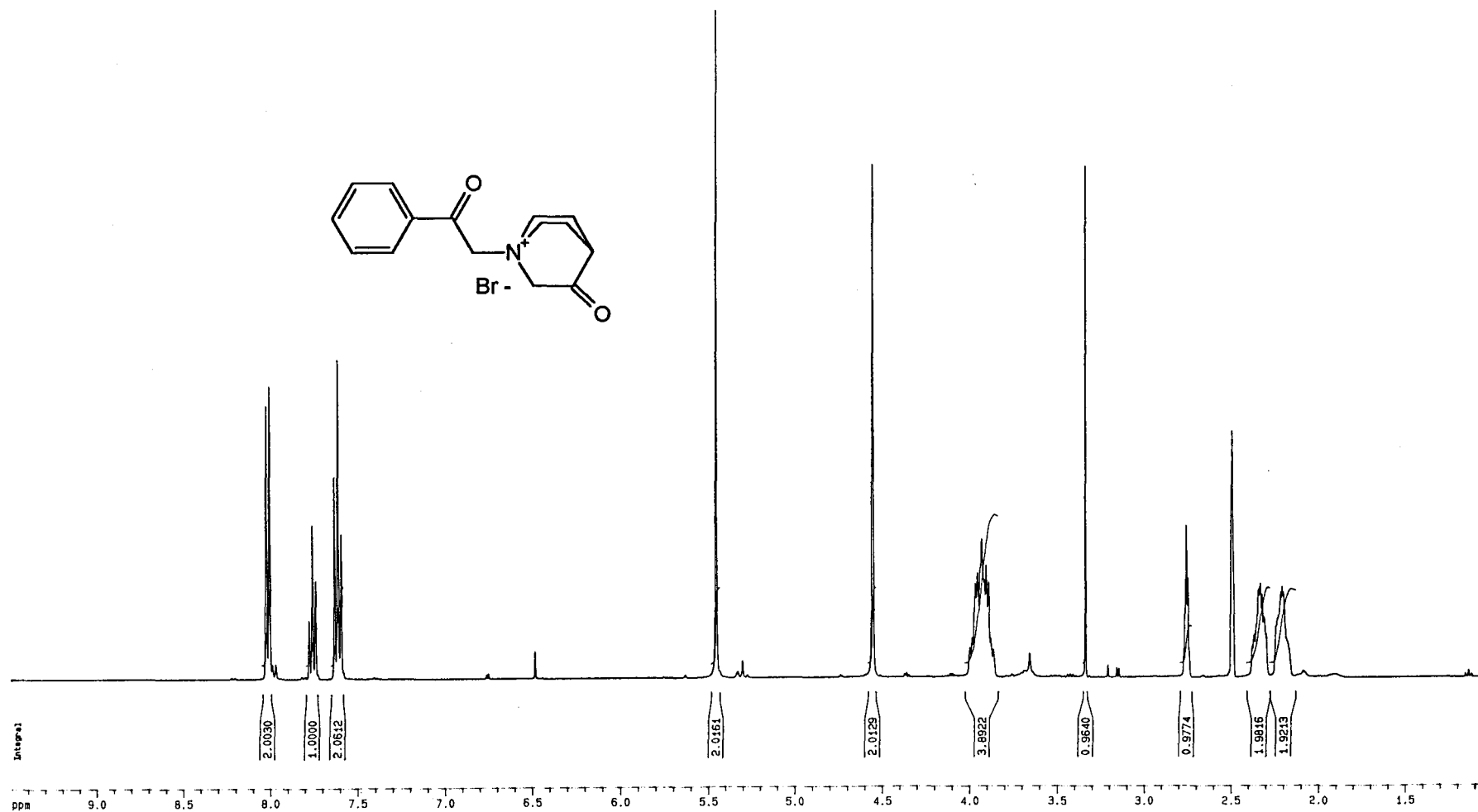
¹H-RMN 31: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-2,2'-dimetoxietildimetilamonio 63.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA
Centro de
Instrumentación
Científica

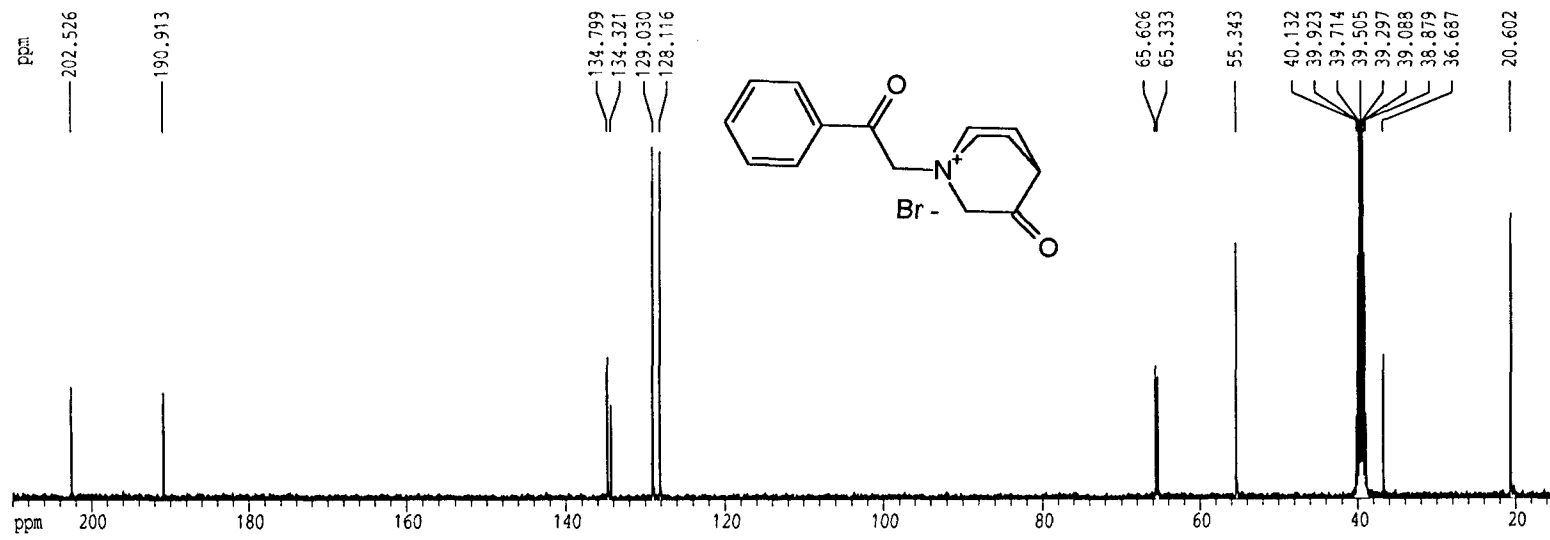
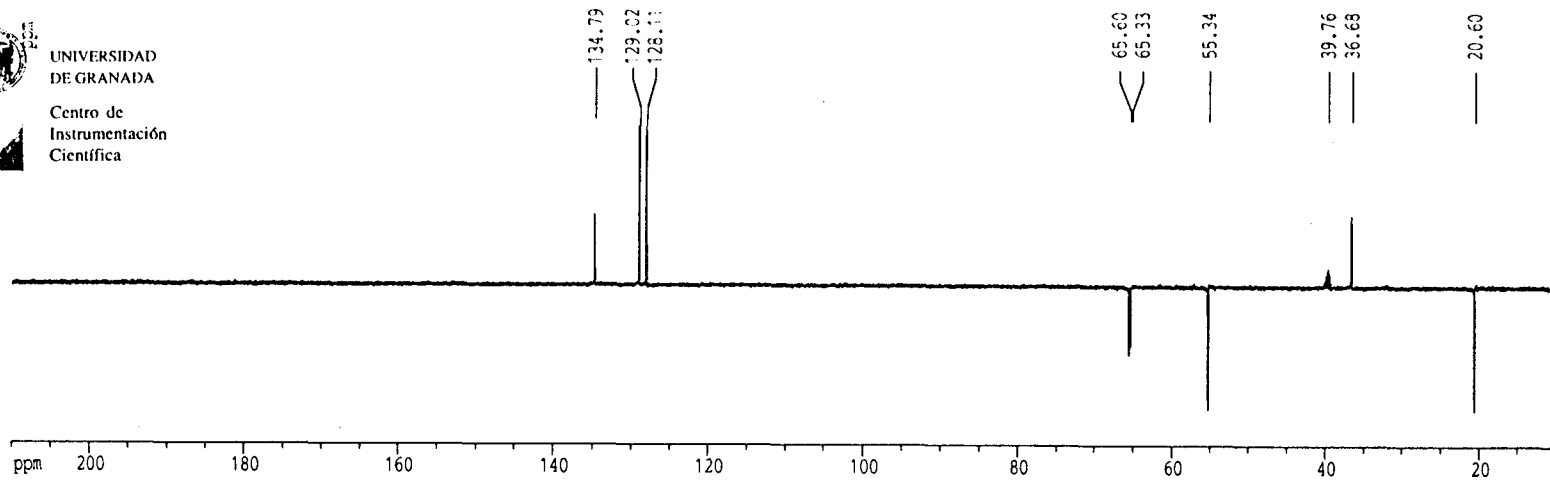


¹³C-RMN 31: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-2,2'-dimetoxietildimetilamonio 63.

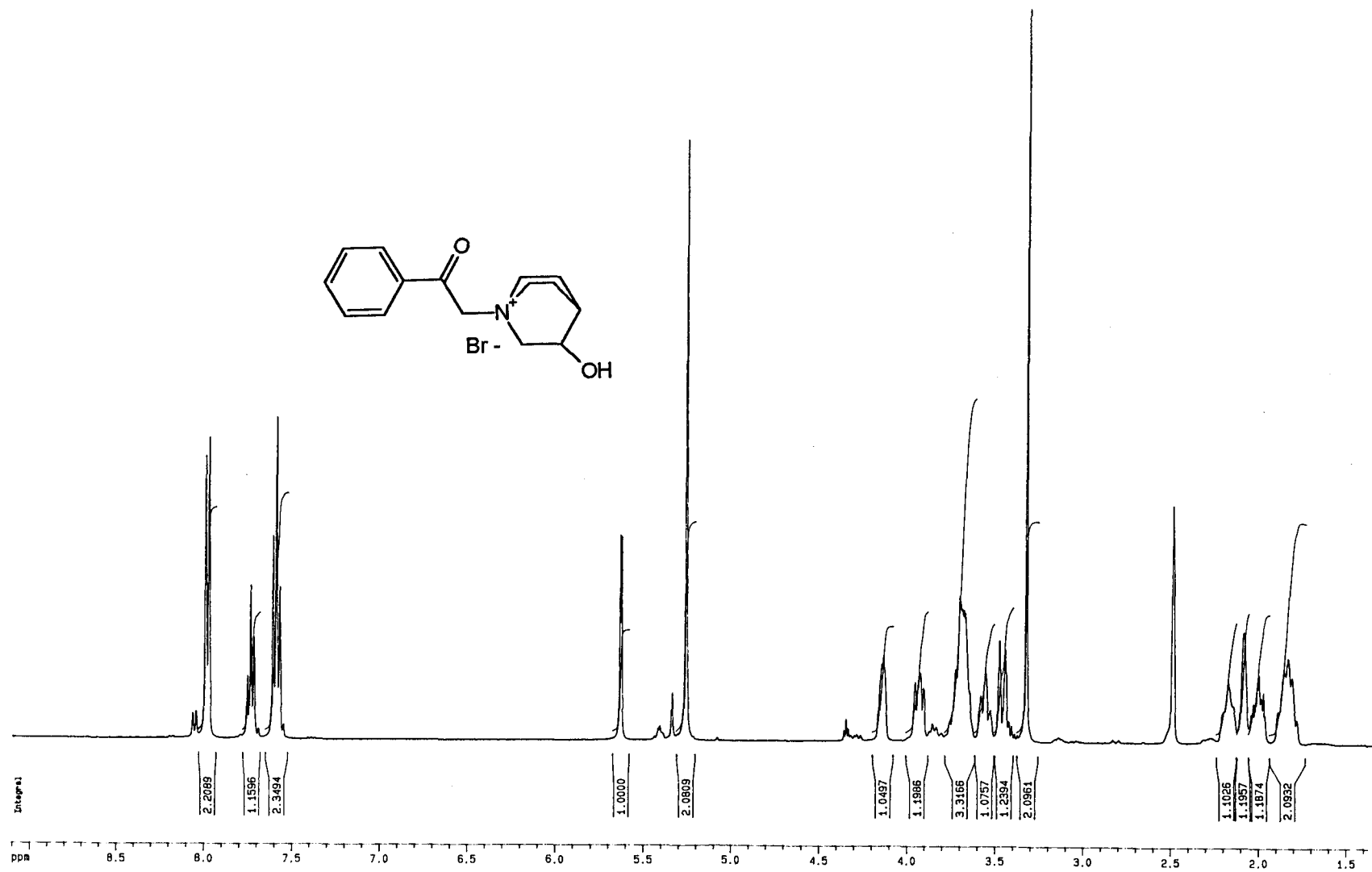




UNIVERSIDAD DE GRANADA
Centro de Instrumentación Científica



¹³C-RMN 32: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-oxoquinuclidinio 65.



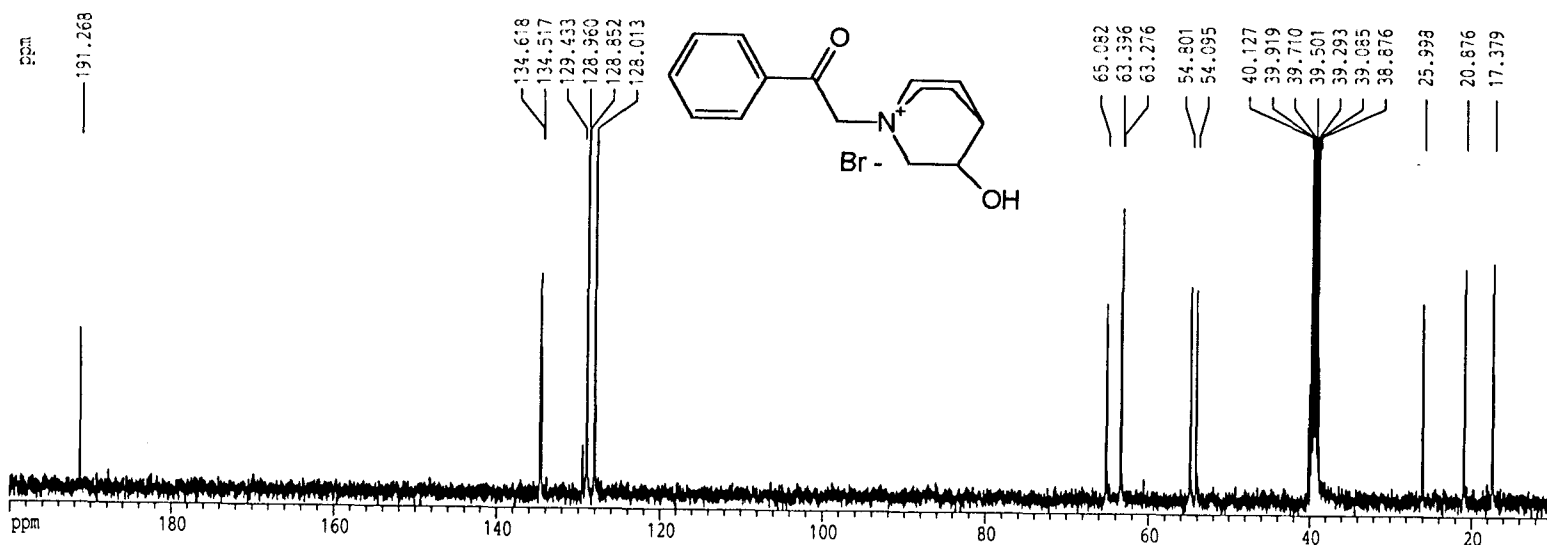
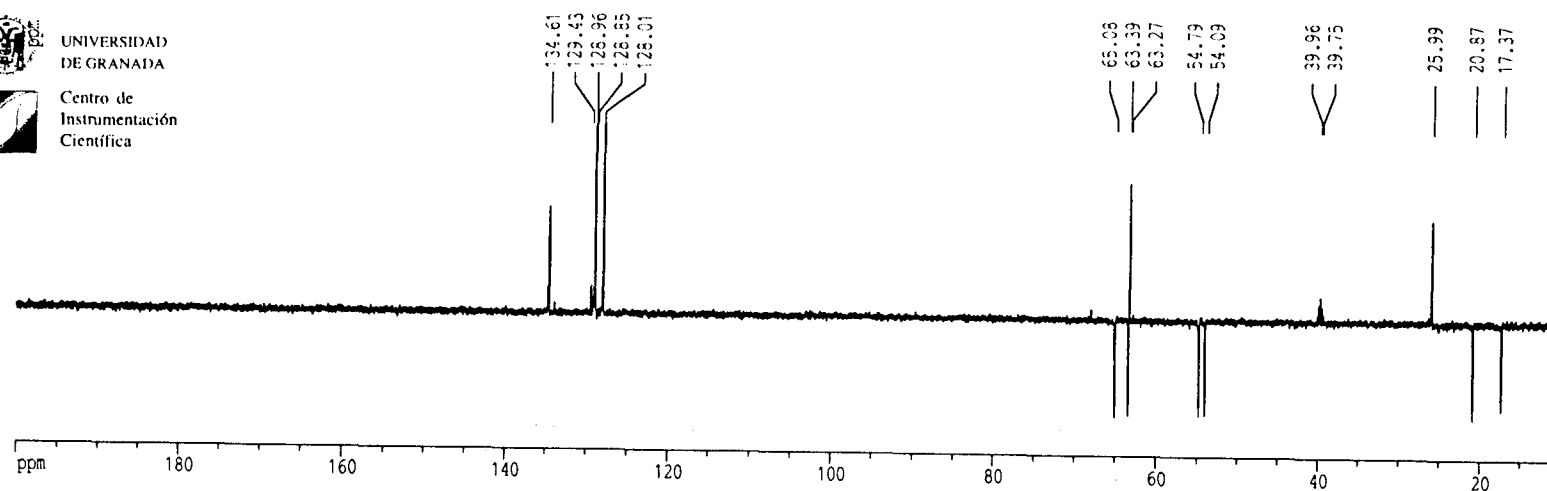
¹H-RMN 33: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-hidroxiquinclidinio 66.



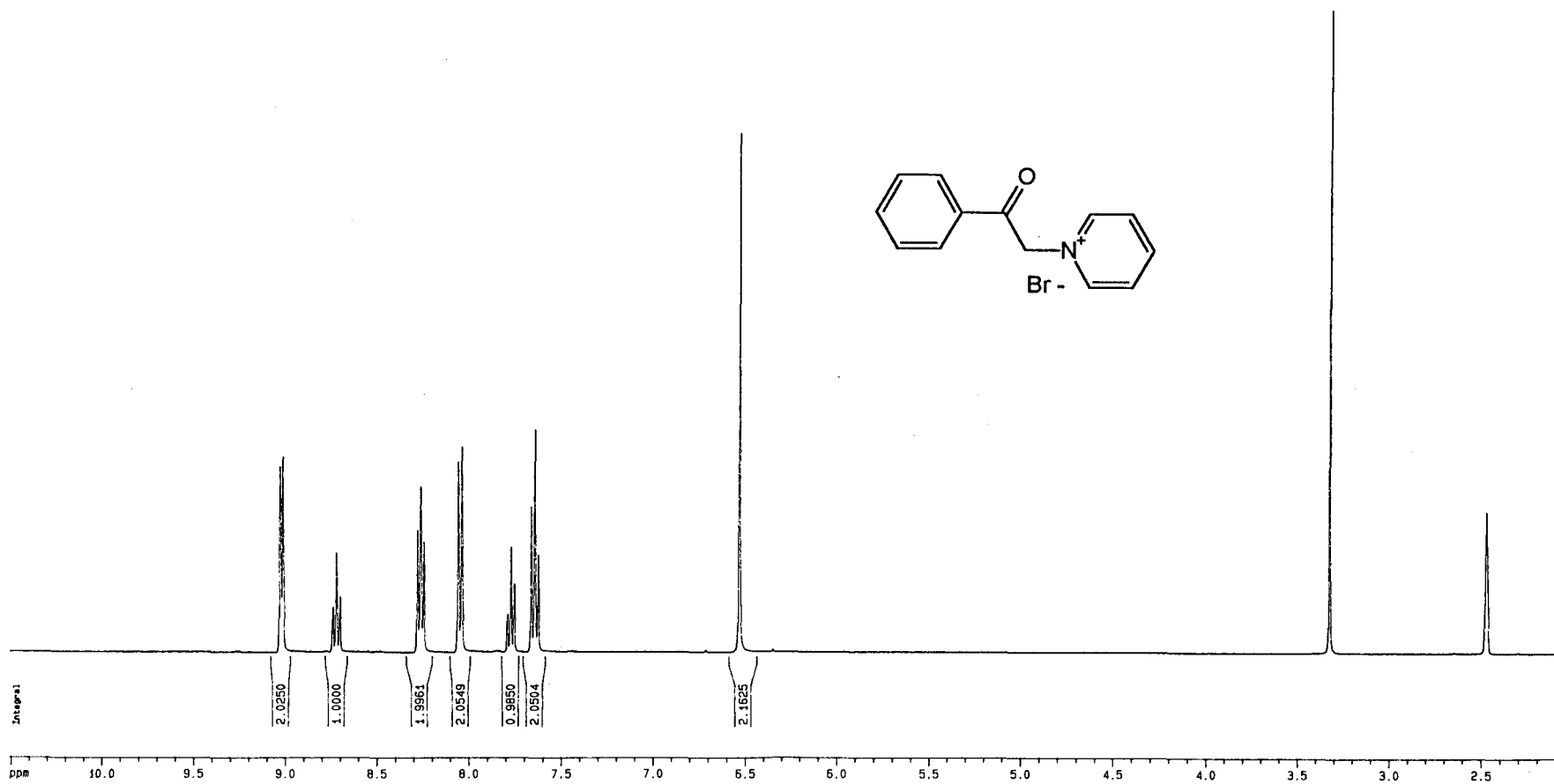
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN 33: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-3-hidroxiquinuclidinio 66.



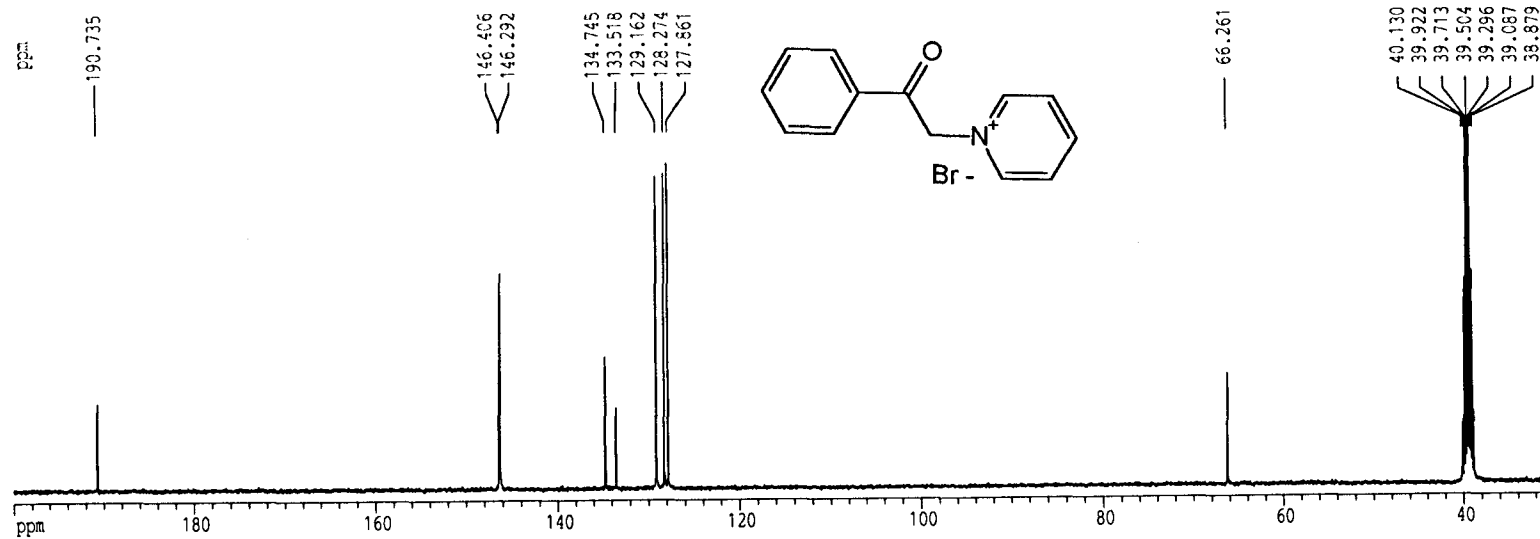
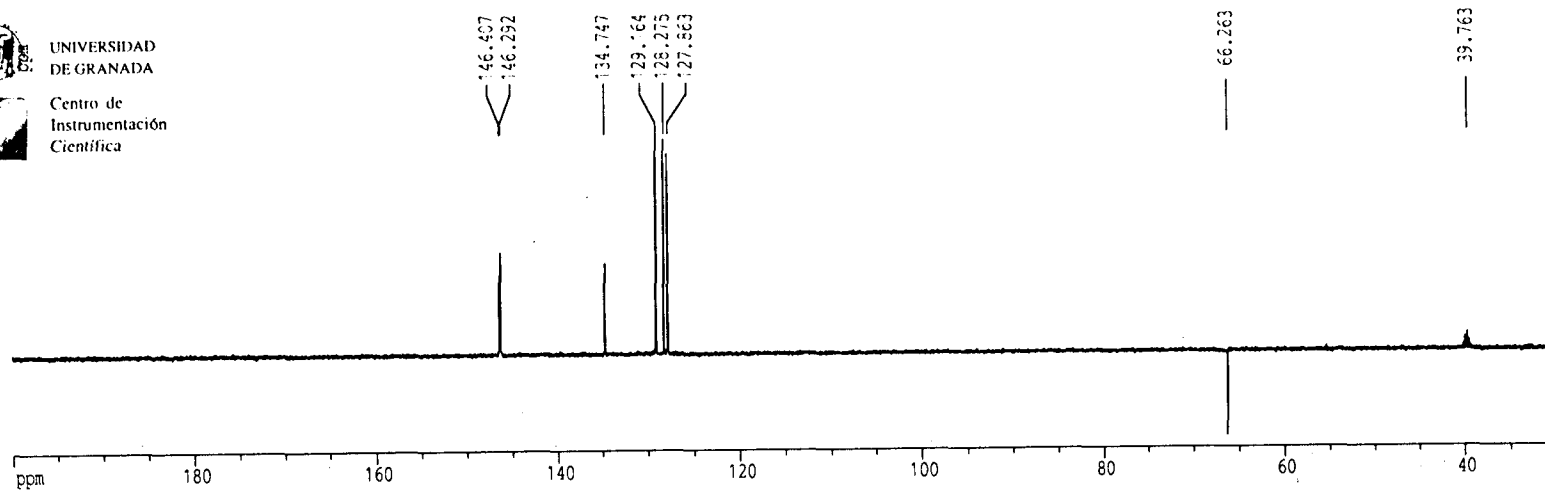
¹H-RMN 34: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)piridinio 68.



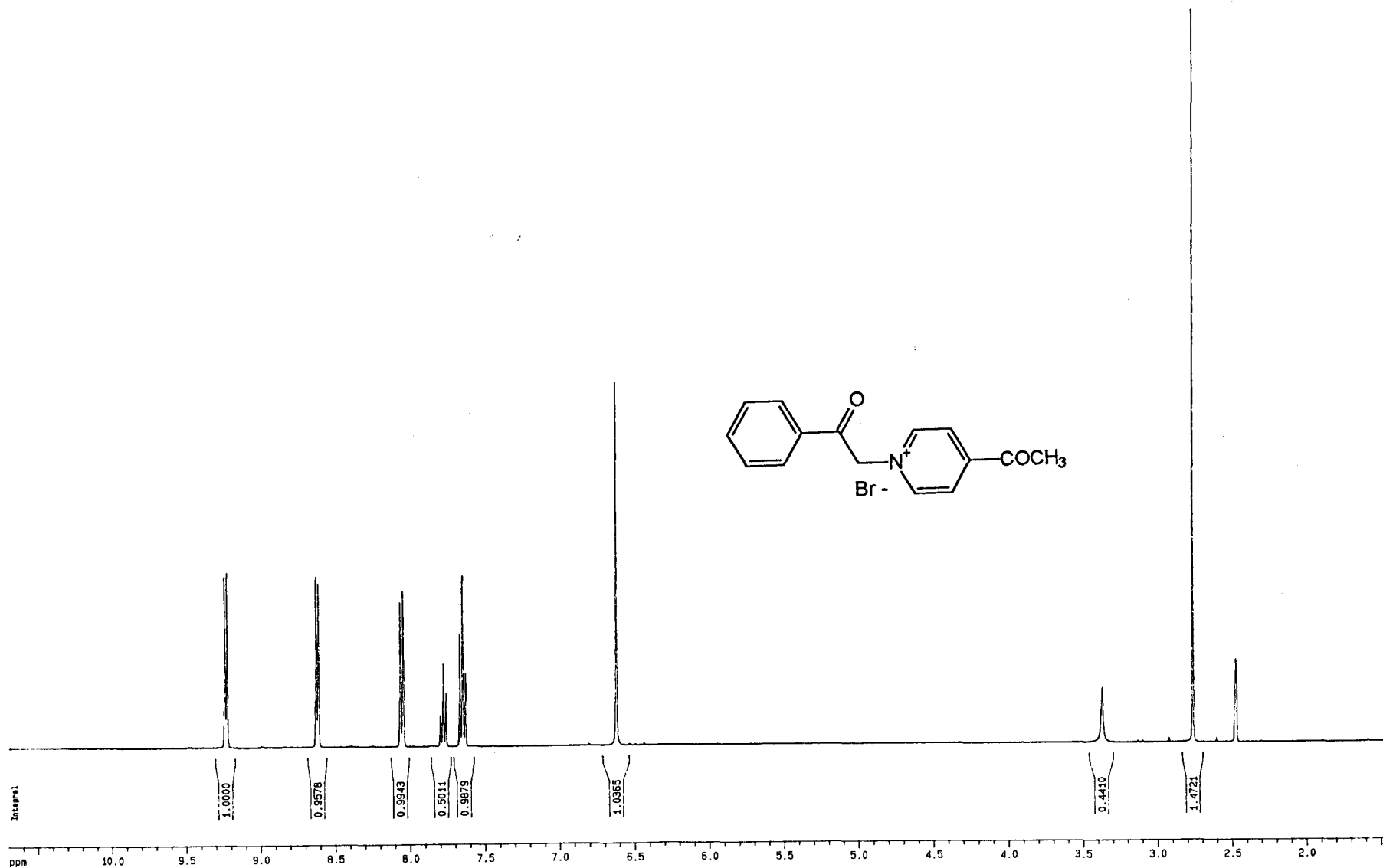
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



^{13}C -RMN 34: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)piridinio 68.



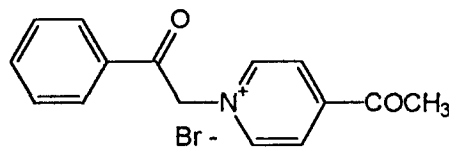
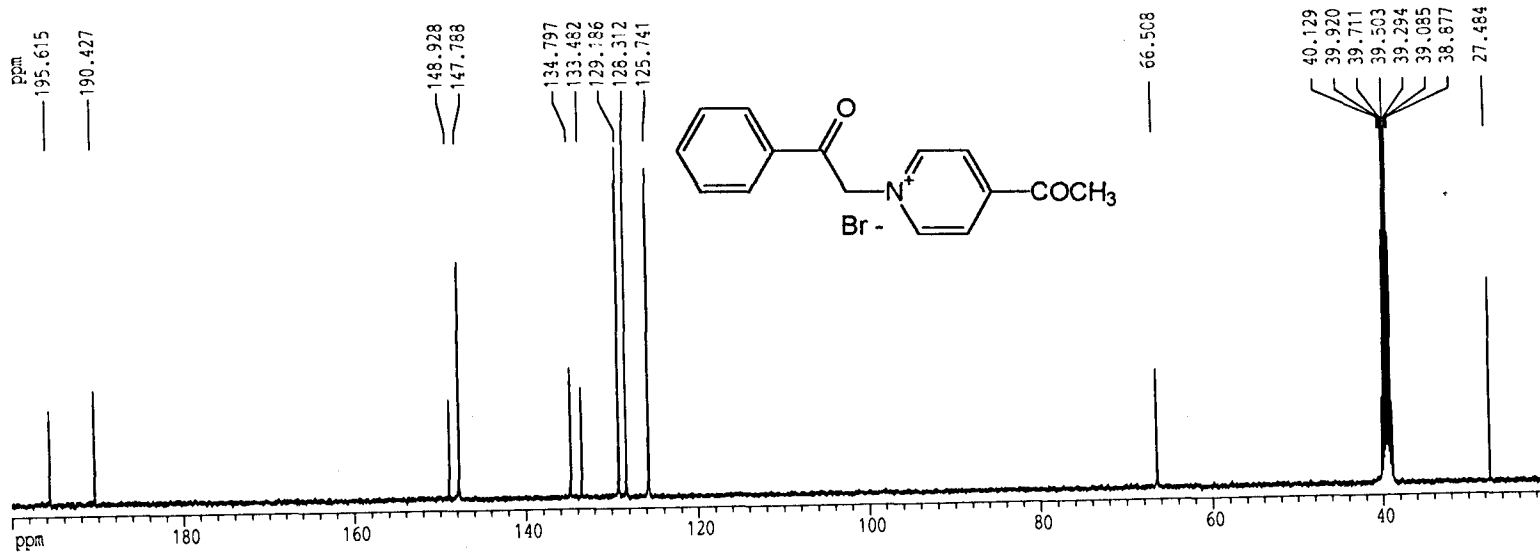
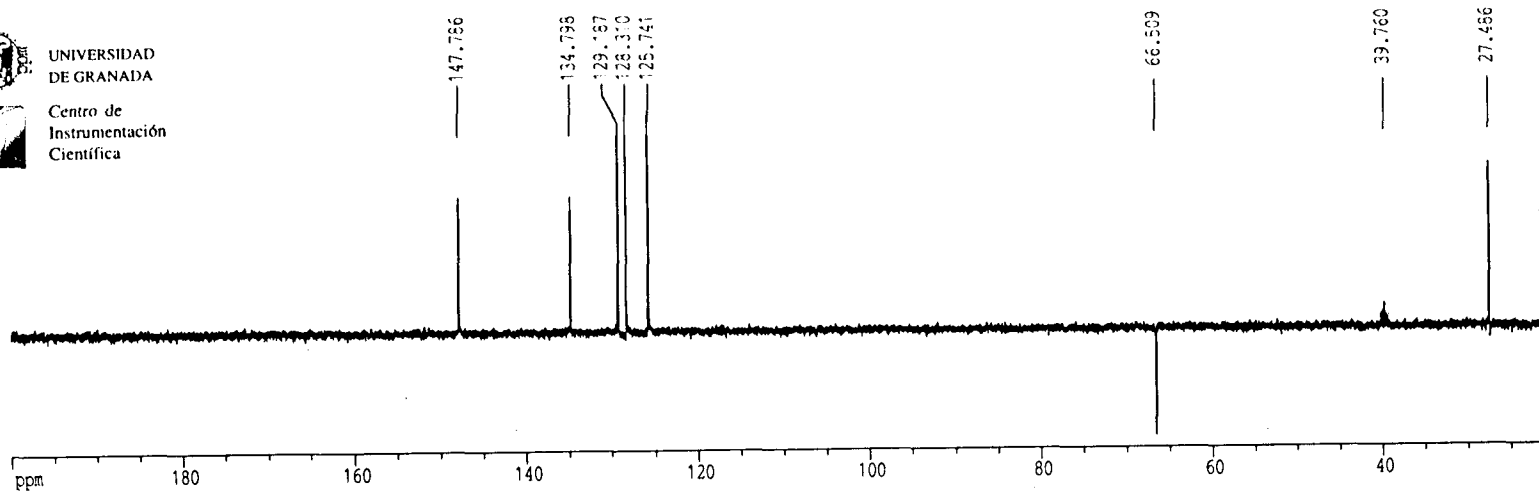
¹H-RMN 35: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-acetilpiridinio 69.



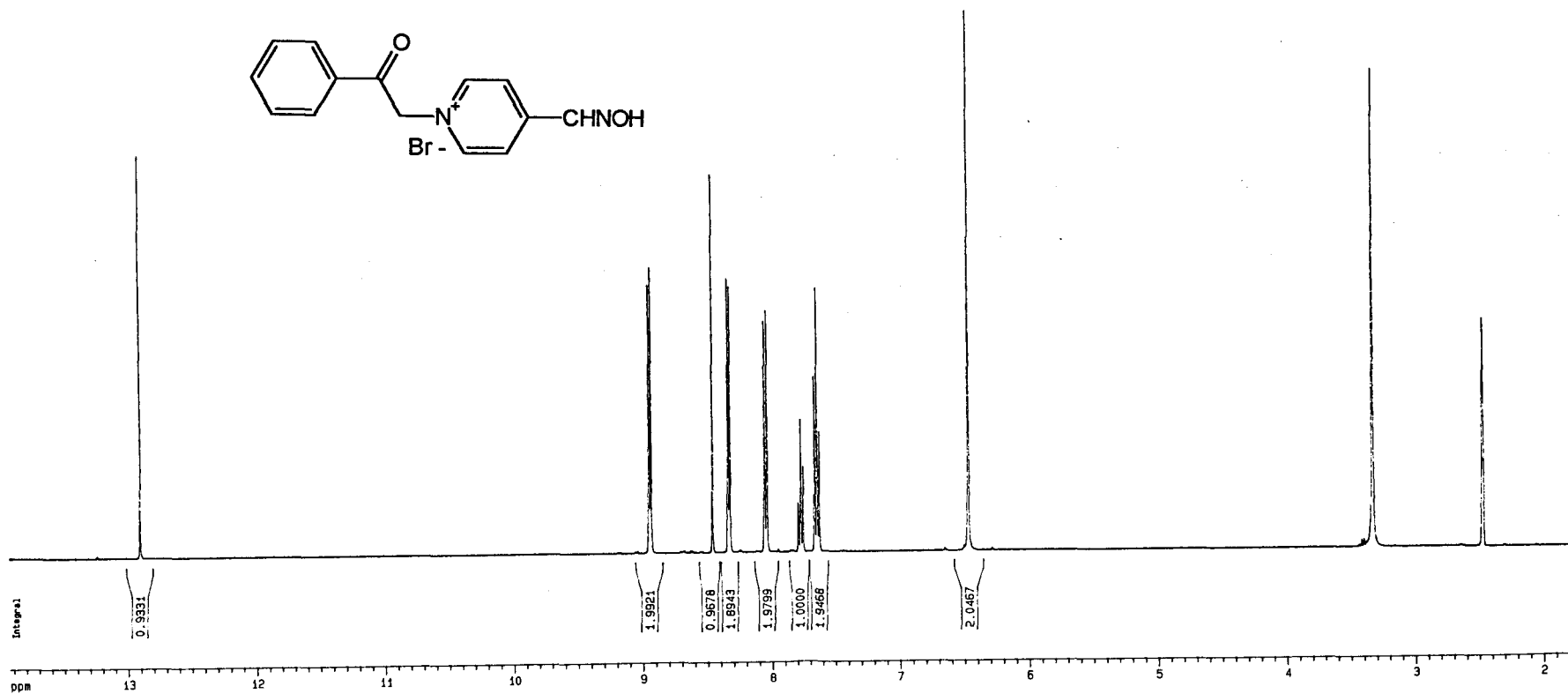
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN 35: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-acetilpiridinio 69.



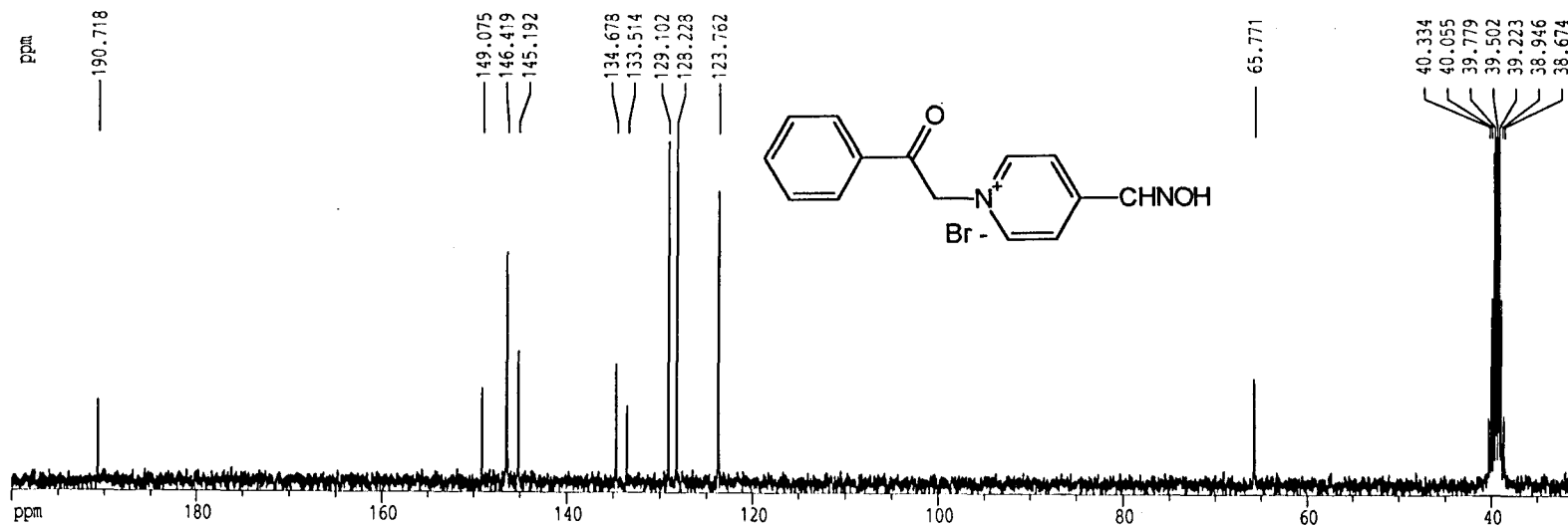
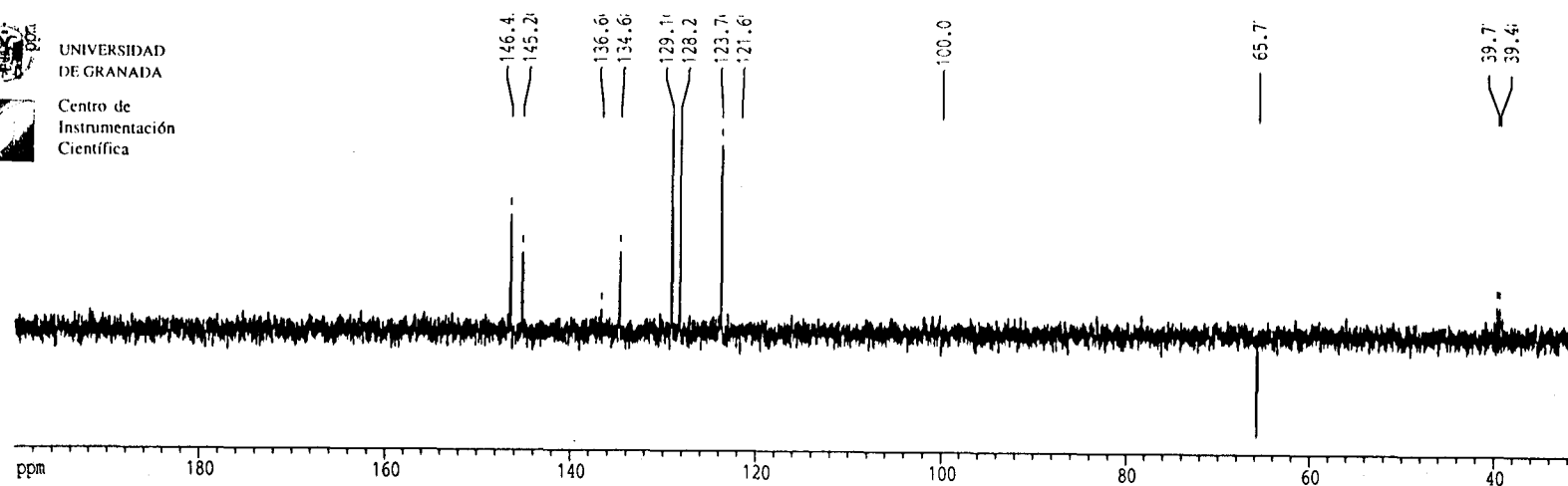
¹H-RMN 36: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-hidroxiiminoformilpiridinio 70.



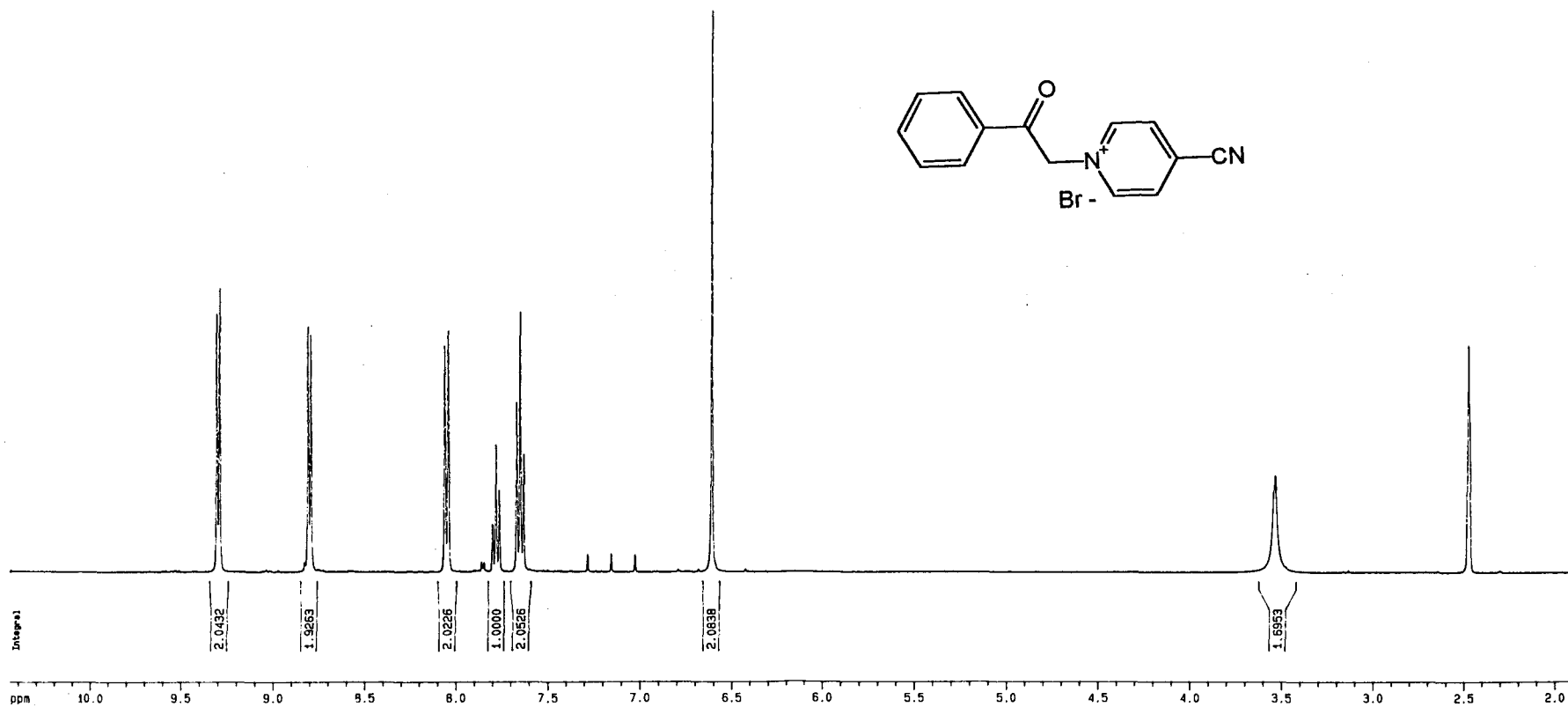
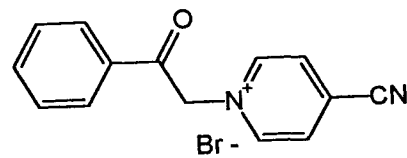
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN 36: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-hidroxiiminoformilpiridinio 70.



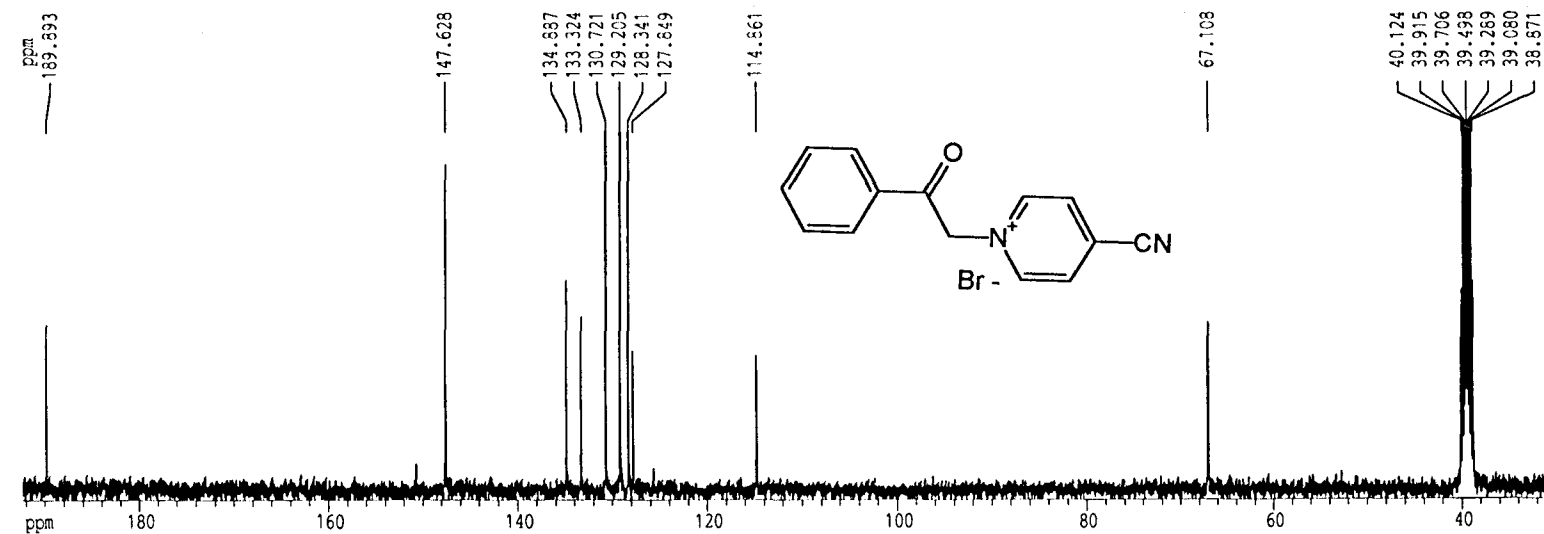
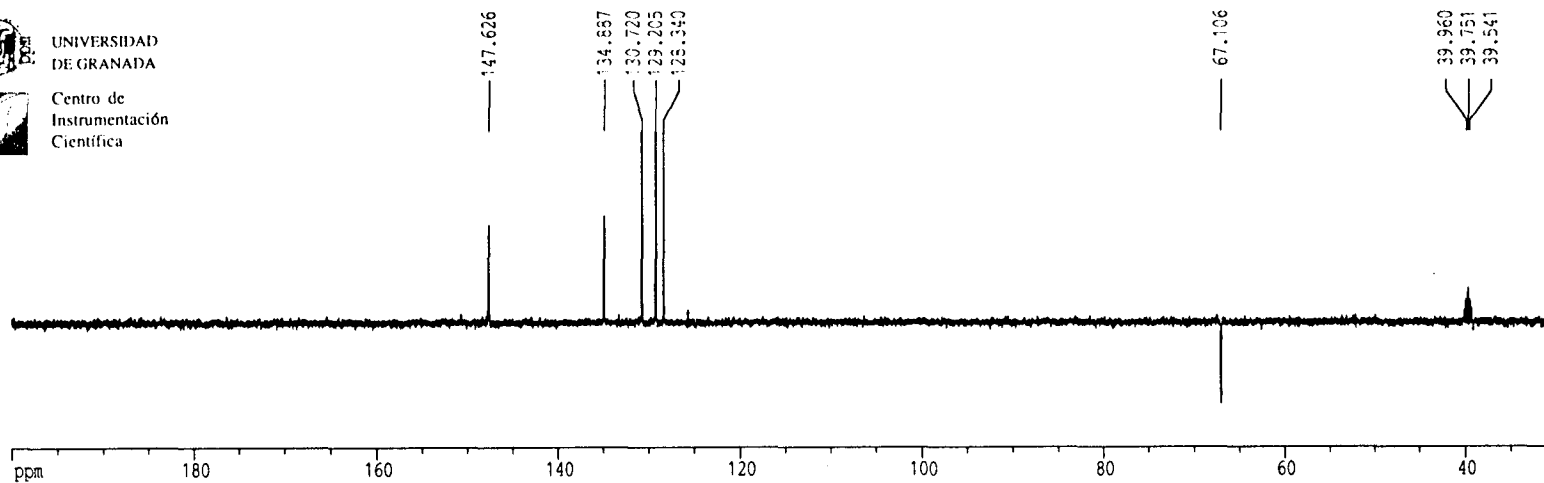
¹H-RMN 37: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-cianopiridinio 71.



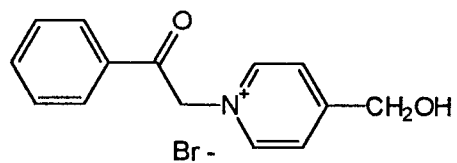
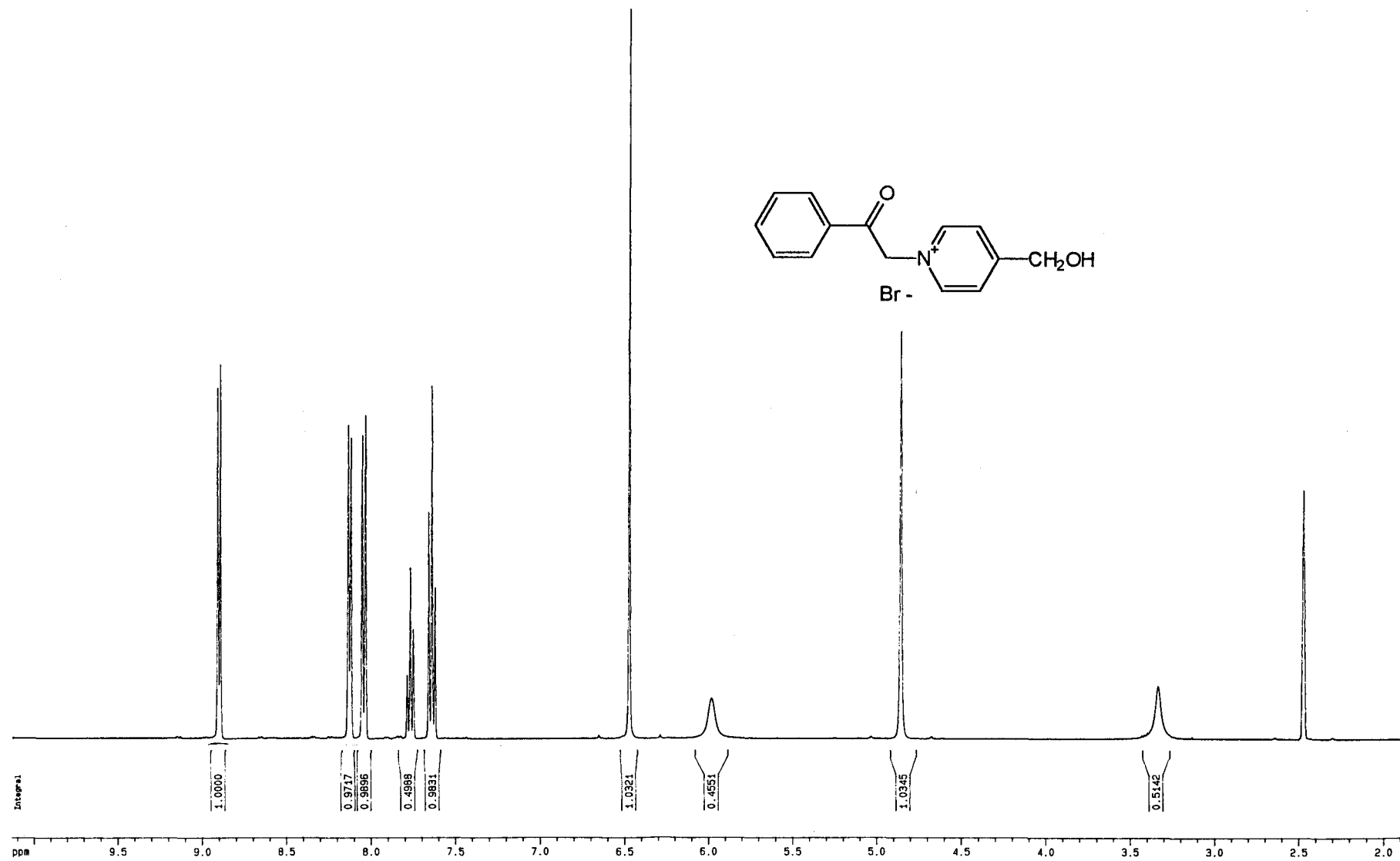
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN 37: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-cianopiridinio 71.



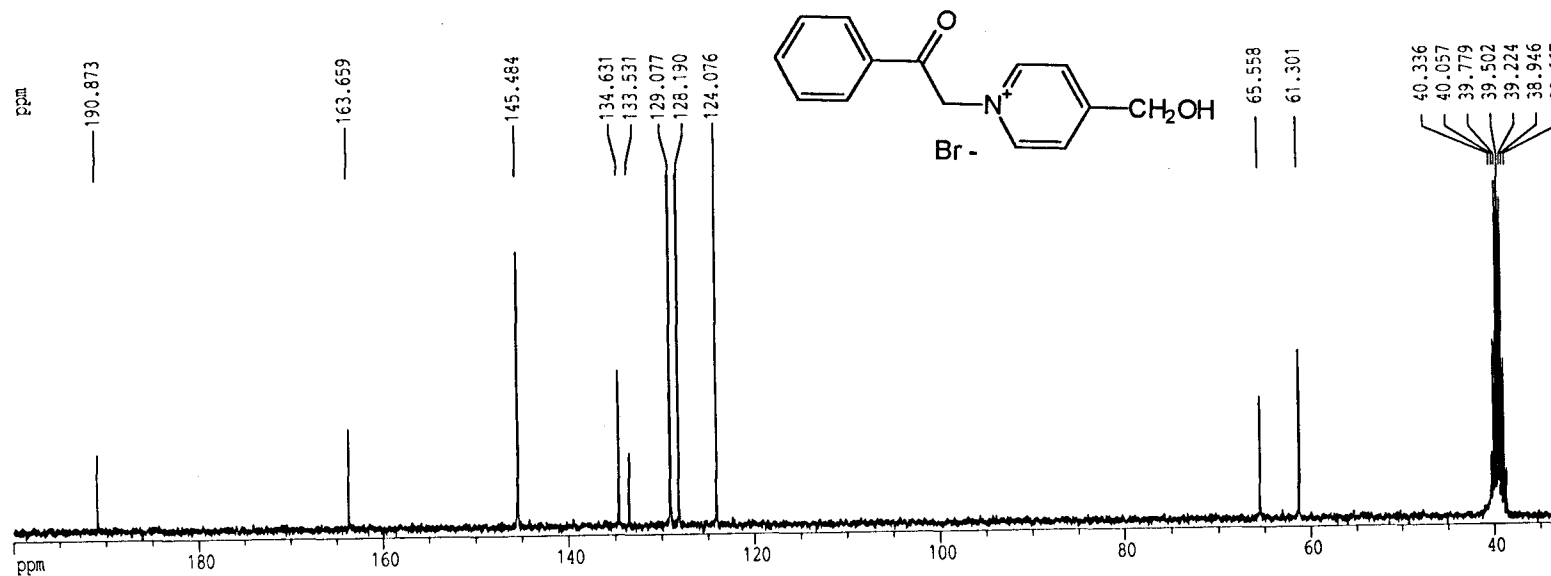
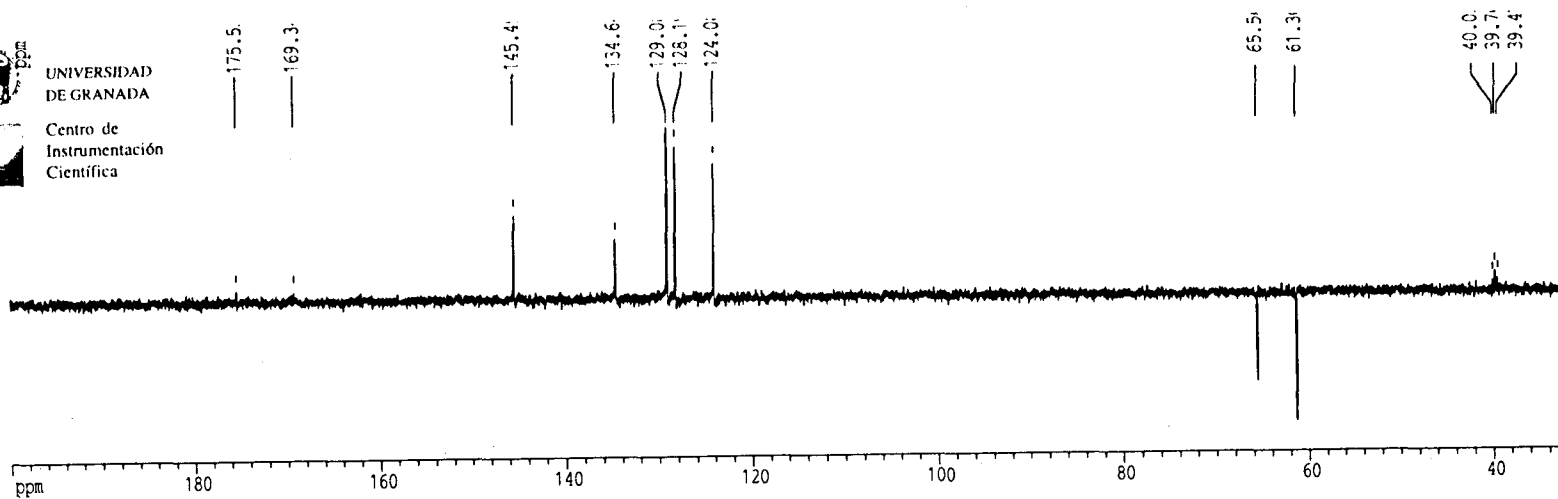
¹H-RMN 38: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-hidroximetilpiridinio 72.



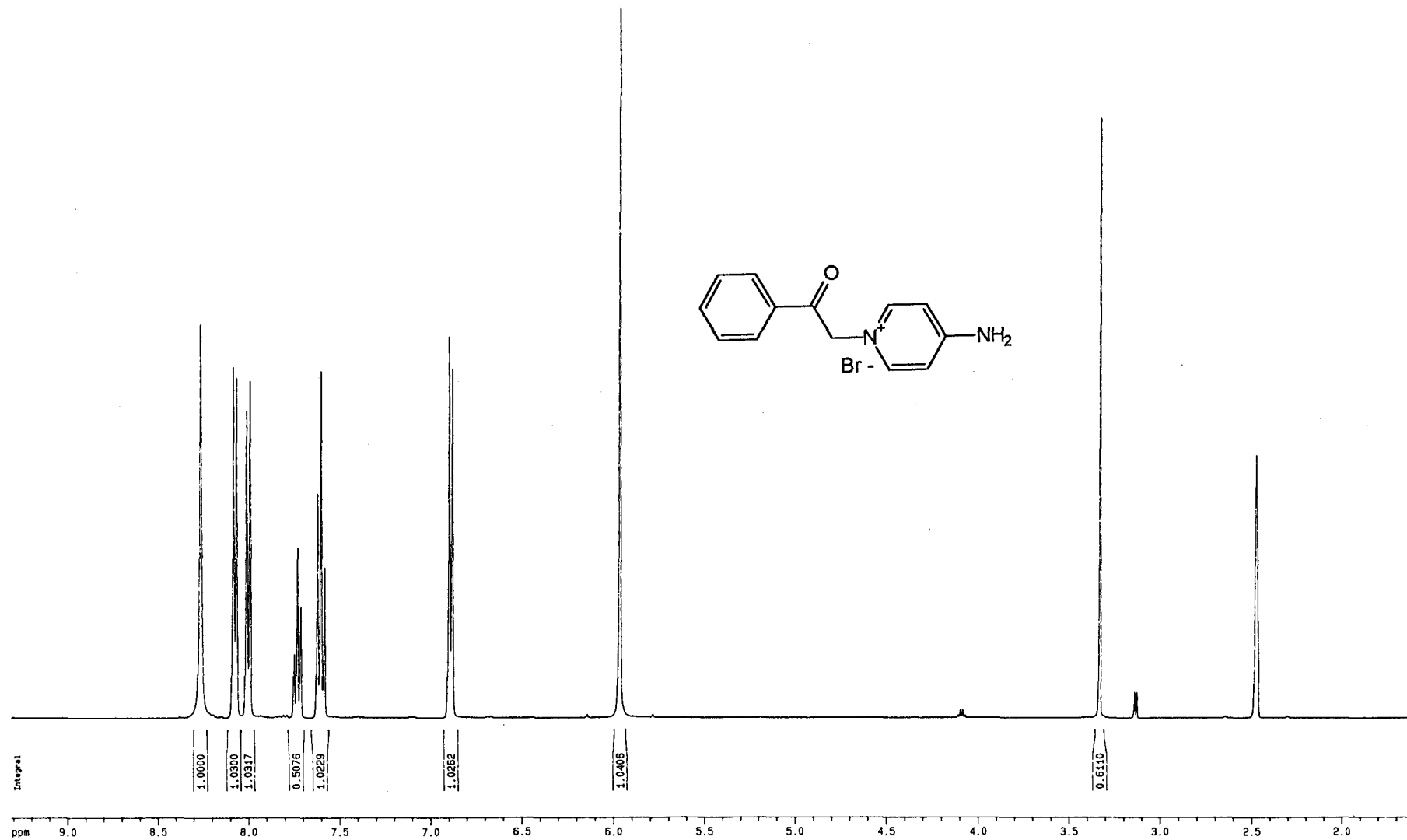
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



^{13}C -RMN 38: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-hidroximetilpiridinio 72.



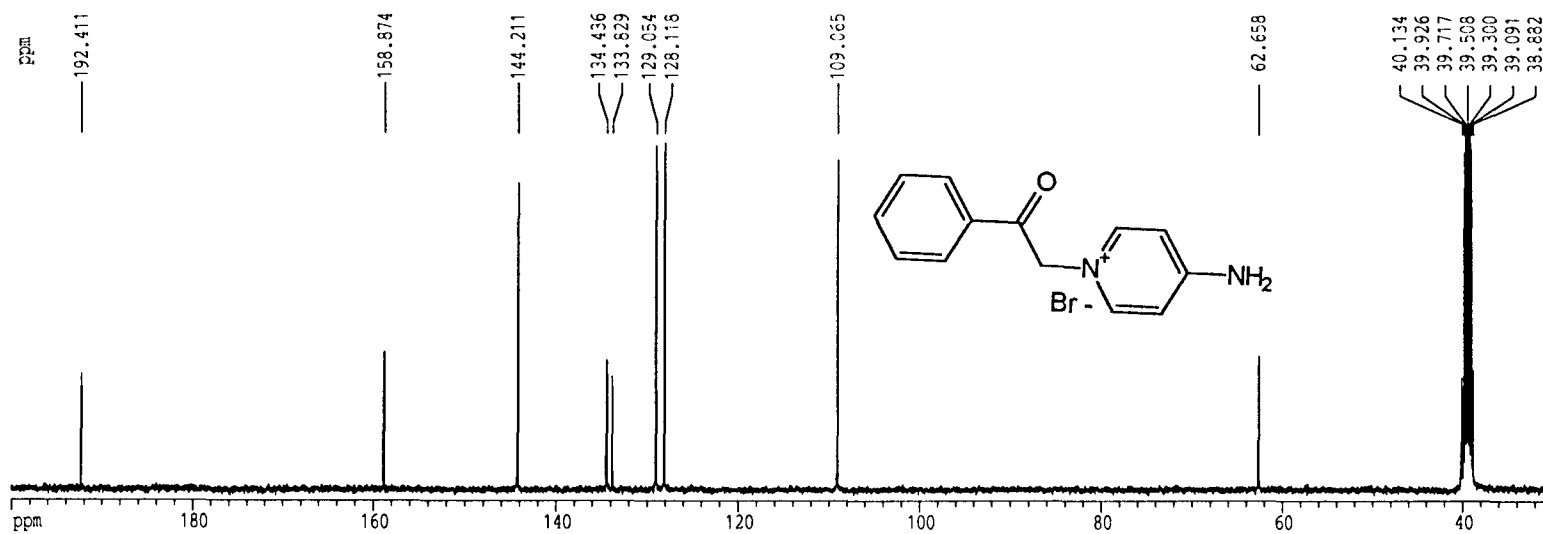
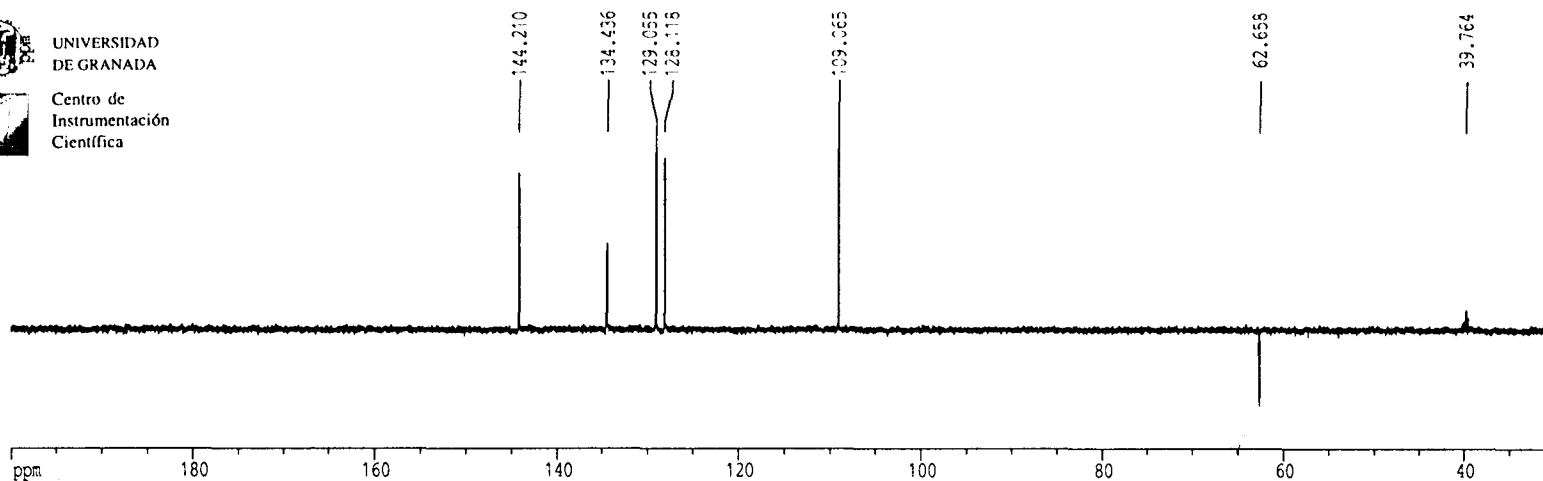
¹H-RMN 39: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-aminopiridinio 73.



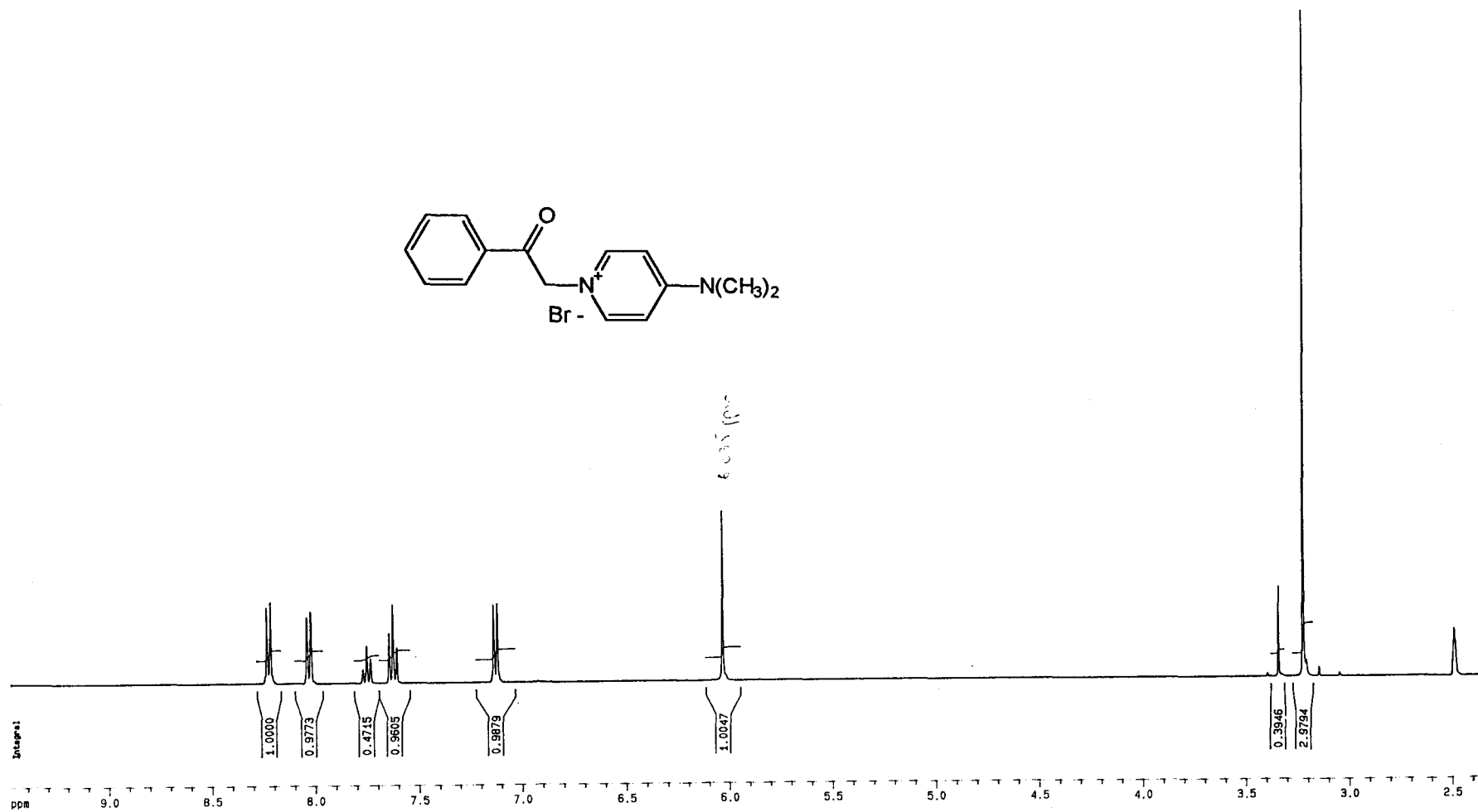
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN 39: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-aminopiridinio 73.



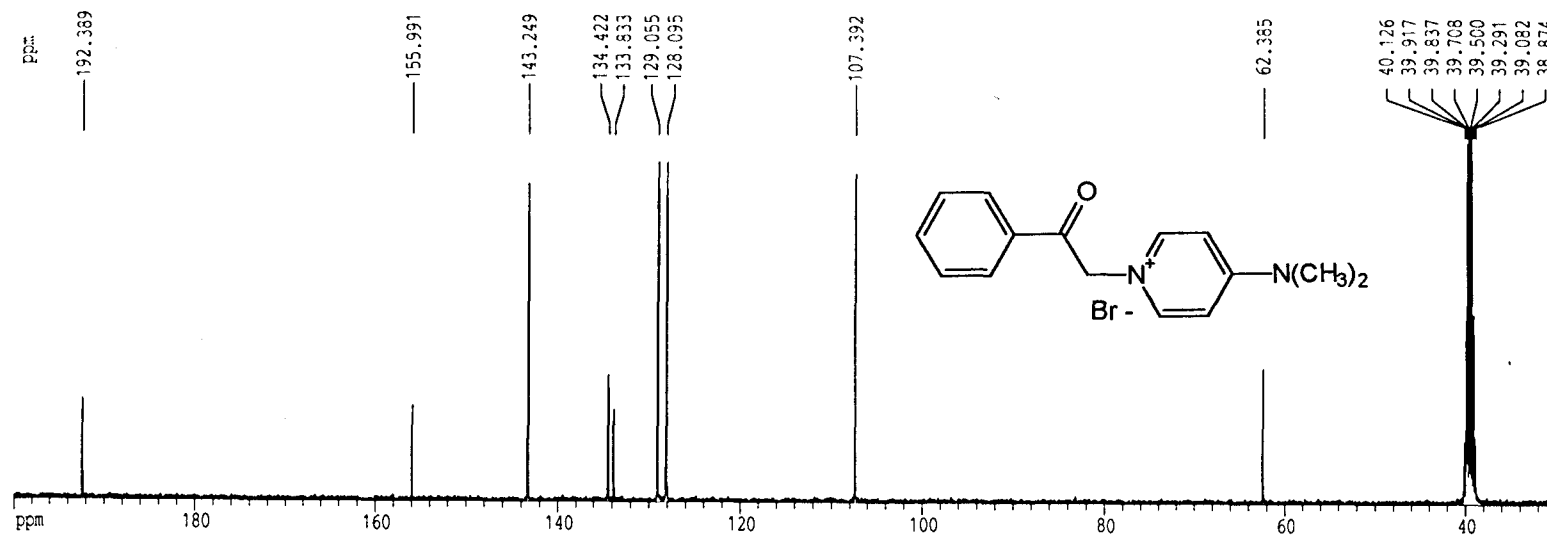
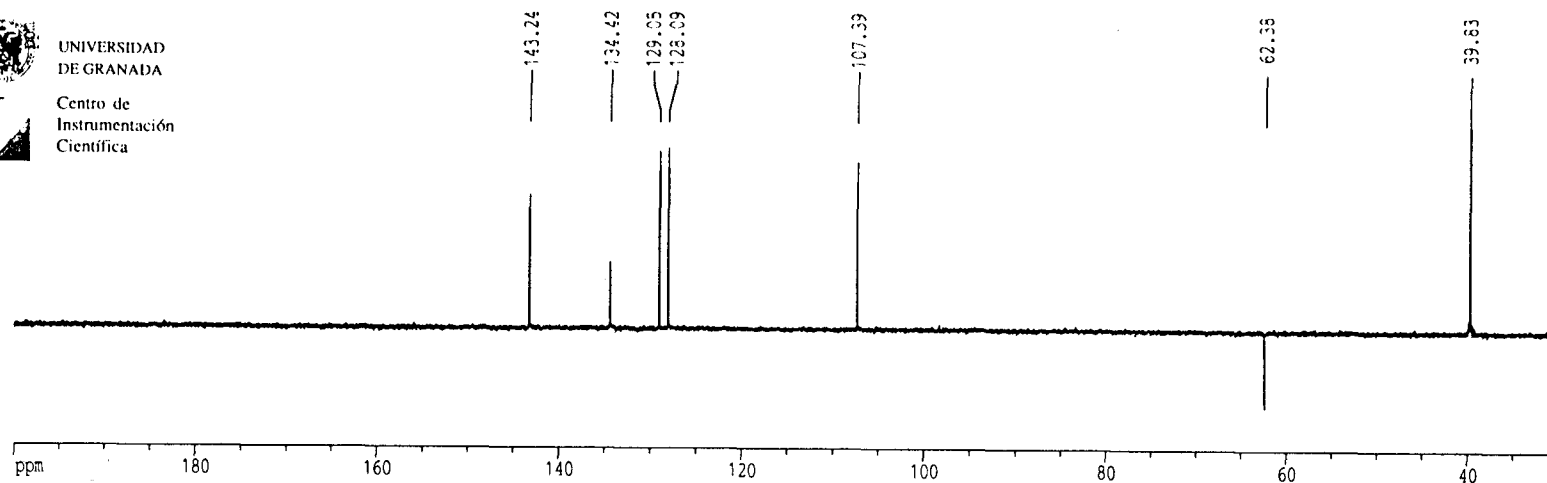
¹H-RMN 40: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-dimetilaminopiridinio 74.



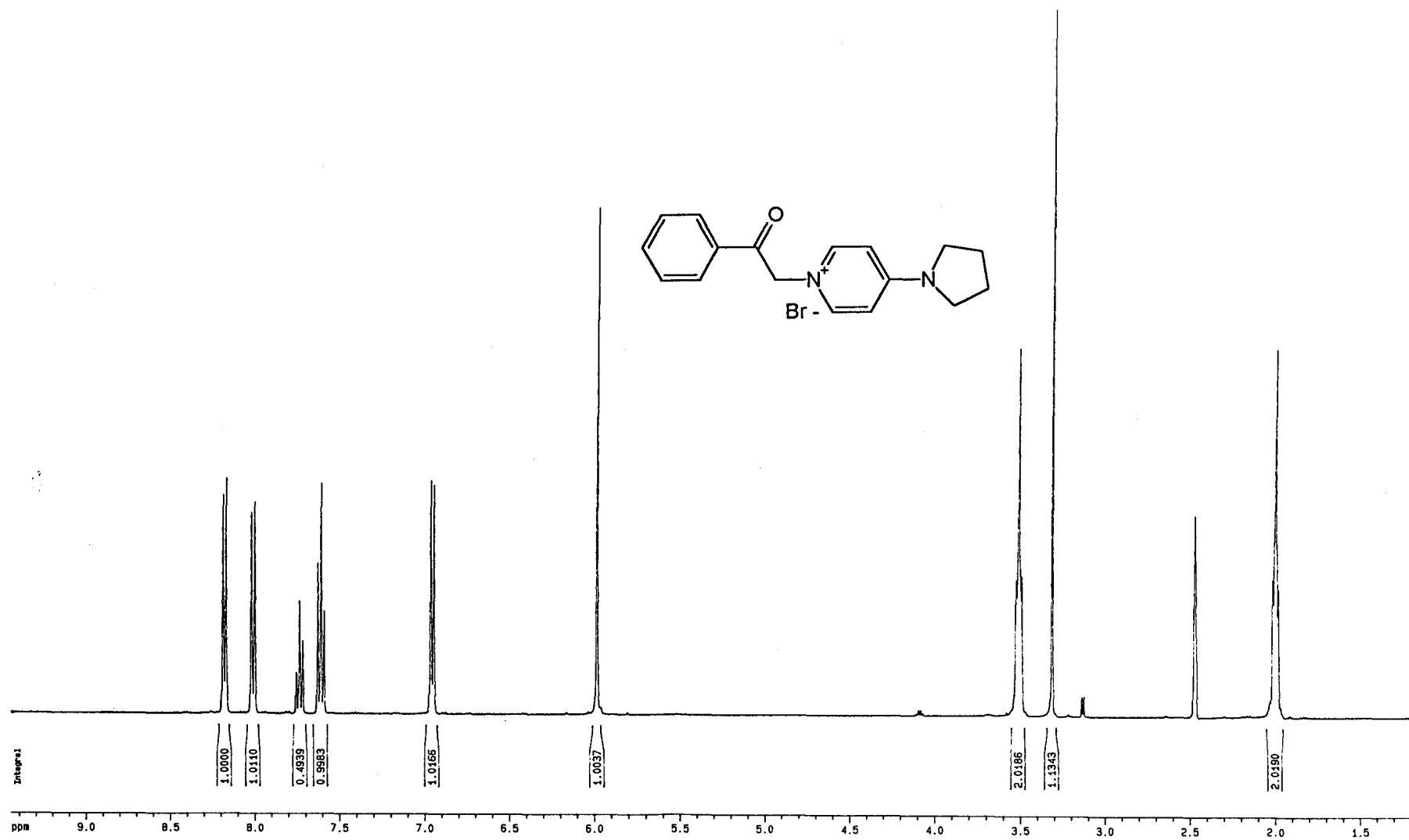
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



^{13}C -RMN 40: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-dimetilaminopiridinio 74.



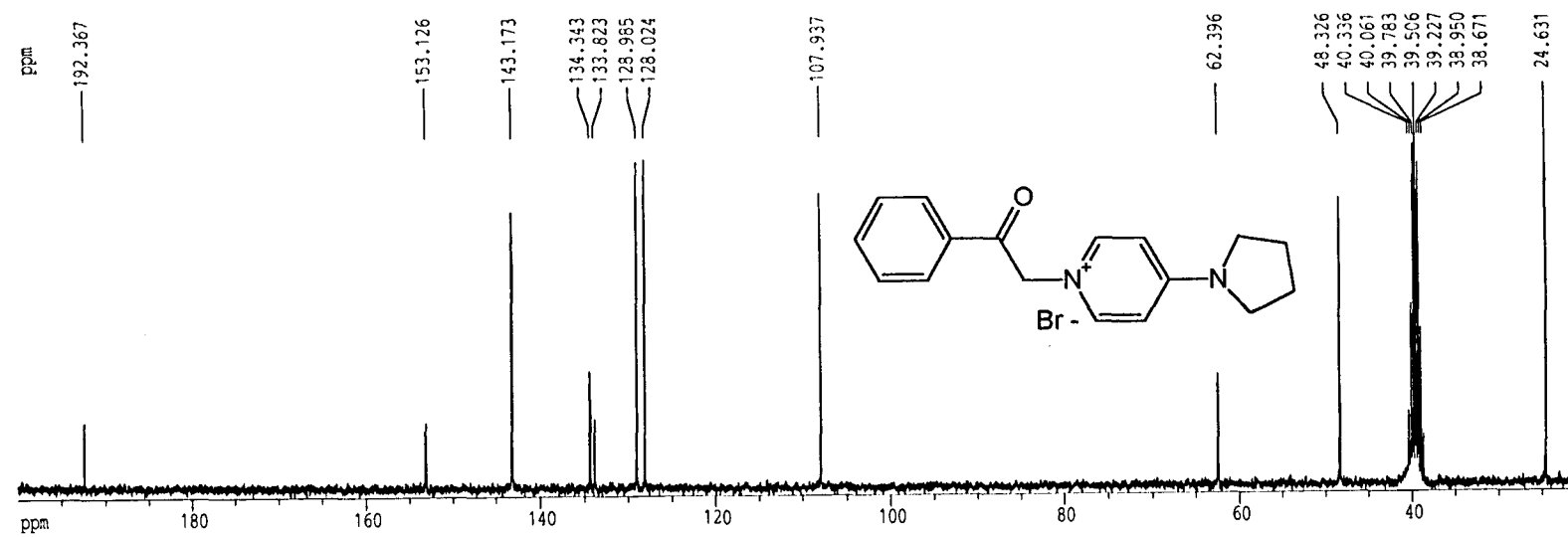
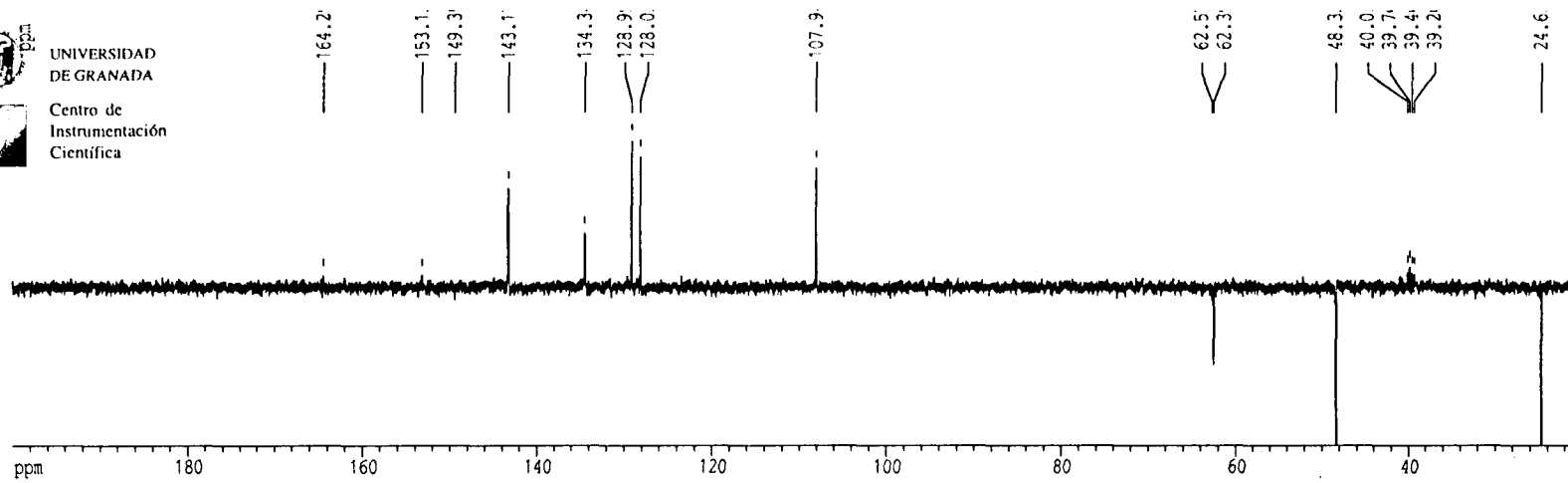
¹H-RMN 41: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-(1-pirrolidino)piridinio 75.



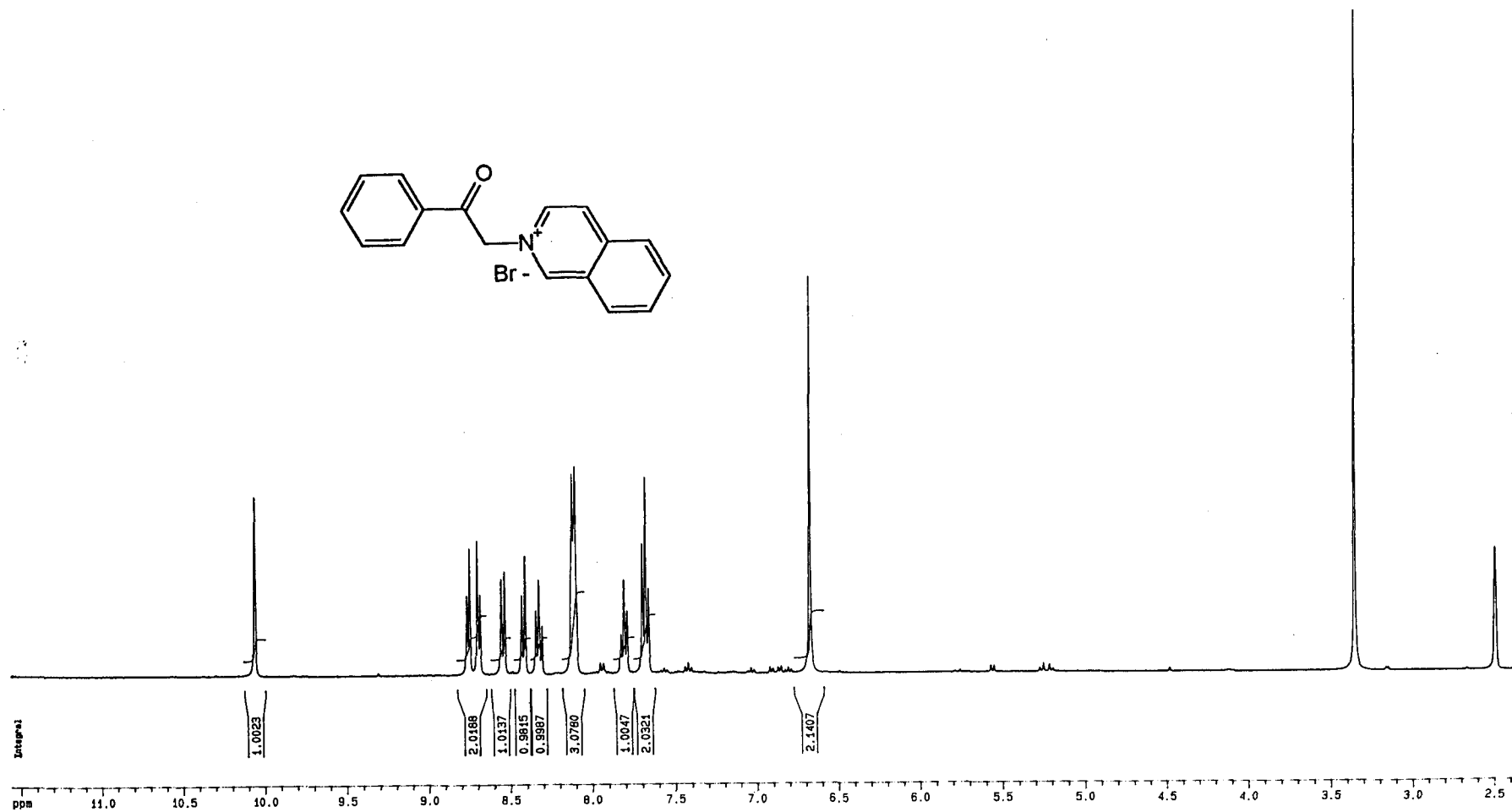
UNIVERSIDAD DE GRANADA



Centro de Instrumentación Científica



¹³C-RMN 41: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)-4-(1-pirrolidino)piridinio 75.



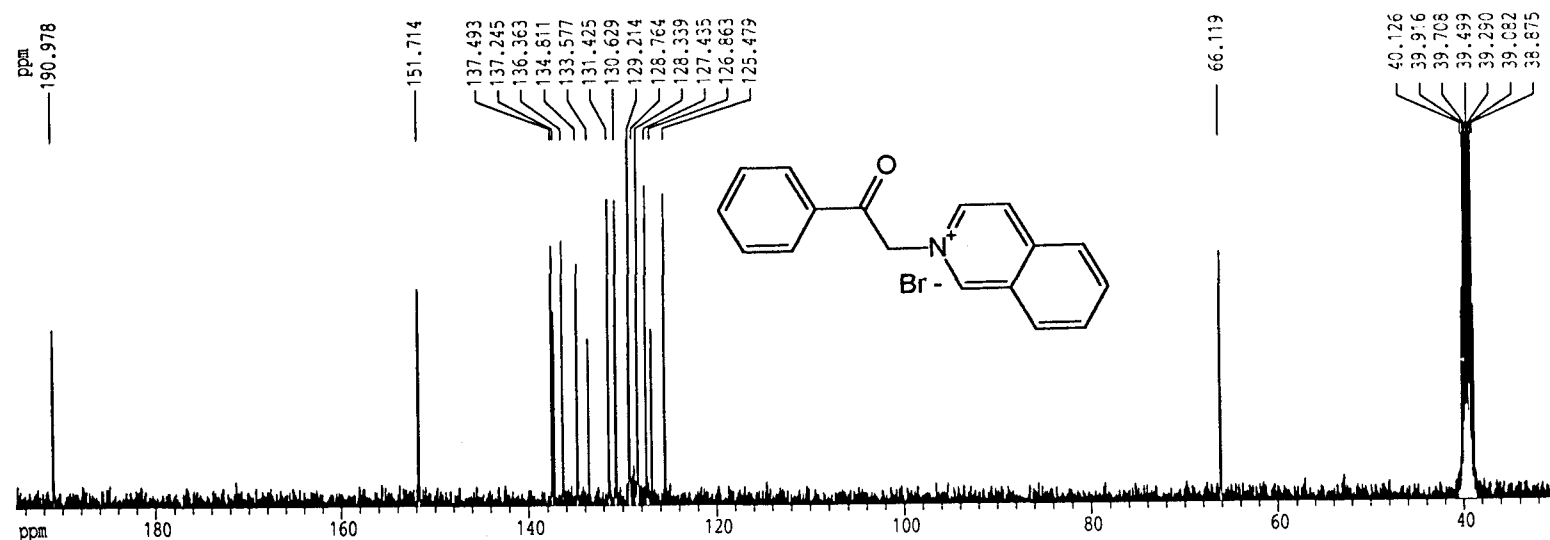
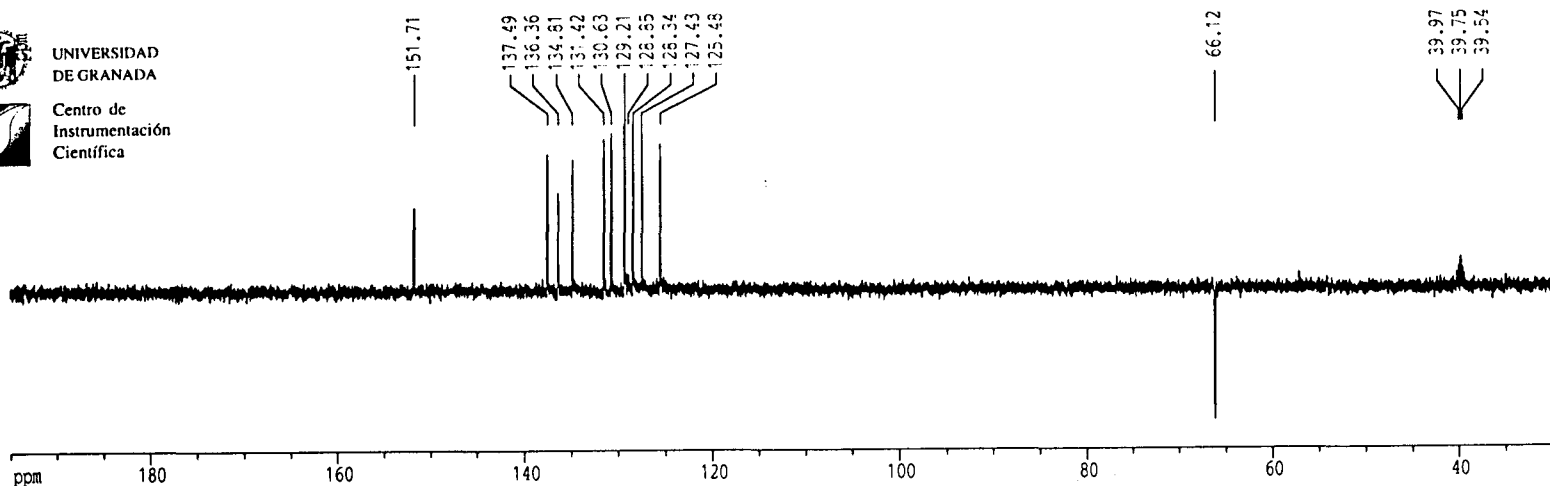
¹H-RMN 42: Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)isoquinolinio 78.



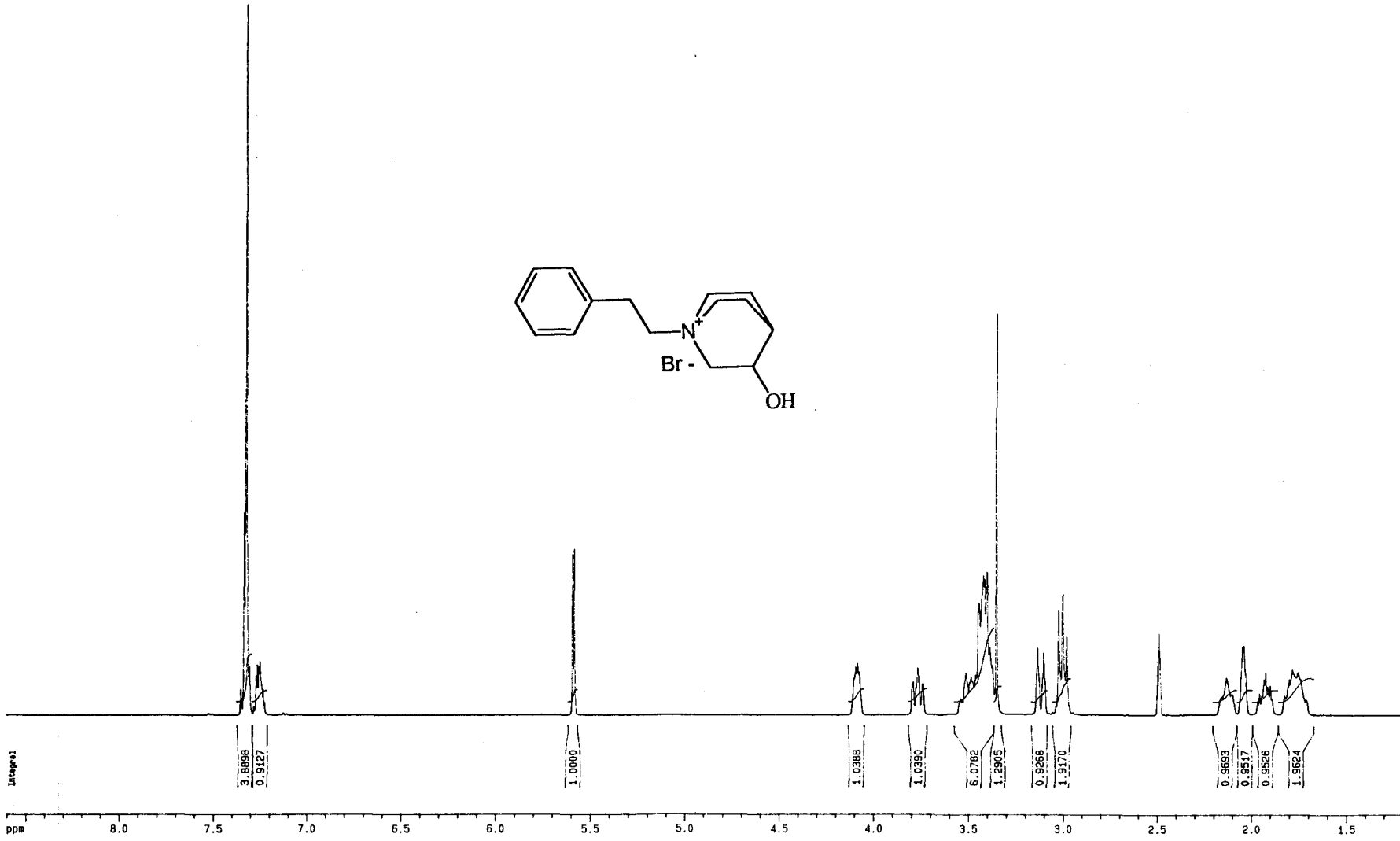
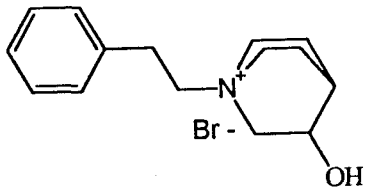
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



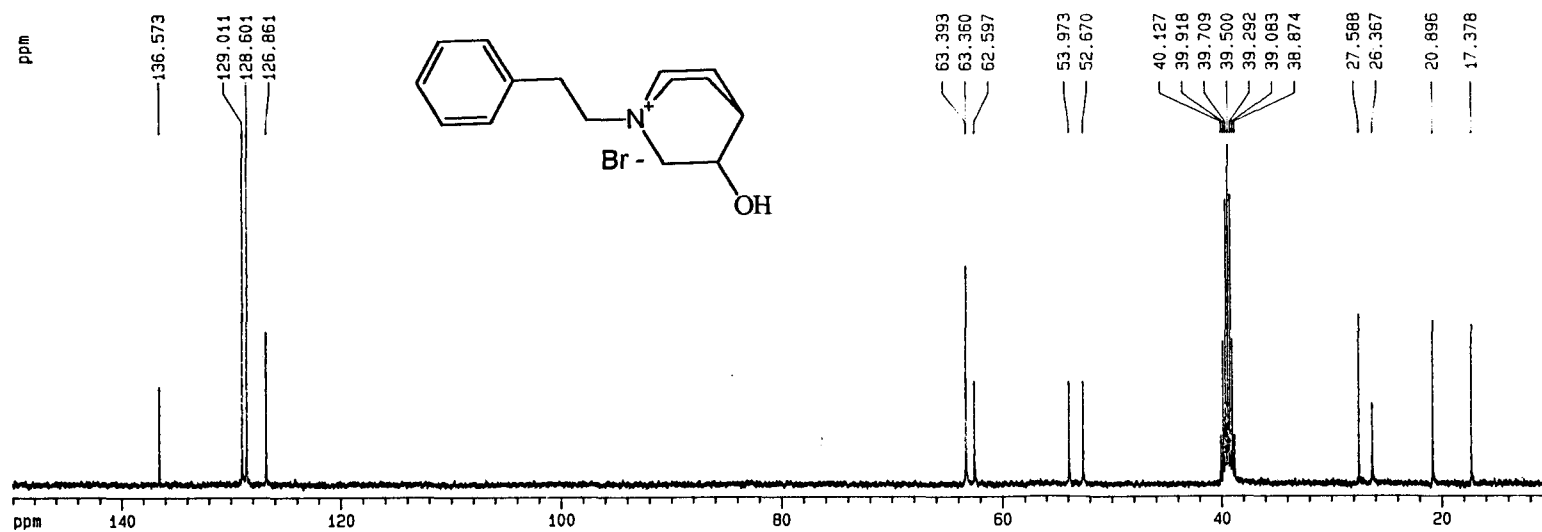
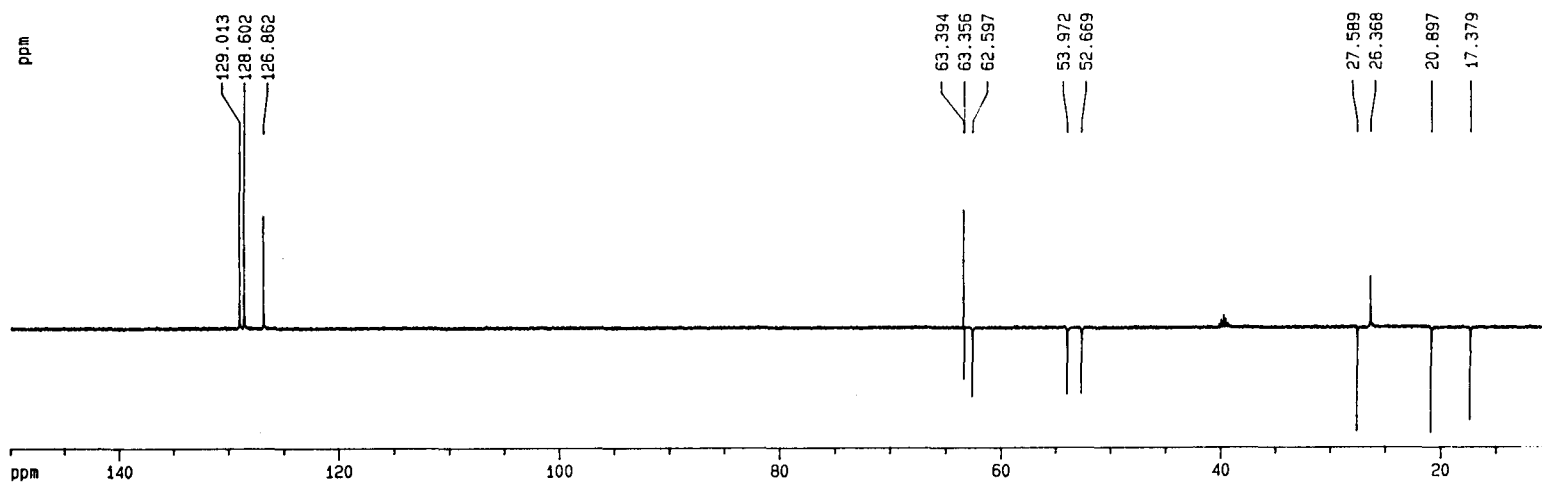
Centro de
Instrumentación
Científica



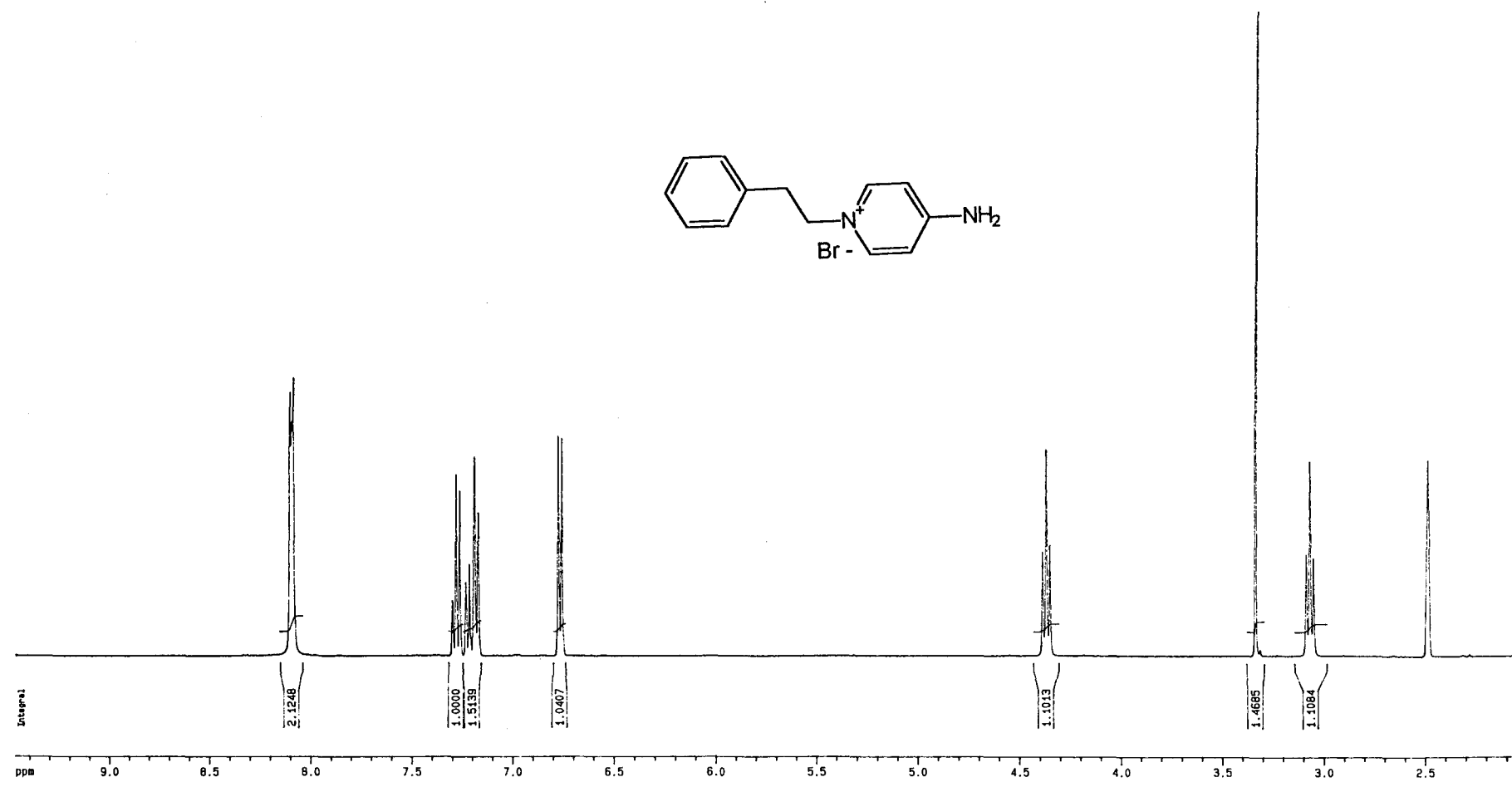
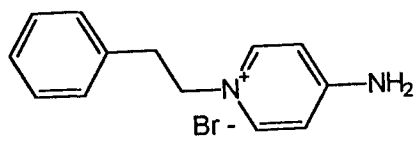
^{13}C -RMN 42 Bromuro de 1-(fenilcarbonilmetil)isoquinolinio 78.



¹H-RMN 43: Bromuro de 1-fenetil-3-hidroxiquinuclidinio 80.



¹³C-RMN 43: Bromuro de 1-fenetil-3-hidroxiquinuclidinio 80.



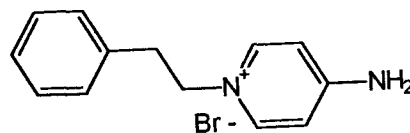
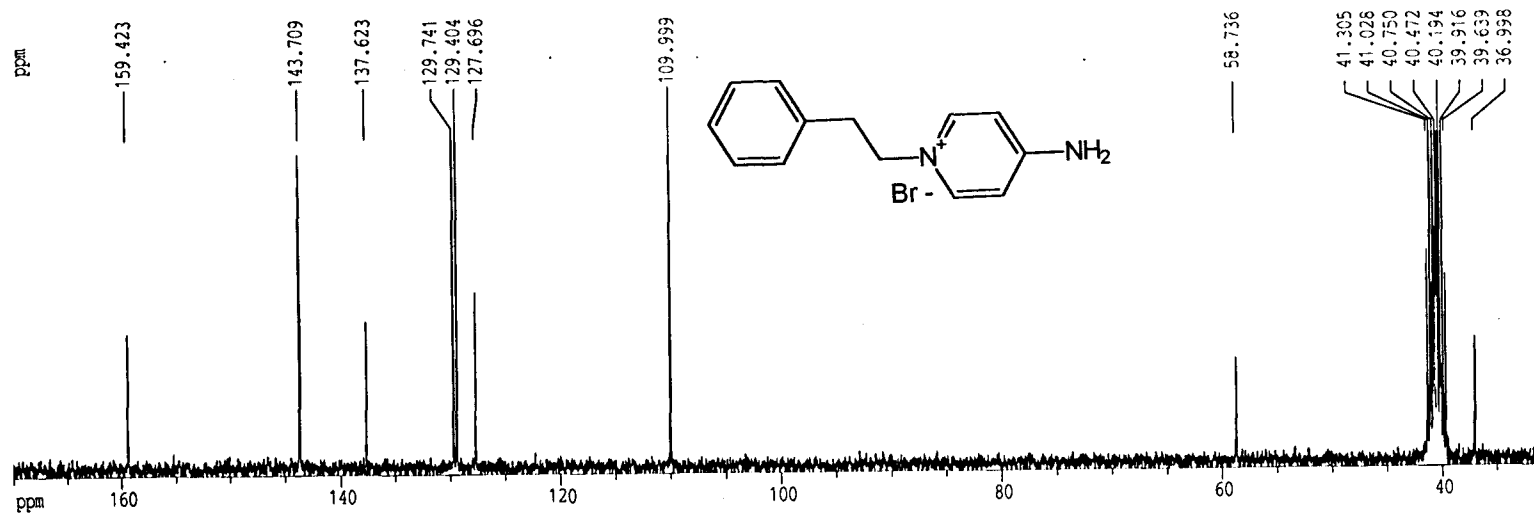
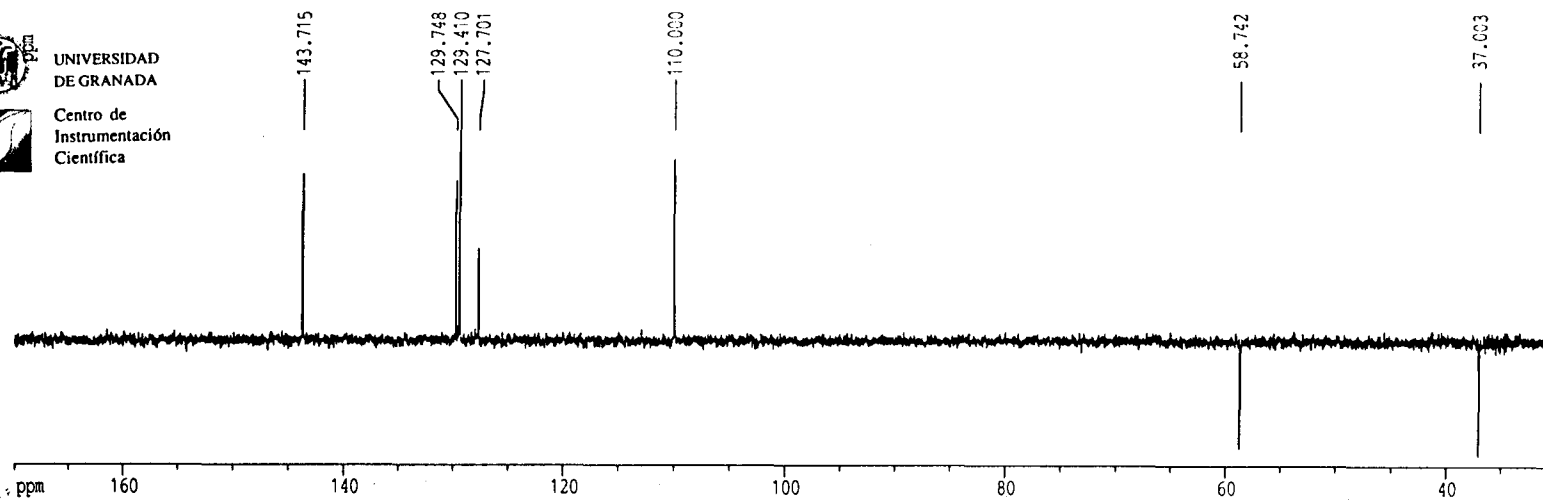
¹H-RMN 44: Bromuro de 1-fenetil-4-aminopiridinio 81.



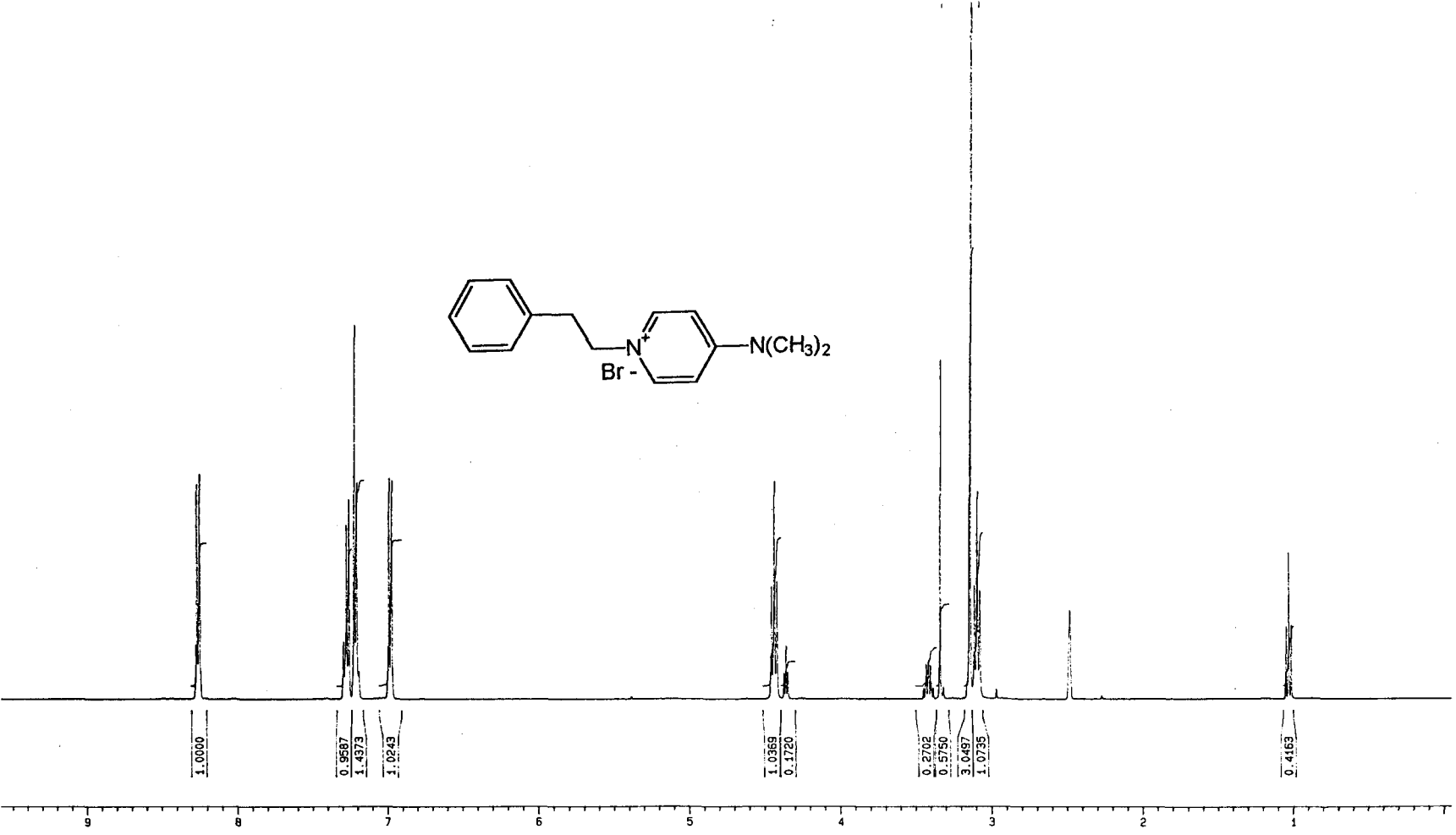
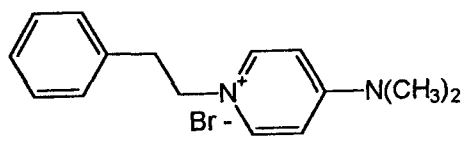
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



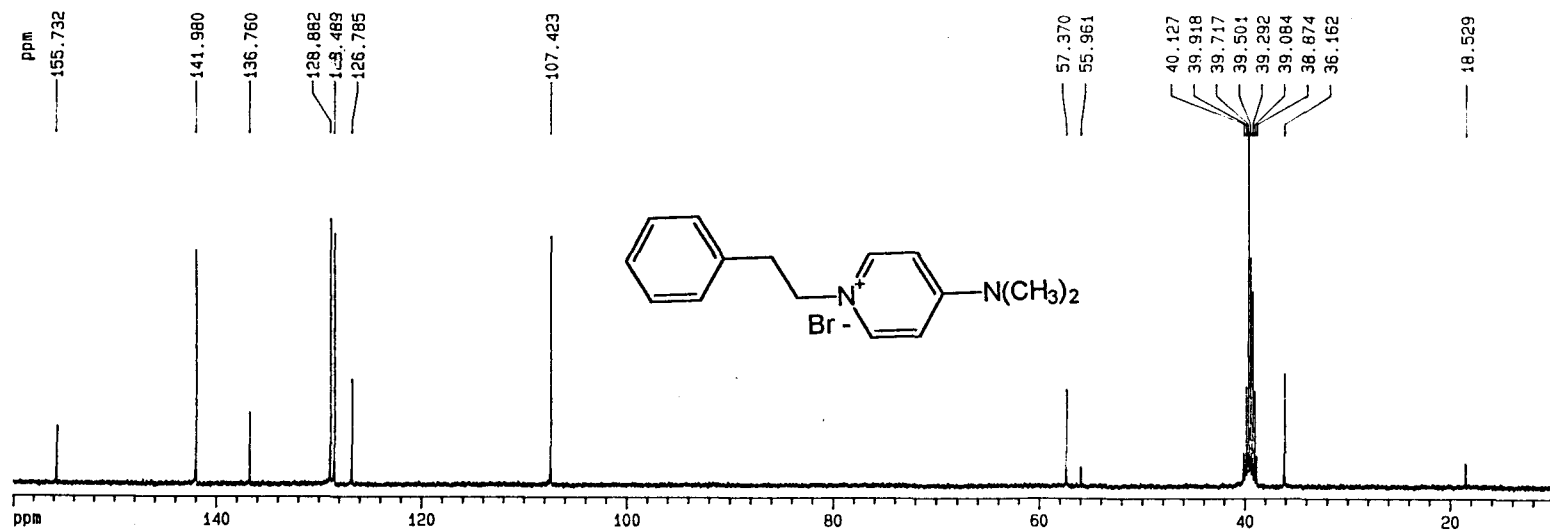
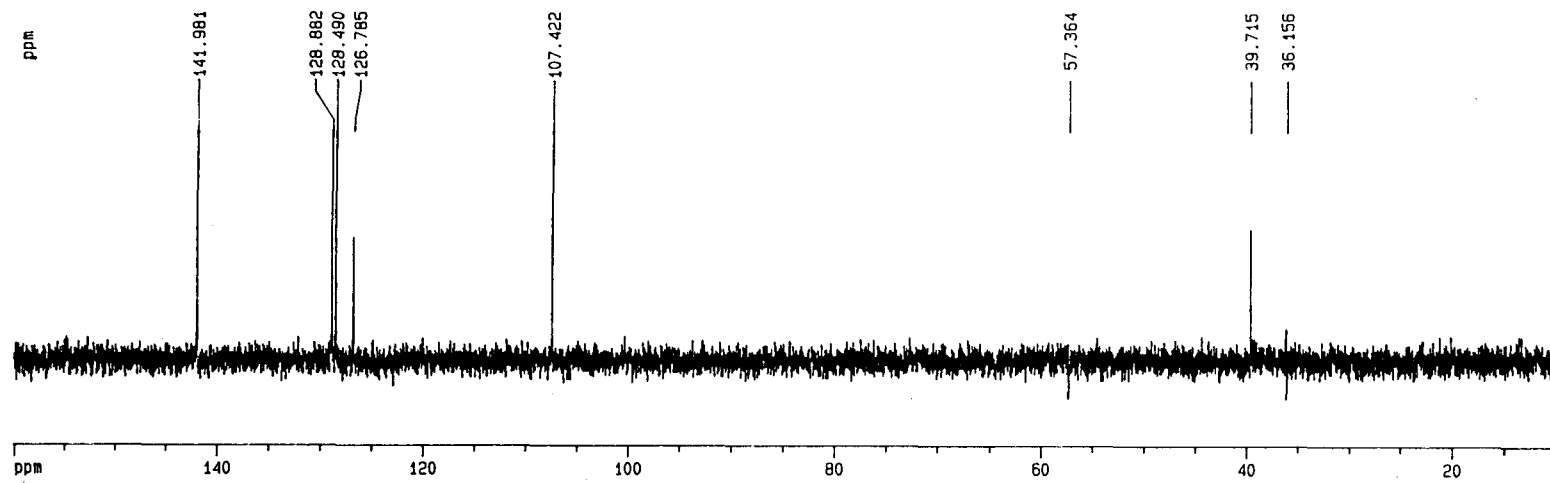
Centro de
Instrumentación
Científica



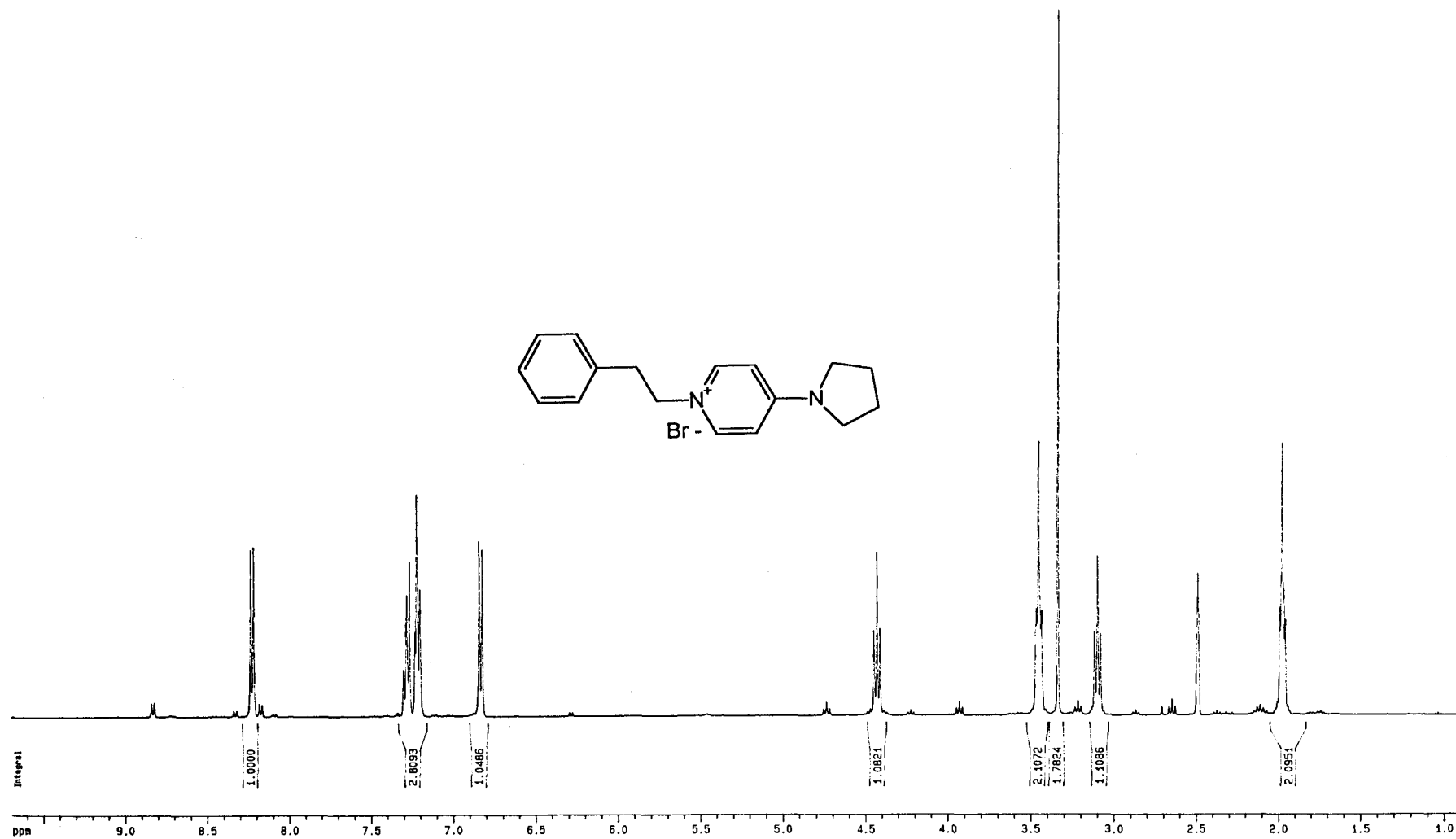
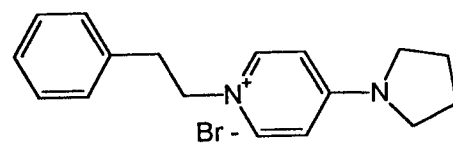
¹³C-RMN 44: Bromuro de 1-fenetil-4-aminopiridinio 81.



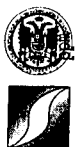
¹H-RMN 45: Bromuro de 1-fenetil-4-dimetilaminopiridinio 82.



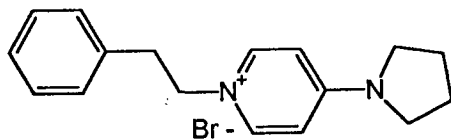
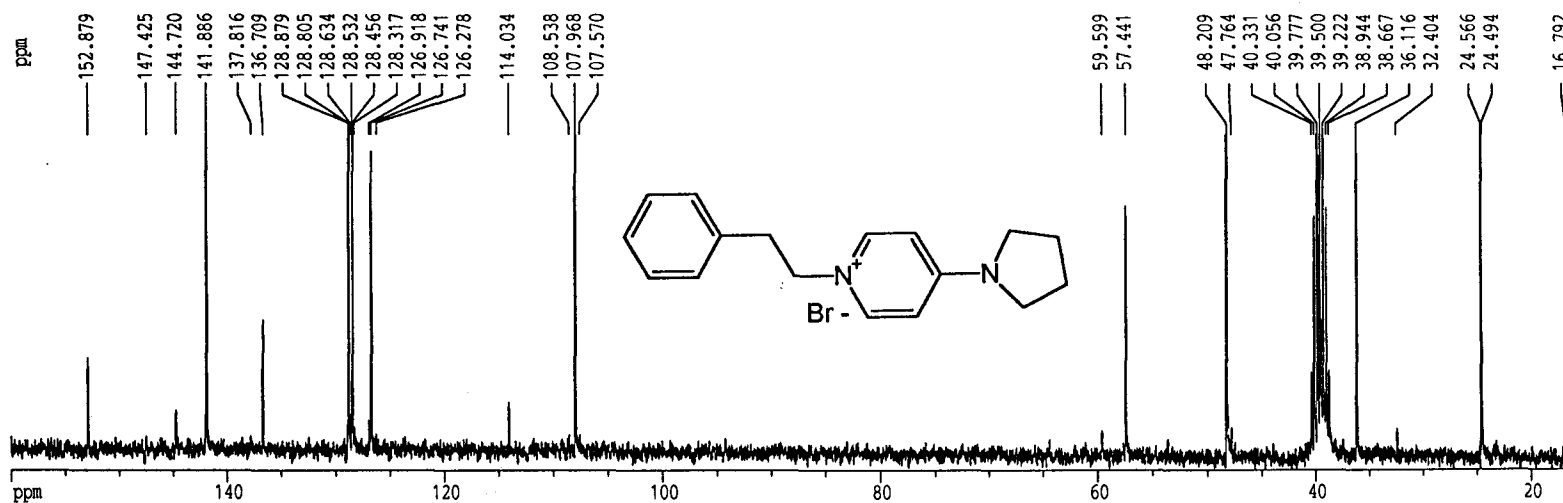
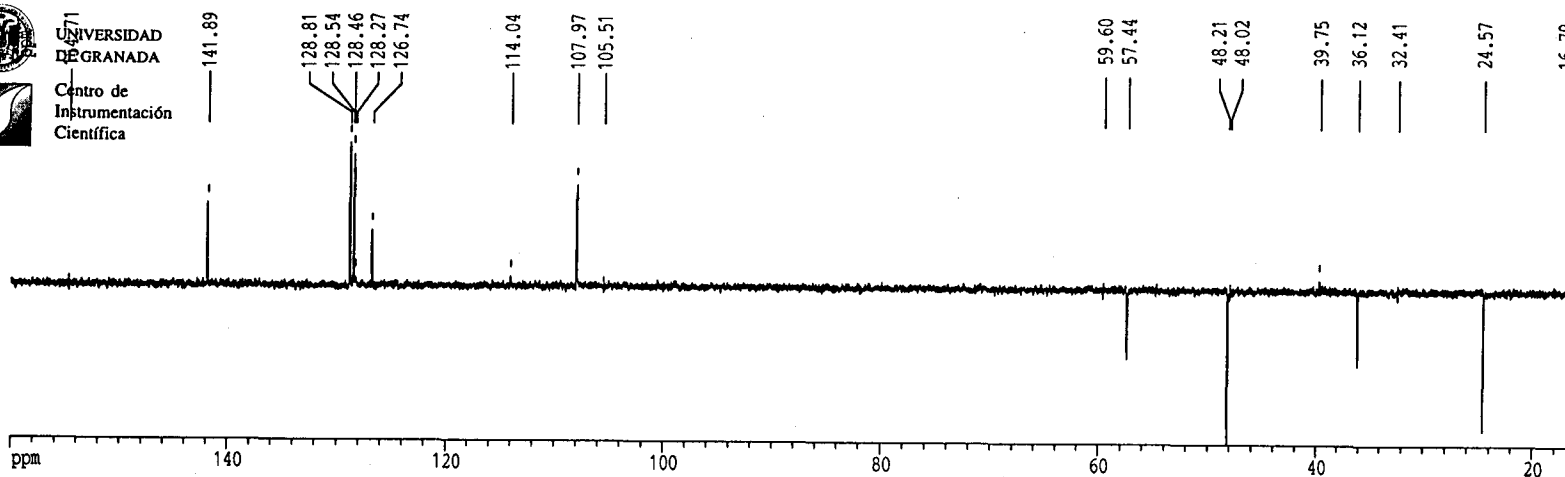
¹³C-RMN 45: Bromuro de 1-fenil-4-dimetilaminopiridinio 82.



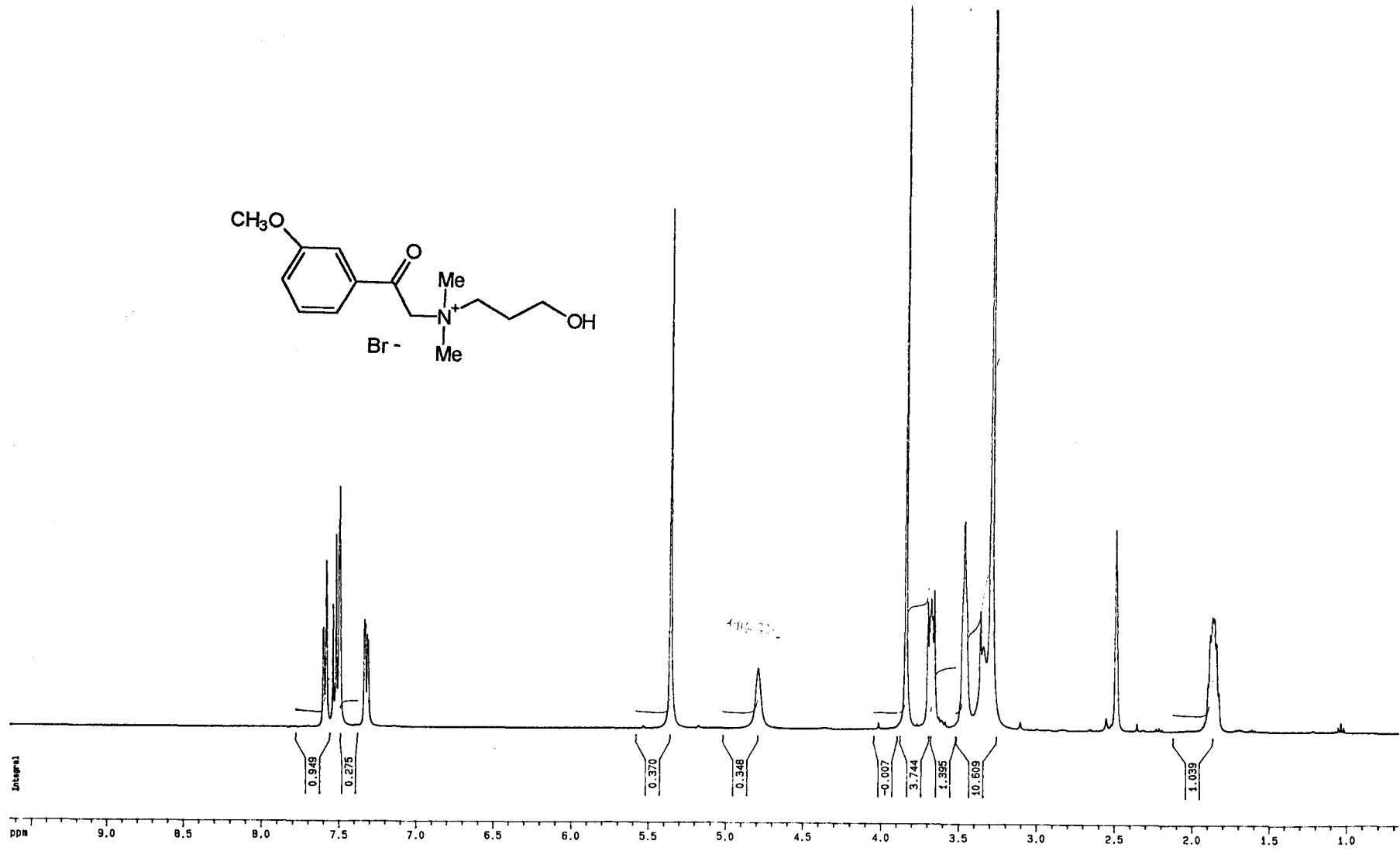
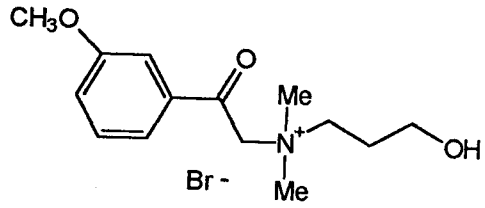
¹H-RMN 46: Bromuro de 1-fenetil-4-(1-pirrolidino)piridinio 83.



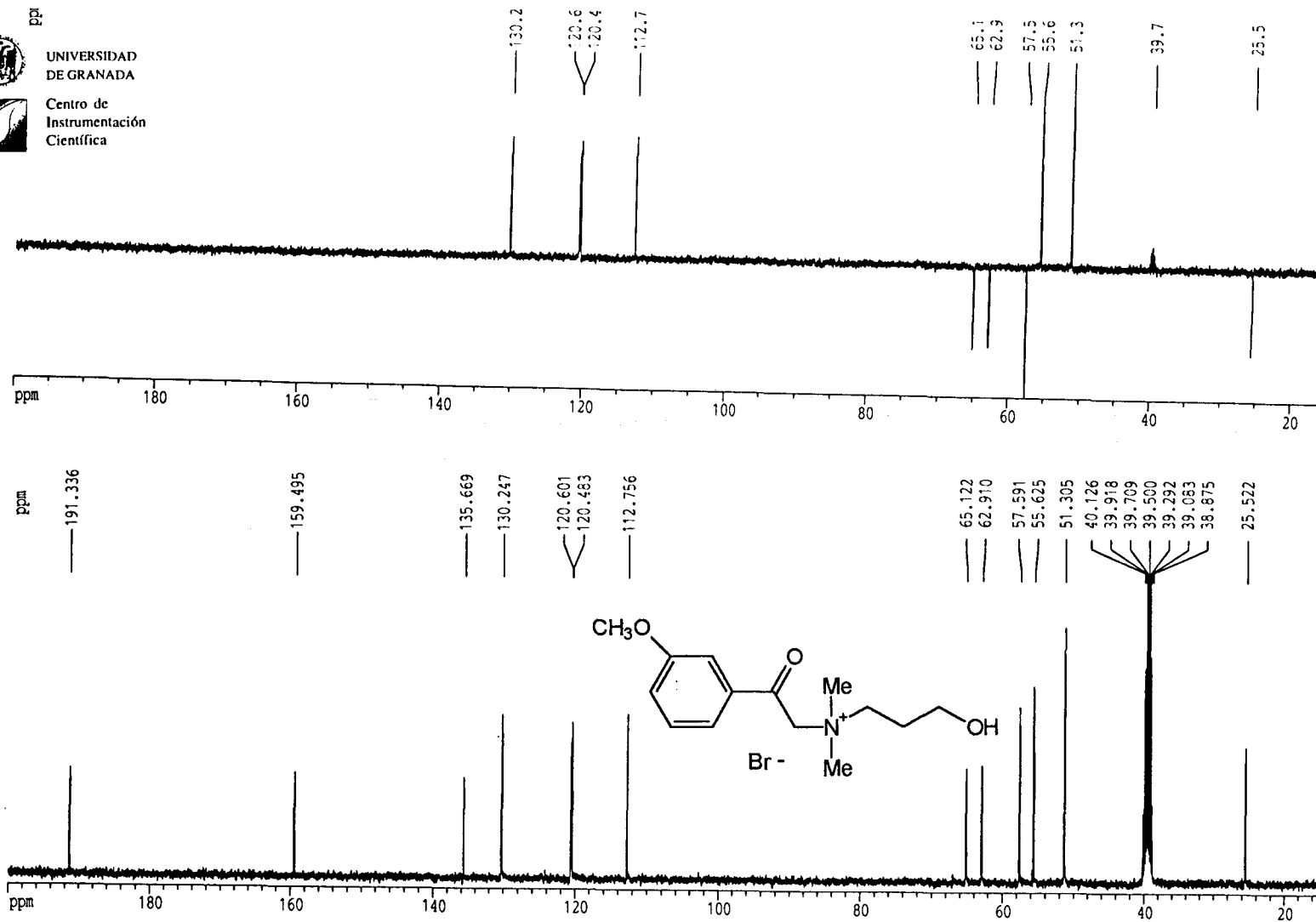
UNIVERSIDAD
DE GRANADA
Centro de
Instrumentación
Científica

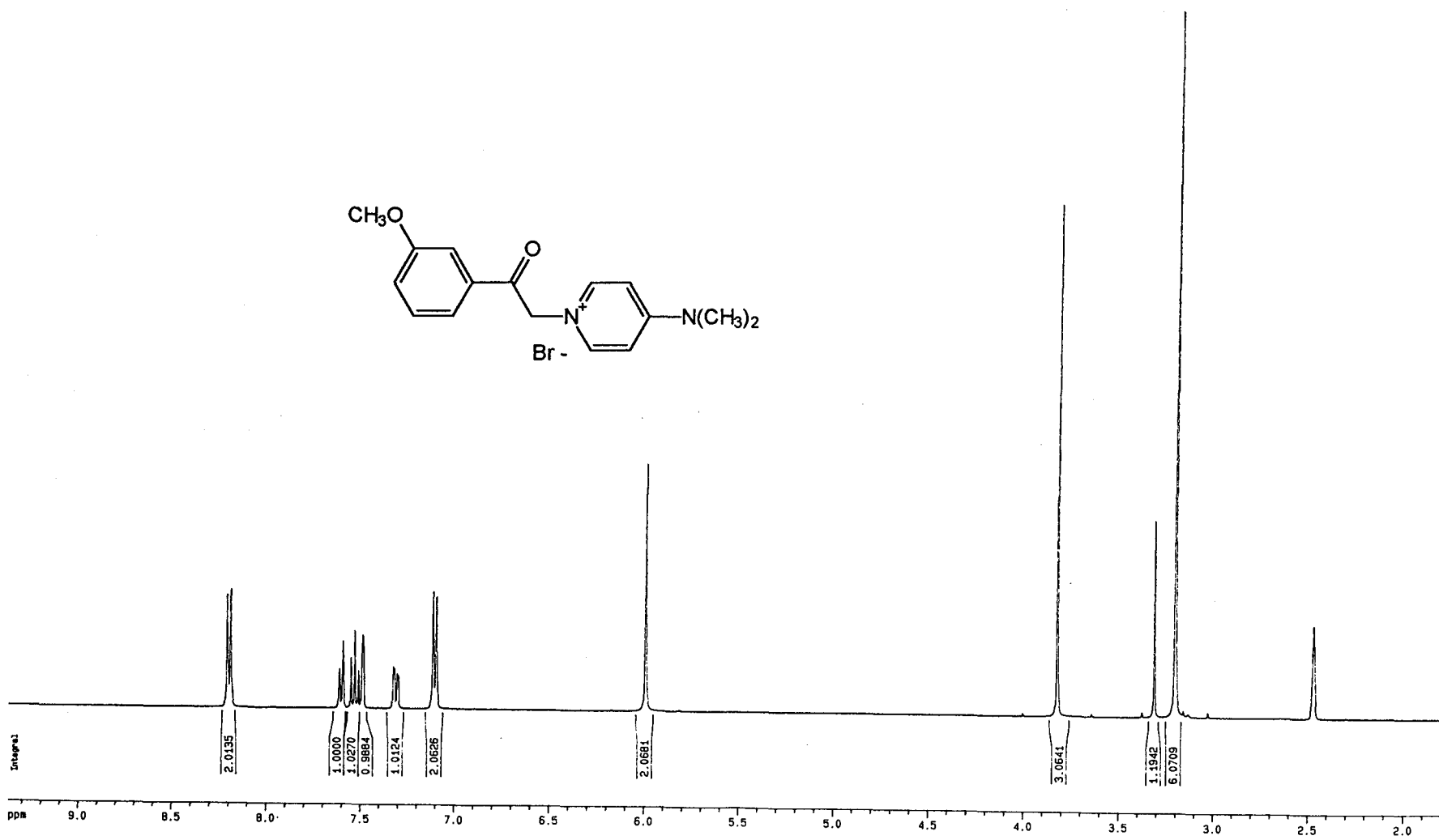
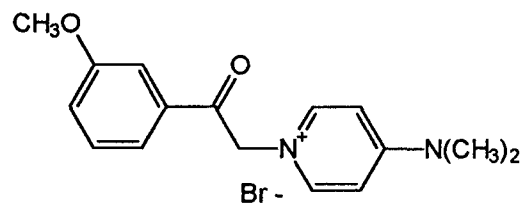


¹³C-RMN 46: Bromuro de 1-fenetil-4-(1-pirrolidino)piridinio 83.



¹H-RMN 47: Bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-3-hidroxiopropildimetilamonio 85.





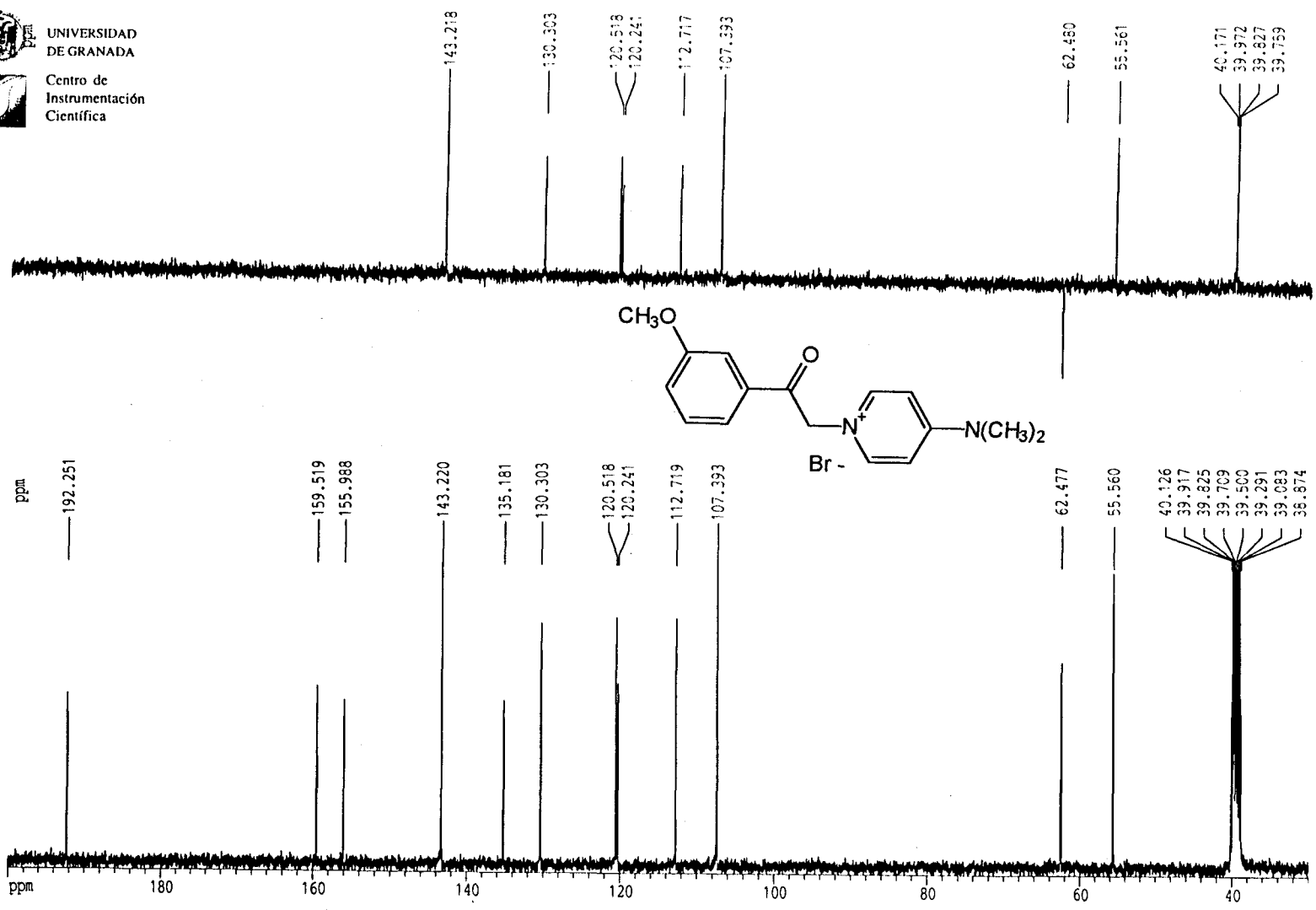
¹H-RMN 48: Bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-4-dimetilaminopiridinio 86.



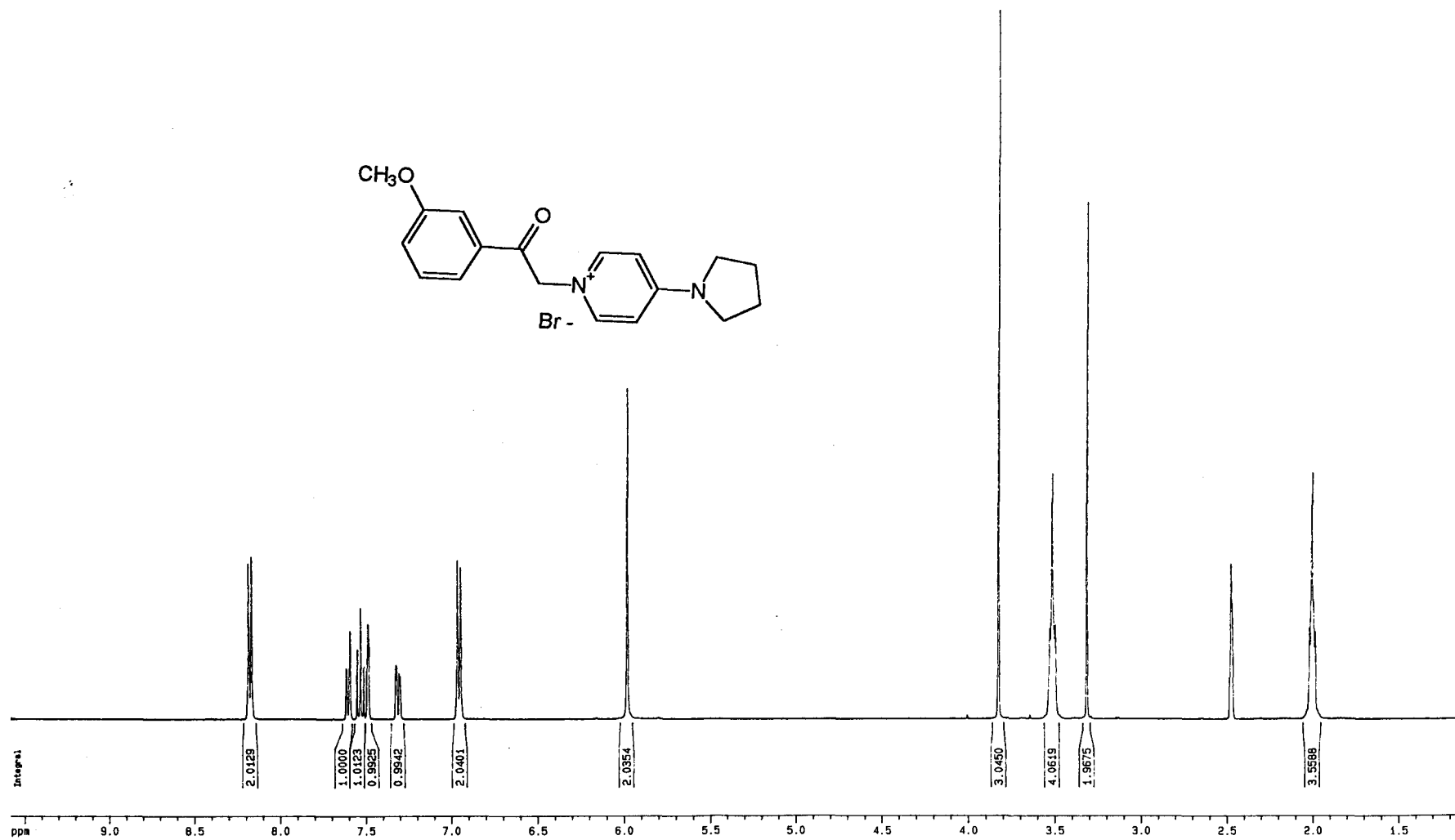
UNIVERSIDAD DE GRANADA



Centro de Instrumentación Científica



¹³C-RMN 48: Bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-4-dimetilaminopiridinio 86.



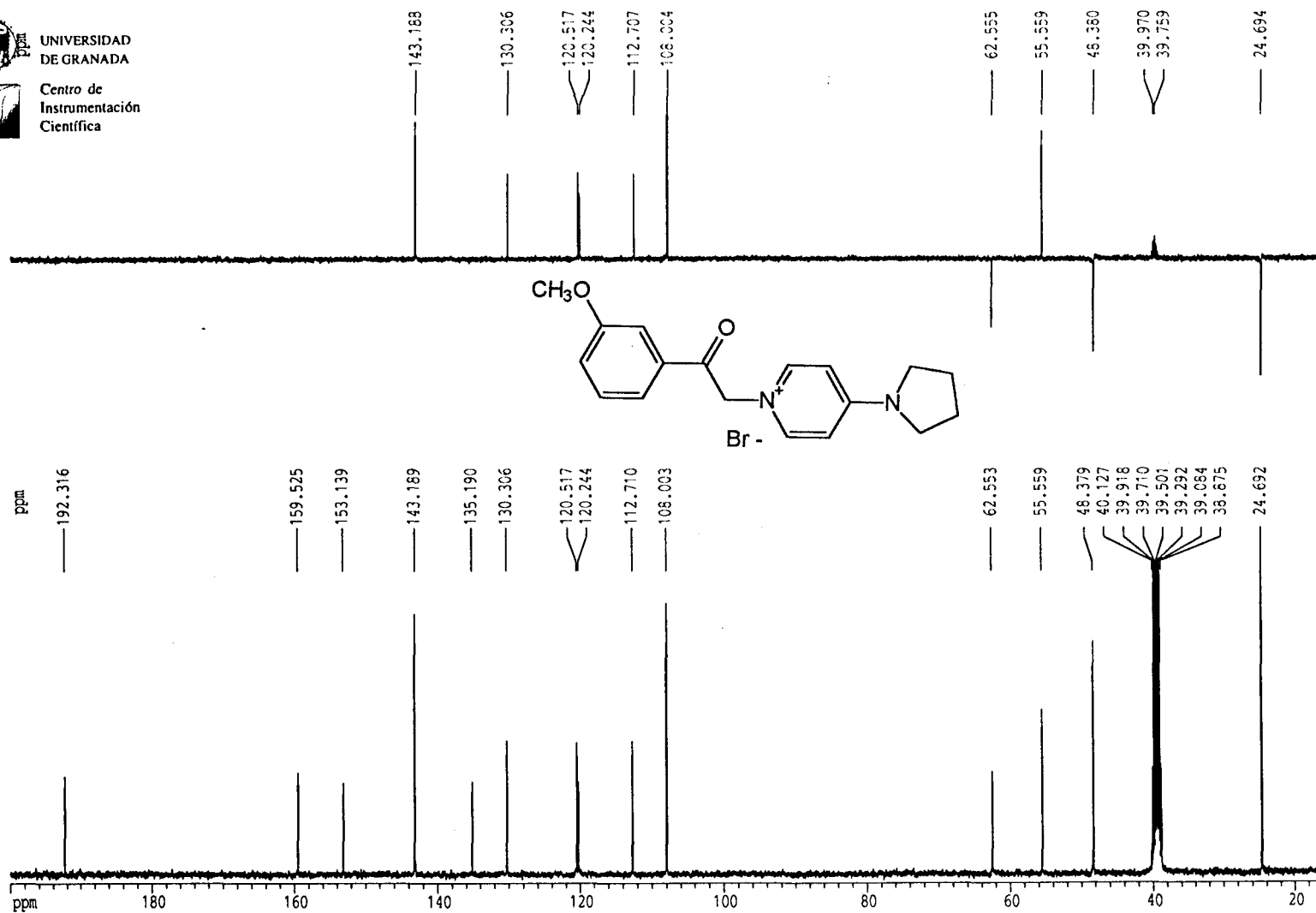
¹H-RMN 49: Bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-4-(1-pirrolidino)piridinio 87.



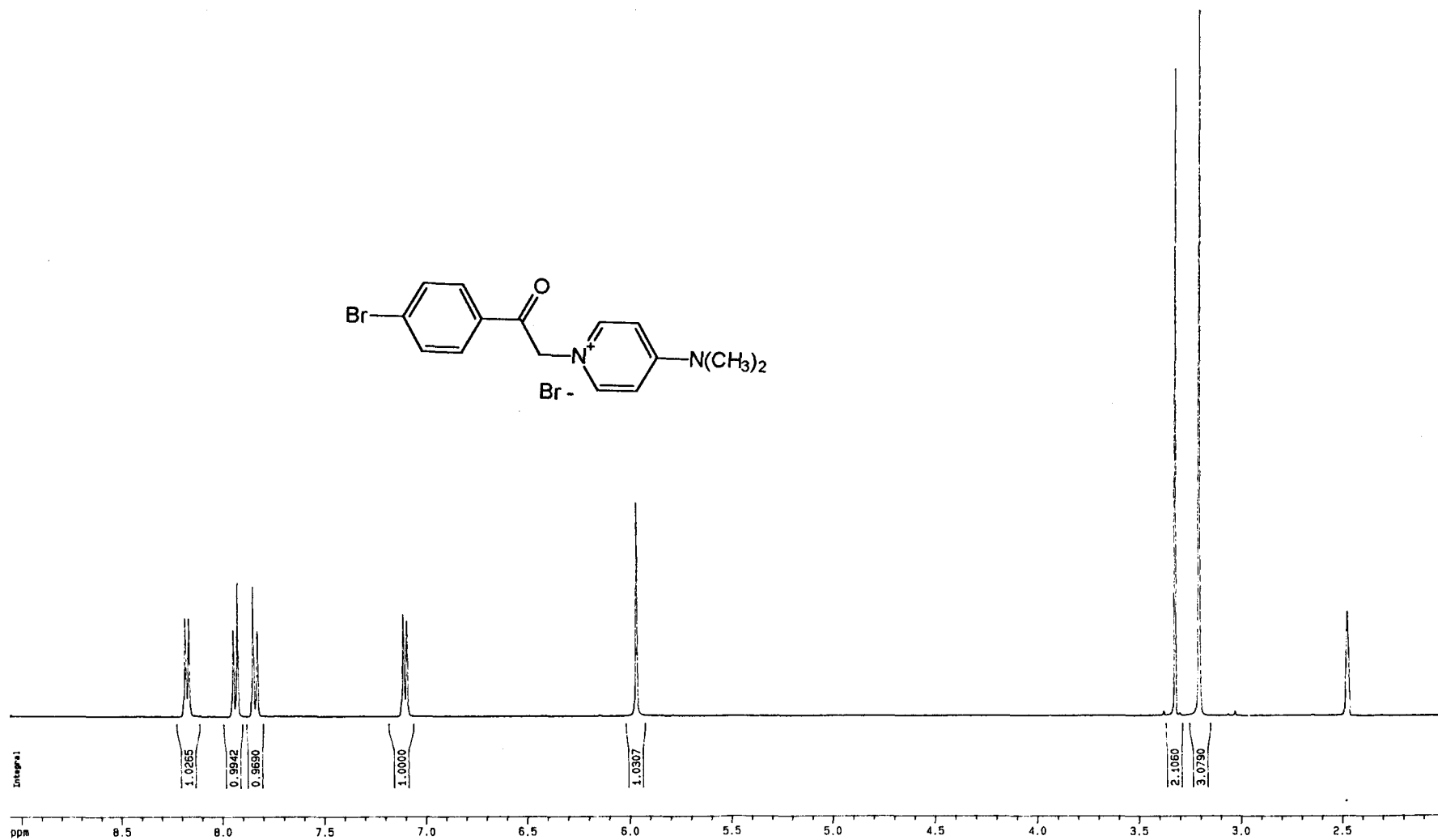
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN 49: Bromuro de 1-[(3-metoxifenil)carbonilmetil]-4-(1-pirrolidino)piridinio 87.



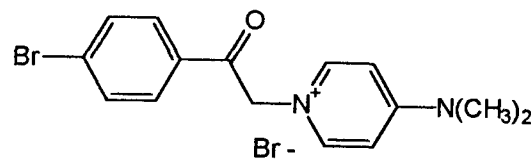
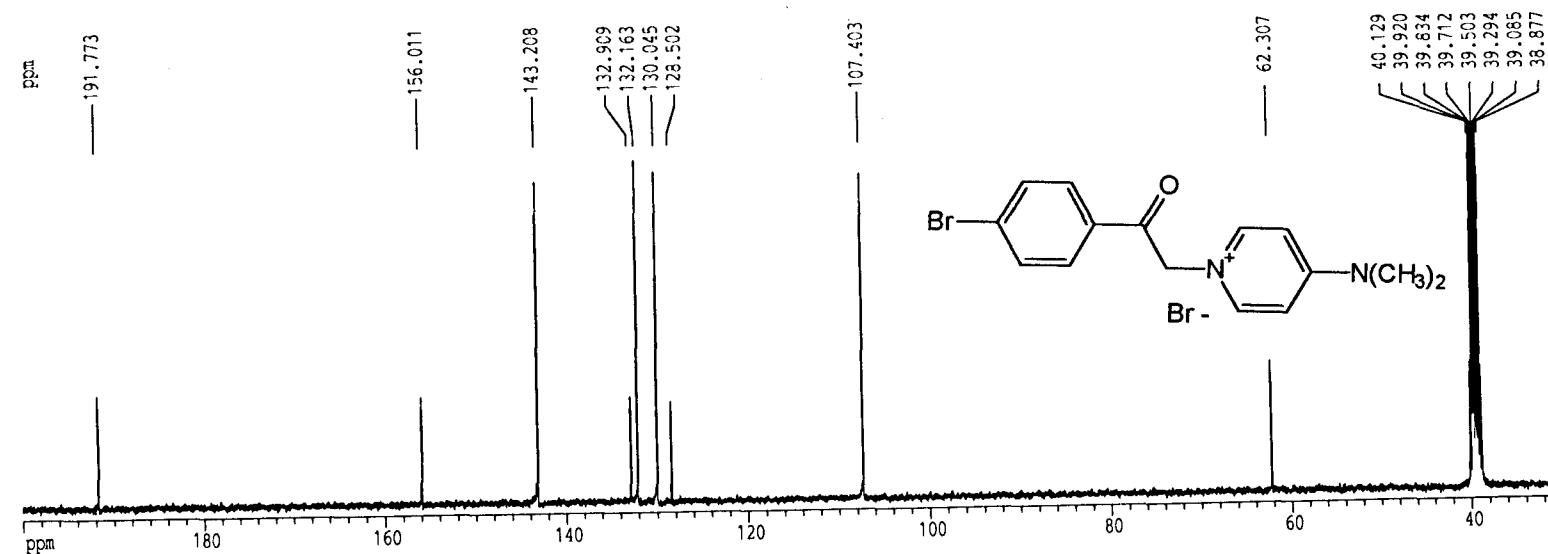
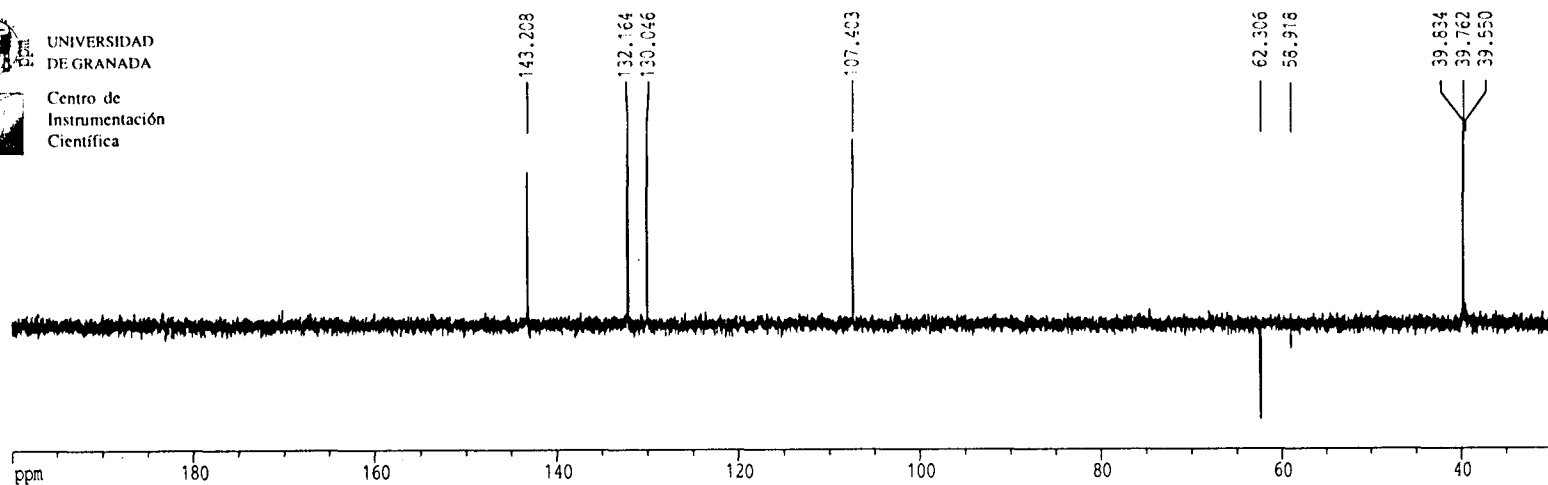
¹H-RMN 50: Bromuro de 1-[(4-bromofenil)carbonilmetil]-4-dimetilaminopiridinio 89.



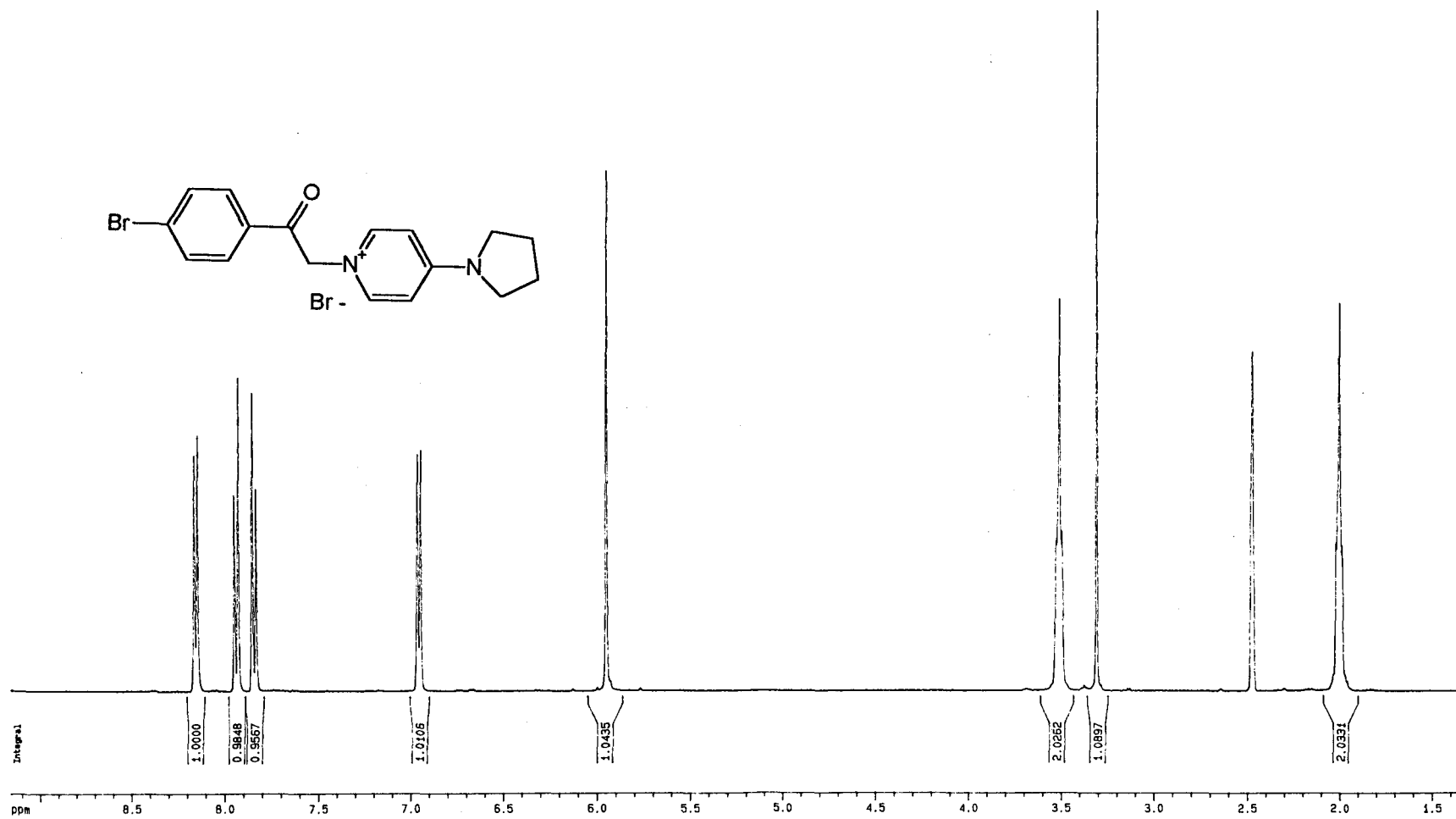
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Centro de
Instrumentación
Científica



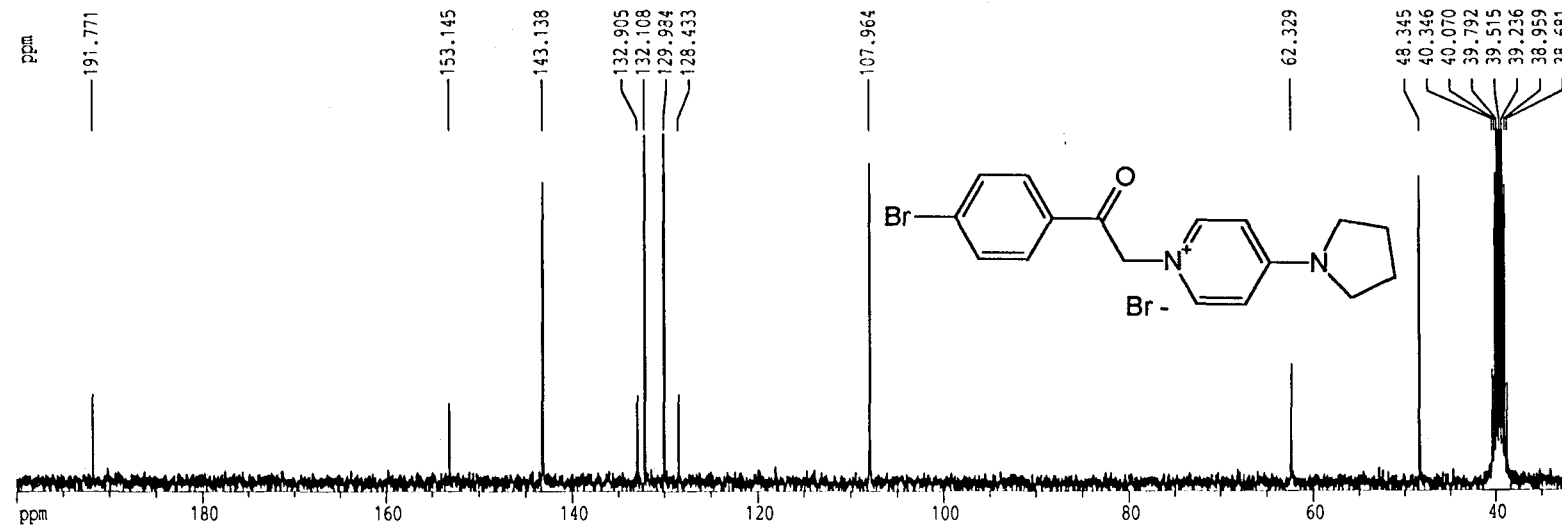
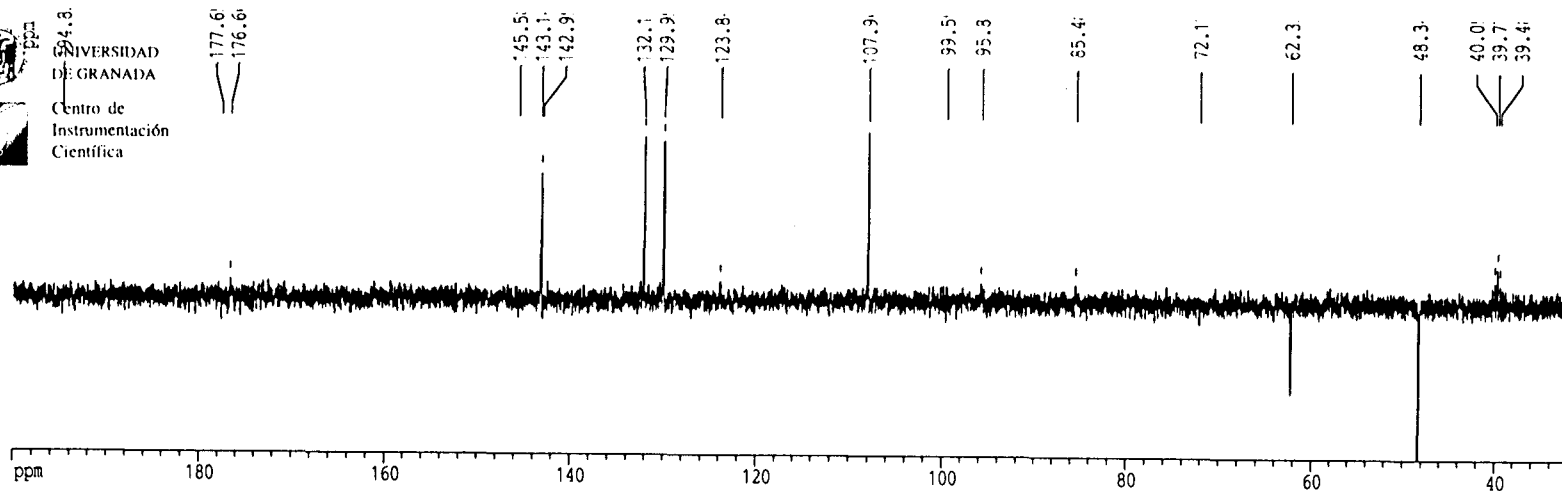
¹³C-RMN 50: Bromuro de 1-[(4-bromofenil)carbonilmetil]-4-dimetilaminopiridinio 89.



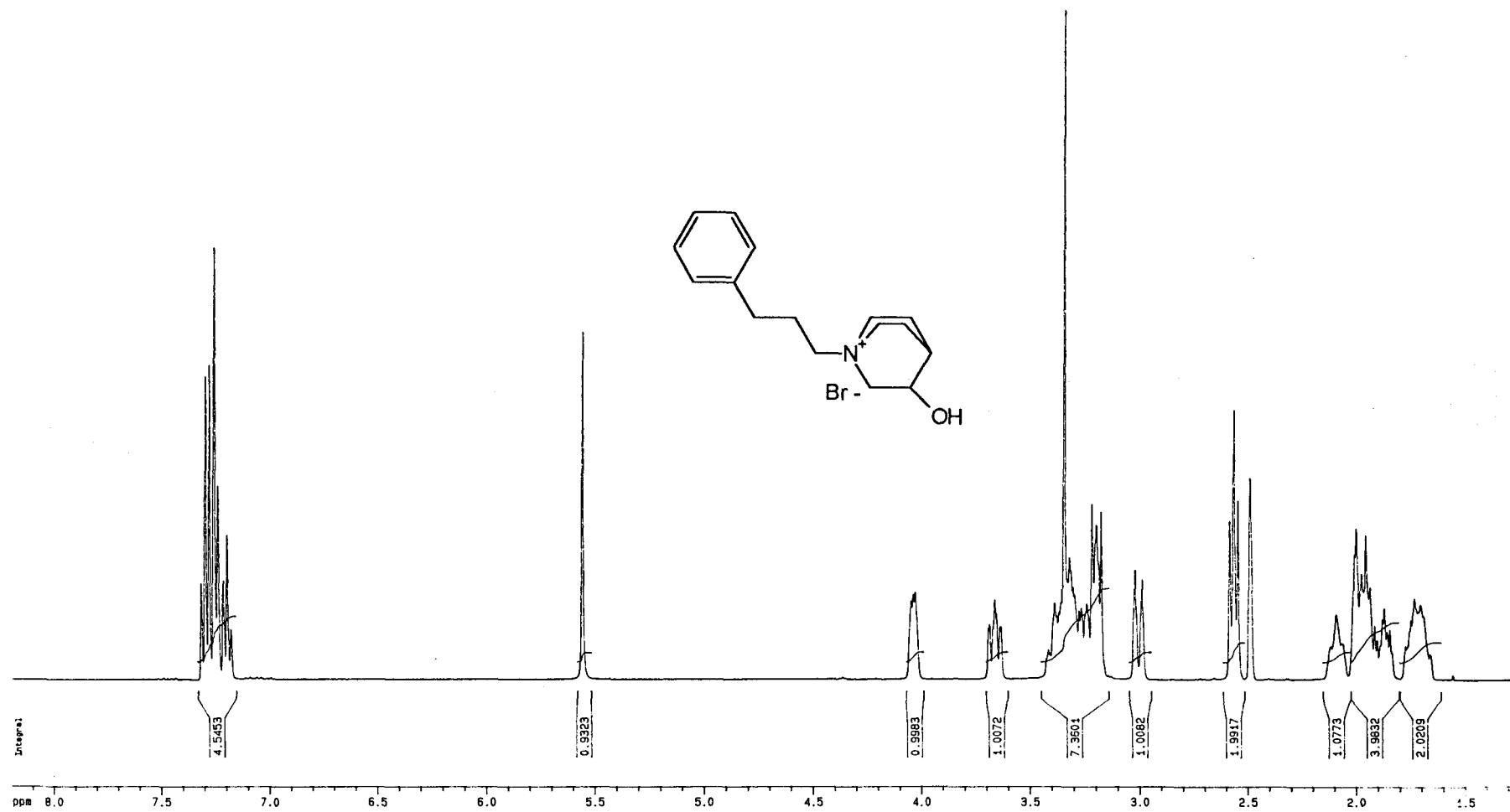
¹H-RMN 51: Bromuro de 1-[(4-bromofenil)carbonilmetil]-4-(1-pirrolidino)piridinio 90.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA
Centro de
Instrumentación
Científica



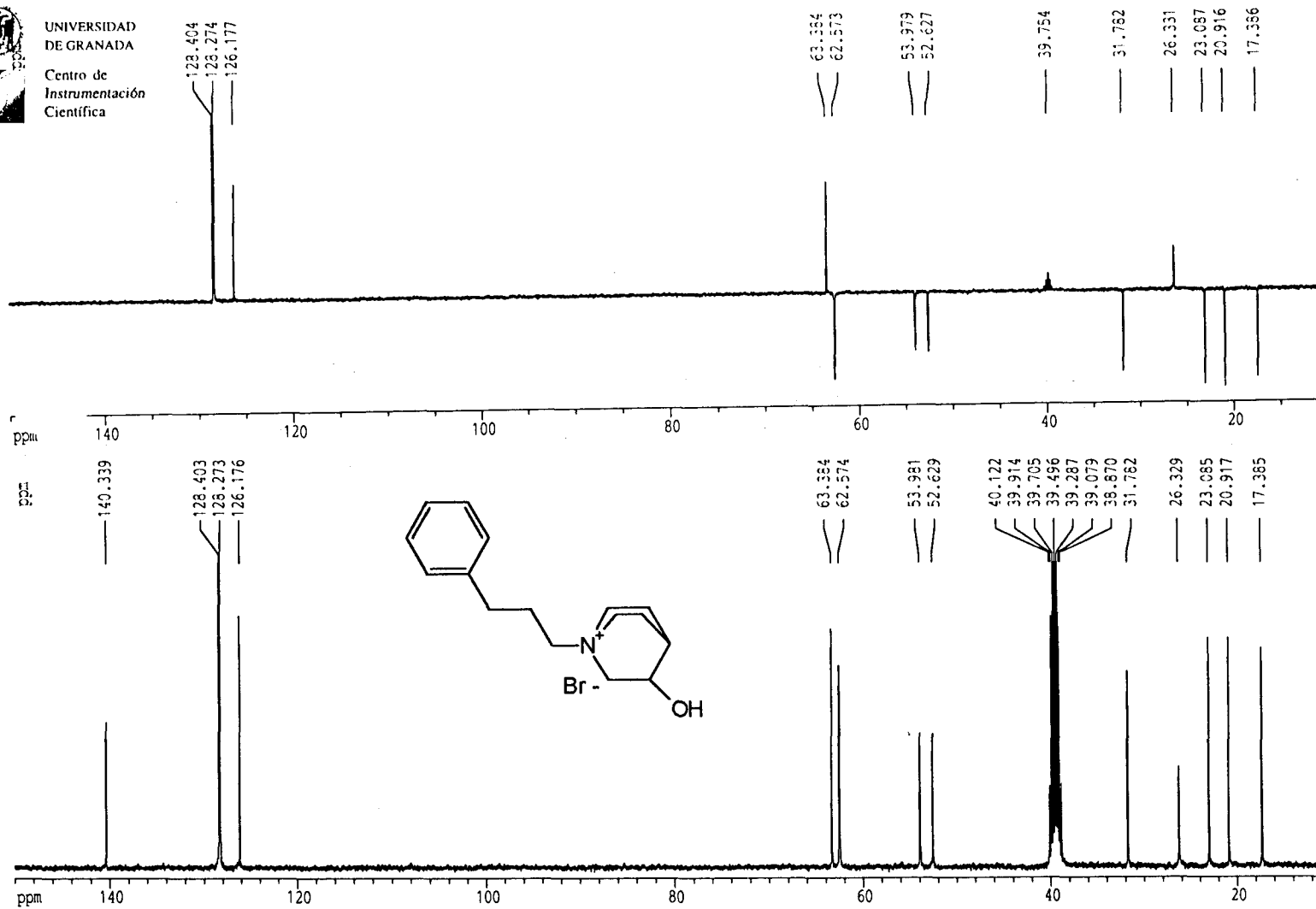
¹³C-RMN 51: Bromuro de 1-[(4-bromofenil)carbonilmetil]-4-(1-pirrolidino)piridinio 90.



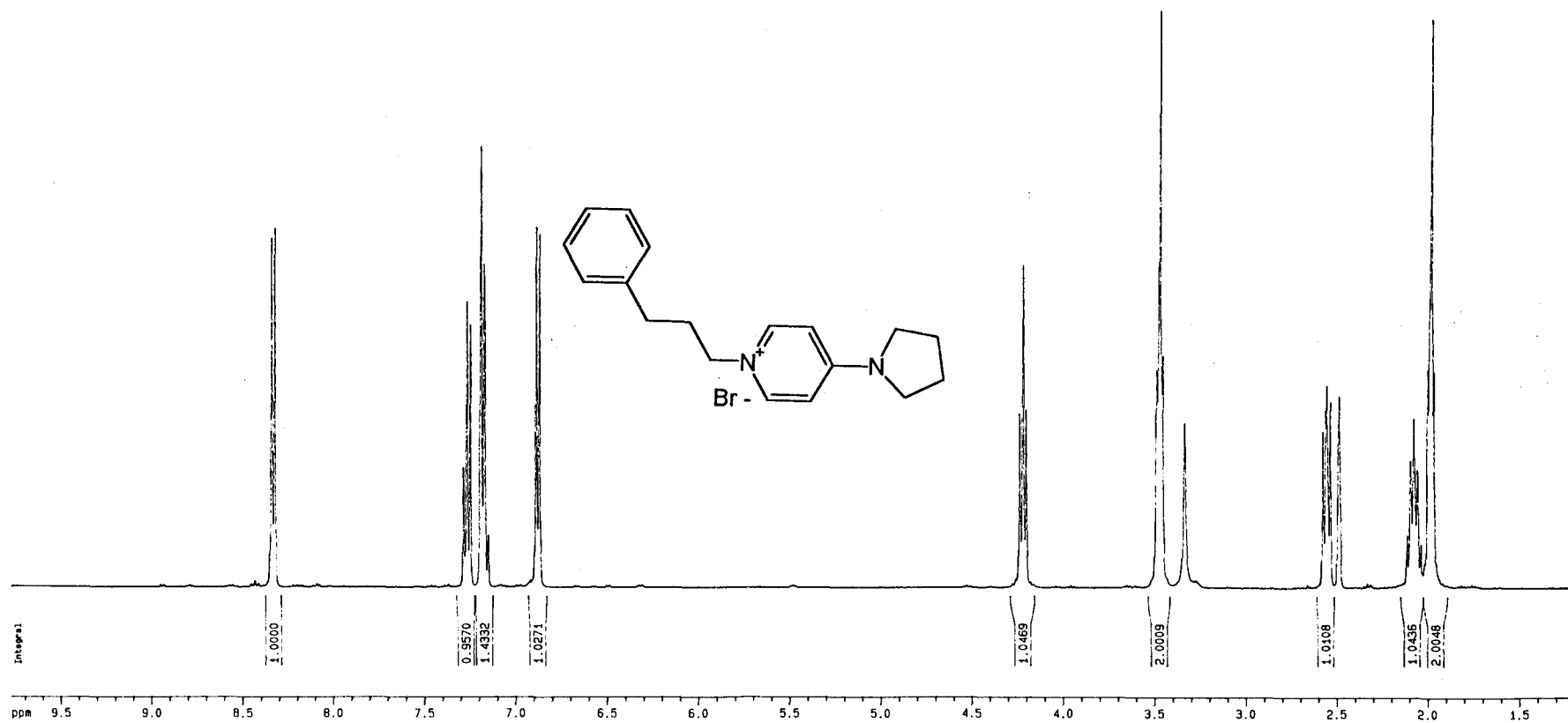
¹H-RMN 52: Bromuro de 1-(fenilpropil)-3-hidroxiquinuclidinio 91.



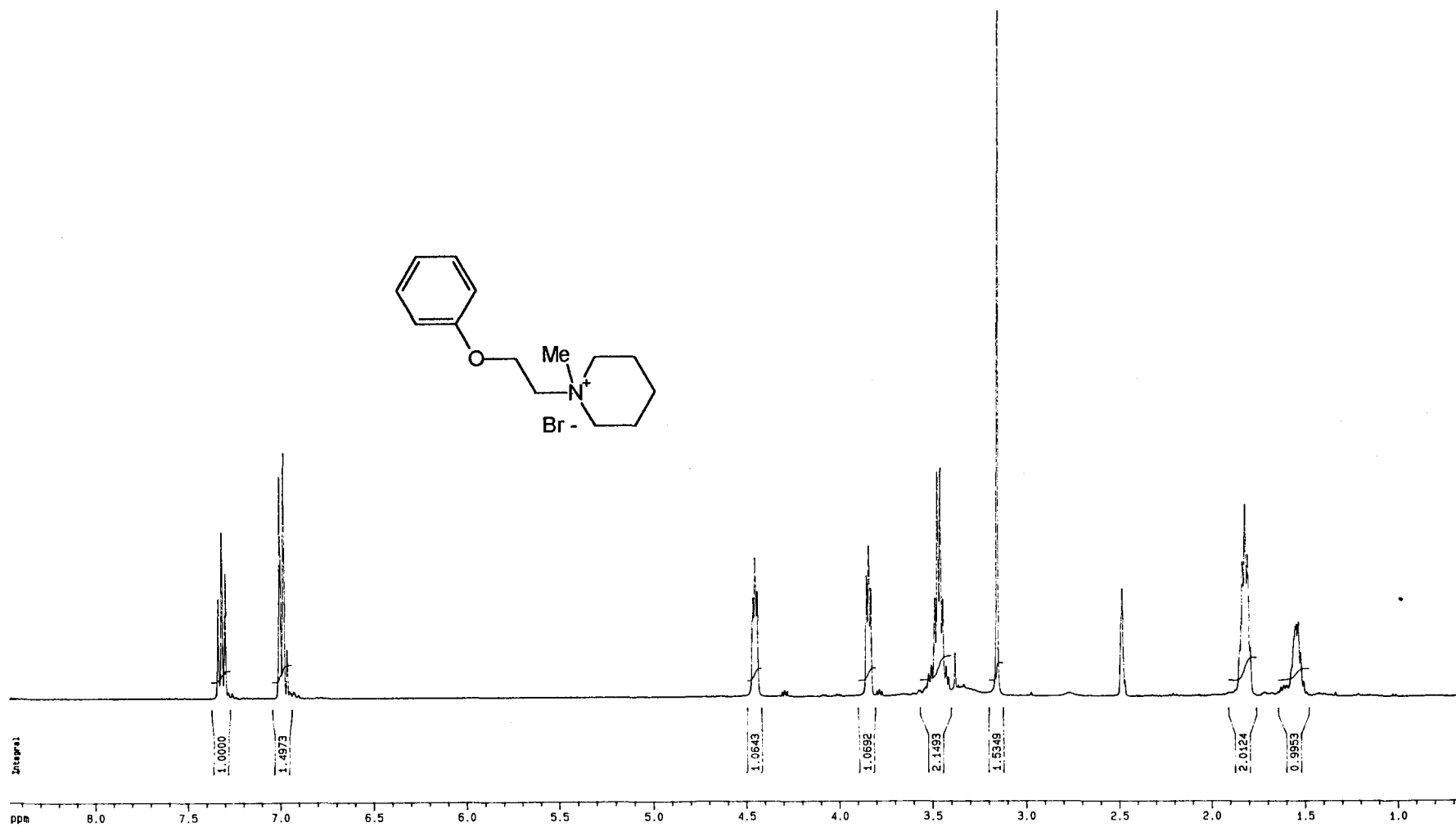
UNIVERSIDAD
DE GRANADA
Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN 52: Bromuro de 1-(fenilpropil)-3-hidroxiquinuclidinio 91.



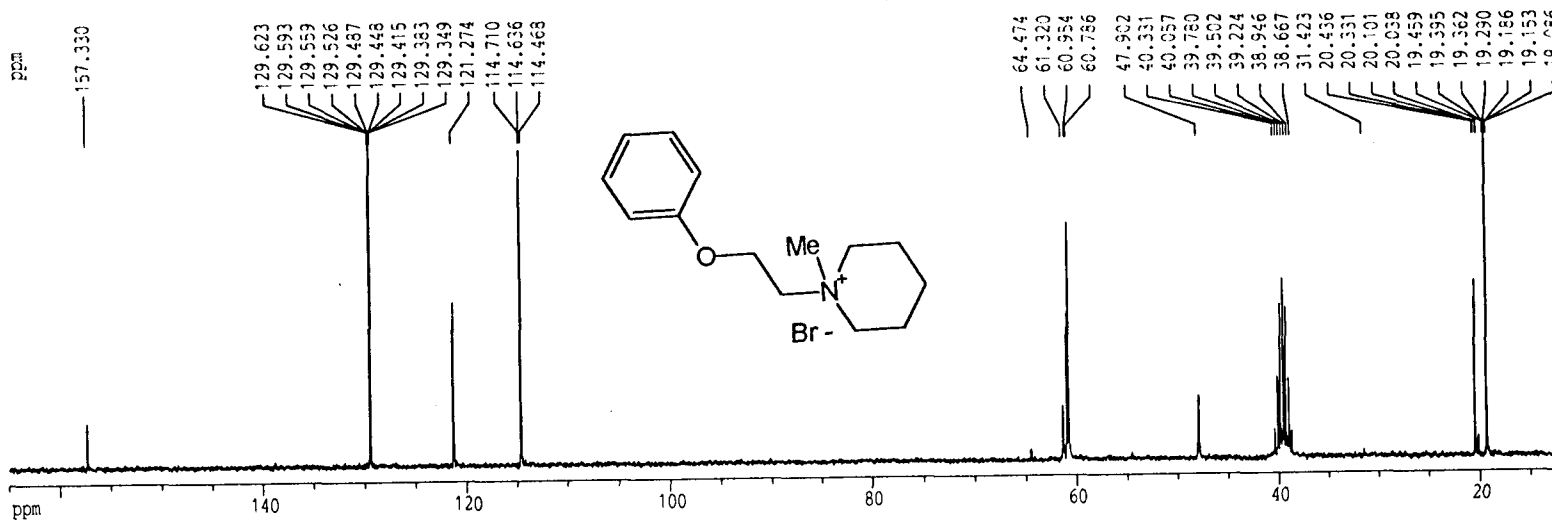
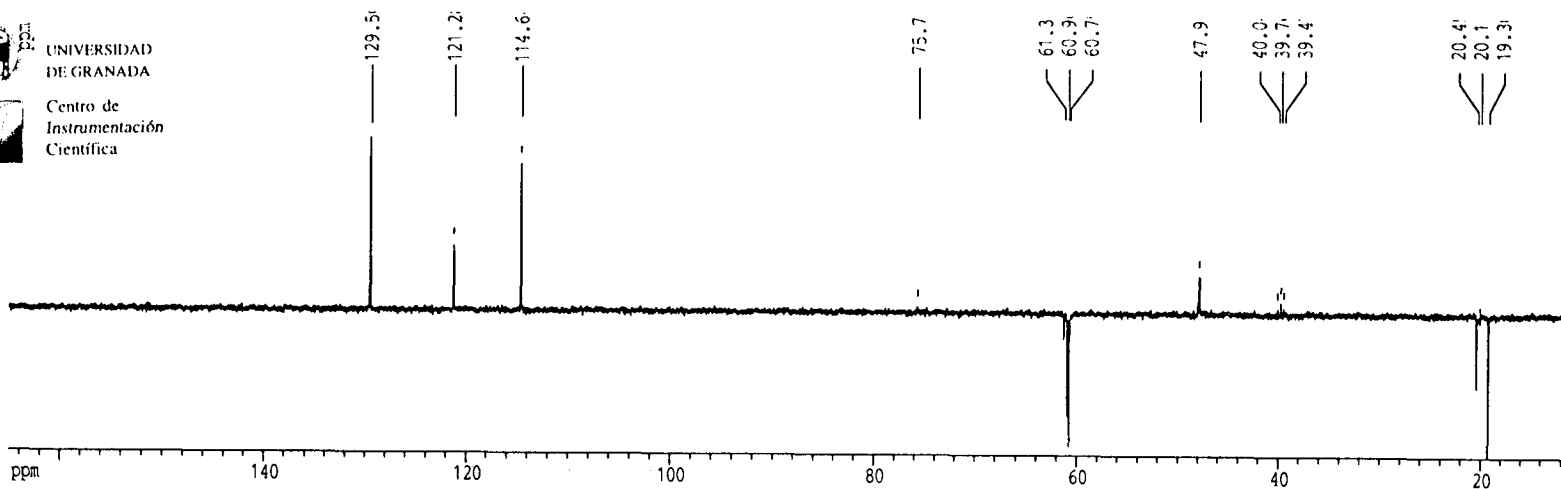
¹H-RMN 53: Bromuro de 1-(fenilpropil)-4-(1-pirrolidino)piridinio 93.



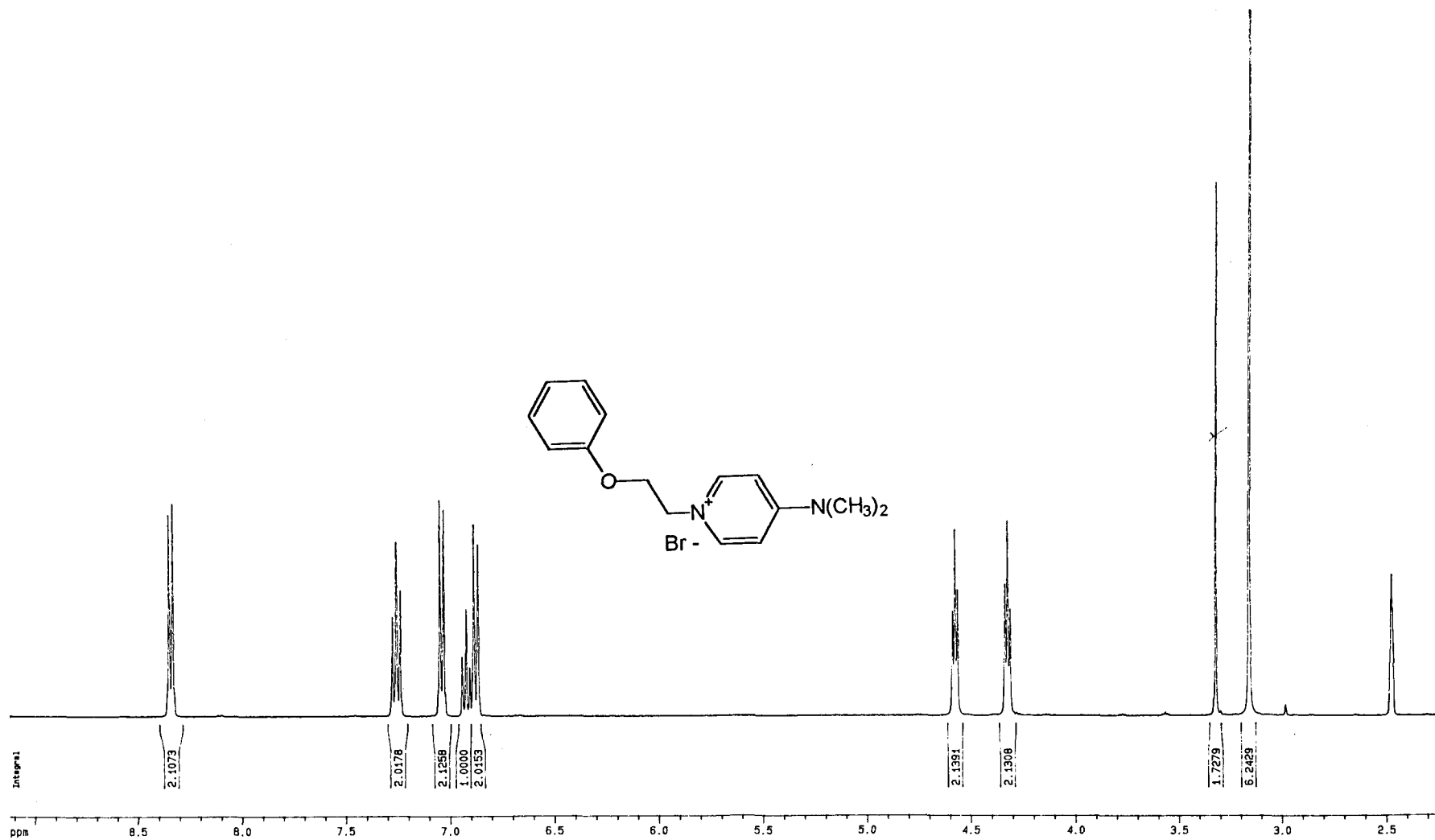
$^1\text{H-NMR}$ 54: Bromuro de 1-(fenoxietil)-N-metilpiperidinio 96.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA
Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN 54: Bromuro de 1-(fenoxietil)-N-metilpiperidinio 96.



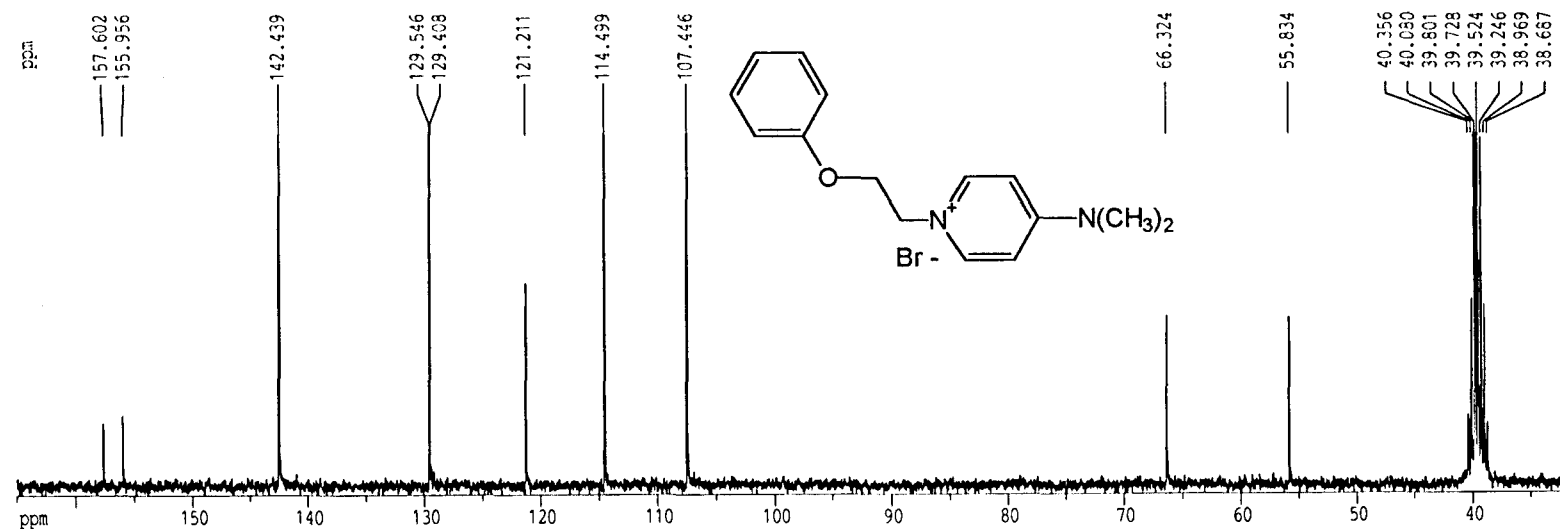
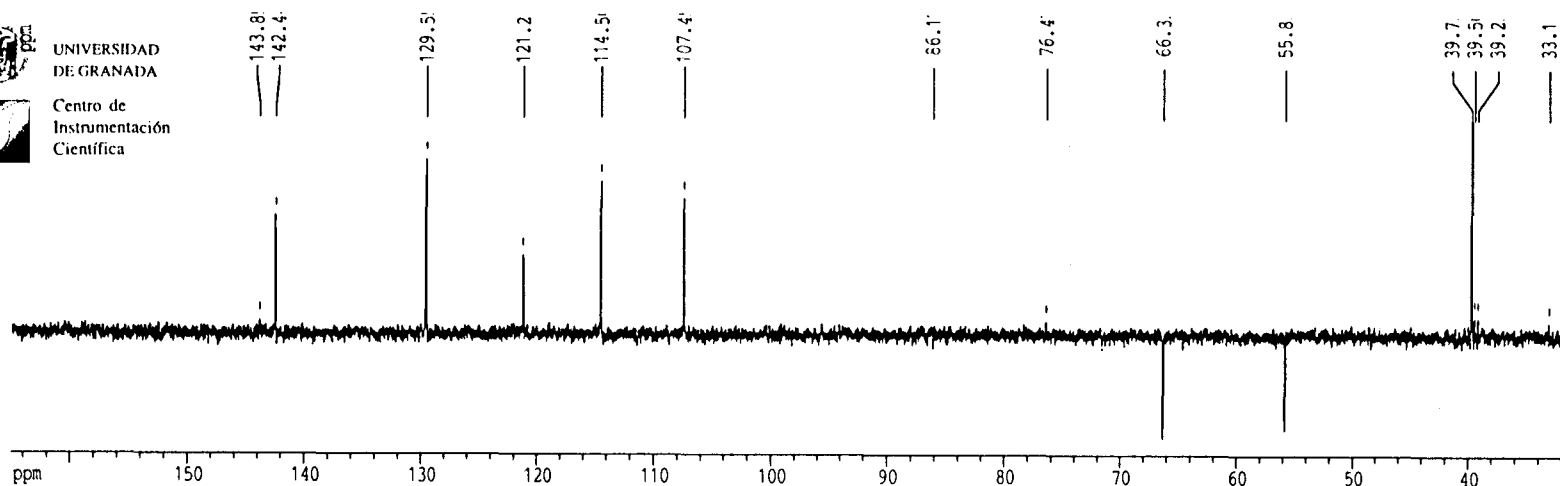
¹H-RMN 55: Bromuro de 1-(fenoxietil)-4-dimetilaminopiridinio 98.



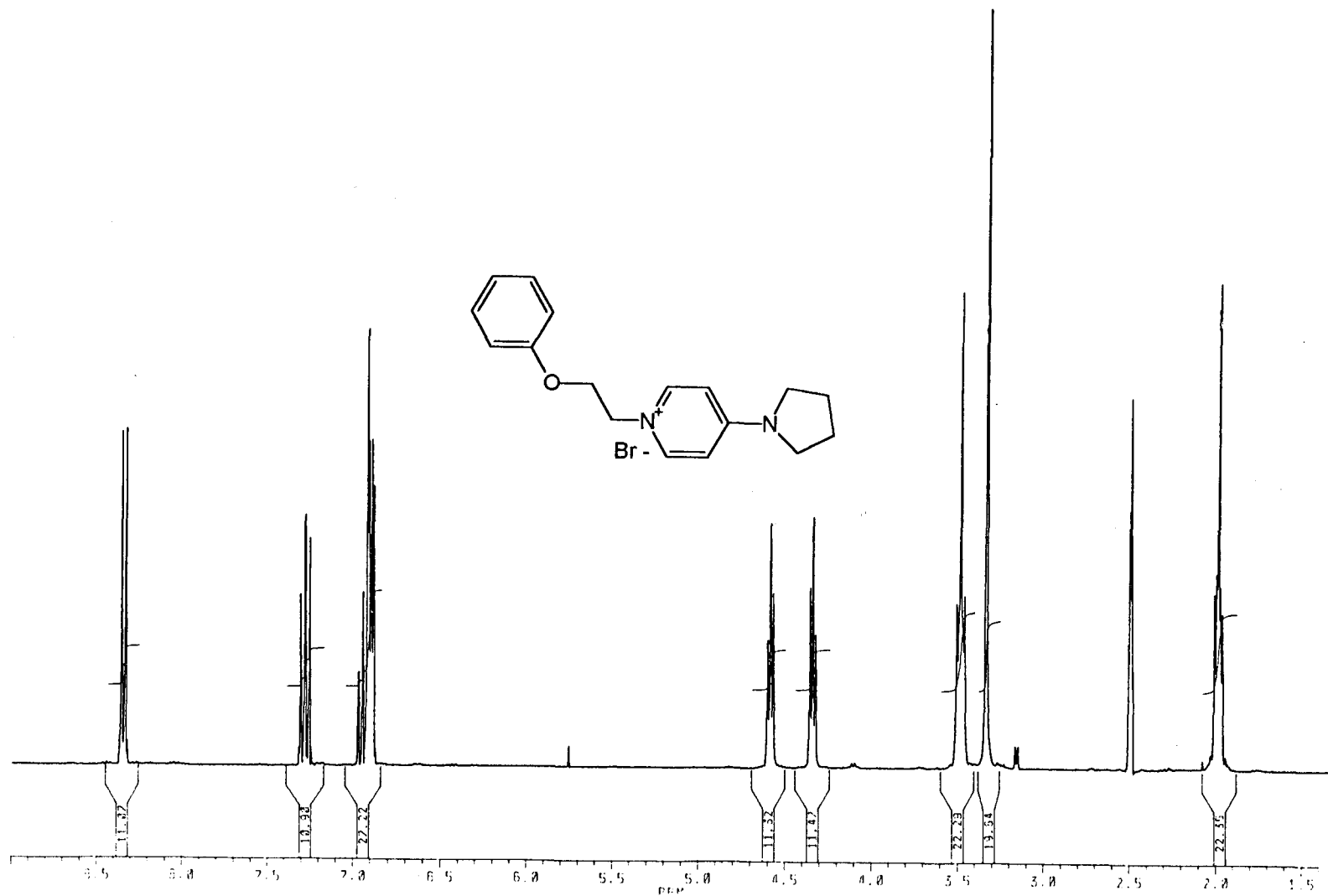
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



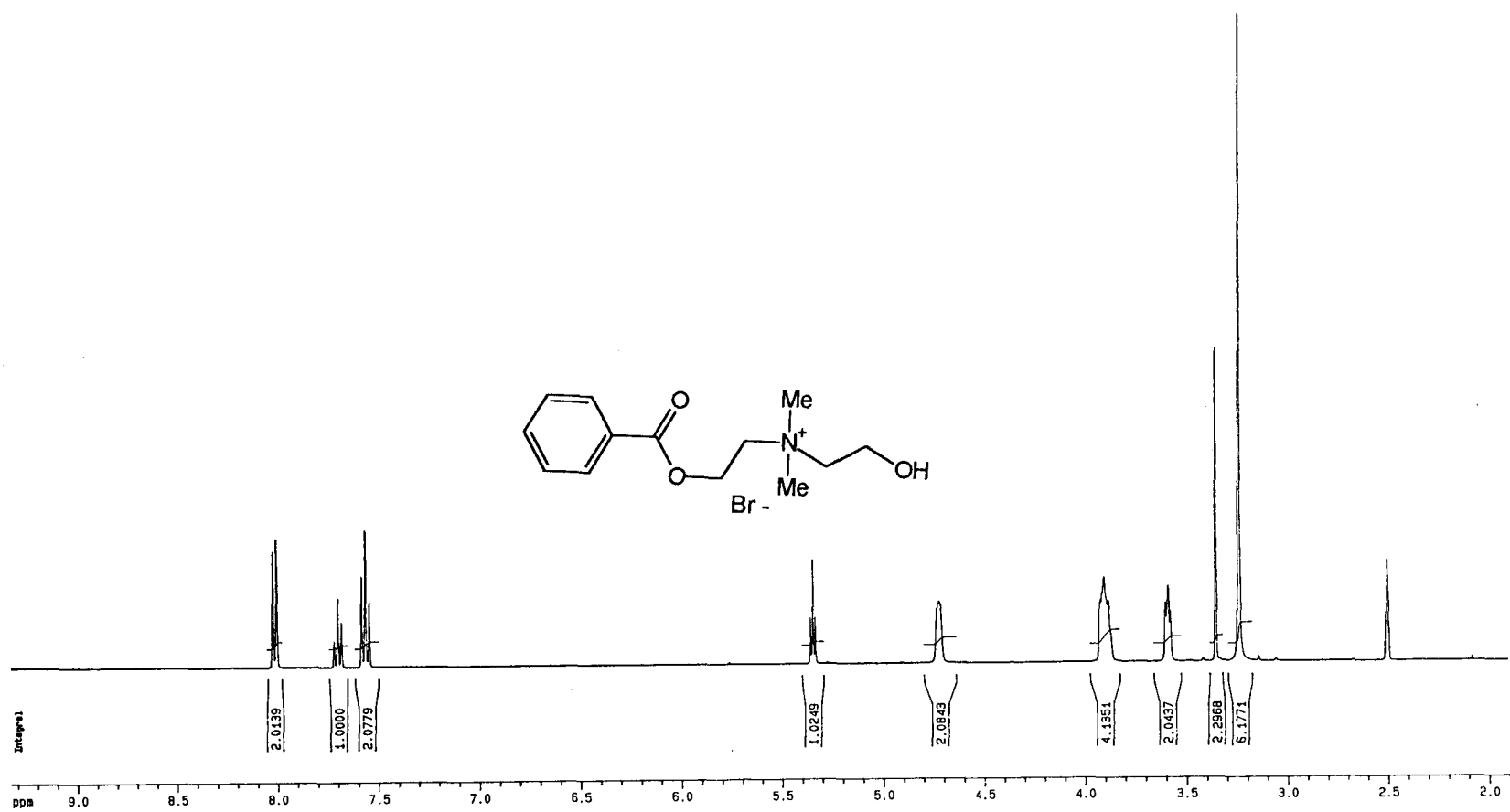
Centro de
Instrumentación
Científica



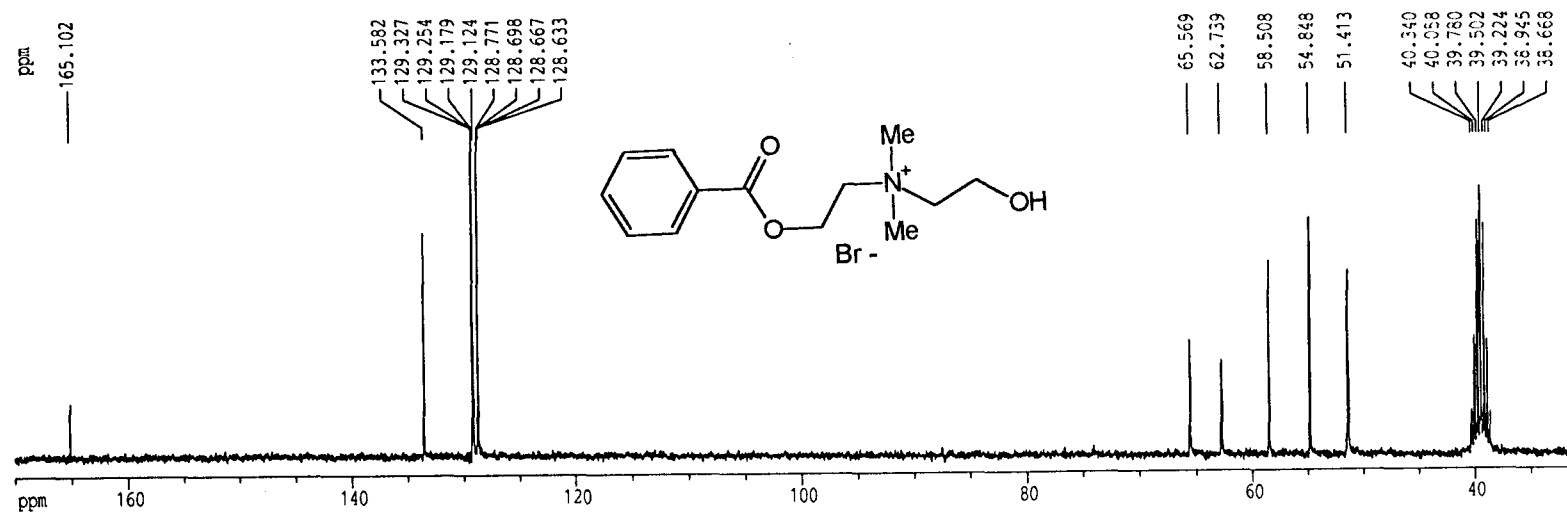
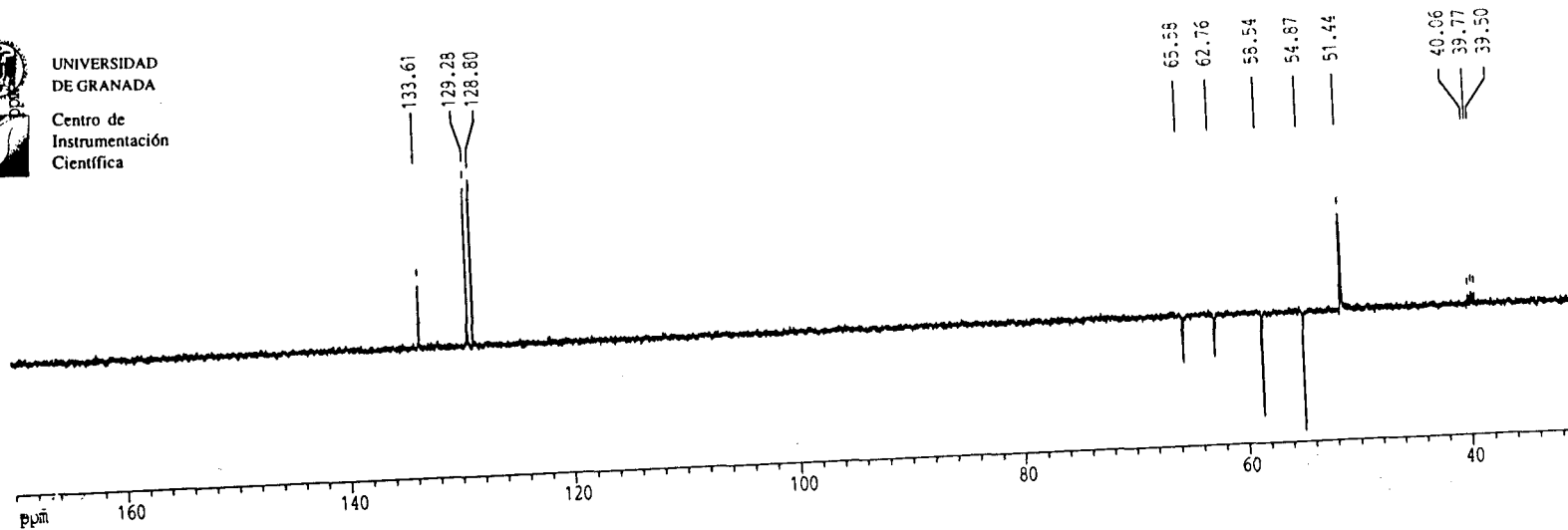
¹³C-RMN 55: Bromuro de 1-(fenoxietil)-4-dimetilaminopiridinio 98.



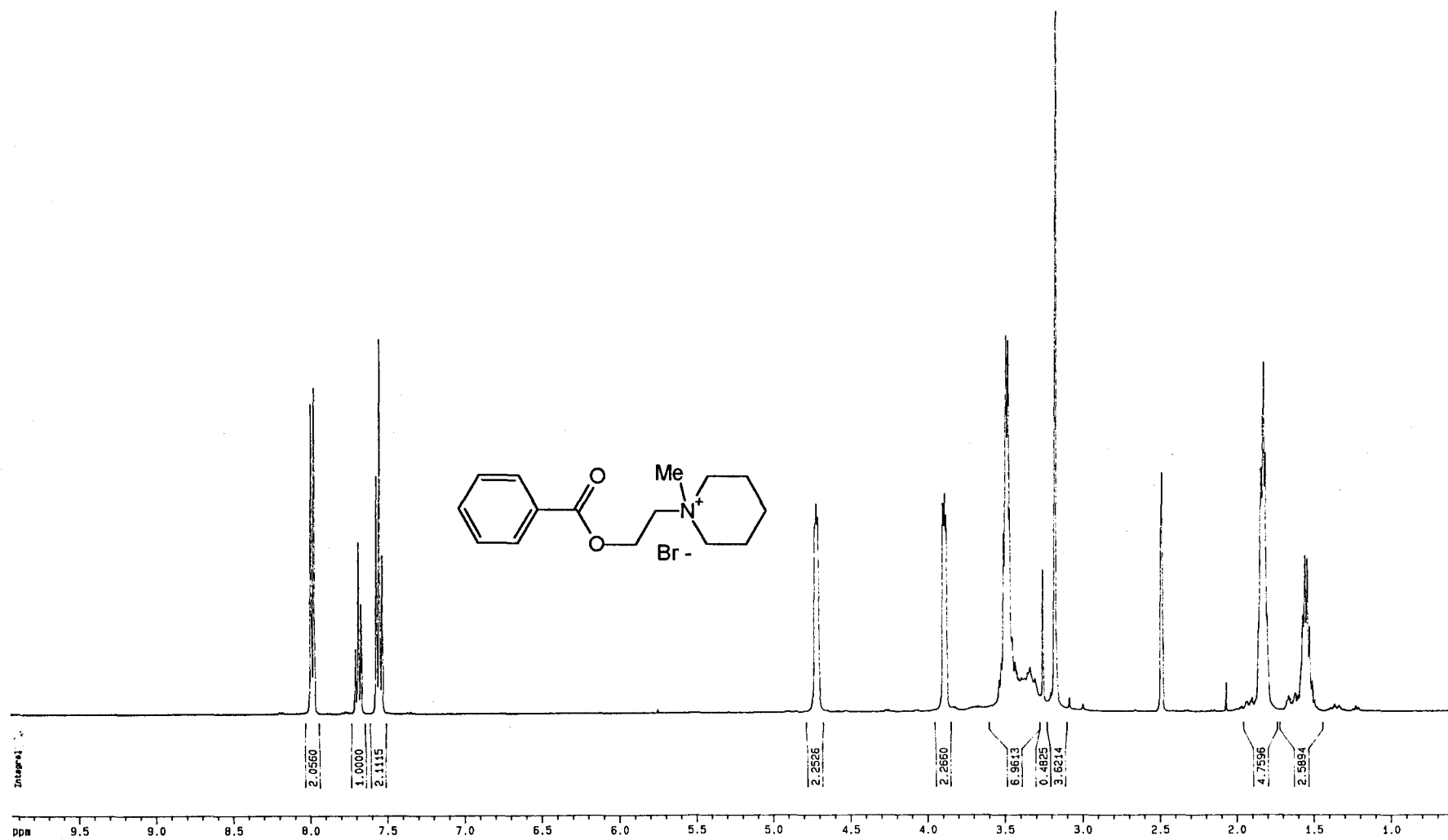
¹H-RMN 56: Bromuro de 1-(fenoxietil)-4-(1-pirrolidino)piridinio 99.



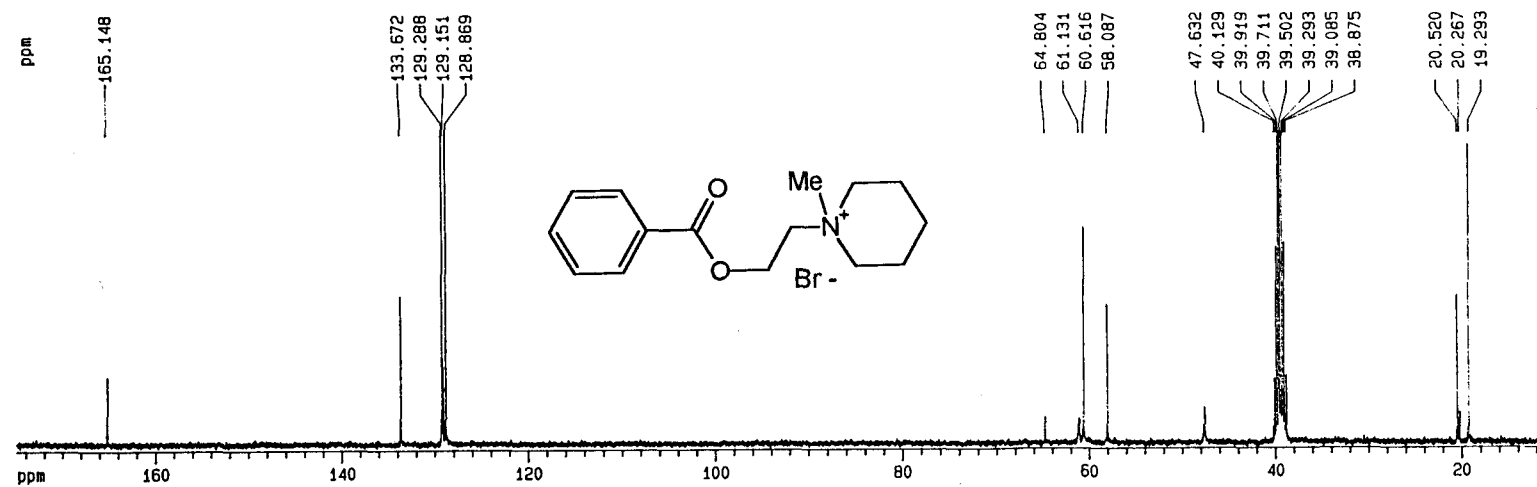
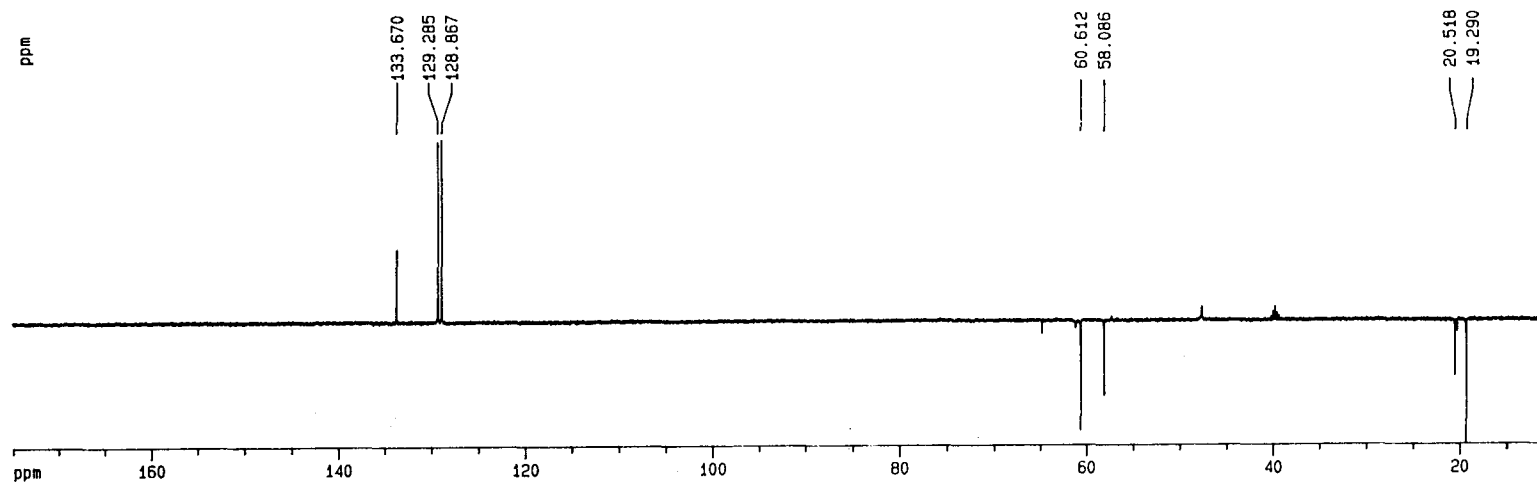
¹H-RMN 57: Bromuro de 1-(benzoiloxietil)-2-hidroxi etildimetilamonio 100.



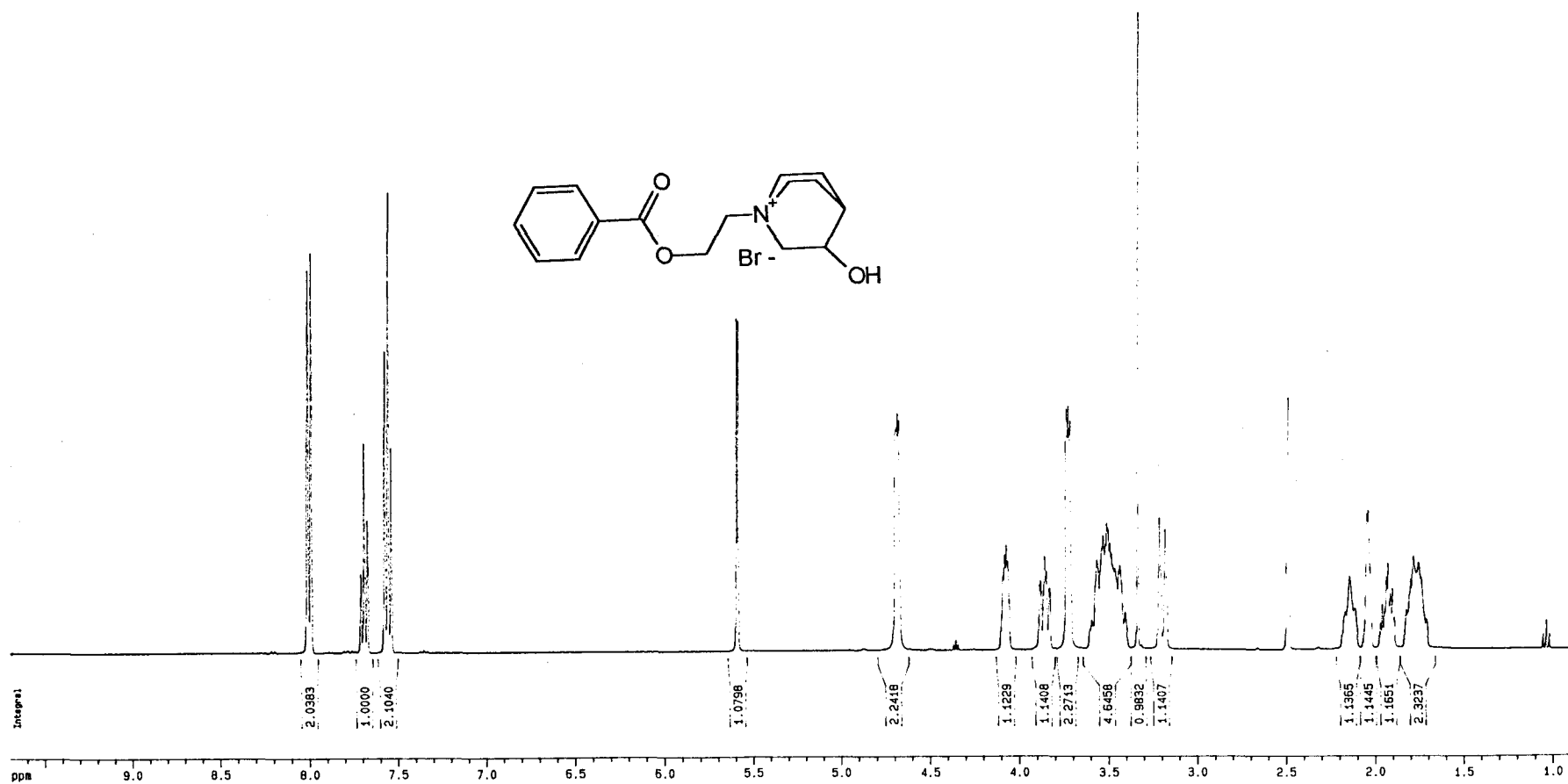
¹³C-RMN 57: Bromuro de 1-(benzoiloxietil)-2-hidroxiethylidimetilamonio 100.



¹H-RMN 58: Bromuro de 1-(benzoiloxietil)-N-metilpiperidinio 101.



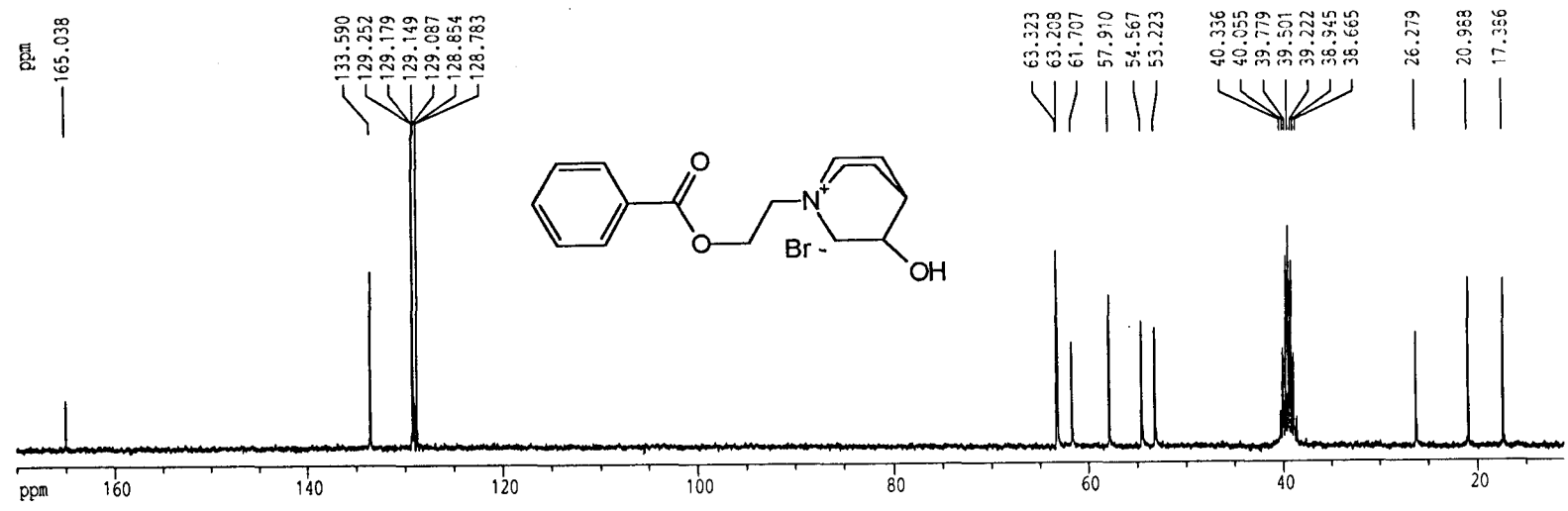
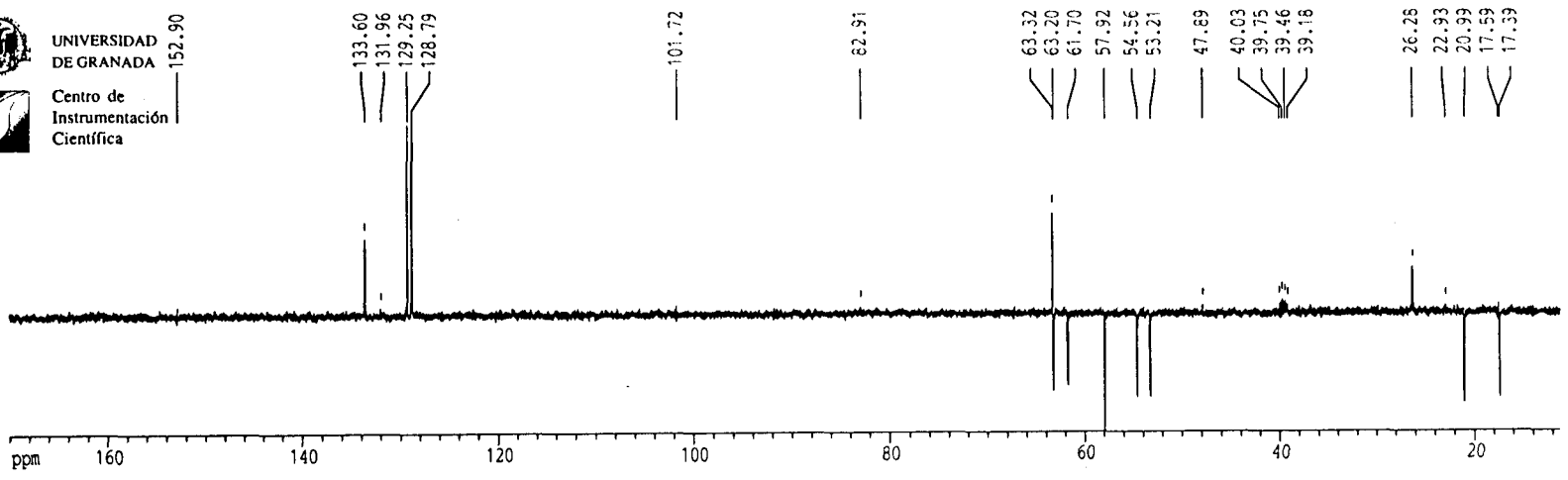
¹³C-RMN 58: Bromuro de 1-(benzoiloxietil)-N-metilpiperidinio 101.



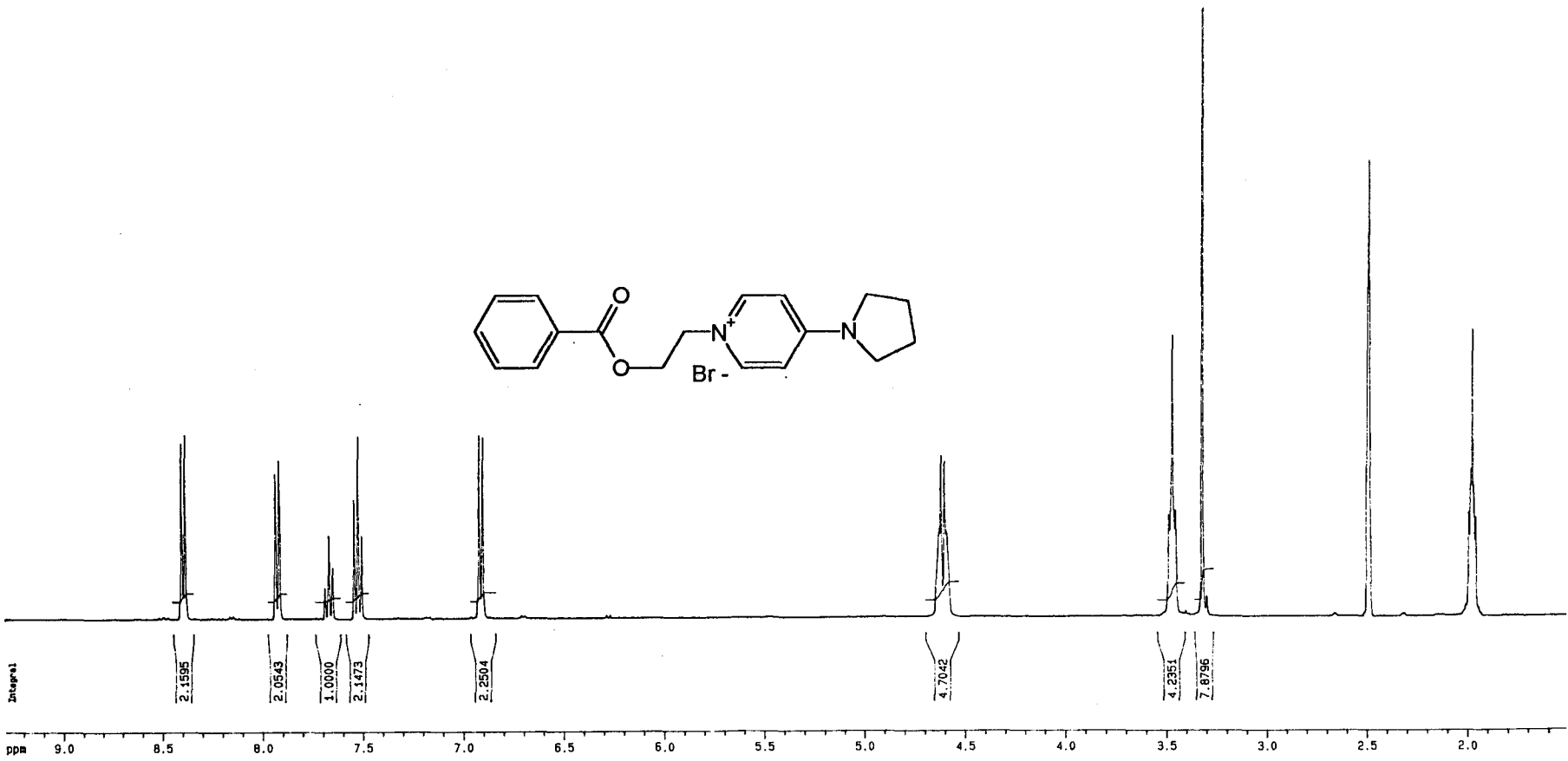
¹H-NMR 59: Bromuro de 1-(benzoiloxietil)-3-hidroxiquinuclidinio 102.



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Centro de Instrumentación Científica



¹³C-RMN 59: Bromuro de 1-(benzoiloxietil)-3-hidroxiquinuclidinio 102.



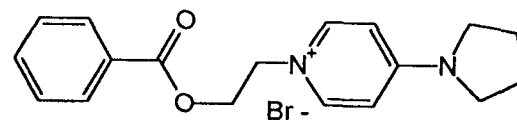
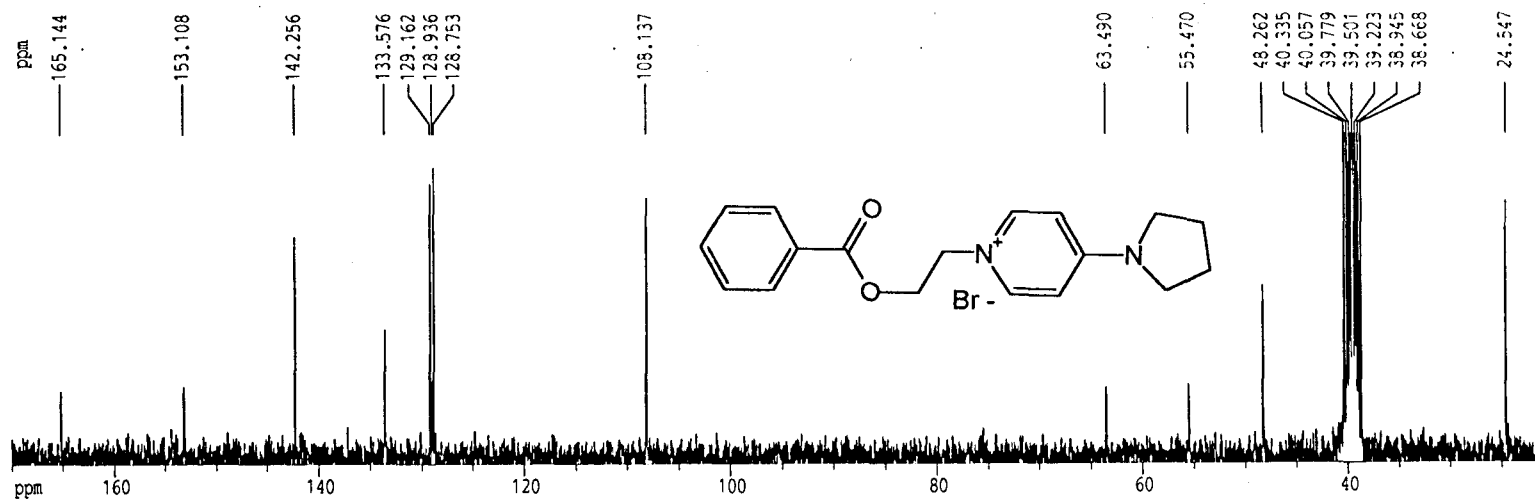
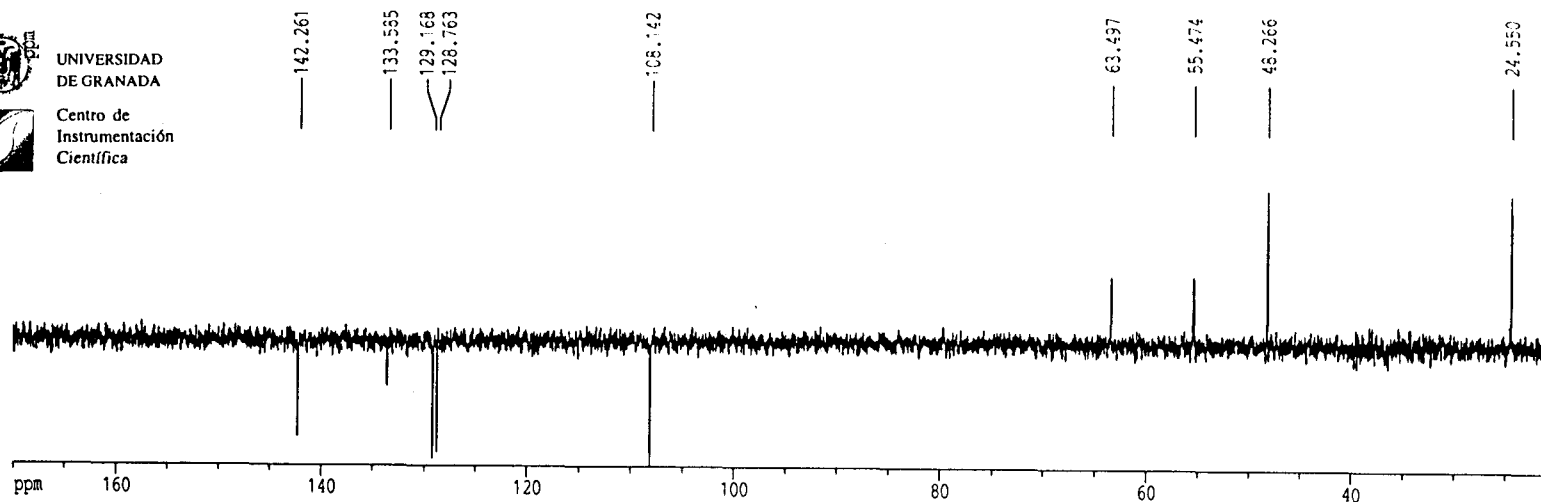
¹H-RMN 60: Bromuro de 1-(benzoiloxietil)-4-(1-pirrolidino)piridinio 103.



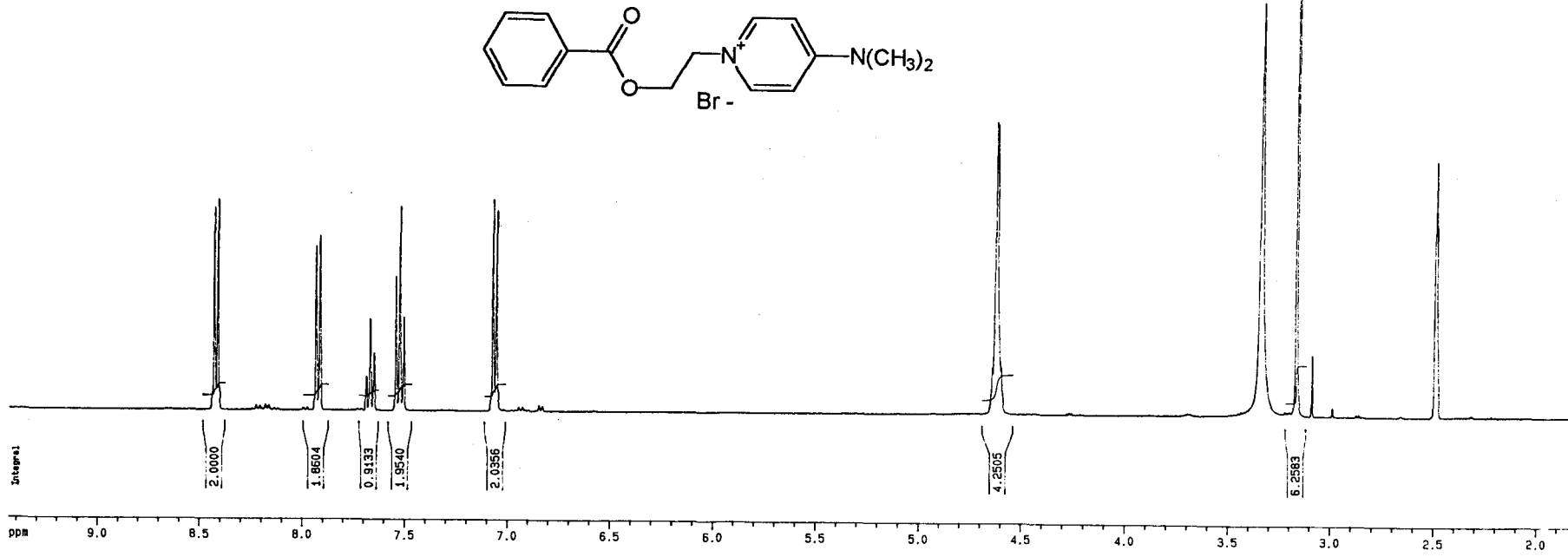
UNIVERSIDAD
DE GRANADA



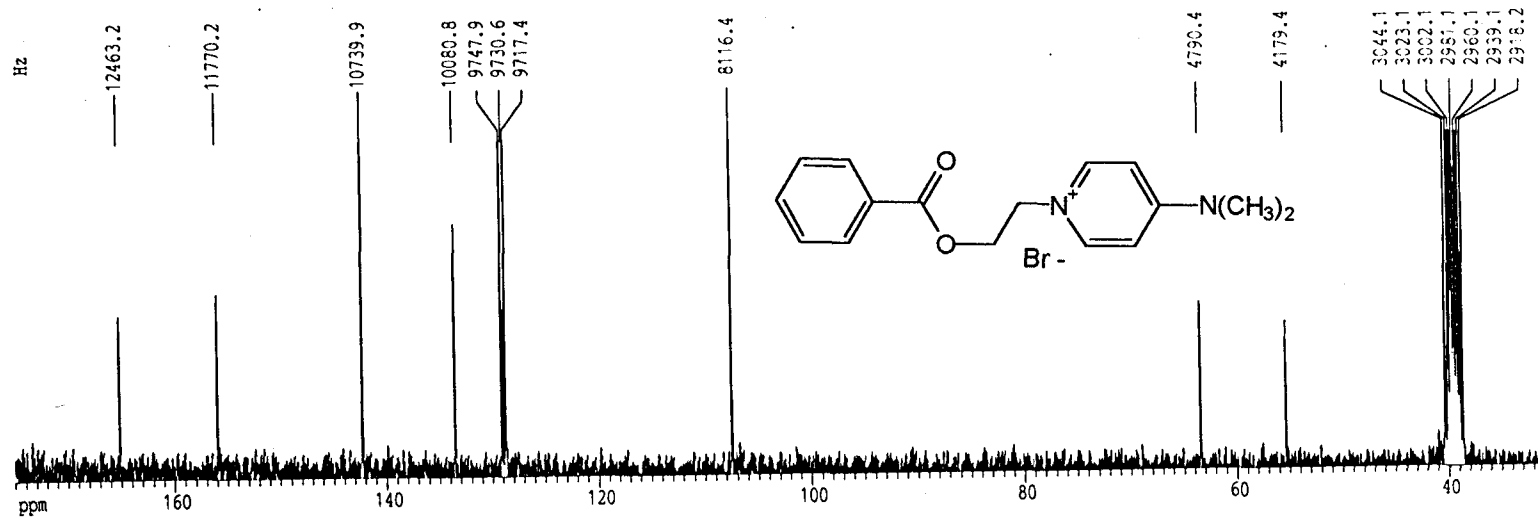
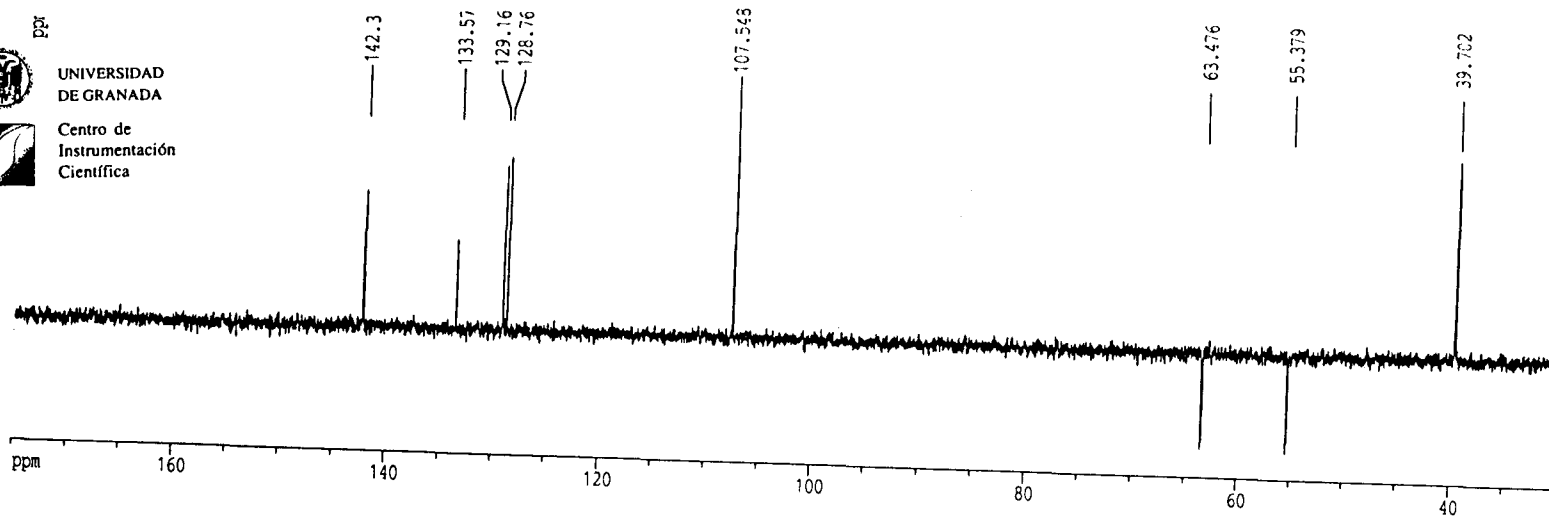
Centro de
Instrumentación
Científica



¹³C-RMN 60: Bromuro de 1-(benzoiloxietil)-4-(1-pirrolidino)piridinio 103.



¹H-RMN 61: Bromuro de 1-(benzoiloxietil)-4-dimetilaminopiridinio 104.



¹³C-RMN 61: Bromuro de 1-(benzoiloxietil)-4-dimetilaminopiridinio 104.

8.- APÉNDICE 2



Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design

Rubén Hernández-Alcoceba¹, Luisa Saniger¹, Joaquín Campos², M Carmen Núñez², Fouad Khaless², Miguel Angel Gallo², Antonio Espinosa² and Juan Carlos Lacal¹

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Madrid; ²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, Spain

Recent progress in deciphering the molecular basis of carcinogenesis is of utmost importance to the development of new anticancer strategies. To this end, it is essential to understand the regulation of both normal cell proliferation and its alterations in cancer cells. We have previously demonstrated that in *ras*-transformed cells there is an increased level of phosphorylcholine (PCho) resulting from a constitutive activation on choline kinase (ChoK). The importance of ChoK for the regulation of cell proliferation has also been proposed since an inhibitor for this enzyme, hemicholinium-3 (HC-3), drastically reduces entry into the S phase after stimulation with growth factors. Here we report the synthesis of several new compounds which are highly specific inhibitors for ChoK, with up to 1000-fold or 600-fold increased inhibitory activity, compared to HC-3 under *ex vivo* or *in vitro* conditions respectively. These novel compounds also drastically reduce entry into the S phase after stimulation with specific growth factors. A more profound inhibition of cell proliferation was observed in *ras*-, *src*- and *mos*-transformed cells in the presence of ChoK inhibitors, compared to their parental, untransformed NIH3T3 cells. By contrast, this effect was not observed in *fos*-transformed cells. While *ras*, *src* and *mos* transformation is associated with elevated levels of ChoK activity, *fos*-induced transformation does not affect ChoK activity. The inhibitory effect on proliferation of the new compounds correlates with their ability to inhibit the production of phosphorylcholine in whole cells, a proposed novel second messenger for cell proliferation. These results strongly support a critical role of choline kinase in the regulation of cell growth and makes this enzyme a novel target for the design of new antiproliferative and anticancer drugs.

Keywords: oncogenes; choline kinase; antiproliferative drugs; growth factors; phosphorylcholine; *ras*; *src*; *fos*; hemicholinium-3

Introduction

Anticancer therapy is based mostly upon the use of drugs with antiproliferative activity to such an extent that the most frequently used ones belong to the group of cytotoxic drugs (De Vita *et al.*, 1993; MacDonald *et al.*, 1995). Their mechanism of action is based upon the fact that they are most effective towards cancer cells

because of their high rate of proliferation, in comparison to normal cells which have lower proliferative rates (MacDonald *et al.*, 1995). Fast-growing normal cells, such as hematopoietic precursors and epithelial cells of the intestine and other tissues, are also negatively affected by therapeutic treatments. As a consequence, stem-cells toxicity which produces anemia and immunosuppression and dysfunction of epithelial cells resulting in hair loss and digestive disorders, are frequent side effects of therapy with cytotoxic drugs (De Vita *et al.*, 1993; MacDonald *et al.*, 1995). Besides the existence of multiple cytotoxic drugs, about 50% of the cancer patients still die after treatment (De Vita *et al.*, 1993). Thus, the availability of new cytotoxic drugs is a requirement for the successful treatment of cancer patients in the future.

Recent progress in the understanding of the mechanisms that regulate cell proliferation, differentiation and apoptosis is facilitating the development of new strategies based on the rational design of new antitumor agents (Kerr and Workman, 1994). Thus, it is becoming more evident that tumor cells harbor alterations that subvert signal transduction cascades controlling these cellular processes. Specific interference with the aberrant signaling process pretends either reversion of the transformed phenotype or the selective destruction of tumor cells. Thus, the identification of novel intracellular targets responsible for the alterations induced by the activity of different oncogenes and tumor suppressor genes, constitutes the basis for the rational design of novel antiproliferative and antitumor strategies (Kerr and Workman, 1994). This strategy can also be applied to other diseases where alterations of the regulation of proliferation, differentiation or apoptosis play a relevant role.

Previous studies have demonstrated that in cells transformed by oncogenes with high incidence in human tumors such as *ras* oncogenes (found in about 30% of all human tumors), there is a constitutive activation of choline kinase (ChoK) (Lacal *et al.*, 1987; Macara, 1989; Lacal, 1990; Teegarden *et al.*, 1990; Cuadrado *et al.*, 1993; Carnero *et al.*, 1994a; Jiménez *et al.*, 1995; Ratnam and Kent, 1995), an enzyme that is responsible for the conversion of choline into phosphorylcholine (PCho) (Pelech and Vance, 1984). The increase in ChoK activity results in elevated levels of PCho, a putative novel second messenger involved in proliferation (Cuadrado *et al.*, 1993). Furthermore, there is evidence that hemicholinium-3 (HC-3), the most potent drug known as a ChoK inhibitor, blocks DNA synthesis stimulation by growth factors such as PDGF, bFGF, EGF, or phorbol esters but not that of serum or insulin (Cuadrado *et al.*, 1993). Furthermore,

Table 1 Structures, yields, melting points and analytical data for type 2 compounds

| Compound | B ⁺ | Yield (%) ^a | mp (°C) | Formula ^b |
|----------|----------------|------------------------|----------------------------|--|
| a, FK21 | | 66 | 280-281 | C ₃₀ H ₃₈ O ₄ N ₂ ²⁺ · 2Br ⁻ · 1.5H ₂ O |
| b, FK8 | | 89 | 246-247 (dec) ^c | |
| c, FK24 | | 71 | >300 | C ₂₆ H ₃₈ O ₄ N ₂ ²⁺ · 2Br ⁻ |
| d, FK7 | | 93 | >300 | C ₂₆ H ₂₂ O ₂ N ₂ ²⁺ · 2Br ⁻ · H ₂ O |

^aAll the yields refer to recrystallized samples: a EtOH-MeOH; c MeOH; d EtOH-Et₂O. ^bThe elemental analyses were within ±0.4% of the theoretical values for C, H and N. ^cFrom Cannon *et al.*, 1990

Table 2 Structures, yields, melting points and analytical data for type 3 compounds.

| Compound | Het ⁺ | A | Yield (%) ^a | mp (°C) | Formula ^b |
|--------------|------------------|---|------------------------|----------------------|---|
| a, JCR/89C | | | 77 | 207-209 ^c | |
| b, JCR/951B | | | 57 | 74-75 | C ₂₄ H ₂₇ N ₂ ²⁺ · 2Br ⁻ · 2H ₂ O |
| c, JCR/795B | | | 87 | 291-293 (dec) | C ₃₀ H ₃₆ N ₄ ²⁺ · 2Br ⁻ · 2H ₂ O |
| d, JCR/1043B | | | 90 | 80-82 | C ₃₅ H ₃₂ N ₂ ²⁺ · 2Br ⁻ · 1.8H ₂ O |
| e, JCR/947A | | | 92 | 133-135 | C ₃₁ H ₃₈ N ₄ ²⁺ · 2Br ⁻ · H ₂ O |
| f, JCR/791B | | | 83 | 295-296 (dec) | C ₂₆ H ₂₈ N ₄ ²⁺ · 2Br ⁻ |
| g, JCR/927A | | | 98 | 275-277 | C ₂₄ H ₂₂ N ₂ ²⁺ · 2Br ⁻ · 0.8H ₂ O |
| h, JCR/987B | | | 61 | 177-179 | C ₃₀ H ₃₄ N ₄ ²⁺ · 2Br ⁻ · H ₂ O |
| i, JCR/859B | | | 39 | 179-181 | C ₃₂ H ₂₆ N ₂ ²⁺ · 2Br ⁻ · 1.9H ₂ O |

^aAll the yields refer to recrystallized samples (EtOH-Et₂O). ^bThe elemental analyses were within ±0.4% of the theoretical values for C, H and N. ^cFrom Campos *et al.*, 1996

best *in vitro* inhibitors of ChoK. As shown in Figure 2, a drastic inhibition of DNA synthesis in response to PDGF was observed for all the compounds analysed that paralleled their effect on ChoK *in vitro*. Furthermore, similar results were also observed for bFGF (Figure 2b). All the compounds analysed were much more effective than HC-3 under identical conditions, with an IC_{50} of 5 mM (Figure 2e). Table 4 summarizes the results obtained as the IC_{50} values for the compounds tested. The concentrations required for the inhibition of DNA synthesis ranged from 100–2500-fold lower than those required for a similar effect using HC-3. Thus, these novel compounds were much more effective both as inhibitors of ChoK *in vitro* and as inhibitors of DNA synthesis induced by growth factors than HC-3.

It has been previously demonstrated that the inhibitory effect of HC-3 on DNA synthesis in response to growth factors, is not a consequence of non specific toxicity, since no inhibition is observed in the presence of serum (Cuadrado *et al.*, 1993; Jiménez *et al.*, 1995) and addition of HC-3 to cells 6 h after stimulation with growth factors also results in no inhibitory effect (Jiménez *et al.*, 1995). Similar results were also observed when the most active ChoK inhibitors generated in this study were tested in the presence of serum (Figure 2). This effect was also consistent with their much higher *in vitro* inhibitory activity against ChoK, suggesting that inhibition of ChoK is most likely responsible for the blockage of DNA synthesis found in cells stimulated by growth factors.

Signal transduction pathways affected by specific ChoK inhibition

We have previously demonstrated that HC-3 is rather specific for ChoK since no inhibitory effect was observed against a series of phospholipases (Cuadrado *et al.*, 1993). Furthermore, HC-3 does not interfere with the interaction of growth factors with their receptors, nor the receptor's kinase activity determined by either autophosphorylation of the receptor or phosphorylation of endogenous substrates such as PI3K (Jiménez *et al.*, 1995). However, an apparent specific interference with the activation of the Raf kinase/MAPK pathway was observed that paralleled inhibition of PCho

Table 4 Antimitogenic activity of the newly generated compounds after stimulation with PDGF

| Compound | Activity IC_{50} (μ M) | Fold |
|-------------|-------------------------------|------|
| 1, HC-3 | 5000 | 1 |
| 3a, JCR89C | 22 | 227 |
| 3c, JCR795B | 44 | 114 |
| 3e, JCR947A | 50 | 100 |
| 3f, JCR791B | 150 | 33 |
| 3h, JCR987B | 2 | 2500 |

Inhibitory activity of the newly generated compounds on DNA synthesis stimulated by PDGF in NIH3T3 cells. Numbers reflect concentrations of each compound, expressed as μ M, to which 50% inhibition was obtained. Fold indicates the fold of increased activity in each case referred to the activity of HC-3 under identical conditions. ND: not determined

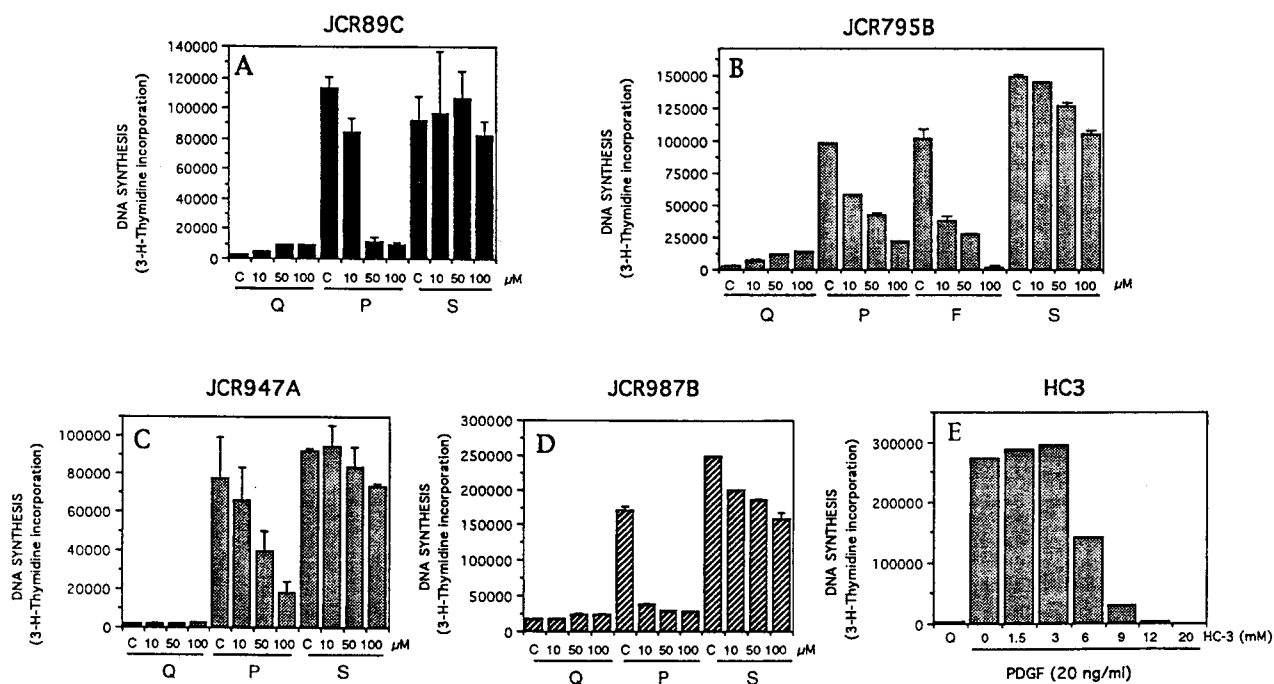


Figure 2 Effect on DNA synthesis induced by growth factors and serum of new compounds with high inhibitory activity on ChoK. Cells were grown and made quiescent as described under Materials and methods. Then, cells were stimulated with the indicated growth factors or 20% serum in the presence of 10, 50 or 100 μ M of each compound. Thymidine incorporation was determined as indicated under Materials and methods. Cells were treated with (a) JCR/89C; (b) JCR/795B; (c) JCR/947A; (d) JCR/987B. (e) Cells treated with indicated amounts of HC-3 in the presence or absence of PDGF (20 ng/ml). Q: quiescent cells; P: PDGF-treated cells (20 ng/ml); F: FGF-treated cells (20 ng/ml); S: 20% serum. Results show mean values of a single experiment performed in triplicate, representative of three independent experiments with similar results

While the involvement of the Raf/MAPK pathway in the regulation of cell proliferation is well established, resulting in the regulation of several transcription factors (Moodie *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Vojtek *et al.*, 1993; Warne *et al.*, 1993), the putative participation of the *ras*-activated lipid-related pathways is still not completely understood. A consequence of the activation of the PLD/ChoK pathway in *ras*-transformed cells, is a constitutive increase in the basal levels of *PCho* which seems critical for cell proliferation (Lacal *et al.*, 1987; Cuadrado *et al.*, 1993; Jiménez *et al.*, 1995). Thus, we have investigated whether the specific inhibition of the ChoK-dependent generation of *PCho* is relevant for *ras*-transformation. To that end, we have incubated NIH3T3 cells transformed by the Harvey-*ras* oncogene with JCR/795B and compared their antiproliferative action to that observed versus untransformed NIH3T3 cells. A strong inhibition on proliferation was observed in the *ras*-transformed cells at concentrations as low as 10 μM of JCR/795B, which was not observed in the parental NIH3T3 cells (Figure 5a). This antiproliferative effect was observed at all concentrations of serum tested, suggesting that although the mitogenic effect after 24 h treatment can be bypassed by serum, after prolonged treatments of up to 6 days, JCR/795B had an antiproliferative effect even in the presence of 10% serum. A higher dose of the ChoK inhibitor of 50 μM was also an efficient inhibitor of proliferation for both NIH3T3 and *ras*-transformed cells, a further indication that this compound may be cytotoxic. Moreover, the above results indicate a higher sensitivity of the *ras*-transformed cells to ChoK inhibition than their parental, untransformed cells, which correlates with their effects on *PCho* production. We also tested the other compounds with efficient *in vitro* inhibitory activity towards ChoK and antimitogenic activity on cells stimulated by growth factors under identical conditions to that of JCR/795B. Either JCR/89C, JCR/791B, JCR/947A and JCR987B showed similar responses and higher activity towards *ras*-transformed cells than the parental NIH3T3 cells (Figure 5).

As further controls, we also investigated the effect on cell proliferation of the new ChoK inhibitors in other oncogene-transformed cells with either increased or normal ChoK activity. We determined by two alternative methods that *src*-induced, but not *fos*-induced transformation is also associated with elevated levels of *PCho*, due to an increased ChoK activity, as previously demonstrated for *ras*. To that end we first measured the kinetics of accumulation of radiolabelled *PCho* after a 2–3 h incubation period with labelled choline. As shown in Figure 6a, both *ras* and *src*-transformed cells had an increased *PCho* production relative to their parental cell lines, an indication of a higher ChoK activity. By contrast, the *fos*-transformed cells had a ChoK activity not distinguishable from that of the control cells. We also determined the specific activity of ChoK in cell extracts from each of the transformed cell lines and found that both the *ras*- and *src*-transformed cells had an increased ChoK activity (Figure 6b). By contrast, *fos*-transformed cells have normal levels of ChoK activity. We next investigated whether the *src*- and *fos*-transformed cells were more sensitive to the inhibitory effects of the ChoK

inhibitors. As shown for *ras*, the *src*-transformed cells were more sensitive to the ChoK inhibitors than their parental NIH3T3 cells (Figure 7a). By contrast, the *fos*-transformed cells were similarly sensitive to the ChoK inhibitors as their parental counterparts (Figure 7b). This effect was specially observed at the lower concentrations of each inhibitor tested (1 and 10 μM), with no significant inhibition, analysed by the *t*-student test, in the case of the *fos*-transformed cells but a consistent, significant reduction of the proliferation rates in the *ras*- and *src*-transformed cells.

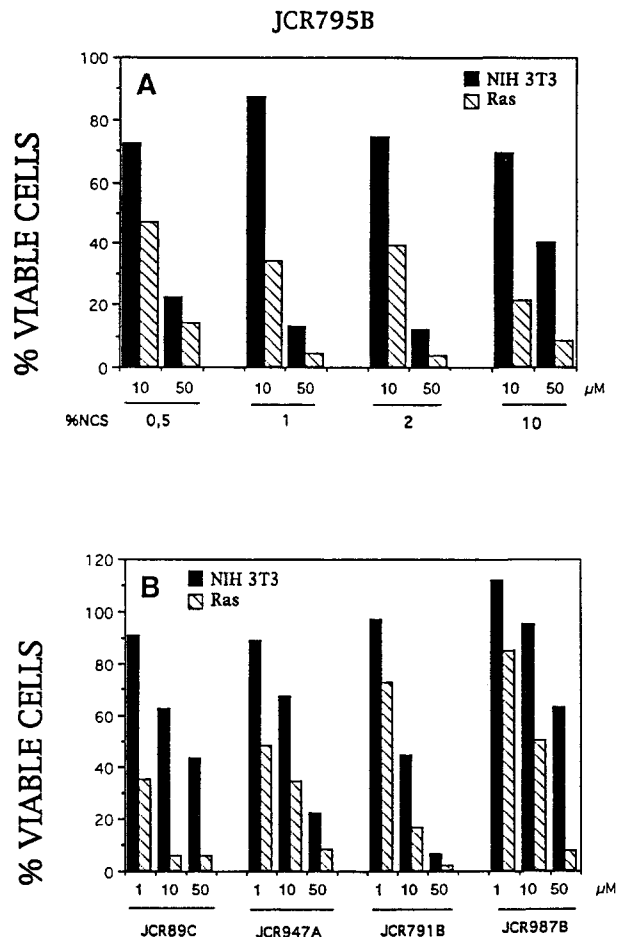


Figure 5 Effects on cell proliferation by ChoK inhibitors in *ras*-transformed cells. (a) Effects of JCR/795B treatment: Cells were seeded on plastic plates and incubated for 24 h in DMEM supplemented with 10% NCS. Then, cells were incubated in DMEM containing the indicated amounts of serum and the indicated concentrations (10 or 50 μM) of JCR/795B. Three days later medium was aspirated from each well, fresh medium added containing identical concentrations of serum and JCR/795B, and cells maintained for three additional days. Quantification of the cells remaining in each well was carried out basically using the crystal violet method (Gillies *et al.*, 1986). Data represent mean values of triplicate determinations reported as percentage of cells relative to their untreated controls, which is considered as 100% in each case. The experiment was repeated at least three times with similar results. (b) Untransformed NIH3T3 cells (■) and *ras*-transformed cells (hatched box) were grown under standard conditions and treated with the indicated concentrations (1, 10 or 50 μM) of each ChoK inhibitor in the presence of 2% serum, essentially as described in the legend to a. Data indicate the mean values of triplicate determinations. The experiment was repeated twice more with similar results. Variations were less than 15% among all samples. Values were statistically significant by the *t*-student test between $P < 0.01$ and $P < 0.001$

It is interesting to note that the *mos*-transformed cells, with higher basal ChoK levels, were more sensitive than those of *raf*-transformed cells, with lower relative basal ChoK levels. Altogether, these results provide a strong support to the hypothesis of an important role of ChoK in the signalling processes altered by oncogenes. Furthermore it also indicates that ChoK inhibition is in fact responsible for the specific antiproliferative effect of the new compounds.

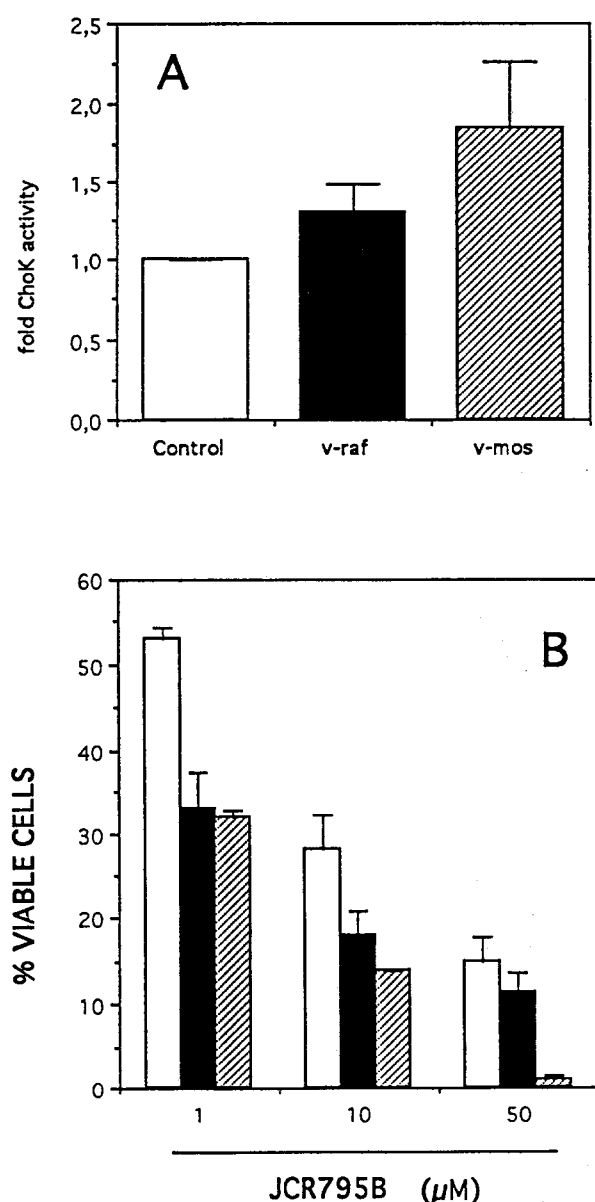


Figure 8 Basal ChoK activity correlates with sensitivity to ChoK inhibitors in *raf*- and *mos*-transformed cells. (a) The specific activity for ChoK in extracts from the parental (NIH3T3 cells (□) or the corresponding *raf* (■) or *mos*-transformed cells (hatched box) were determined as indicated under Materials and methods. Data shown represents the mean value of two independent experiments performed in triplicate along with standard deviations, expressed as c.p.m. of *PCho* divided by the total counts in *Cho* plus *PCho* in each assay. (b) Parental NIH3T3 cells (□) or the corresponding *raf* (■) or *mos*-transfected cells (hatched box) were treated with the indicated concentrations of the ChoK inhibitor JCR795B (1, 10 or 50 μM), as described in the legend to Figure 5. Mean values of three experiments performed in triplicate each is shown using *raf*- and *mos*-transformed cells grown in 10% serum

Discussion

Previous studies from our group demonstrated that *PCho* levels increase in NIH3T3 cells after stimulation with growth factors and serum and are constitutively elevated in *ras*-transformed cells (Lacal *et al.*, 1987; Cuadrado *et al.*, 1993; Carnero *et al.*, 1994a; Jiménez *et al.*, 1995). The elevated level of *PCho* results from the consecutive action of phospholipase D and ChoK (Cuadrado *et al.*, 1993; Carnero *et al.*, 1994a; del Peso *et al.*, 1997). HC-3, the best ChoK inhibitor known until now, shows antimitogenic activity to NIH3T3 cells stimulated with specific growth factors such as PDGF, bFGF, EGF or phorbol esters but not serum (Cuadrado *et al.*, 1993; Jiménez *et al.*, 1995), an indication that this effect is not a consequence of non-specific toxicity. Since these experiments were performed to establish DNA synthesis on a 24 h time period, they show the effect of these drugs on entry into the S phase. However they do not measure their effects on cell proliferation. Furthermore, HC-3 treatment is efficient only if added up to 6 h after mitogenic stimulation, an indication that it is affecting a rather specific step within the cell cycle previous to the commitment to enter the S phase (Jiménez *et al.*, 1995). These results suggested that ChoK, and therefore generation of *PCho*, may be a critical event in mitogenic signal transduction induced by growth factors.

In this study we provide evidence that transformation by *ras* is more sensitive to ChoK inhibition than their parental cells. We also provide evidence that other oncogenes such as *src* and *mos*, and to a lesser extent *raf*, but not *fos*, induces increased basal ChoK activity. These results are in agreement with a recent report indicating that *raf*-transformed cells have also increased ChoK activity and elevated *PCho* levels (Ratnam and Kent, 1995). They also suggest that several oncogenes may mediate transformation by altering signaling pathways which include those related to phospholipid metabolism. In keeping with these results, we have recently reported that oncogenes such as *ras*, *src* and *met* have similar effects on PLD regulation, while other oncogenes such as *sis*, *fgr* or *fms* do not (del Peso *et al.*, 1997). Furthermore, specific interference of these signaling pathways affecting phospholipid metabolism may be critical for dysregulated cell proliferation induced by specific oncogenes based on these differential requirements. Our results demonstrate that this is the case for *ras*, *src*, *mos* and *raf*-transformed cells, which have increased *PCho* levels and increased sensitivity to ChoK inhibition. In contrast, *fos*-transformation does not affect *PCho* levels and therefore is as sensitive to ChoK inhibition for cell proliferation as their parental counterpart.

The concentrations of HC-3 required to inhibit ChoK are in the mM range. However, at these concentrations no inhibitory activity was found against several phospholipases tested under *ex vivo* conditions (Cuadrado *et al.*, 1993). No effect was observed either on ligand-receptor interaction for PDGF, nor inhibition of the autophosphorylation of the PDGF-receptor or the activation of its known endogenous substrates (Jiménez *et al.*, 1995). By contrast, HC-3 blocked Raf kinase and MAPK activation induced by specific growth factors but not

Materials and methods

Synthesis

Compounds 2a, FK21 and 2c, FK24 were prepared by dissolving 1 mmol of α,α' -dibromo-4,4'-biacetophenone in a minimum amount of warmed tetrahydrofuran, adding 2 mmol of the corresponding tertiary amine with stirring and more solvent until the final volume was 10 ml, and allowing the mixture to stir overnight at room temperature. Compound 2d, FK7 was prepared by warming 0.2 g of α,α' -dibromo-4,4'-biacetophenone in pyridine (5 ml) and stirring at room temperature for 3 h. The experimental procedure for type 3 compounds consisted simply of heating in a sealed tube at 100°C a solution of the heterocycle (1.10 mmol) and the corresponding bis(bromomethyl) compound $\text{BrCH}_2\text{ACH}_2\text{Br}$ (0.54 mmol) in dry butanone (25 ml). In all cases, the solid which formed was recrystallized (see Table 1 and 2 for each particular case). After filtration, the product was left for 16 h at 40°C in a vacuum oven at ca. 0.1 mmHg over phosphorus pentoxide. Melting points (mp) were obtained on an Electrothermal melting point apparatus and are non corrected. Many of the bis-salts were unavoidably analysed as solvates, owing to their tendency to retain water under the non-destructive drying conditions. Synthesis of compounds 2b, FK8 (Cannon *et al.*, 1990) and 3a, JCR/89C (Campos Rosa *et al.*, 1996) have been previously reported.

Bis-quaternization of the substituted pyridines and quinolines occurred smoothly, requiring less than 1 h when electron-donating substituents of the 4-dimethylamino and 4-amino type were present on the ring. The yields of the expected products were good. In contrast, when no substituents were present on the heteroaromatic ring, prolonged heating of the sealed tube was found to be necessary. A more detailed description of the synthesis procedures will be described elsewhere.

Cell cultures and reagents

Cells used in this study have been previously described (del Peso *et al.*, 1997). NIH3T3 mouse fibroblasts and their derivatives, the Harvy-*ras*-transformed cell line (*H-ras*) and the LP8.3 (*ras*), *v-src* and *c-fos*, were grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% new-born calf serum (Gibco, Grand Island, NY) under standard conditions of temperature (37°C), humidity (95%), and carbon dioxide (5%). Commercially available reagents were hemicholinium-3 from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), homodimer BB platelet derived growth factor (PDGF) from Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY), anti-phosphotyrosine antibody and methyl [³H]thymidine from Amersham International (Amersham, UK), yeast choline kinase from Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany), methyl [¹⁴C]choline chloride from ICN Pharmaceuticals Inc. (Costa Mesa, CA), myo-[³H]-inositol from American Radiolabeled Chemicals, Inc. (St. Louis, MO), and [¹⁴C]glycerol from Moravex Biochem Inc. (Brea, CA).

Ex vivo assays of choline kinase activity

Different concentrations of the new choline kinase inhibitors were incubated for 45 min at 37°C with 10 mU/ml choline kinase from yeast in a buffer containing 100 mM Tris pH 8, 100 mM MgCl₂, 10 mM ATP and 200 μM methyl-[¹⁴C]choline chloride (55 mCi/mmol, 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) in a final volume of 50 μl . The reaction was stopped in ice by adding 10 μl 500 mM EDTA. Thirty μl of every sample were resolved in this layer chromatography plates (LK6D Silica gel 60 A, Whatman Inc. New Jersey) using as liquid phase 0.9% NaCl:methanol:ammonium hydroxide (50:70:5; V:V:V). Radioactive metabolites (Choline and Phosphocholine) were automatically quantified by an

electronic auto radiography system (Instantimager, Packard; Meriden, CT). The inhibitory concentrations at which 50% was reached (IC₅₀) were calculated using a semilogarithmic plotting of the ratio $P\text{Cho}/(P\text{Cho} + \text{Cho})$ versus concentration of the inhibitors.

Analysis of PCho production in cells (in vitro assay)

Cells (typically $1.5 \times 10^5/\text{well}$) were seeded on 6 well plates and incubated for 3 days. Then, cells were rinsed in TD buffer (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Tris, pH 7.4), and 1 h before labeling with 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ methyl-[¹⁴C]choline chloride, cells were incubated in DMEM supplemented with different concentrations of choline kinase inhibitors, and maintained for 14 additional hours. Then cells were rinsed in ice-cold TD and fixed with 16% ice-cold trichloroacetic acid (TCA). TCA-soluble material containing choline and phosphorylcholine was washed three times with four volumes of diethyleter, dried under vacuum and resuspended in water. Samples were resolved and quantified as described for the *ex vivo* assay. IC₅₀ of phosphorylcholine production were then calculated using a semilogarithmic plotting of the *PCho* levels versus concentration of the inhibitors.

Analysis of choline kinase activity in different cell lines

Two different approaches were used to assess choline kinase activity in oncogene-transfected cells relative to their parental, non-transformed cell lines. One of the methods was to determine the levels of *PCho* per μg of protein after a short (2–3 h) labeling period with 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ methyl-[¹⁴C]cho. The experiment was carried out essentially as described above, except that the labeling period was shorter and no choline kinase inhibitors were added. The alternative method consisted in an *ex vivo* reaction using cell extracts from the different cell lines as a source of choline kinase. Briefly, monolayers of quiescent cells seeded on six well plates were lysed in a buffer containing 0.5% Triton-X100, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM Tris, pH 7.5, 10 mM Na₄P₂O₇, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin and 1 mM PMSF. After centrifugation at 13 000 r.p.m. for 30 min at 4°C, 100 μg of protein were used as a source of choline kinase in the reaction described as '*ex vivo* choline kinase activity' in a final volume of 100 μl . The reaction was stopped by adding ice-cold TCA to a final concentration of 15%. After centrifugation at 13 000 r.p.m. for 30 min at 4°C, 30 μl of the supernatants were resolved by thin layer chromatography on LK6D Silica gel 50 A plates as described above.

Mitogenic assays

Cells (typically $3 \times 10^4/\text{well}$) were seeded on 24-well plates and incubated for 3 days. Then cells were rinsed in TD and stimulated for 22 h with PDGF-BB (20 ng/ml), bFGF (20 ng/ml), or 20% serum in DMEM containing different concentrations of the inhibitors. Six hours before processing, 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ methyl-[³H]thymidine was added and cells incubated under standard conditions of temperature, humidity and CO₂ atmosphere. [³H]thymidine incorporation into DNA replicating cells was determined as the amount of radioactivity present in TCA-insoluble material. The cells were rinsed once with TD and twice with ice-cold 16% TCA. Then, TCA-insoluble material was resuspended in 400 μl 0.25 N sodium hydroxide for 1 h. The solubilized solution was scintillation counted.

Western blot analysis of MAP-1K and MAP-2K

Anti-MAP-1K and MAP-2K antibodies were generated as described in Jiménez *et al.* (1995). Cells were grown to

References

- Bar Sagi D and Feramisco JR. (1986). *Science*, **233**, 1061–1068.
- Bhakoo KK, Williams SR, Florian CL, Land H and Noble MD. (1996). *Cancer Res.*, **56**, 4630–4635.
- Campos Rosa J, Galanakis D, Ganellin CR and Dunn PM. (1996). *J. Med. Chem.*, **39**, 4247–4254.
- Cannon JG, Sahin MF, Long JP, Flynn JR and Bhetnagar RK. (1990). *J. Med. Chem.*, **33**, 577–579.
- Cannon JG. (1994). *Med. Res. Rev.*, **14**, 505–531.
- Carnero A, Cuadrado A, del Peso L and Lacal JC. (1994a). *Oncogene*, **9**, 1387–1395.
- Carnero A, Dolfi F and Lacal JC. (1994b). *J. Cell. Biochem.*, **54**, 478–486.
- Carnero A and Lacal JC. (1995). *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 1094–1101.
- Cuadrado A, Carnero A, Dolfi F, Jiménez B and Lacal JC. (1993). *Oncogene*, **8**, 2959–2968.
- De Vita VT, Hellman S and Rosenberg SA. (1993). *Cancer, Principles and Practice of Oncology*, 4th edition. JB Lippincott Com: Philadelphia, USA.
- Dent P and Sturgill TW. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9544–9548.
- Gillies RJ, Didier N and Denton M. (1986). *Anal. Biochem.*, **159**, 109–113.
- Guyenet P, Lefresne P, Rossier J, Beaujouan JC and Glowinski J. (1973). *Mol. Pharmacol.*, **9**, 630–639.
- Hamza M, Lloveras J, Ribbea G, Soula G and Douste-Blazy L. (1983). *Biochem. Pharmacol.*, **32**, 1893–1897.
- Jiménez B, del Peso L, Montaner S, Esteve P and Lacal JC. (1995). *J. Cell. Biochem.*, **57**, 141–149.
- Kerr DJ and Workman P. (1994). *New molecular targets for cancer chemotherapy*. CRC Press: Boca Raton, Florida, USA.
- Lacal JC, Moscat J and Aaronson SA. (1987). *Nature*, **330**, 269–271.
- Lacal JC. (1990). *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 333–340.
- Lacal JC and Carnero A. (1994). *Oncology Reports*, **1**, 677–693.
- Macara I. (1989). *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 325–328.
- MacDonald JS, Haller DG and Mayer RJ. (1995). *Manual of Oncologic Therapeutics*, 3rd edition. JB Lippincott Com: Philadelphia, USA.
- Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ and Wolfman A. (1993). *Science*, **260**, 1658–1661.
- Pelech SL and Vance DE. (1984). *Biochem. Biophys. Acta*, **779**, 217–251.
- del Peso L, Lucas L, Esteve P and Lacal JC. (1997). *Biochem. J.*, **322**, 519–528.
- Polak RL, Molenaar PC and van Gelder M. (1977). *J. Neurochem.*, **29**, 477–485.
- Ratnam S and Kent C. (1995). *Arch. Biochem. Biophys.*, **323**, 313–322.
- Rodríguez Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroech B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD and Downward J. (1994). *Nature*, **370**, 527–532.
- Ronen SM, Rushkin E and Degani H. (1991). *Biochem. Biophys. Acta*, **1095**, 5–16.
- Ronen SM, Rushkin E and Degani H. (1992). *Biochem. Biophys. Acta*, **1138**, 203–212.
- Teegarden D, Taparowsky EJ and Kent C. (1990). *J. Biol. Chem.*, **265**, 16638–16643.
- Tucek S. (1985). *J. Neurochem.*, **44**, 12–24.
- Vojtek AB, Hollenberg MS and Cooper JA. (1993). *Cell*, **74**, 204–214.
- Warne PH, Rodríguez-Viciano P and Downward J. (1993). *Nature*, **364**, 352–355.
- Zhang X-F, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledges J, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR and Avruch J. (1993). *Nature*, **364**, 308–313.
- Zlatkine P, Moll G, Blais A, Loiseau A and Grimellec CL. (1993). *Biochem. Biophys. Acta*, **1153**, 237–242.