

00582

(7)



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DISEÑO Y SÍNTESIS ORGÁNICA DE BIS-  
INTERCALADORES DEL ADN**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS  
(FARMACIA)

**P R E S E N T A**

**M. C. LUIS CHACÓN GARCÍA**

MÉXICO, D.F.

2001

299024



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 2-11 del Instituto de Química de la UNAM, bajo la asesoría del doctor **Roberto Martínez**. Se contó con apoyo económico de **CONACYT** proyecto **32633E** y **DGAPA** proyecto **IN-206598**.

Asimismo, el M. en C. Luis Chacón García contó con becas otorgadas por **CONACYT** y **DGEP** para la obtención del grado.

El presente trabajo ha generado, hasta el momento, las siguientes publicaciones:

Cytotoxic Activity and QSAR of N,N'-diarylalkanemides.

**Chacón-García, L.;** Martínez, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 731-736.

Synthesis and In vitro Cytotoxic Activity of Pyrrolo[2,3-e]indole derivatives and a dihydro benzoindole analogue.

**Chacón-García, L.;** Martínez, R. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, aceptado para su publicación.

Asimismo, parte de este trabajo ha sido presentado en los siguientes congresos:

Molecular Interactions in a DNA-daunomycin complex.

**Chacón García, L.;** Cogordan, J. A.; Martínez, R.

Quinto Congreso de América del Norte, Can-cun Q. Roo, noviembre de 1997.

Diseño y Síntesis Orgánica de la Porción Monomérica de Bis-intercaladores del ADN.

**Chacón García, L.;** Martínez, R.

Encuentro entre investigadores en Química, Academia Mexicana de Ciencias, Pachuca Hgo., noviembre de 1998.

Diseño de Bis-intercaladores del ADN.

**Chacón García, L.;** Martínez, R.

XXXIV Congreso Mexicano de Química, Monterrey, N.L., octubre de 1999.

Síntesis de Potenciales Bis-intercaladores del ADN.

**Chacón- García L.;** Martínez, R.

XXXIV Congreso Mexicano de Química, Monterrey, N.L., octubre de 1999.

Estudio de la Actividad Citotóxica de N,N'-Diarilalcanodiamidas.

**Chacón García, L.;** Martínez, R.

XXXV Congreso Mexicano de Química, San Luis Potosí, S.L.P. septiembre de 2000.

Adicionalmente ha recibido el siguiente reconocimiento:

“Tercer Lugar en los Trabajos Presentados en el Simposio del Instituto de Química de la UNAM” Instituto de Química, UNAM, diciembre de 2000, con la presentación:

**Chacón García, L.;** Martínez, R. “Diseño y Síntesis de Bis-intercaladores del ADN”

Se agradece la asistencia técnica de:

M. en C. Ma. Isabel Chávez Uribe  
Q.F.B. Ma. Del Rocio Patiño Maya  
M. en C. Angeles Peña  
M. en C. Hector Rios Olivares  
M. en C. Javier Perez Flores  
I.Q. Luis Velazco Ibarra

por la obtención de los datos espectroscópicos y a la M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan  
por la obtención de los datos de actividad biológica.

*Con el más sincero agradecimiento a mis papás:*

*Eba*

*y*

*David*

*y a mis hermanos: David y Daniel*

*quienes siempre me apoyaron en todo lo posible e incondicionalmente, como bien saben hacerlo, en cada uno de los países para llegar a realizar una de mis más grandes metas.*

Quiero agradecerle a todas las personas que de alguna manera me apoyaron y contribuyeron en la realización de este trabajo.

Particularmente al Dr. Roberto Martínez, quién desde el comienzo de éste proyecto me dio todas las facilidades para hacer investigación y además me demostró no solamente sus habilidades de asesoría e investigación, sino también una gran amistad.

A la Dra. Ofelia Espejo y al Dr. Manuel Rubio por haberle dado seguimiento a este trabajo y haber aportado sugerencias muy importantes con la mejor disposición.

Además, quiero expresarle mi gratitud a mis compañeros del Lab. 2-11, incluyendo a Paola, por su apoyo, amistad y momentos agradables dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros del Instituto de Química y del posgrado.

A Rafael H. por sus valiosos comentarios.

A mis primos, tíos y abuelos por su confianza, apoyo y espera.

A mis abuelos Petra Garibay de G. + y Ladislao Chacón +

Y por su puesto a una linda persona que representa mucho para mi y que *apareció* al final de esta tesis apoyándome, motivándome y teniéndome paciencia hasta con mis “dobladas de pie” además de facilitarme la escritura de esta tesis, etc. etc.(no acabaría): MaryCarmen (tqm).

Sabiendo que todos ellos son personas sumamente ocupadas y que, a pesar de ello, aceptaron formar parte del jurado y dedicaron su valioso tiempo a la revisión de este manuscrito aportando importantes e interesantes sugerencias, deseo manifestarles mi agradecimiento:

Dra. Esther García Garibay

Dra. Rachel Mata Esseyag

Dra. Adela Rodríguez

Dr. Enrique Angeles

Dr. Carlos Cerda García Rojas

Dr. Eusebio Juaristi C.

Dr. Joaquín Tamariz M.

---

# I N D I C E

---

Indice	i
Indice de figuras	ii
Indice de esquemas	iii
Indice de tablas	iv
Glosario	v
Resumen	vi
Summary	vii
Introducción	1
Antecedentes	3
Generalidades de la intercalación	3
Bis-intercaladores del ADN	8
Requerimientos estructurales	9
Usos de los intercaladores	10
Intercaladores como agentes citotóxicos	11
Objetivos	14
Diseño	15
Síntesis	20
Estrategia de síntesis	20
Obtención de la porción monomérica	23
Funcionalización de la porción monomérica	28
Síntesis convergente de los homodímeros	37
Síntesis de análogos estructurales	47
Derivados pirrolo[2,3-e]indoles	49
Derivados pirrolonaftalenos	50
Homodímeros 65 y 74	53
N,N'-Bis(arilalcanodiamidas)	58
Actividad citotóxica	61
Elección de los compuestos a evaluar	61
Evaluación de la actividad citotóxica	67
Actividad citotóxica de bis-fenilalcanodiamidas	72
Conclusiones	78
Parte experimental	80
Metodología química	80
Ensayos de citotoxicidad	99
Referencias	100
Anexo: Publicaciones generadas	107

---

## I n d i c e   d e   f i g u r a s

---

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la intercalación	3
<b>Figura 2.</b> Estructura del complejo (GC92-daunomicina 1, obtenida por difracción de rayos X.	4
<b>Figura 3.</b> Ejemplos de intercaladores recientemente sintetizados con actividad citotóxica	12
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de citotoxicidad de los intercaladores del ADN	13
<b>Figura 5.</b> Resultado del diseño y esquematización de los componentes del homodímero resultante	19
<b>Figura 6.</b> Representación gráfica de la contribución del HOMO en <b>36b</b> .	29
<b>Figura 7.</b> RMN <sup>1</sup> H de <b>72</b> a diferente temperatura.	55
<b>Figura 8.</b> Representación tridimensional de <b>74A</b> y <b>74B</b> .	56
<b>Figura 9.</b> Compuestos sometidos a evaluación citotóxica.	65
<b>Figura 10.</b> Información proporcionada por los cambios estructurales propuestos.	66
<b>Figura 11.</b> % de Inhibición del crecimiento de <b>55</b> , <b>57</b> , <b>60</b> , <b>72</b> y <b>73</b> en PC-3 a 31 μM.	70
<b>Figura 12.</b> Comparación de la actividad citoóxica de <b>74</b> y <b>65</b> .	71
<b>Figura 13.</b> Tendencia de la citotoxicidad de <b>75</b> con respecto al número de metilenos en K562.	73
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática de la interacción de las bis-(4-aminofenil)alcanodiamidas <b>74</b> con el ADN.	75

---

# I n d i c e d e e s q u e m a s

---

<b>Esquema 1.</b> Mecanismo de acción molecular de los hidrocarburos policíclicos aromáticos cancerígenos.	16
<b>Esquema 2.</b> Sustitución bioisostérica de los anillos A y C del fenantreno.	17
<b>Esquema 3.</b> Incorporación de metilos en el esqueleto base	18
<b>Esquema 4.</b> Rutas de síntesis descritas para la obtención de benzodipirroles.	21
<b>Esquema 5.</b> Ruta propuesta para la obtención del dímero mediante la incorporación de <i>p</i> -nitroanilina.	31
<b>Esquema 6.</b> Intentos de alquilación de <b>41</b> .	33
<b>Esquema 7.</b> Segunda ruta alterna propuesta para la obtención del homodímero mediante la incorporación de <i>p</i> -nitroanilina.	34
<b>Esquema 8.</b> Tercer ruta alterna para la obtención del homodímero mediante síntesis convergente.	38
<b>Esquema 9.</b> Ruta alternativa para la obtención de <b>51</b> a partir de <b>41</b> .	40
<b>Esquema 10.</b> Intentos de alquilación de <b>51</b> .	41
<b>Esquema 11.</b> Obtención de la bis-fenilalcanodiamida <b>56</b> a partir de <i>p</i> -nitroanilina.	42
<b>Esquema 12.</b> Ruta de obtención alterna del homodímero <b>55</b> a partir de <b>48</b> .	43
<b>Esquema 13.</b> Análogos estructurales del pirroloindol <b>55</b> propuestos para evaluar actividad citotóxica	48

---

## I n d i c e d e t a b l a s

---

<b>Tabla I.</b> Condiciones de los intentos de nitración de <b>36a</b> y <b>36b</b> .	30
<b>Tabla II.</b> Condiciones de reacción para la obtención de <b>44</b> .	35
<b>Tabla III.</b> Rendimiento en la obtención de <b>76a-f</b> y <b>52</b> .	59
<b>Tabla IV.</b> Rendimiento en la obtención de <b>75a-f</b> y <b>50</b> .	60
<b>Tabla V.</b> Datos de actividad citotóxica de los compuestos <b>55</b> , <b>57</b> , <b>59</b> , <b>69</b> , <b>65</b> , daunomicina <b>1</b> , y 5-fluorouracilo <b>86</b> .	68
<b>Tabla VI.</b> % de Inhibición del crecimiento a una concentración de 31 $\mu$ M de <b>76</b> , <b>52</b> , <b>75</b> y <b>50</b> .	72
<b>Tabla VII.</b> Comparación de la actividad citotóxica calculada por la <i>ecuación 2</i> vs. experimental.	76

---

## G l o s a r i o

---

A	Adenina
ADN	Ácido ácido
AMSA	9-(4-metanosulfoanilida-amino)acridina
c	Cuarteto
C	Citosina
CYP 450	Citocromo P450
d	Doblete
EM	Espectroscopía de Masas
EM-AR	Espectroscopía de Masas de Alta Resolución
FAB	Bombardeo Rápido de Átomos
G	Guanina
h	Horas
HOMO	Orbital Ocupado de Mayor Energía
IC	Inhibición del Crecimiento
IC <sub>50</sub>	Inhibición del Crecimiento 50
IE	Impacto Electrónico
IR	Infrarrojo
LUMO	Orbital Ocupado de Menor Energía
m	Multiplete
m/z	Relación masa/carga
ppm	Partes por millón
q	Quinteto
QSAR	Relación Estructura-Actividad Cuantitativa
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C
t	Triplete
T	Timina
TOTO	Tetraioduro de 1,1'-(4,4,8,8,-tetrametil-4,8-diazaundecametilen)bis[4-(3-metil-2,3-dihidrobenczo-1,3-tiazolil-2-metiliden)quinolio]

---

## R E S U M E N

---

El descubrimiento de nuevos compuestos con actividad antitumoral, es uno de los retos más importantes en la química farmacéutica. Uno de los grupos de agentes quimioterapéuticos mas relevantes utilizados en el tratamiento del cáncer, comprende moléculas que interaccionan con el ADN. Este grupo incluye a los intercaladores del ADN. Estos compuestos son moléculas que se insertan en el material genético sin desnaturalizarlo. Esta inserción genera cambios conformacionales en la doble hélice, tales como incremento en los ángulos azúcar-fosfato y en la distancia entre pares de bases. Los intercaladores del ADN tienen características en común como planaridad y aromaticidad. Por su parte, los bis-intercaladores del ADN son los respectivos homo- o hetero-dimeros unidos por una cadena puente. Tomando en cuenta las características estructurales de estos compuestos, en el presente trabajo se describe la síntesis de bis-intercaladores del ADN potenciales tomando como esqueleto base el pirrolo[2,3-*e*]indol. Adicionalmente se sintetizaron algunos benzoindoles análogos con la finalidad de elucidar los principales requerimientos estructurales para su actividad citotóxica.

Se describe la síntesis de los compuestos mencionados a partir de la 1,3-ciclohexanodiona y de la  $\alpha$ -tetralona en siete y cinco pasos respectivamente.

La evaluación biológica de los compuestos probados se llevó a cabo en seis diferentes líneas celulares tumorales. Se encontró que los factores que afectan la actividad citotóxica pueden ser el peso molecular, los susituyentes en los grupos fenilos y la presencia de una amida capaz de llevar a cabo interacciones fuertes con enzimas tales como puentes de hidrógeno.

---

## S U M M A R Y

---

The discovery of new compounds with antitumoral activity has become one of the most important goals in medicinal chemistry. One important group of chemotherapeutic agents used in cancer therapy comprises molecules that interact with DNA. This group includes DNA intercalators. These compounds are molecules that insert between the base pairs of the DNA without denaturalizing it. This insertion causes conformational changes in the double helix such as increase in the phosphate-sugar angles and the distance between base pairs. DNA intercalators have common structural characteristics such as planarity and aromaticity. DNA bis-Intercalators are the respective homo- or hetero-dimers bridged by a linker, which resembles a DNA groove ligand. With these considerations, molecules with the structural characteristics of DNA Intercalating and Bis-intercalating compounds, using pyrrolo[2,3-*e*]indole as the aromatic portion, are described in this study. Some dihydro benzoindol analogues were also synthesized to elucidate the major structural requirements for cytotoxic activity.

The seven steps synthesis of the homodimers from 1,3-ciclohexanodione and five steps from  $\alpha$ -tetralone is described.

A biological evaluation of the test compounds was carried out in six different tumoral cell lines. The factors that affect the cytotoxic activity appear to be molecular weight, the substituents on the phenyl group and the presence of an amide group capable of strong interactions such as hydrogen bonding.

---

# I N T R O D U C C I O N

---



El diseño y síntesis de moléculas con actividad biológica es una de las ramas prioritarias de las ciencias naturales para dar solución a problemas tan relevantes como son las enfermedades. El diseño racional de un compuesto con la actividad deseada debe contemplar el conocimiento de su mecanismo de acción, así como los factores que influyen para lograr una alta especificidad, pudiendo abarcar estos últimos desde estructurales hasta electrónicos.

El diseño racional de fármacos requiere de una participación interdisciplinaria que incluye áreas del conocimiento de la química, la bioquímica, la fisicoquímica y la farmacología, entre otras, para dar forma a un nuevo compuesto con posibilidades de llevar a cabo una actividad deseada, sustituyendo así los medios clásicos empleados para este fin (Boyd et al., 1999; Reddy y Parril, 1999; Drews, 2000). En la literatura se pueden encontrar varios ejemplos de compuestos con actividad farmacológica que fueron diseñados racionalmente (Propst y Perum, 1992), y algunos de ellos se encuentran en uso clínico.

En el tratamiento de enfermedades, uno de los blancos que han atraído la atención por su participación en las mismas es el ácido desoxirribonucleico (ADN), ya que como se conoce, es en donde se encuentra la información genética de todos los seres vivos y en donde se llevan a cabo los programas de reproducción celular, síntesis de proteínas y apoptosis (Hartwell y Kastan, 1994). Así, el ADN puede interactuar con otras moléculas para activar o impedir muchas de las funciones celulares. Se ha descrito una extensa variedad de compuestos que interactúan con el material genético ya sea reversible o irreversiblemente, los primeros son de considerable importancia e incluye péptidos, agua, y algunos iones que participan en las funciones normales del ADN. Una de las líneas más importantes en el desarrollo de la

quimioterapia contra algunos tipos de cáncer. virus y enfermedades parasitarias involucran fármacos con las características de este grupo, entre los que se encuentran los intercaladores.

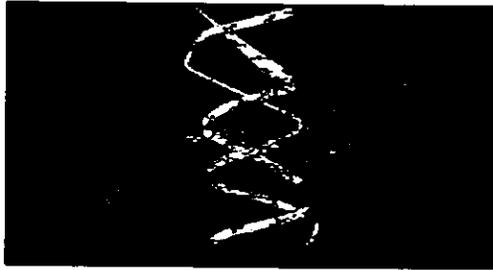
El estudio de los intercaladores del ADN comienza en 1961 (Lerman, 1961) y hasta la fecha continúan siendo objeto de estudio ya que se les han encontrado aplicaciones en investigación básica y terapéutica. Dentro de su aplicación medicinal destaca la antitumoral, de hecho algunos fármacos de esta clase son empleados en el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Sin embargo, los mecanismos de resistencia de células malignas ante estos compuestos así como su toxicidad han motivado a la búsqueda de nuevos intercaladores.

En la presente tesis se plantea el diseño de un nuevo grupo de bis-intercaladores potenciales del ADN, su síntesis y su evaluación como agentes citotóxicos.

---

# A N T E C E D E N T E S

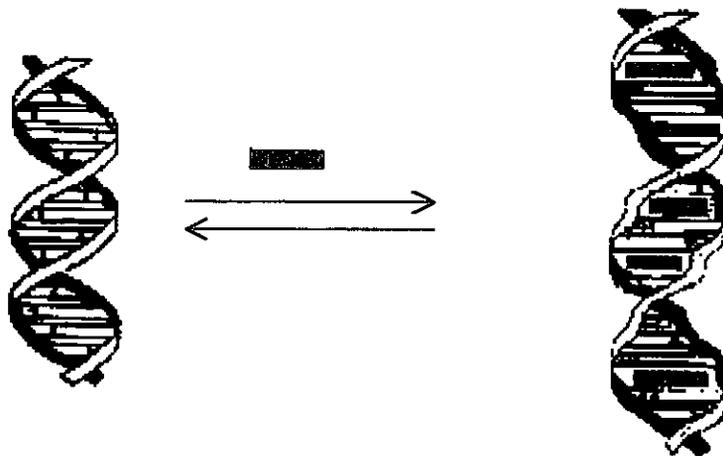
---



---

## GENERALIDADES DE LA INTERCALACIÓN

Los intercaladores del ADN son moléculas que, como su nombre lo indica, se intercalan reversiblemente en la doble hélice del material genético, sin unirse covalentemente a éste y sin romper los puentes de hidrógeno que forman los pares de bases de Watson y Crick. (Figura 1)

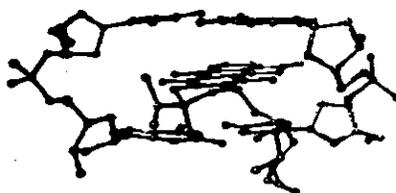


---

**Figura 1.** Representación esquemática de la intercalación.

El ADN resultante de la intercalación se distorsiona conformacionalmente. Este hecho es provocado por los cambios en los ángulos de enlace de los grupos azúcar-fosfato para poder

soportar la separación necesaria entre pares de bases, que se incrementa de 3-4 Å a  $\approx$ 7-8 Å una vez ocurrida la intercalación (Pindur et al., 1993). En la figura 2 se muestra el complejo (GC)<sub>2</sub>-daunomicina (1) obtenido por difracción de rayos X en donde no existe unión covalente entre el ligando y la diana.



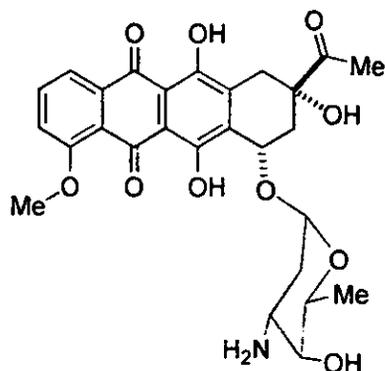
**Figura 2.** Estructura del complejo (GC)<sub>2</sub>-daunomicina 1, obtenida por difracción de rayos X.

Se muestra únicamente el sitio de intercalación.

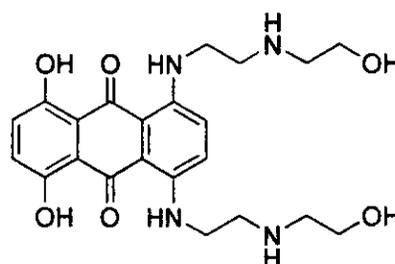
Los intercaladores siguen el principio de exclusión del sitio vecino, lo cual quiere decir que no ocupan dos sitios adyacentes. Esto se debe a que al sitio adyacente no le sería posible soportar demasiada tensión angular, si otro intercalador entrara en él (Wakelin et al., 1978; Canellakis et al., 1976).

El origen de las fuerzas de intercalación es variable, aunque dos factores de evidente importancia son las contribuciones electrostáticas y las fuerzas hidrofóbicas. En el primer caso, son importantes los *puentes de hidrógeno* que pueden ser formados entre los grupos amino y carbonilo de las bases púricas y pirimídicas y los grupos hidroxilos, carbonilos y aminos, entre otros, por parte del intercalador (Chaires, 1995; Waring y Bailly, 1994, Adams et al., 1999). Cabe señalar que la contribución energética de un puente de hidrógeno es de 3 a 6 kcal/mol. (March, 1992), lo cual es muy poco si se compara con la energía de 80 kcal/mol de un enlace covalente típico, sin embargo la aportación energética de los puentes de hidrógeno adquiere importancia conforme el número de los mismos se incrementa (Morokuma, 1977). Esta interacción ha quedado demostrada en procesos de intercalación de la daunomicina 1 (Chaires, 1995) y la mitoxantrona 2 (Rehn y Pindur, 1996a). Esta contribución no es un requerimiento indispensable para la intercalación pues se han descrito intercaladores que carecen de la posibilidad de formar puentes de hidrógeno, al menos en el sitio de intercalación, tales como la 9-aminoacridina 3 (Sakore et al., 1979) y derivados del [(1-pirenilmetil)amino] alcohol 4 (Bair et al., 1990; Bair et al., 1991). Otros tipos de fuerzas electrostáticas que

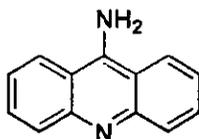
intervienen en el reconocimiento ligando-ADN, son las *fuerzas de van der Waals*, cuya contribución energética es aun menor que la aportada por los puentes de hidrógeno, esto es menos de 1 kcal/mol (Morokuma, 1977), pero que al igual que estos últimos, su importancia se vuelve relevante entre más interacciones de este tipo existan. Un ejemplo de estas interacciones son las encontradas en el complejo ADN-daunomicina (1) (Chaires et al., 1993).



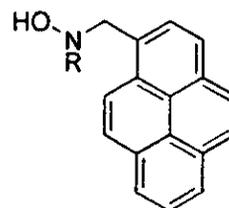
Daunomicina 1



Mitoxantrona 2



9-Aminoacridina 3



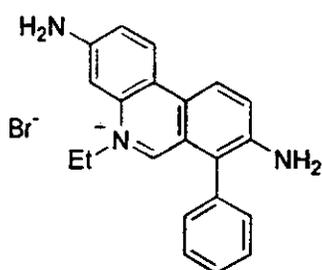
[(1-Pirenil-metil)amino]alcohol 4

Por otra parte, en lo que respecta a los *factores hidrofóbicos*, es importante resaltar que la interacción es relevante, debido a que la molécula intercaladora al ser relativamente poco polar y encontrarse en un entorno hidrofílico, que es en el que se encuentra el ADN (iones y agua), tiende entonces a ubicarse en el ambiente hidrofóbico de los pares de bases (Lenhinger, 1993). Mediante estudios teóricos empleando antibióticos del tipo de la antraciclina como modelos de intercaladores, se ha fortalecido esta teoría (Baginski et al., 1997).

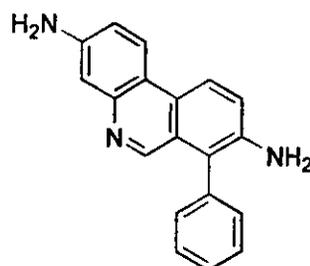
Por otra parte, empleando métodos semiempíricos en el complejo 9-aminoacridina 3-ADN se ha demostrado que, adicionalmente a los factores fisicoquímicos previamente mencionados, la *transferencia de carga* entre guanina e intercalador es un factor importante en la estabilización

del complejo (Rehn y Pindur, 1996b). Este tipo de interacción es común encontrarla en sistemas biológicos (Slifkin, 1980).

También, se han llevado a cabo estudios de orbitales moleculares que han aportado contribuciones interesantes en lo que respecta a la estabilidad de los complejos intercalador-ADN. Uno de ellos se llevó a cabo con el bromuro de etidinio **5** y algunos análogos del mismo y su interacción con guanina y citosina en un complejo simulado (Paterson et al., 1997). Este estudio sugirió una *interacción de los orbitales frontera* entre el LUMO del intercalador y el HOMO de las bases púricas adyacentes, dando lugar a un HOMO extendido estabilizante en el que la contribución tanto por parte del etidinio como por parte de la purina es significativa. Los resultados de este estudio explican el desplazamiento batocrómico en el espectro de absorción electrónica del complejo así como porqué la fenantridina neutra **6** no intercala, con la misma magnitud que lo hace su análogo cargado positivamente, ya que carece de este tipo de interacciones entre orbitales.



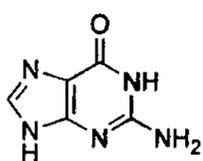
Bromuro de etidio **5**



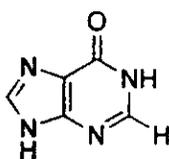
Fenantridina **6**

Otro estudio de orbitales moleculares relacionado con complejos intercalador-ADN se llevó a cabo sobre la estructura obtenida por difracción de rayos x del complejo GCGC-daunomicina **1**. Empleando métodos *ab initio* se encontró una contribución representativa en 16 orbitales moleculares profundos (abajo del HOMO) tanto por parte de la porción cromófora de la daunomicina como por parte de la guanina y la citosina. Resulta importante señalar que en este estudio se encontró que las principales contribuciones por parte del intercalador las aportan los heteroátomos, lo cual refleja que estos tienen una participación estabilizante en el complejo. Un aspecto de interés relacionado con la estabilidad sugerida por estos orbitales, es que el número de interacciones se ve favorecido con la guanina (Chacón-García et al., 1997).

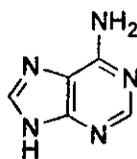
La intercalación ocurre principalmente entre pares de bases guanina-citosina (Saenger, 1983), lo cual puede ser explicado, como se mencionó anteriormente, basándose en la preferencia de los intercaladores por llevar a cabo interacciones de transferencia de carga así como de estabilización entre orbitales frontera y orbitales moleculares profundos con la guanina. Sin embargo un factor relevante, al cual inicialmente se le atribuyó esta preferencia, es el grupo 2-amino de la guanina, ya que fue demostrado experimentalmente que al sustituir guanina **7** por inosina **8** y, adenina **9** por 2,4-diamino purina **10** (DAP) en secuencias nucleotídicas, la selectividad que presentan los intercaladores actinomicina **11** y equinomicina por guanina-citosina cambio por DAP-timina (Waring y Bailly, 1994). Un resultado similar se encontró en la daunomicina (Bailli et al, 1998). Resulta interesante señalar que la energía del HOMO de la inosina es menor que aquella de la guanina, mientras que la energía del LUMO de la DAP es mayor (Chacón-García, 2000), estos datos apoyan la propuesta de estabilización del complejo por transferencia de carga e interacción entre orbitales frontera.



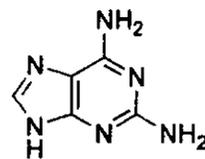
Guanina **7**



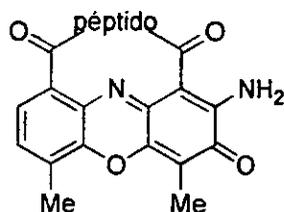
Inosina **8**



Adenina **9**



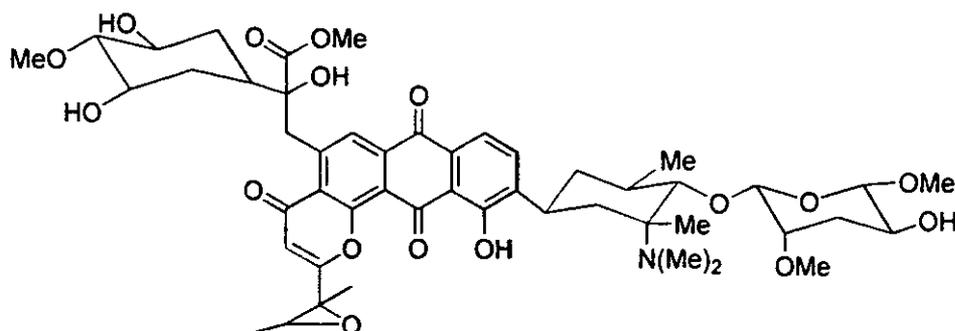
2,4-Diaminopurina **10**



Actinomicina D **11**

También existen intercaladores cuya preferencia es por sitios adenina-timina, un ejemplo es el derivado del [(1-pirenilmetil)amino]alcohol **4** (Wilson y Gisvold, 1985). Como ya se mencionó, los intercaladores pertenecientes a este grupo son poco comunes, y la explicación referente a la selectividad por estos sitios no ha sido extensamente estudiada.

En lo que respecta a la preferencia por el surco del ADN, la mayoría de estos compuestos prefieren entrar por el surco menor, aunque también se han encontrado intercaladores con preferencia opuesta (Tanious et al., 1991). Asimismo, existen intercaladores cuya intercalación es por ambos surcos. Dos casos interesantes de esta ambivalencia es la intercalación de la Altromicina B **12**, un miembro de la familia de las pluramicinas y la Nogalamicina, un derivado de las antraciclinas (Liaw et al., 1989).



Altromicina B **12**

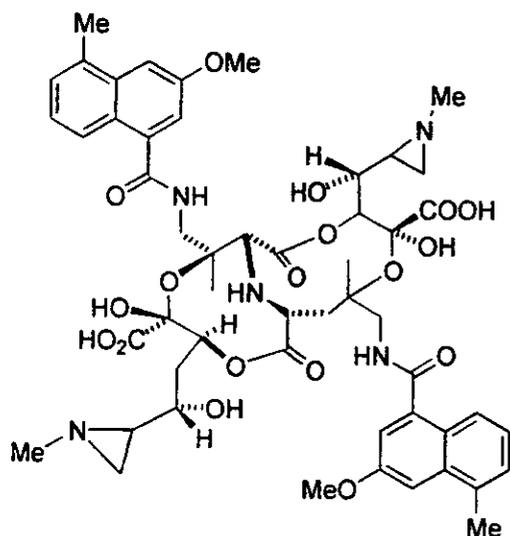
## BIS-INTERCALADORES DEL ADN

Una variante de los monointercaladores son los bis-intercaladores, los cuales consisten en dos moléculas intercaladoras unidas por un puente de naturaleza y longitud variable (Lipard, 1984). La ventaja potencial de los bis-intercaladores sobre su contraparte monomérica es contundente. En primer lugar, los bis-intercaladores presentan mayor afinidad por el ADN (Lepecq et al., 1975; Capelle et al., 1979). En segundo lugar, el tamaño de la molécula es mayor y por consecuencia puede, potencialmente, incrementar la selectividad sobre secuencias nucleotídicas (Dervan, 1986).

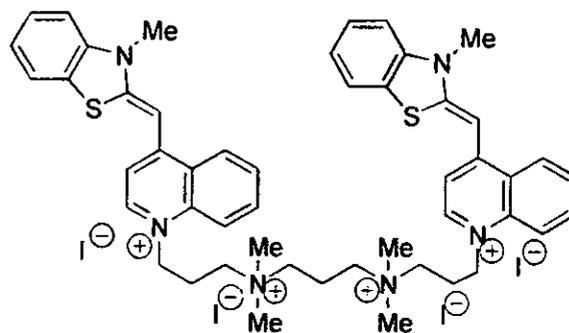
Al igual que los mono-intercaladores, en estos dímeros, los principios que gobiernan la selectividad sobre G-C parecen estar igualmente dados por el grupo amino libre de la guanina 7 (Bailly y Waring, 1998b).

En la literatura se pueden encontrar diversos ejemplos de compuestos de este grupo, tanto naturales como sintéticos. Ejemplos de los primeros son la Triostina A (Wang, 1984) y la carcinofilina A **13**, un antibiótico aislado de *Streptomyces sahachiroi*, que además de ser

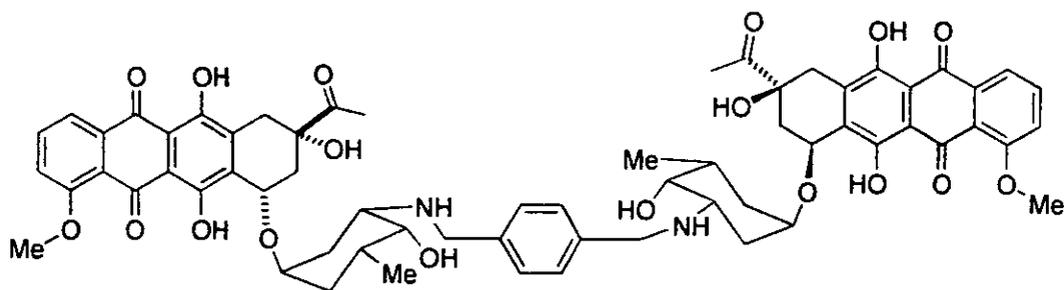
agente intercalador es alquilante (Lown y Hanstock, 1982); ejemplos de bis-intercaladores sintéticos son: el TOTO **14** cuya bis-intercalación ha sido demostrada por RMN  $^1\text{H}$  y el benzimidazolio (Spielman et al., 1995; Pastor et al., 1995). Así mismo, se han descrito estructuras semisintéticas tales como la bis-daunomicina **15** (Chaires, 1995; Leng et al., 1998).



Carcinofilina 13



TOTO 14



Bis-daunomicina 15

## REQUERIMIENTOS ESTRUCTURALES

Como puede apreciarse en los ejemplos tratados hasta el momento, la variedad de intercaladores del ADN es tal que no existe un esqueleto que pueda ser considerado como base, sin embargo si es posible saber que los requerimientos estructurales para un buen intercalador son:

1. -Planaridad o *cuasi* planaridad, que permita que las interacciones estéricas en el complejo ADN-intercalador se minimicen (Gabay y DePaolis, 1971) no contraponiendo así las interacciones estabilizadoras.
2. -Área de la porción intercaladora equivalente a tres o cuatro anillos (Pindur et al., 1993), misma que corresponde al tamaño del área de intercalación, es decir entre los pares de bases. Sin embargo es importante señalar que se han descrito intercaladores en los que esta porción es de solamente dos anillos (Dai et al., 1999).
3. - Polaridad relativamente baja que favorezca la estabilización del complejo por efectos hidrofóbicos o bien grupos funcionales que permitan interacciones de tipo puentes de hidrógeno.
4. - La cadena puente, en el caso de los bis-intercaladores, con una longitud de  $\sim 10 \text{ \AA}$  (Assamunt et al., 1985) u  $8.8 \text{ \AA}$  como mínimo (Wakelin et al., 1978). Es elemental considerar que la torsión de la cadena, al momento de la bis-intercalación, permita la doble inserción respetando el principio de exclusión del sitio vecino. Aunque ha habido controversia sobre la distancia precisa, se ha considerado que cuando la cadena es alifática, son necesarios 8 o 9 metilenos (Fuller et al., 1964).

## USOS DE LOS INTERCALADORES

Desde su descubrimiento, a los intercaladores del ADN se les han proporcionado una extensa variedad de usos tanto en investigación básica como aplicada, algunos ejemplos son:

En investigación bioquímica, algunas bis-acridinas son empleadas como marcadores de ADN (Shigeori et al., 1990). En biología molecular, algunos derivados de dibenzoquinonas (Mesmaeker et al., 1997) y otros intercaladores unidos a secuencias nucleotídicas son utilizados para incrementar la afinidad de triplex (Asseline, 1997, Zhou et al., 1995). En esta misma área, se buscan inhibidores de la reparación del ADN uniendo una base púrica o pirimidínica a un intercalador por una cadena puente (Berthet et al., 1997; Belmont et al., 1999). En la búsqueda de nuevos fármacos se investigan 9-aminoacridinas sustituidas para el tratamiento de leishmaniasis y tripanosomiasis (Gamage et al., 1997) y derivados de la fenantridina como agentes antivirales (Peytoux et al., 1999). A pesar del extenso uso de estas moléculas en diversas áreas, la aplicación más relevante es como agentes citotóxicos.

## INTERCALADORES COMO AGENTES CITOTÓXICOS

De una manera particular, mucha de la investigación en el área de los intercaladores del ADN se encuentra enfocada hacia el tratamiento del cáncer, padecimiento que es considerado la segunda causa de muerte en nuestro país seguido de las enfermedades del corazón (S.S., 1996). En México uno de los fármacos intercaladores disponibles en el mercado es la daunomicina 1 (PLM, 2000), que se utiliza para el tratamiento de la leucemia y que como ya se mencionó es un fuerte intercalador del ADN. Infortunadamente, su valiosa aplicación está limitada por la alta cardiotoxicidad que presenta (Bowman, Rand, 1984). Las desventajas de toxicidad, disminución de la respuesta inmunológica y malestares que van desde leves a graves, como náuseas o vómito, no son exclusivas de la daunomicina 1 sino de todos los agentes antitumorales, esto debido a que la diferencia metabólica de las células cancerígenas con respecto a las sanas es cuantitativa y no cualitativa. Este problema, aunado a la resistencia múltiple a fármacos que presentan las células tumorales, ha llevado a la búsqueda de nuevos agentes citotóxicos y en lo que a los intercaladores del ADN respecta, no han sido la excepción y por ello hasta la fecha se busca incrementar su actividad antitumoral, modificando los ya existentes para así generar nuevas moléculas más efectivas y menos tóxicas; por ejemplo, haciéndolos bifuncionales (Kar et al., 2000, Creech et al., 1972) o selectivos (Leenders y Scheeren, 1995). Algunos ejemplos recientes de estos últimos se muestran en la figura 3.

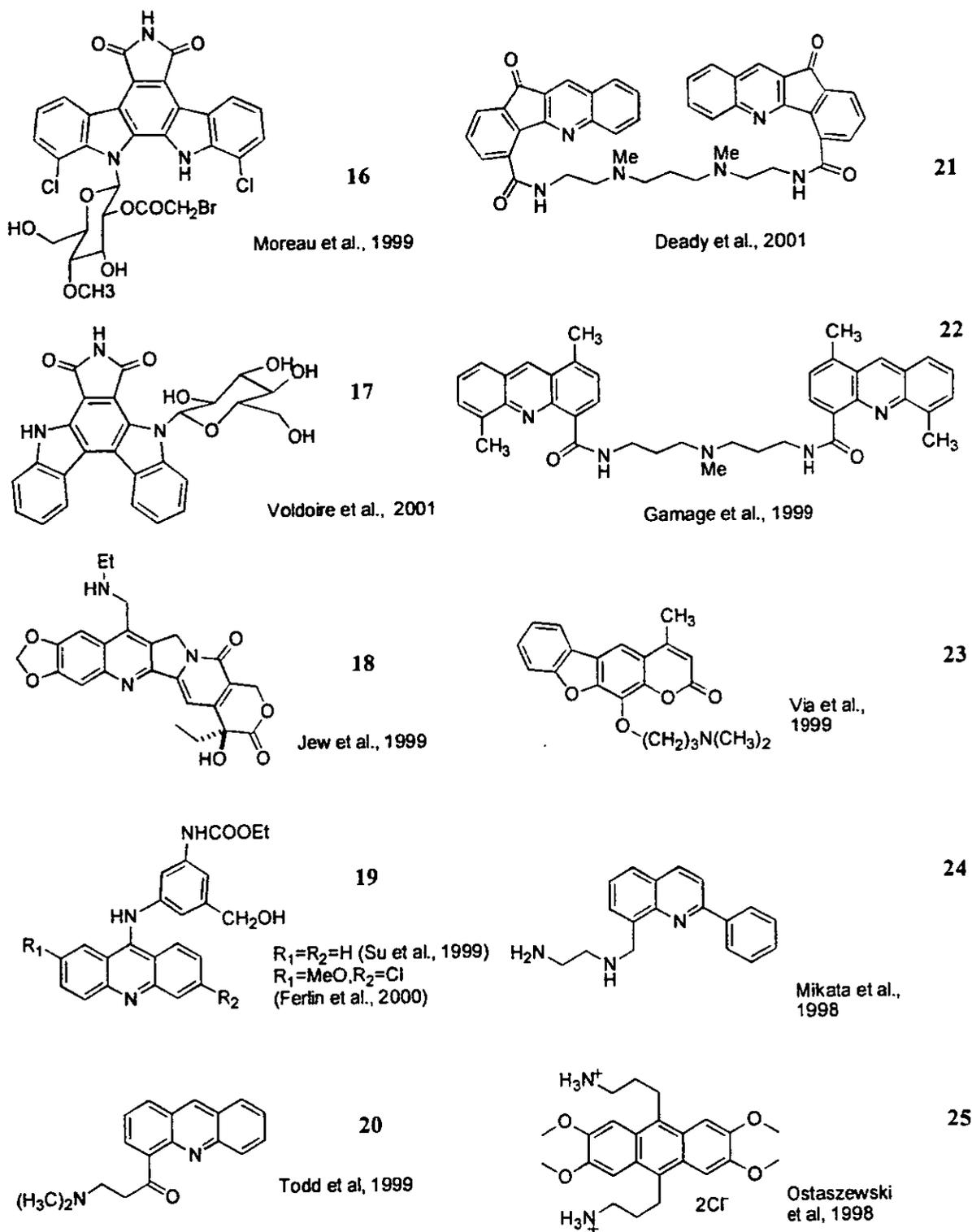
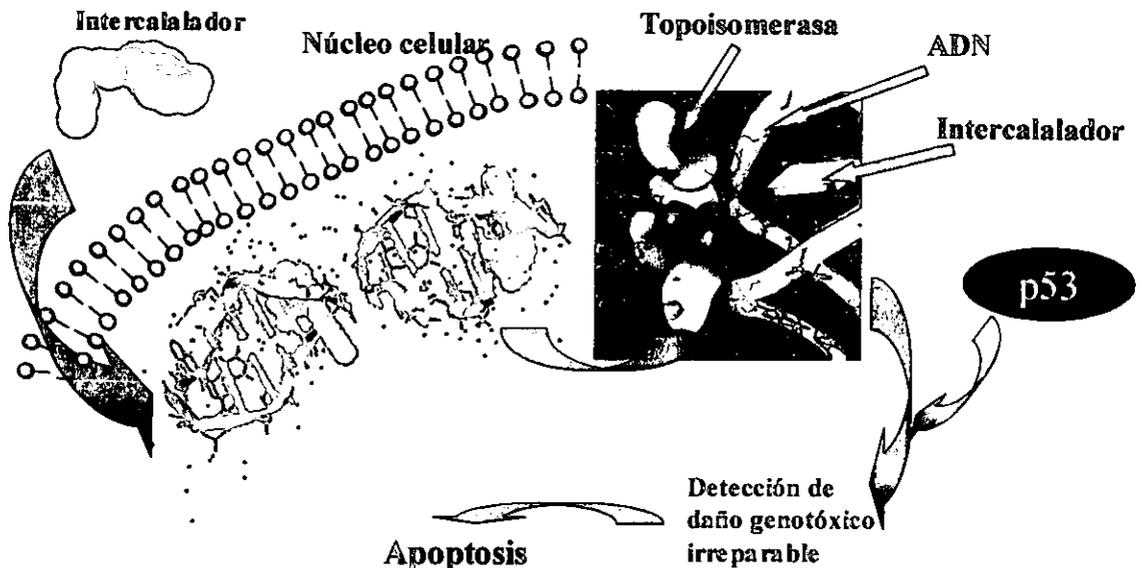


Figura 3. Ejemplos de intercaladores recientemente sintetizados con actividad citotóxica.

En vista de que el enfoque del diseño y síntesis de bis-intercaladores potenciales en esta tesis está principalmente dirigido a la actividad citotóxica, a continuación se describe brevemente, cuál es el mecanismo de citotoxicidad de estos compuestos:

El sitio de acción de este grupo de agentes es el núcleo celular, más específicamente el ADN, por lo que el fármaco debe atravesar tanto membrana celular como nuclear para entonces insertarse en el material genético. Una vez formado el complejo ADN-intercalador y si la célula se encuentra en la fase S, entra en acción la enzima Topoisomerasa I o II (Potmesil y Silver, 1990; Liu, 1990; Wang, 1996) que, mediante una reacción de adición-eliminación (Berger et al., 1996; Stewart et al., 1998), es la responsable de “sobredesenrollar” el material genético y comenzar con el proceso de replicación y transcripción (Merino et al, 1993). Entrando en acción esta enzima, se forma un complejo ternario ADN-intercalador-topoisomerasa de naturaleza irreversible. Este complejo, que es estabilizado por puentes de hidrógeno entre el intercalador y la enzima (Redinbo et al., 1998), es considerado por la célula como una región dañada y al no poder ser reparada entra en acción la proteína p53 (Culota, 1993) que lleva a la célula a sufrir apoptosis (Cotter et al., 1990; Stewart, 1994), este proceso se resume en la figura 4.



**Figura 4.** Mecanismo de citotoxicidad de los intercaladores del ADN.

---

# O B J E T I V O S

---

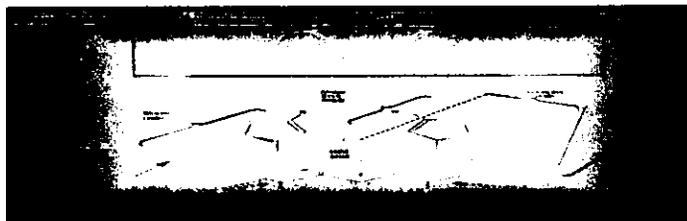
En México el cáncer ha alcanzado niveles elevados de incidencia y, al igual que en otros países, se ha convertido en un tema importante de investigación con la finalidad de encontrar una terapia adecuada. Aunque los intercaladores del ADN tienen utilidad tanto en investigación básica como en terapéutica, su aplicación más relevante es, precisamente, en esta última como agentes anticancerígenos. En nuestro grupo de trabajo, desde hace algunos años, se ha desarrollado una línea de investigación relacionada con la búsqueda de compuestos con actividad citotóxica, dentro de los cuales se encuentran los bis-intercaladores del ADN. Como continuación de esta línea, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1. Diseño de bis-intercaladores del ADN potenciales, con características estructurales de los mismos, tomando como base el núcleo pirrolo[2,3-*e*]indol.
2. Síntesis del homodímero, resultante del objetivo anterior, que se considere el mejor candidato como agente citotóxico potencial.
3. Evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* del homodímero resultante, en líneas celulares tumorales.

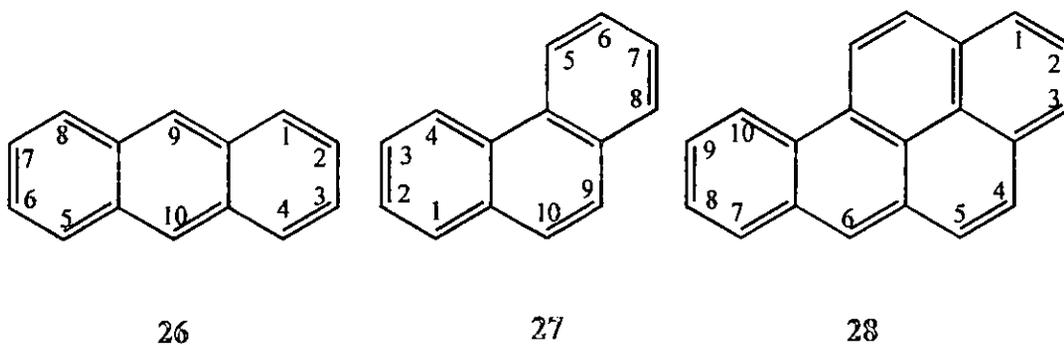
---

# D I S E Ñ O

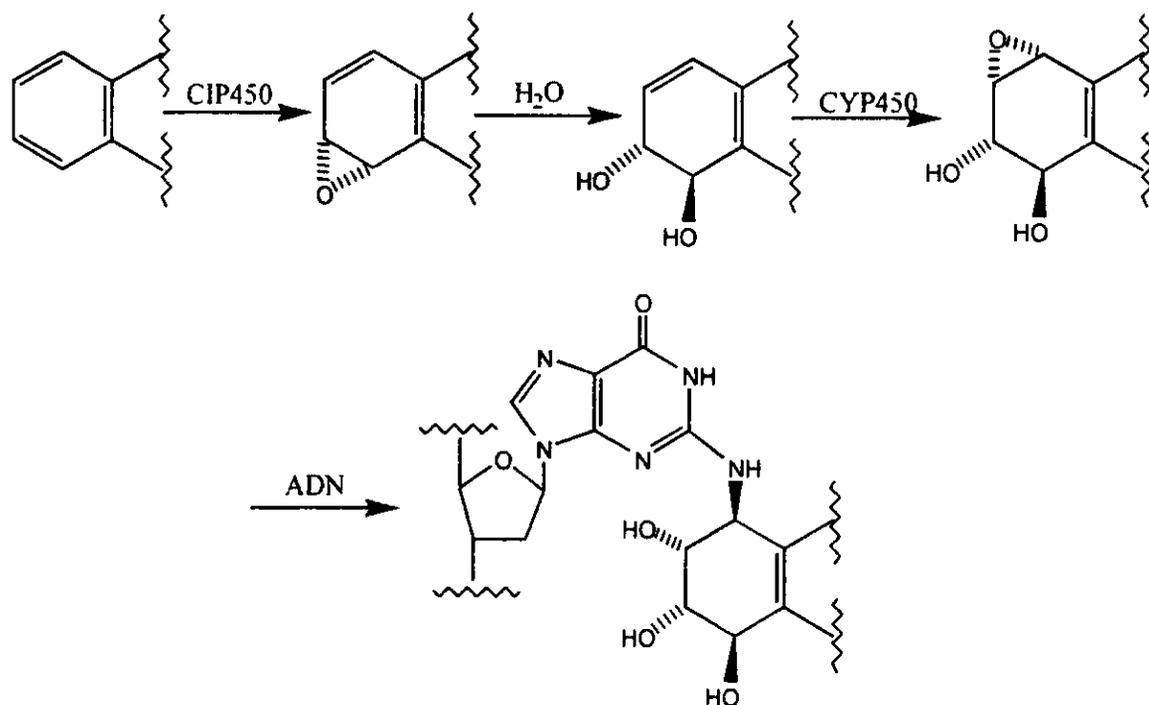
---



Como se mencionó en los antecedentes de esta tesis, los intercaladores del ADN tienen como características estructurales comunes la planaridad, un área de superficie de la porción intercaladora equivalente a tres o cuatro anillos y polaridad relativamente baja. Los intercaladores más simples, que desde el punto de vista estructural se pueden considerar, son los hidrocarburos policíclicos aromáticos. Ejemplos de estos compuestos, y que se ha demostrado que se intercalan, son el antraceno **26**, el fenantreno **27** y el benzo[a]pireno **28** (Bair et al., 1991).



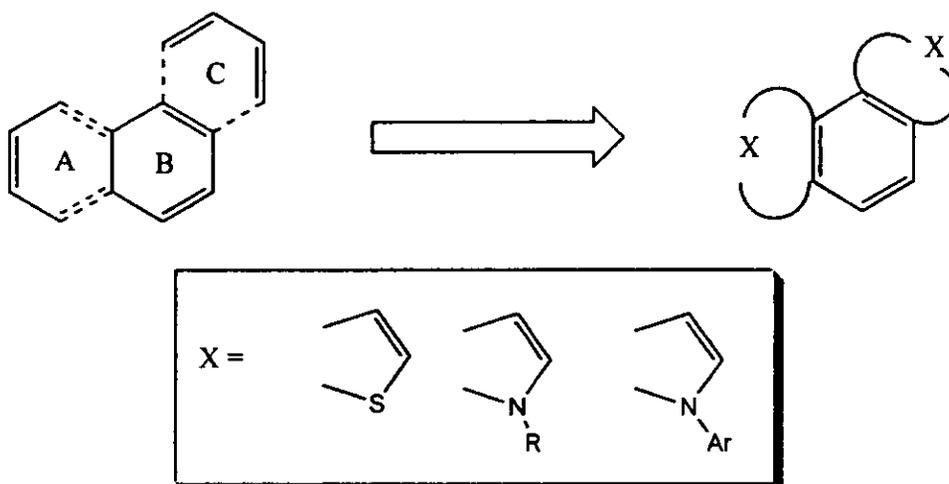
Algunos de estos hidrocarburos, como el benzo[a]pireno **28**, son altamente tóxicos debido a una reacción de epoxidación llevada a cabo por el citocromo P450 (Ortiz, 1986), seguida por una reacción con el ADN como se muestra en el Esquema 1 (Jeffrey, 1976; Koreeda, 1976), provocando con ello daños irreversibles en el material genético tales como mutaciones que generan tumores.



**ESQUEMA 1.** Mecanismo de acción molecular de los hidrocarburos policíclicos aromáticos cancerígenos.

Considerando lo anterior, resulta evidente que para diseñar nuevos intercaladores se debe tomar en cuenta esta transformación metabólica con la finalidad de evitar mutagenicidad. Puesto que el diseño de ligandos pretende obtener compuestos activos con baja toxicidad y alta especificidad, se consideró interesante explorar una sustitución bioisostérica de los anillos A y C del fenantreno, que fue tomada como núcleo base para el diseño en virtud de que es un intercalador angular que presenta baja actividad cancerígena con respecto a otros hidrocarburos análogos como **28** (Blackburn y Kellard, 1986)

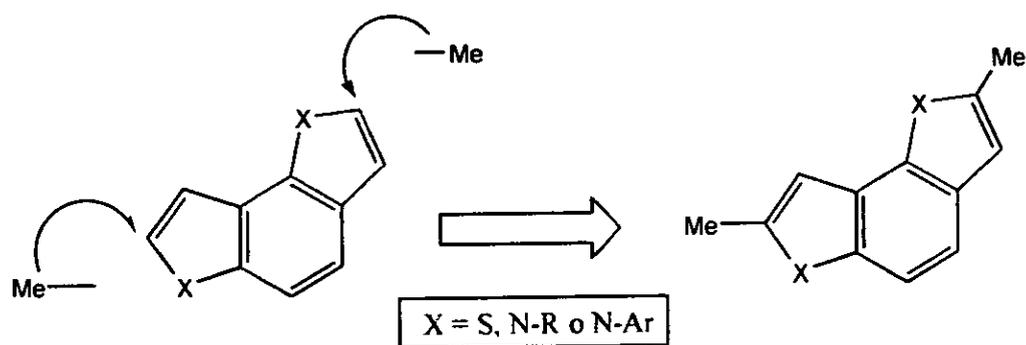
Así, el cambio de anillo podría ser por tiofeno, furano o pirrol (Wilson and Gisvold's, 1998) (ver esquema 2). De estos tres se descartó el furano ya que es el menos aromático, factor importante para un buen intercalador.



**ESQUEMA 2.** Sustitución bioisostérica de los anillos A y C del fenantreno.

Hasta el momento el resultado es un pirroloindol angular. Cabe mencionar que la mayoría de los intercaladores descritos son lineales y que aunque hay, hasta nuestro conocimiento, un caso de pirroloindol referido como intercalador, éste no es pirrolo[2,3-*e*]indol sino pirrolo[3,2-*f*]indol (Chunchatprasert y Shannon, 1996).

Otro factor importante en el diseño que debe tenerse presente, es el incrementar la afinidad del ligando por el blanco, con la finalidad de disminuir efectos secundarios y colaterales cuando el compuesto tiene interés farmacológico. Así, se sabe que la presencia de grupos ligeramente electrodonadores en la porción intercaladora incrementa la interacción de éste con el ADN (Gupta y Ali, 1984; Qian et al., 1996). Es por esta razón que consideramos incluir grupos metilo que además no son demasiado voluminosos, factor importante pues se ha demostrado, mediante estudios de QSAR en acridinas, que un incremento en el volumen de los sustituyentes en la región intercaladora está relacionado con la pérdida de actividad citotóxica (Spicer et al., 1997). Estos metilos son preferentemente ubicados en los extremos de la molécula, como se muestra en el esquema 3, para evitar al máximo interacciones repulsivas con los pares de bases en el complejo intercalador-ADN.



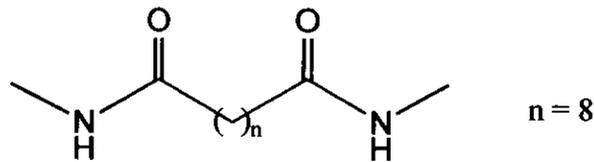
ESQUEMA 3. Incorporación de metilos en el esqueleto base.

Una vez diseñada la porción monointercaladora, el siguiente paso es seleccionar la cadena puente que unirá a las dos estructuras monoméricas para dar lugar al bis-intercalador.

Cabe mencionar que la participación de la cadena puente no es exclusivamente una unión entre ambos monómeros disminuyendo la entropía del complejo ADN-Intercalador, ya que, si cuenta con las características necesarias, adicionalmente incrementa la afinidad del dímero por el ADN debido a un reconocimiento molecular adicional entre la cadena mencionada y el ácido nucleico.

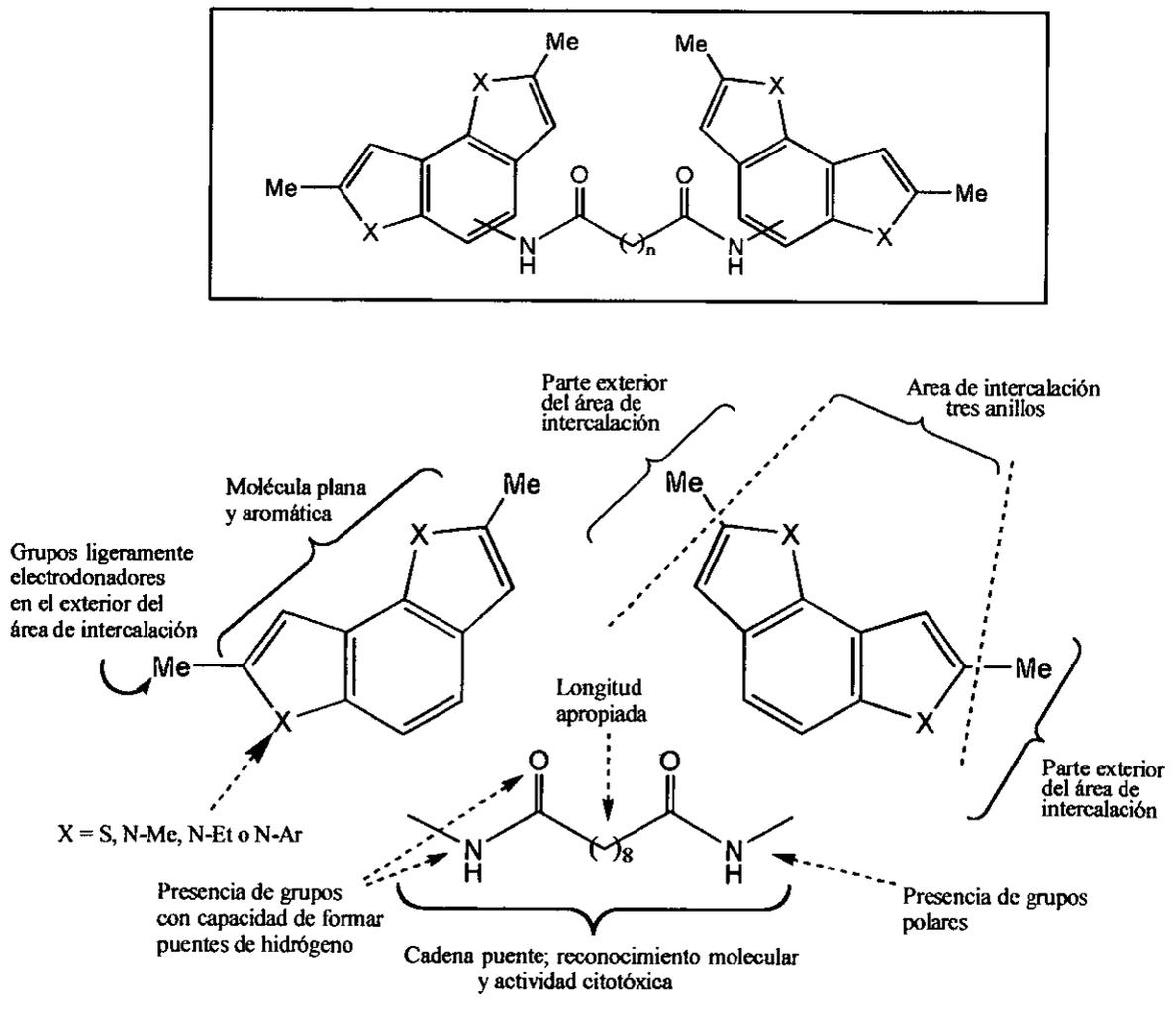
Si consideramos de manera aislada esta cadena puente, es evidente que corresponde al grupo de los ligantes de surco (groove binders en inglés) del ADN, es decir moléculas que se unen al surco ya sea mayor o menor sin formar enlaces de tipo covalente. Una de las características de este tipo de compuestos es la presencia de grupos polares con los cuales llevan a cabo interacciones de tipo dipolo-dipolo con los grupos fosfato del esqueleto del ADN o bien puentes de hidrógeno con las bases. Dentro de estas funcionalidades se encuentran las amidas (Wakelin y Waring, 1974) y es por ello que decidimos incluirlas en la cadena puente.

La distancia entre las porciones monoméricas del bis-intercalador es importante, ya que no se pueden encontrar muy cercanas debido al principio de exclusión del sitio vecino, ni tampoco muy alejadas por los grados de libertad que se tendrían presentes. Como se mencionó en los antecedentes de esta tesis, este factor estará definido por la longitud de la cadena puente, por lo que se consideró la de 8 metilenos como la óptima, aunque no se descartan variaciones.



La posición en la que se unirá esta cadena a la porción intercaladora puede ser cualquiera de los anillos heterocíclicos, dado que son los que se localizan en los extremos y quedarán en el exterior del área de intercalación.

El resultado del diseño es el siguiente:



**Figura 5.** Resultado del diseño y esquematización de los componentes del homodímero resultante.

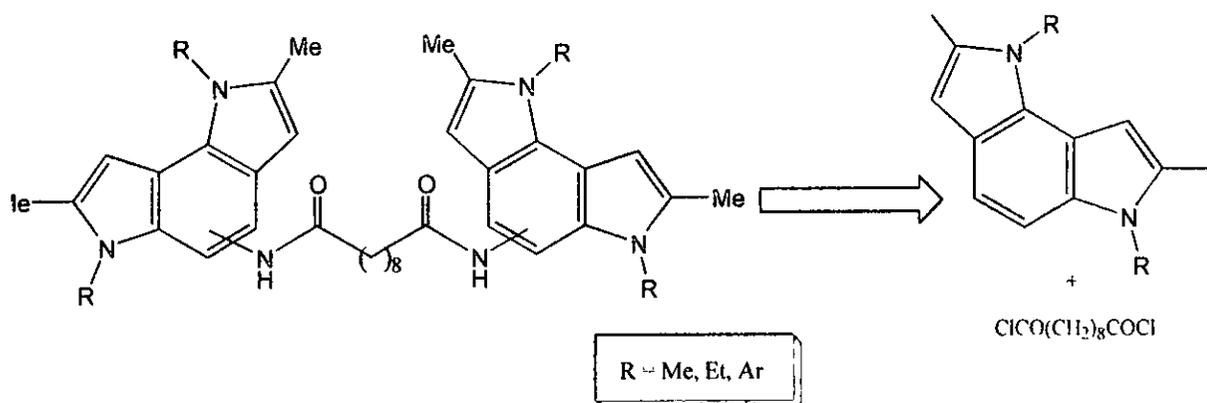
# S I N T E S I S



## ESTRATEGIA DE SINTESIS

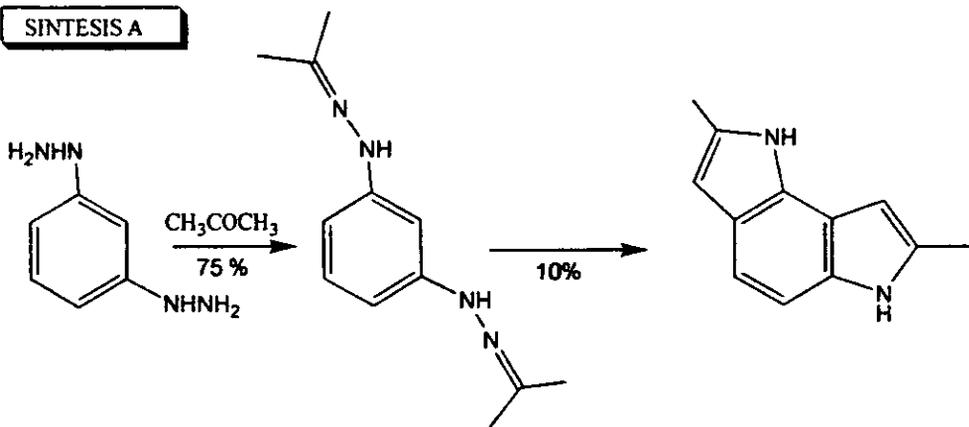
Debido a que los homodímeros diseñados no se encuentran descritos, se buscó una estrategia para sintetizarlos la cual se detalla a continuación:

En primera instancia, se consideró la obtención de la estructura dimérica a partir de la respectiva estructura monomérica mediante una nitración de esta última, seguida de la reducción del grupo nitro generado para dar lugar a la amina correspondiente y, finalmente, la condensación de dos equivalentes de ésta con el cloruro de sebacoilo.

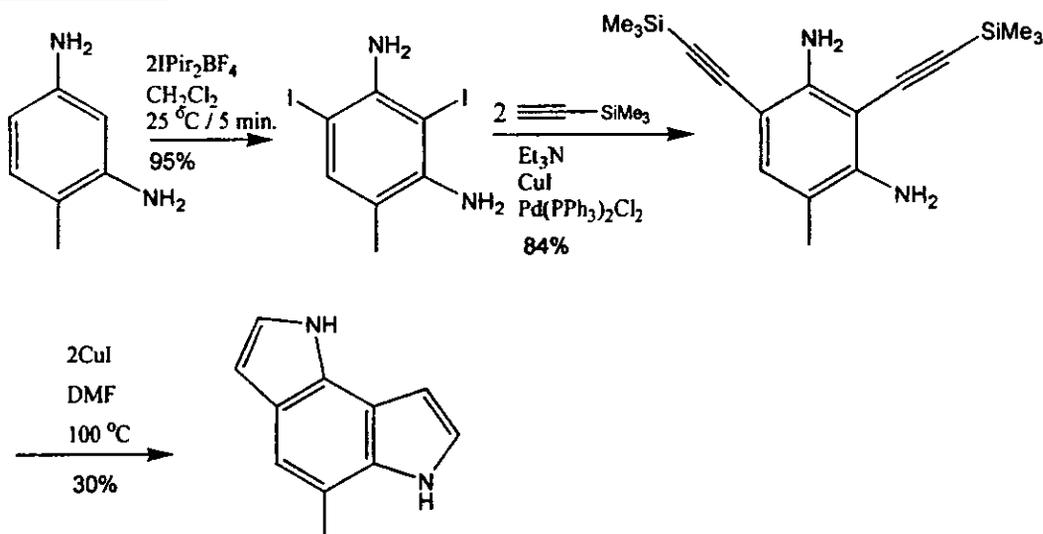


Así, el primer reto consistió en obtener la estructura monomérica, es decir el esqueleto pirrolo[2,3-*e*]indólico, para lo cual, hasta el momento, se han descrito tres diferentes rutas que se muestran en el esquema 4.

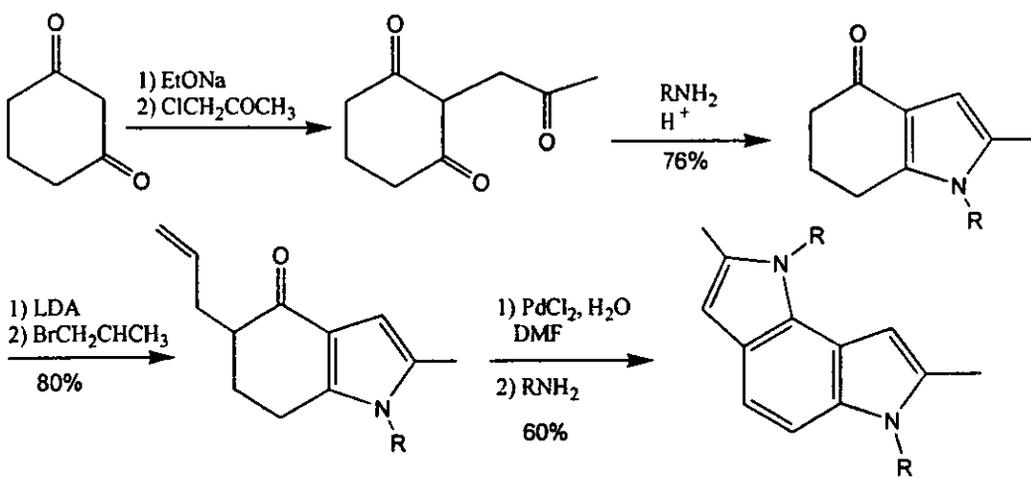
**SINTESIS A**



**SINTESIS B**



**SINTESIS C**



**ESQUEMA 4.** Rutas de síntesis descritas para la obtención de benzodipirroles

La primera de ellas (síntesis A) propone la obtención de pirroloindoles mediante la síntesis de Fisher a partir de *m*-fenilendihidrazonas de la acetona, obtenidas a su vez de la condensación de acetona con las respectivas dihidrazinas (Kadzhirshvili et al., 1990). Esta ruta sintética presenta algunas desventajas. En primer lugar los pirroloindoles resultantes se obtienen con los mismos sustituyentes en ambos nitrógenos y, en segundo término, obtener una diferente sustitución implicaría una serie de pasos adicionales que repercutirían en un bajo rendimiento que, solamente en la formación del indol, es del 10%.

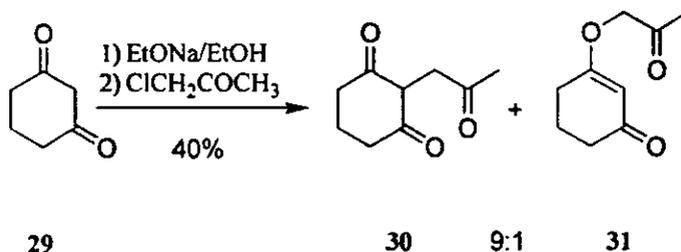
Por su parte la estrategia en la síntesis B consiste en tres reacciones selectivas: la *orto* yodación de anilinas sustituidas, el acoplamiento de aminas yodadas, catalizadas por paladio con (trimetilsilil)acetileno y el tratamiento del arilacetileno resultante con CuI, para la obtención del benzodipirrol (Ezquerro et al., 1996). Los rendimientos descritos en cada uno de estos pasos son altos a excepción del último que es moderado (30%). Por otra parte es claro que el producto resultante deberá contener un sustituyente en el anillo bencénico. Asimismo al igual que en la metodología descrita en la síntesis A, también se presenta el inconveniente de la misma sustitución en ambos nitrógenos, aunque en este caso se podría controlar si el pirroloindol se obtiene a partir de un 5-nitroindol N-protégido y 7-sustituido, lo cual implicaría también hacer la síntesis más laboriosa y no se evitaría el sustituyente bencénico si se pretende mantener los rendimientos aceptables. Asimismo, un reto adicional sería el incorporar grupos alquilo en el anillo pirrólico.

Finalmente, la estrategia presentada en la síntesis C consiste en la alquilación de la 1,3-ciclohexanodiona para dar lugar a la formación del derivado 1,4 dicarbonílico y obtener el pirrol mediante reacción de Paal-Knorr. La tetrahidroindol-4-ona obtenida es igualmente llevada al derivado 1,4 dicarbonílico y es en donde se genera el segundo anillo de pirrol, el compuesto dipirrólico obtenido aromatiza en las mismas condiciones de reacción para dar lugar finalmente al compuesto tricíclico deseado (Martínez et al., 1998).

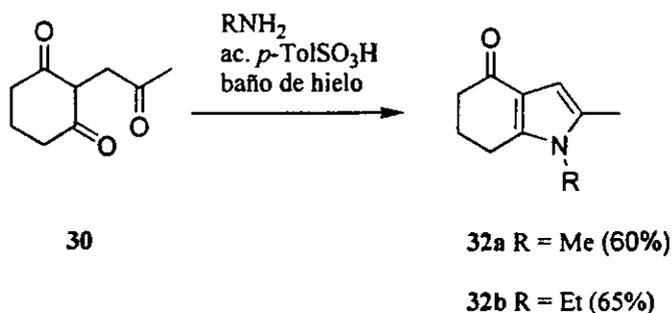
En esta síntesis los rendimientos son entre moderados y buenos y aventaja a las otras dos metodologías descritas en que se pueden obtener N-sustituyentes diferentes incorporándolos en cada uno de los respectivos pasos de formación de pirroles. Por otra parte, los compuestos 1,4 dicarbonílicos son muy útiles para obtener además otros heterociclos de cinco miembros como el tiofeno. Por estas razones es evidente la elección, en primera instancia, de esta última estrategia para la obtención de las estructuras monoméricas.

## OBTENCION DE LA PORCION MONOMÉRICA

Siguiendo la estrategia de la síntesis C del esquema 5, primero se llevó a cabo la obtención del anión de la 1,3 ciclohexanodiona, utilizando etóxido de sodio (preparado *in situ*) como base y posteriormente la alquilación del anión formado mediante la adición de cloroacetona y reflujo.



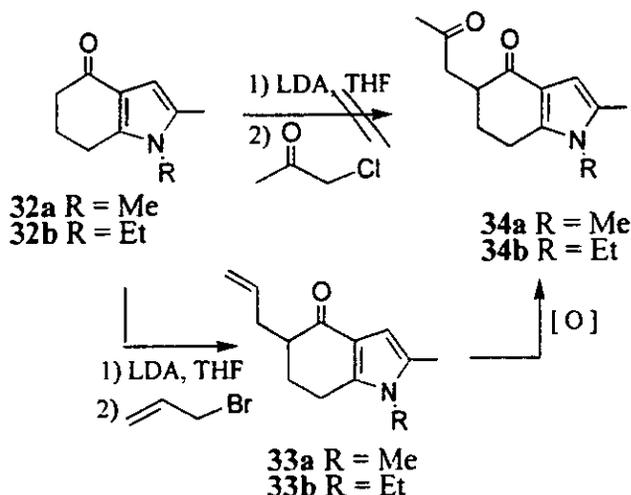
La reacción llevada a cabo bajo las condiciones descritas dio un rendimiento relativamente bajo debido en parte a que la reacción se desvió hacia la formación del éter de enol 31 producido por la alquilación en el oxígeno y no en el carbono  $\alpha$  a ambos carbonilos, por lo que se exploraron algunas variantes en el medio de la reacción, como la temperatura de adición de la cloroacetona. Las mejores condiciones consistieron en adicionar la cloroacetona al anión, lentamente, manteniendo la reacción en baño de hielo-sal y dejándola después a la misma temperatura por cinco horas. De esta forma, se disminuyó la cantidad de producto *O*-alquilado a menos del 10%. La purificación de este compuesto 30, representó un problema, ya que descomponía en gel de sílice, fue por esta razón que se decidió utilizar el crudo de la reacción para la obtención de la tetrahydroindol-4-ona.



La síntesis de pirroles de Paal-Knor consiste en una reacción entre compuestos 1,4-dicarbonílicos y aminas primarias alifáticas o aromáticas. Ya ha sido descrita la obtención de las *N*-metil y *N*-etilindolonas utilizando esta síntesis de pirroles (Stetter y Lauterbach, 1962; Remers et al., 1971). Infortunadamente, los rendimientos encontrados experimentalmente al seguir la metodología descrita para la obtención de **32a** y **32b** resultaron ser muy bajos dando como producto principal el furano. La baja reactividad es atribuible a la poca disponibilidad del par de electrones de la amina para efectuar un ataque nucleofílico sobre el carbonilo, ya que se utiliza el clorhidrato de la amina y la reacción procede preferentemente, dadas las condiciones de acidez y calor, de manera intramolecular mediante un ataque del enol hacia el carbonilo. Para solucionar este problema se decidió no utilizar el clorhidrato sino la amina libre sin olvidar que tanto la metil como la etilamina son gases y por ende la reacción no se llevaría a cabo en condiciones de reflujo, lo cual aparentemente afectaría los rendimientos de la reacción. En la práctica se utilizó metilamina en forma de gas burbujeada en el medio de la reacción y etilamina en solución 2 M en hexano, ya que eran las disponibles en ese momento. Las condiciones de reacción fueron muy suaves (tolueno, ácido *p*-toluensulfónico como catalizador, baño de hielo y agitación por tres horas) y los rendimientos bastante aceptables (65%). El agua formada por la condensación no hizo reversible la reacción, por lo que no fue necesario eliminarla del medio. Adicionalmente, se aisló y caracterizó un subproducto que resultó ser la etilamina de la 2-oxopropilciclohexanodiona, que es un intermediario de la reacción y que al someterse a reflujo fue transformado totalmente en el pirrol. Las indolonas obtenidas son estables y en su espectro de RMN  $^1\text{H}$  presentan como señal característica un cuarteto en 6.26 ppm ( $J = 0.9\text{Hz}$ ) para **32a** y 6.25 ppm ( $J = 1.4\text{Hz}$ ) para **32b** que corresponden a los protones de C3 del pirrol que se acoplan con el metilo vecino, cuyas señales aparecen en 2.21 y 2.23 ppm, respectivamente. Por su parte, los espectros de IR presentan una señal fuerte en  $1640 - 1670\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo carbonilo; al igual que el resto de los compuestos sintetizados, la estructura se corroboró por espectrometría de masas. Adicionalmente el punto de fusión correspondió al reportado ( $85-87\text{ }^\circ\text{C}$ )

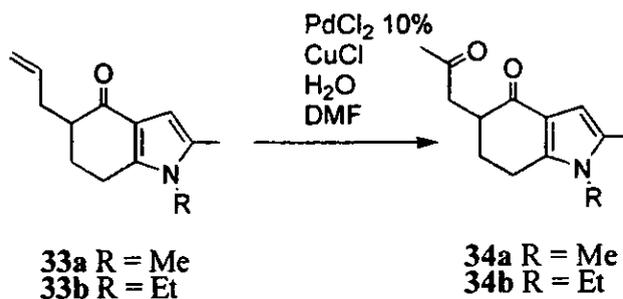
Una vez obtenido y caracterizado el primer intermediario, se procedió a la introducción del segundo grupo 2-oxopropilo. *A priori*, la forma de introducirlo sería la misma que en el primer paso de la síntesis, es decir mediante la reacción del material de partida con una base para generar el nucleófilo y posteriormente la adición de cloroacetona. Sin embargo, aunque se probaron diferentes bases (EtONa, LDA), la reacción no procedió, debido, probablemente, a la

baja nucleofilia del anión formado frente a la cloroacetona misma que se comporta como base más que como electrófilo. Es por ello que la introducción del grupo 2-oxopropilo se llevó a cabo en dos pasos: Primero, la alilación con bromuro de alilo en el carbono  $\alpha$  al grupo carbonilo, en donde el alilo es más susceptible a reaccionar electrofílicamente ya que el bromo es mejor grupo saliente que el cloro. Finalmente la oxidación del alqueno para dar lugar a la cetona.



La primera de estas reacciones procedió con rendimientos moderados (60%), pero con recuperación de materia prima. Se hicieron varios intentos para incrementar la cantidad de producto deseado, entre los cuales se adicionó un exceso de base, pensando en la reversibilidad de la reacción, encontrándose que efectivamente se incrementaba el rendimiento de 33a (70%); sin embargo adicionalmente se encontró el producto doblemente alquilado. Tanto 33a como 33b presentaron en el espectro de RMN<sup>1</sup>H, las señales correspondientes a los hidrógenos vinílicos entre 5 y 6 ppm que integran para tres protones, además del resto de las señales esperadas, y en el espectro de IR la banda del carbonilo en 1650 cm<sup>-1</sup>.

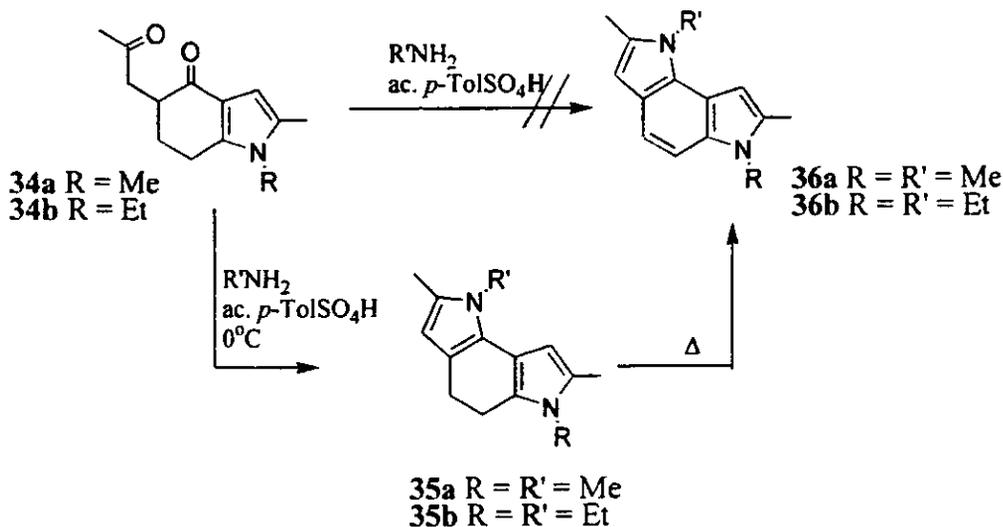
La siguiente reacción fue la oxidación del grupo alilo con PdCl<sub>2</sub> para dar lugar al compuesto 1,4 dicarbonílico que es el precursor del segundo anillo de pirrol.



La reacción de oxidación de dobles enlaces utilizando  $\text{PdCl}_2$  es un método muy práctico para obtener cetonas a partir de alquenos y el mecanismo de reacción involucra un complejo  $\pi$  del paladio y migración de un hidrógeno de la olefina (Zaw, 1990). Por su parte, el cloruro cuproso y el oxígeno tienen solamente la finalidad de volver a oxidar el paladio que se reduce durante la reacción pues éste es relativamente costoso. Cuando existe la posibilidad de obtener la cetona y el aldehído, el producto principal es el primero, es decir el producto deseado en esta síntesis.

Experimentalmente, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, en agitación y atmósfera de oxígeno hasta desaparición de la materia prima. Los rendimientos fueron alrededor del 70%, después de eliminar el paladio y las sales de cobre por percolación en una columna empacada con algodón. Cabe señalar que dicha precolación con celita o sílice no procedió de manera adecuada. La metilcetona en **34a** se evidenció por la aparición de su respectiva señal en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  en 2.2 ppm y en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  en 208 ppm así como por la presencia de una banda fuerte en el espectro de IR en  $1717\text{ cm}^{-1}$ . La espectroscopia de **34b** fue muy similar.

Ya contando con el nuevo derivado dicarbonílico 1,4, el último paso para la obtención de la estructura monomérica consistió en la formación del segundo anillo de pirrol y la aromatización del ciclo de seis miembros para dar lugar al derivado bencénico. Cabe recordar que estas dos reacciones han sido descritas en el mismo paso, pero bajo las condiciones de ácido acético como disolvente y temperatura de reflujo. Sin embargo, en este caso el estado de los reactantes no permite tales condiciones de calor por lo que se supuso de antemano que primero se formaría el derivado dipirrólico y posteriormente, como un segundo paso, se tendría que llevar a cabo la aromatización completa.



En lo que respecta al derivado *N*-metilado **34a**, éste reaccionó rápidamente, casi en su totalidad, con metilamina en forma de gas burbujeada sobre el medio de la reacción, manteniéndola en baño de hielo, para dar un producto muy poco polar e inestable en sílica gel que fue caracterizado como el 4,5-dihidropirroló[2,3-*e*]indol **35a**. En el espectro de RMN <sup>1</sup>H se encuentran los dos metilos así como los protones pirrólicos, pero no aparecen los bencénicos y en su lugar se encuentran dos metilenos como un singulete ancho en 2.72 ppm que integra para cuatro hidrógenos. La estructura fue confirmada por espectrometría de masas, en donde se encontró una masa molecular de *m/z* 214. Este compuesto al ser sometido a reflujo en tolueno dio lugar a un producto que aunque resultó inestable tanto térmicamente como al aire fue posible caracterizarlo como el *N,N*-dimetilpirroló[2,3-*e*]indol (**36a**), en el que, ahora sí, aparecen las señales del benceno en RMN <sup>1</sup>H como dos dobletes en 6.99 y 7.28 ppm, así como los dos *N*-metilos en 3.93 y 3.7 ppm, los hidrógenos pirrólicos como dos cuartetos en 6.26 y 6.54 ppm y los dos metilos como dobletes en 2.42 y 2.46 ppm. Asimismo, la masa molecular correspondió a la esperada (*m/z* 212).

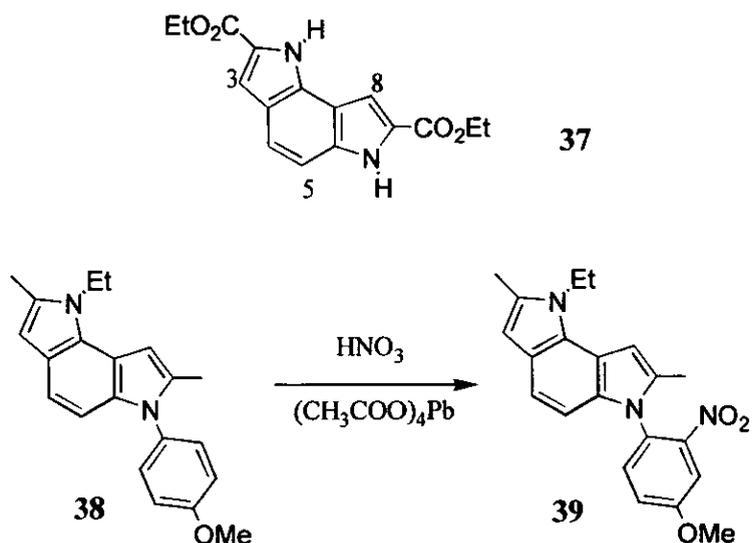
Por su parte, la reacción del derivado *N*-etilado **34b** tuvo un comportamiento similar que **34a**, frente a la etilamina en solución, pero en esta ocasión, el segundo paso, es decir la aromatización, se llevó a cabo inmediatamente después de concluir la condensación y no se intentó aislar el intermediario no aromatizado aunque sí se pudo observar su formación por cromatografía en placa. El espectro de RMN <sup>1</sup>H del producto obtenido mostró dos señales dobles en 7.27 y 7.02 ppm correspondientes a los protones del anillo bencénico, dos señales simples en 6.44 y 6.25 ppm de los protones pirrólicos, dos señales cuádruples en 4.34 y 4.17

ppm atribuidas a los protones de los metilenos base de nitrógeno, dos señales simples en 2.47 y 2.44 ppm que corresponden a los metilos pirrólicos y dos tripletes de los metilos de los respectivos etilos en 1.35 y 1.44 ppm; la espectrometría de masas dio como resultado un ion molecular de  $m/z$  240 lo que confirmó que el compuesto formado era **36b**.

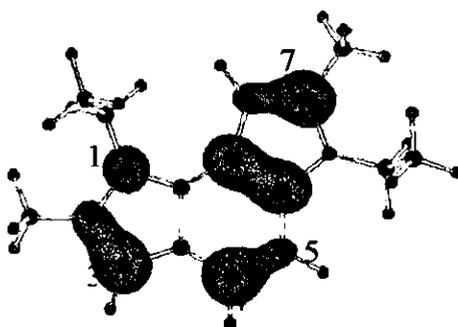
## **FUNCIONALIZACION DE LA PORCION MONOMERICA**

La síntesis de la estructura monomérica fue la primera parte de la síntesis total propuesta para la obtención del dímero. Aun hacia falta la funcionalización de esta porción que permitiera unir dos estructuras a la cadena puente. Entonces el siguiente paso fue la nitración del pirroloindol.

La obtención del núcleo pirrolo[2,3-*e*]indol, como se mencionó al principio de esta sección, ya ha sido descrita, pero no ocurre lo mismo con los compuestos aquí obtenidos que, aunque son sus análogos estructurales, la metodología ha tenido que ser adecuada a las circunstancias requeridas. Este aspecto es necesario señalarlo pues la reactividad de estos sistemas ha sido muy poco explorada y cuando se ha hecho ha sido con sustituyentes diferentes tanto en el nitrógeno como en el anillo del pirrol con respecto al sistema aquí obtenido. Por ejemplo, han sido reportadas algunas reacciones de sustitución electrofílica aromática, entre ellas la nitración en el 2,7-bis(etoxicarbonil)-1*H*,6*H*-pirrolo[2,3-*e*]indol (**37**) y éstas proceden en las posiciones 3, 5 y 8 (Lomadze et al., 1994). Estos resultados son similares a los que se han predicho mediante cálculos teóricos para sistemas similares como el pirroloindol **38**, en el que un cambio de sustituyente en el fenilo, por ejemplo H por OMe, indica que la sustitución nucleofílica aromática sería en la misma posición que en el caso de **37**, mientras que para **38** la sustitución sería en el anillo fenílico unido a N6 (Ramírez-Galicia et al., 2000). Experimentalmente, la nitración de **38** efectivamente ocurrió en la posición 2' del fenilo cuando las condiciones de nitración fueron HNO<sub>3</sub> y (CH<sub>3</sub>COO)<sub>4</sub>Pb (Ramírez, 2000).



Para los fines que perseguimos, es conveniente que esta reacción se lleve a cabo en los anillos pirrólicos ya que, como se ha venido mencionando, estas posiciones se encuentran en el exterior de lo que se espera que sea el área de intercalación. Con la finalidad de predecir en que posición de la molécula se llevaría a cabo la nitración, fue necesario realizar cálculos teóricos empleando métodos semiempíricos (AM1) y se pudo observar que las posiciones más susceptibles a ataques electrofílicos eran la 3 y la 4, ya que son aquellas donde se observa una mayor contribución en el HOMO. (Figura 6)

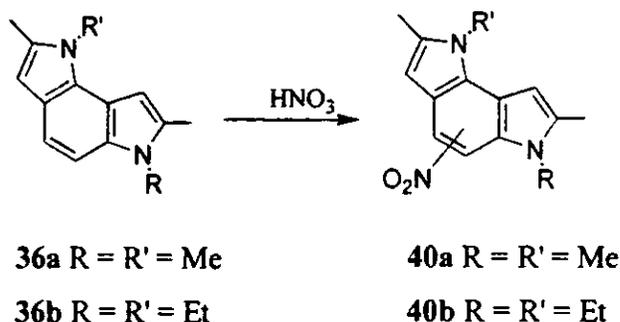


**Figura 6.** Representación gráfica de la contribución del HOMO en 36b.

Infortunadamente, en la práctica, todos los intentos por llevar a cabo la obtención del producto nitrado fallaron y, en el mejor de los casos, se obtuvieron trazas que fueron caracterizadas por

espectrometría de masas como el producto de mononitración. ( $m/z$  285, cuando  $R=R'=Et$ ) En todos los ensayos se consumió la materia prima y se pudo apreciar por cromatografía en placa fina una serie de productos de descomposición, lo que indicaba que el material de partida era inestable ante las condiciones de reacción que se emplearon, a pesar de que una de ellas (ver condiciones 4, tabla I) es considerada como “suave”.

**Tabla I.** Condiciones de los intentos de nitración de 36a y 36b.



Condiciones	HNO <sub>3</sub> /	Observaciones
1	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	descomposición
2	CH <sub>3</sub> COOH	descomposición
3	CF <sub>3</sub> COOH (Kowalczyk, 1997)	descomposición
4	(CH <sub>3</sub> COO) <sub>4</sub> Pb	descomposición y trazas de producto

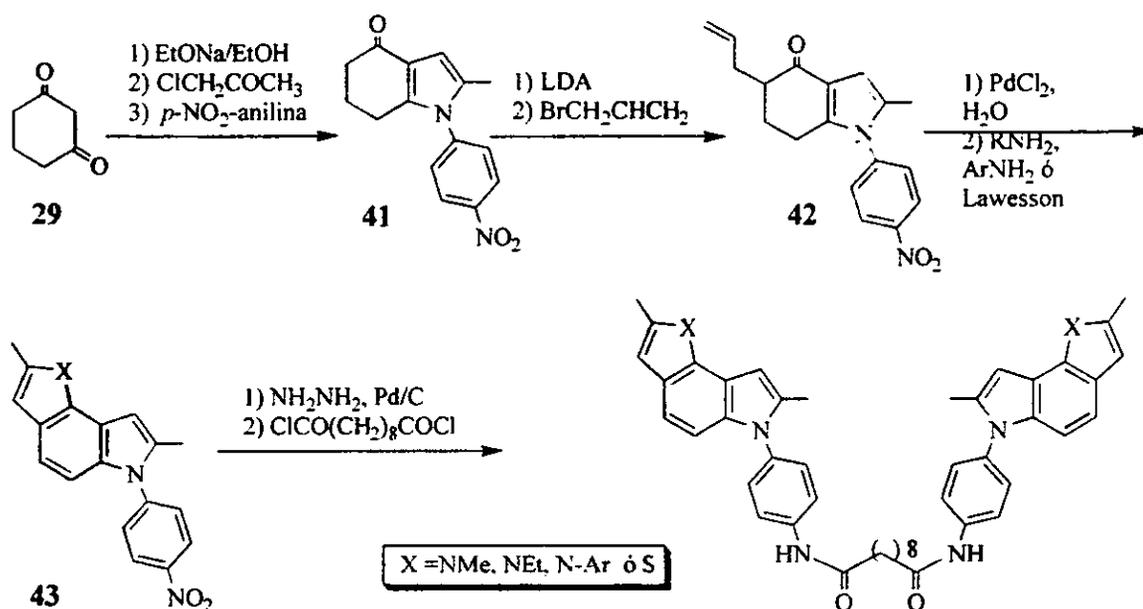
La descomposición se debió más a la inestabilidad de los sistemas que a la reactividad de los productos nitrados, ya que, como se mencionó anteriormente, los pirroloindoles resultaron ser sorprendentemente muy inestables.

Ante la incapacidad de nitrar el sistema tricíclico, se decidió cambiar la estrategia por otra en la que bien se podría nitrar un fenilo incorporado en uno de los anillos de pirrol, que sería un compuesto más estable, o bien incorporarlo ya sustituido en una anilina, previamente nitrada, y llevar a cabo la reacción de Paal-Knor con la misma para obtener directamente el derivado nitrado conjuntamente con la formación del heterociclo. Así, se consideró que la alternativa más lógica era la segunda, ya que se incorporaría el grupo nitro en una posición deseada y se evitarían problemas de bajos rendimientos en el paso de la nitración.

Este cambio estructural, es decir cambio de fenilo por metilo o etilo, no afectaría demasiado la intercalación del compuesto en el ADN, ya que se encuentra en la parte exterior del área de

intercalación. Se han descrito intercaladores del ADN que tienen en su estructura grupos fenilo, tales como el etidio y el m-AMSA por mencionar algunos; adicionalmente se ha demostrado la eficacia de un grupo de intercaladores que implican sistemas tricíclicos no fusionados 2+1 (Denny et al., 1990).

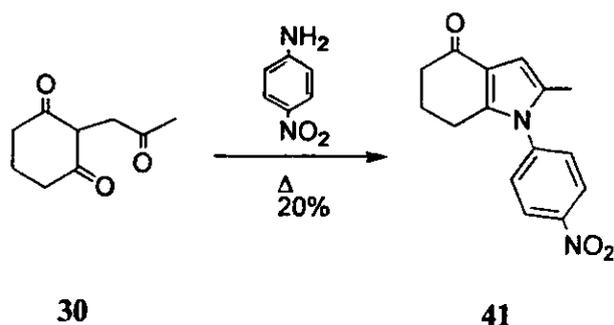
La síntesis del dímero se llevaría a cabo como se muestra en el esquema 5.



**ESQUEMA 5.** Ruta propuesta para la obtención del dímero mediante la incorporación de *p*-nitroanilina

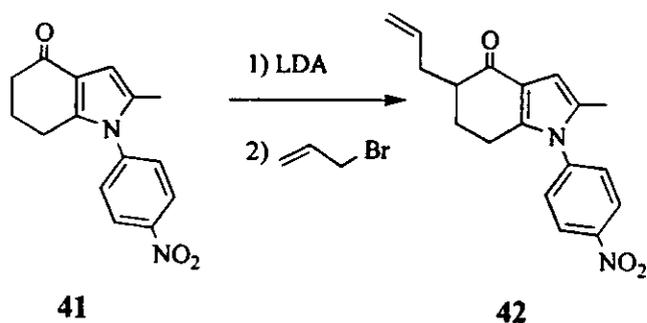
Como puede apreciarse, el esquema de síntesis presenta las siguientes variantes: 1) Se introduce *para*-nitroanilina en lugar de metil- y etilamina en la obtención del primer anillo pirrólico; 2) Se contempla la posibilidad de cambiar el sustituyente en el segundo anillo de pirrol o incluso el pirrol mismo por tiofeno, ya que los derivados *N*-metilados y *N*-etilados resultaron ser inestables en sílica gel y al paso del tiempo. (lo primero dificulta su purificación y lo segundo no garantiza un resultado confiable en pruebas de actividad biológica); y 3) se excluye la nitración.

Así, el primer paso en la síntesis consistió en la obtención de la *N*-(*p*-nitrofenil)-tetrahidroindol-4-ona mediante la reacción del compuesto tricarbónico 30 con *p*-NO<sub>2</sub>-anilina en reflujo.



Los rendimientos fueron bajos (20%) y por esa razón la técnica fue modificada por otra metodología para la obtención de pirroles en donde se emplea radiación infrarroja y bentonita como catalizador. Con esta modificación, los rendimientos ascendieron al 55%. El producto obtenido presentó en RMN  $^1\text{H}$  un sistema AA' BB' en 8.41 y 7.45 ppm, correspondiente a los protones del fenilo *para*-sustituido, una señal simple en 6.44 ppm correspondiente al protón pirrólico y el resto de las señales características del núcleo. Por otra parte, en el espectro de IR se pudo apreciar una banda fuerte en  $1668\text{ cm}^{-1}$ , característica de cetona conjugada.

Una vez obtenido el derivado nitrado **41**, el siguiente paso sería la formación del anión de la indolona y reacción de éste con bromuro de alilo.

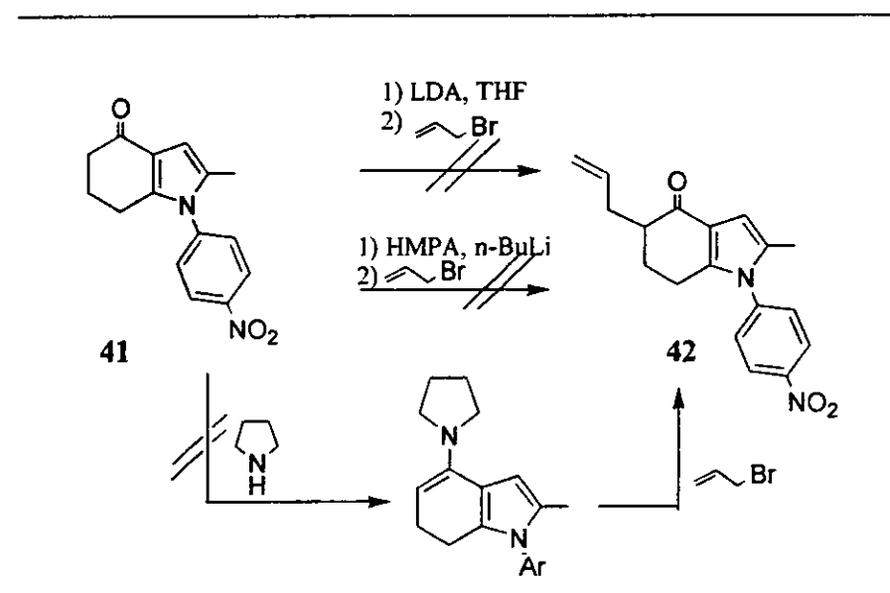


Uno de los problemas predecibles que se tuvieron en esta reacción fue el relacionado con la solubilidad del compuesto, ya que resultó ser muy baja en THF, percance que en principio fue superado al manejar soluciones diluidas. Por su parte, al llevar a cabo la reacción de alilación no se observó conversión de materia prima, la cual se recuperó casi en su totalidad. Debido a que las reacciones con LDA son muy susceptibles a la humedad y que además éste fue preparado *in situ*, se tuvieron precauciones extremas manejando las condiciones totalmente anhidras, así como titulando el *n*-butilitio para verificar su concentración. La reacción

definitivamente no se llevó a cabo, por lo que se consideró que el factor de solubilidad sería el problema principal por lo que se cambió la metodología de alilación por otro, utilizando hexametil fosforamida y *n*-butilitio. Así se tendría un disolvente más polar y una base más fuerte que el LDA. La reacción tampoco procedió. Cuando se adicionó D<sub>2</sub>O se obtuvo la materia prima protonada y no la deuterada por lo que quedaba claro que el anión no se formaba.

Es interesante resaltar que esta reacción de alilación, de acuerdo a la experiencia de nuestro grupo de trabajo, es exitosa cuando el *N*-sustituyente es Me, Et (como se ha presentado en esta tesis), *p*-OCH<sub>3</sub>-fenilo, *p*-CH<sub>3</sub>-fenilo, *p*-Br-fenilo, *p*-Cl-fenilo, y fenilo (Martínez et al., 1998), así que el derivado nitrado es la excepción.

Descartando la posibilidad de formar el anión en esta indolona, consideramos la posibilidad de alquilarla mediante la formación de la enamina de la pirrolidina correspondiente, formada con pirrolidina y benceno como disolvente. Nuevamente el problema de solubilidad se hizo presente. Además se probó utilizar la pirrolidina misma como disolvente. En ningún caso la reacción siguió el curso deseado y siempre se recuperó materia prima. Los intentos por obtener 42 se resumen en el esquema 6.



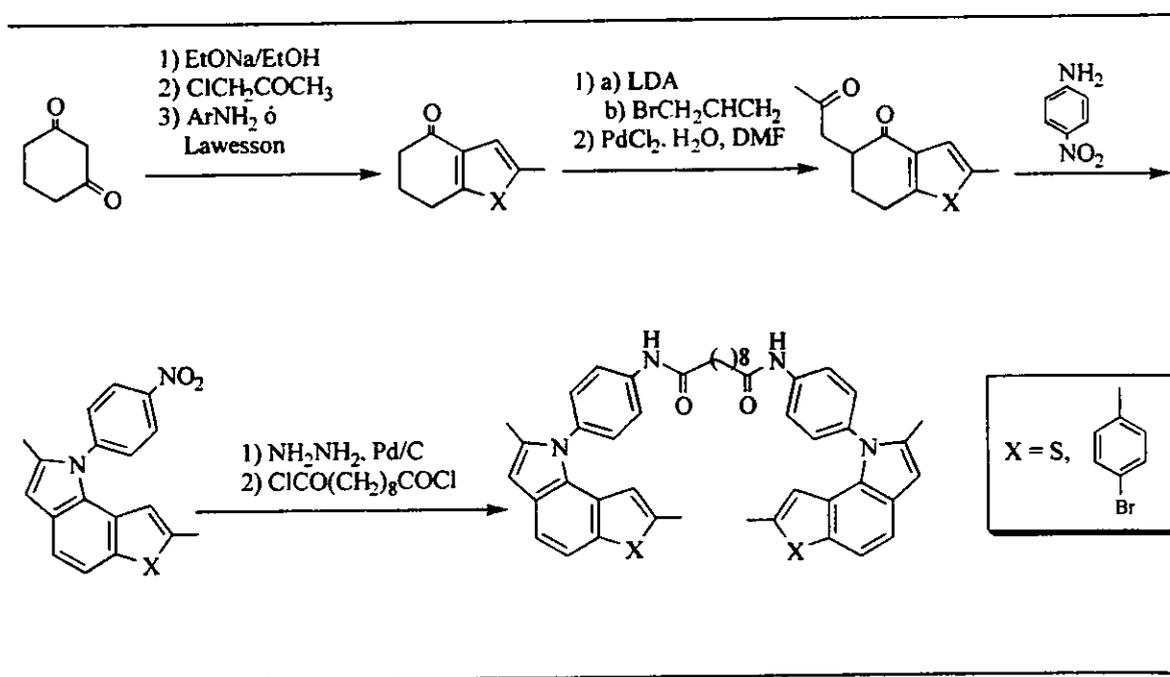
ESQUEMA 6. Intentos de alquilación de 41.

El hecho de no poder alquilar el derivado nitrado no llevó a renunciar a la estrategia de síntesis, pero sí obligó a modificarla, de tal manera que en lugar de introducir el *p*-nitrofenilo

en la formación del primer pirrol, se examinó la alternativa de introducirlo al final; es decir, en la formación del segundo anillo de pirrol, como se muestra en el esquema 7.

Dado que los derivados *N*-metil y *N*-etil resultaron ser muy inestables se descartaron para las síntesis posteriores, de tal suerte que en adelante se describirán los intentos por obtener los dímeros con *N*-fenil sustituyentes y tiofeno. En lo que respecta a los *N*-fenil derivados, cabe señalar que en nuestro grupo de trabajo se han obtenido algunos análogos en los que los sustituyentes son *p*-bromofenil y *p*-iodofenil, los cuales han presentado actividad citotóxica interesante (datos no publicados hasta la fecha). Es por esta última razón que decidimos incluirlos como sustituyentes en los pirroloindoles a sintetizar.

Primeramente se describirá la síntesis de los derivados del tiofeno y posteriormente los del pirrol.



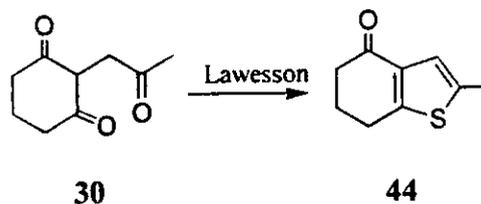
**ESQUEMA 7.** Segunda ruta alterna propuesta para la obtención del homodímero mediante la incorporación de *p*-nitroanilina.

La primera reacción de esta ruta sintética fue la obtención de la tetrahidrobenzotiofenona **44** a partir del intermediario tricarbónico **30**. En la literatura se pueden encontrar diferentes formas para obtener tiofenos a partir de compuestos 1,4 dicarbónicos, entre las que destacan

el uso de azufre, ácido sulfhídrico (Gronowitz, 1986) y mediante el uso del reactivo de Lawesson (Nishio et al., 1988). El empleo de azufre y ácido sulfhídrico tiene como desventaja la obtención de rendimientos bajos. Por su parte el reactivo de Lawesson, (2,4-bis(4-metoxifenil)1,3-ditio-2,4-difosfetano-2,4-disulfuro) aunque costoso, comparado con los otros reactivos utilizados para este fin, representa un reactivo muy útil para obtener este tipo de compuestos con rendimientos que van de moderados a muy buenos. El mecanismo de la reacción implica primeramente la formación de la tiocetona y posteriormente la ciclización intramolecular de la misma para dar lugar al tiofeno.

Así, la reacción se llevó a cabo como ha sido descrito en la literatura, esto es usando una mezcla de benceno y dimetoxietano en proporción 5:1 y reflujo por dos horas. El rendimiento fue del 20 %, el cual se consideró muy bajo, y por consiguiente se decidió hacer algunas variaciones en las condiciones de la reacción (proporción de benceno/dimetoxietano, temperatura de reacción y tiempo de reacción), como se muestran en la tabla II:

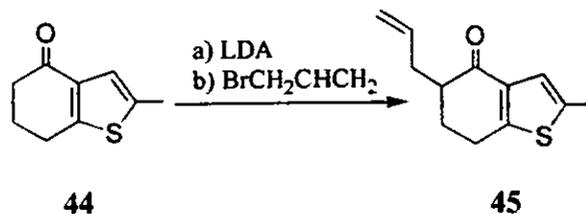
**Tabla II.** Condiciones de reacción para la obtención de 44.



Benceno / DME	Temperatura de reacción	Tiempo de reacción	Rendimiento (%)
5 / 1	reflujo	2 h	20
3 / 1	reflujo	2 h	20
5 / 1	reflujo	1 h	30
5 / 1	45 °C	3 h	60

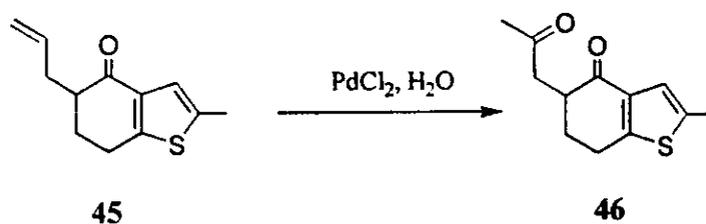
En el espectro de RMN <sup>1</sup>H se puede apreciar una señal aparentemente simple pero, vista expandida, compleja, en 7.07 ppm que integra para un hidrógeno y que corresponde al protón del tiofeno. Esta señal se encuentra desplazada a campo más bajo que el protón equivalente en el pirrol o en el furano que generalmente aparece entre 6 y 6.5 ppm.

Continuando con la síntesis, la siguiente reacción fue la alquilación de 44.



Esta reacción se llevó a cabo bajo las condiciones descritas en esta tesis para las respectivas tetrahydroindolonas. La reacción no presentó problemas y se llevó a cabo con un 50% de rendimiento, recuperando materia prima.

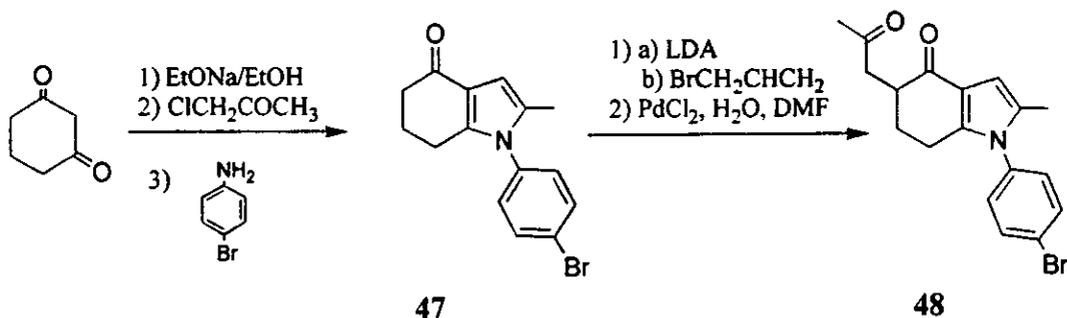
El siguiente paso fue la conversión de la indolona alilada **45** a la 1,4-dicetona **46** mediante la reacción con  $\text{PdCl}_2$ , bajo las condiciones también descritas en esta tesis.



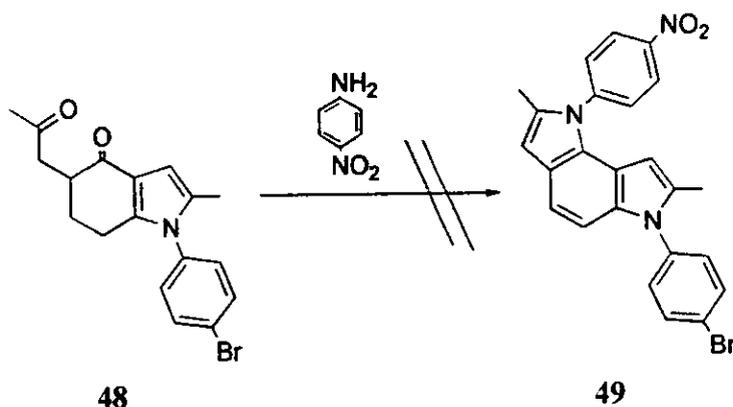
La reacción procedió con bajo rendimiento debido, probablemente, a una oxidación del azufre provocada por la presencia del paladio. Otro factor en contra fue su inestabilidad, ya que, no solamente **46** sino además los precursores obtenidos, había sido aceitoso y sufrió descomposición muy fácilmente incluso almacenado en frío.

Por lo anterior, se valoró como inconveniente continuar con la obtención del dímero con tiofeno presente.

Por su parte, la obtención del *N*-(*p*-Br-fenil)-5-(2-oxopropil)-tetrahydroindol-4-ona (**48**), a partir de la 1,3-ciclohexanodiona se llevó a cabo por la misma estrategia.



Cuando se intentó llevar a cabo la reacción de condensación de **48** con la *p*-nitroanilina la reacción no procedió.



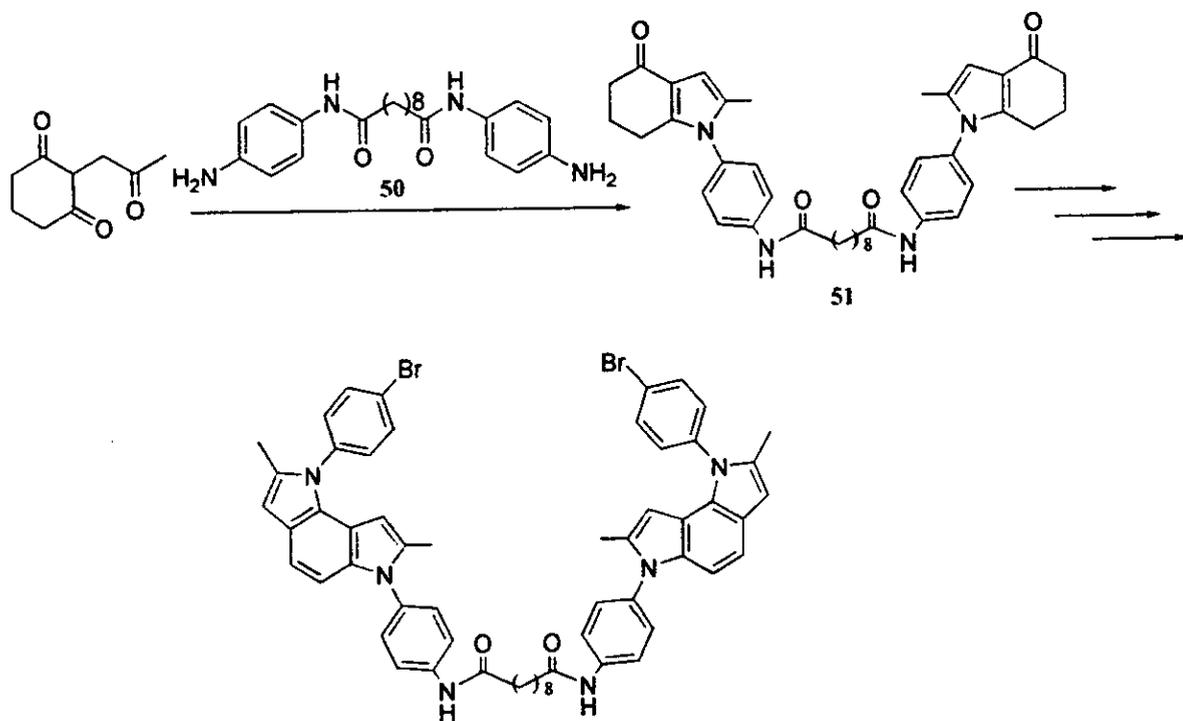
Las condiciones para llevar a cabo esta condensación fueron en ácido acético y reflujo, tolueno y reflujo con ácido *p*-toluénsulfónico como catalizador. ácido acético, bentonita y reflujo y ácido acético, bentonita y reflujo con radiación infrarroja. En todos los casos los rendimientos fueron muy pobres o nulos.

Es interesante comentar que la reacción con el compuesto tricarbónico **30** sí se llevó a cabo y en el caso de la indolona no ocurrió así. Una probable explicación e esto es que el carbono carbonílico del anillo de seis miembros es menos electrofílico por la conjugación con el heterociclo y si esto lo conjuntamos con el efecto electroattractor del grupo nitro, que hace que el par de electrones de la amina se encuentre menos disponible, y por consiguiente ésta sea menos nucleofílica, se desfavorece el avance de la reacción que es reversible en todos los pasos de su mecanismo.

## SÍNTESIS CONVERGENTE DE LOS HOMODIMEROS

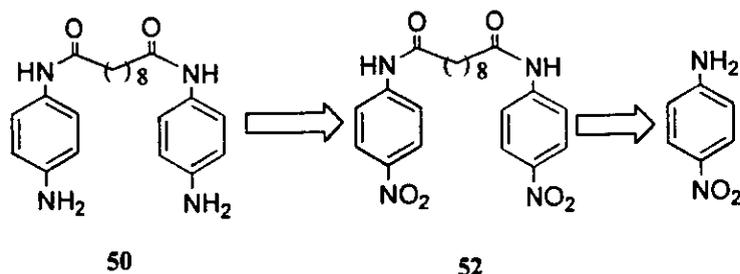
Considerando lo anterior, una alternativa adicional es invertir el efecto de inducción electrónica en el fenilo cambiando el sustituyente. Esto es, que si es el grupo nitro es el responsable de la baja reactividad tanto de la indolona **41** (esquema 6) o de la *p*-nitroanilina en la reacción de Paal Knorr (esquema 7), podría entonces utilizarse en su lugar la *p*-aminoacetanilida o mejor aun la *N,N'*-bis(*p*-aminofenil)octanodiamida esto es la cadena puente. De

esta manera en una propuesta de síntesis paralela a la mostrada en el esquema 5 se haría reaccionar el derivado 1,4-dicarbonílico **30** con la *N,N'*-bis(*p*-aminofenil)octanodiamida y una vez llevada a cabo la condensación se continuaría con la síntesis hasta la obtención del triciclo (Esquema 8).



**ESQUEMA 8.** Tercer ruta alterna para la obtención del homodímero mediante síntesis convergente.

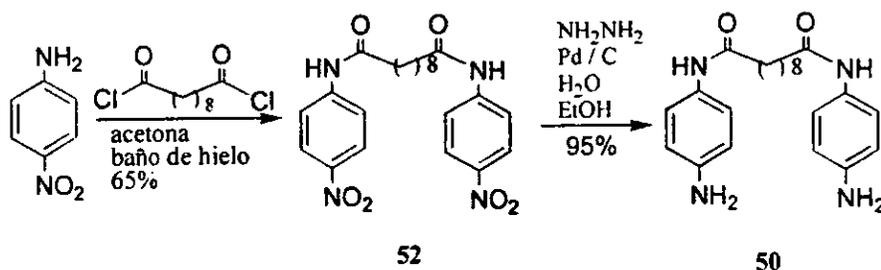
Puesto que la bis-amina **50** requerida no es un producto comercialmente disponible, fue necesario sintetizarla para lo cual se planteó la siguiente estrategia:



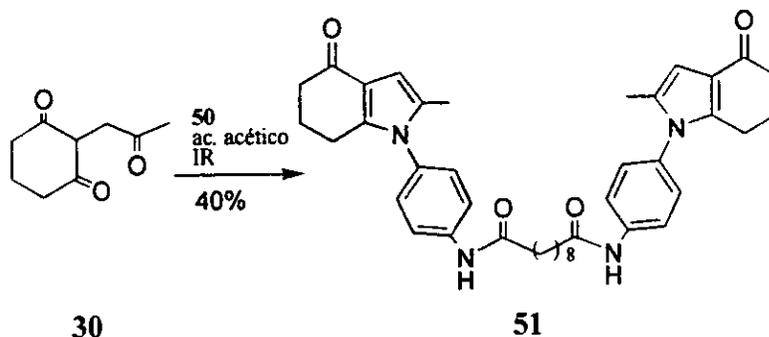
En donde la bis-amina **50** puede ser obtenida a partir del respectivo compuesto nitrado **52**, mediante una reducción, y éste a su vez de la *p*-nitroanilina mediante su condensación con el cloruro de sebacoílo.

El primer paso fue la reacción de la *p*-nitroanilina con el cloruro de sebacoílo en acetona y baño de hielo con agitación, el rendimiento fue del 65% y no hubo problemas de purificación ya que la diamida precipita en el medio de la reacción.

Por su parte la reducción de los grupos nitro se llevó a cabo fácilmente, con rendimiento de 95%, al utilizar hidracina y paladio/carbono en etanol.

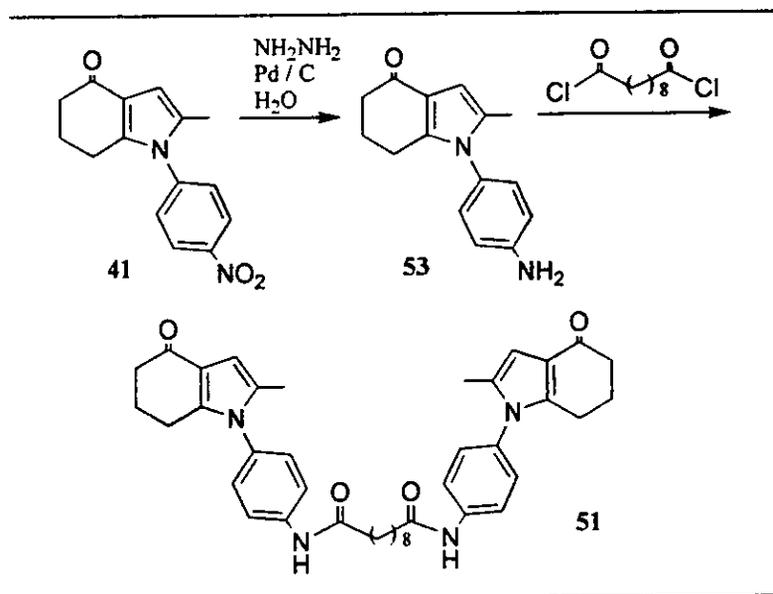


Una vez obtenida, la *N,N'*-bis(*p*-aminofenil)octanodiamida se hizo reaccionar con el compuesto tricarbónico **30** en ácido acético para dar lugar a la bis-indolona **51**.



La reacción se llevó a cabo con rendimiento moderado (40%) y se obtuvo un sólido que en el espectro de RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) presentó una señal simple en 10.2 ppm que integra para un protón, un sistema AA'BB' en 7.8 y 7.43 ppm, correspondientes a los protones de los fenilos que integran para cuatro protones y una señal en 6.3 ppm que integra para uno. Las integrales confirman que fueron dos equivalentes de **30** los que se unieron a la diamina.

Además de esta ruta sintética se decidió explorar una ruta alterna, que lleve al mismo compuesto, consistente en reducir el derivado nitrado **41** previamente obtenido, reducirlo y condensarlo con cloruro de sebacoilo, lo que permitiría valorar los rendimientos y la efectividad de una ruta sobre la otra. Esta ruta de síntesis se muestra en el esquema 9.



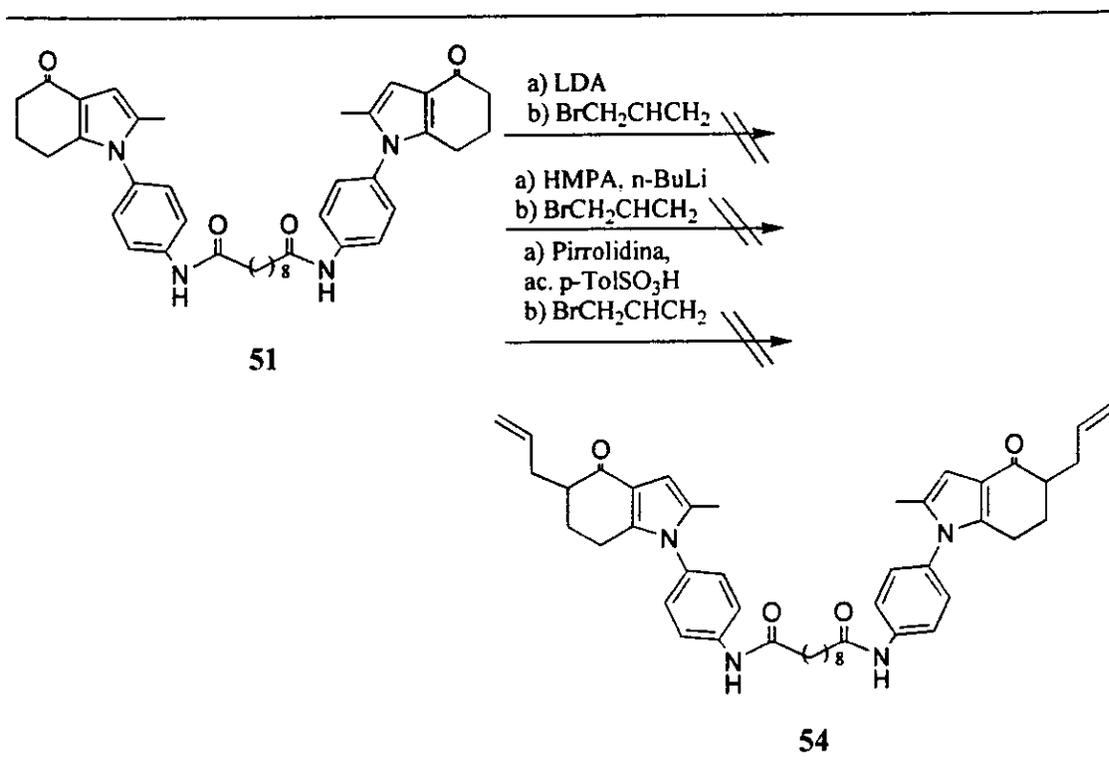
ESQUEMA 9. Ruta alterna para la obtención de **51** a partir de **41**.

Mediante ambas rutas se obtuvo la bis-tetrahydroindolona **51** y una ventaja inmediata de la primera (Esquema 8) sobre la segunda (Esquema 9) fue en términos de estrategia, ya que ésta (convergente) puede ser extrapolada en la formación del segundo anillo de pirrol mientras que en la segunda (lineal) no es posible pues como se mencionó no es factible introducir la *p*-nitroanilina en la formación del tercer anillo.

El compuesto obtenido resultó ser insoluble en los disolventes orgánicos convencionales y soluble en DMSO, lo cual representó un problema para llevar a cabo la siguiente reacción que fue la alilación en el carbono  $\alpha$  al grupo carbonilo.

Es evidente que la reacción de la bis-tetrahydroindolona en medio básico puede sufrir extracción de los protones de la amida y alquilación en esa posición y por supuesto que el anión de la amida sería menos nucleofílico que el del enolato pero no se evitaría la reacción colateral, por lo que se decidió explorar la reacción de alquilación por dos diferentes vías: la

primera por la extracción del protón  $\alpha$  al grupo carbonílico empleando un exceso de base y cantidades equimolares de bromuro de alilo y la segunda mediante la formación de la enamionona. Los intentos por alquilar el compuesto **51** se muestran en el esquema 10.

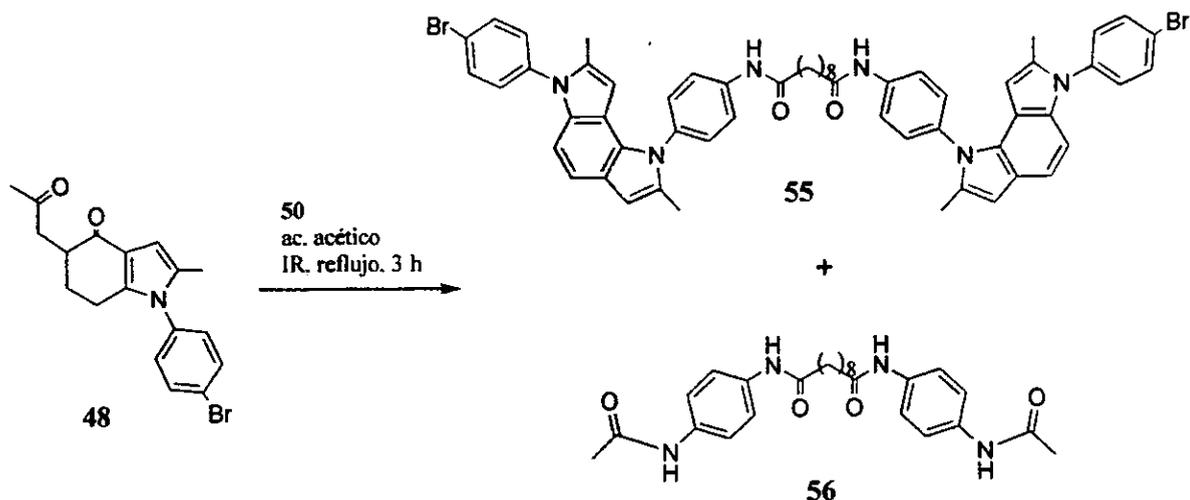


**ESQUEMA 10.** Intentos de alquilación de **51**.

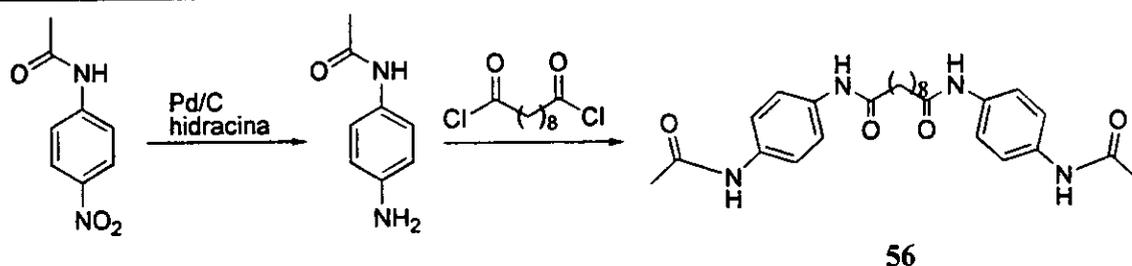
En ninguno de los casos la reacción tomó el curso deseado y el problema principal fue la baja solubilidad

Por lo anterior se decidió introducir la cadena puente en la formación del segundo anillo de pirrol.

Así, la 2-oxo-propil-tetrahidroindolona **48** se hizo reaccionar con la bis-amina **50** en ácido acético a reflujo en presencia de radiación infrarroja, para dar lugar al homodímero del pirrolo[2,3-e]indol.



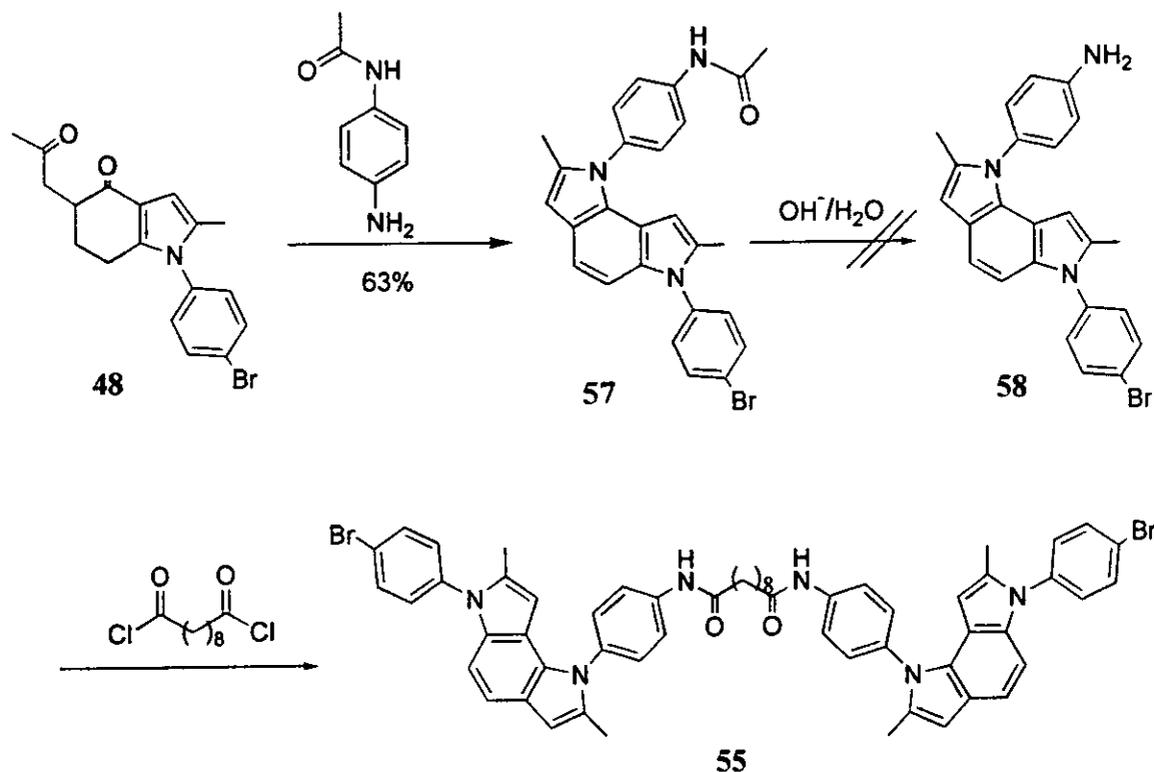
Aunque en principio no aparentó ser problema de mayor importancia, la formación de un compuesto colateral producido por la reacción entre la diamina **50** y el disolvente (ácido acético) complicó la purificación del aducto deseado. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se apreció la presencia tanto de **55** como de **56**. La estructura propuesta de este último fue confirmada mediante su síntesis a partir de la *p*-aminoacetanilida (Esquema 11).



**ESQUEMA 11.** Obtención de la bis-fenilalcanodiamida **56** a partir de *p*-nitroacetanilida.

Aparentemente, el problema podría superarse por cromatografía en columna o alguna otra técnica de separación; sin embargo, el sólido formado en la reacción que contenía tanto **56** como **55** resultó ser soluble en dimetilsulfóxido e insoluble tanto en los disolventes convencionales como en agua o alcoholes, por lo que los intentos por purificarlo por recristalización también resultaron infructuosos. A pesar de los intentos al alcance, **55** no se logró obtener puro ni por purificación ni por cambio en las condiciones de reacción. En este último aspecto cabe señalar que se modificó la temperatura, el orden de adición de reactantes e incluso el disolvente y el ácido.

En este punto es importante señalar que, aunque impuro, **55** fue obtenido conforme a lo planteado. Sin embargo, puesto que la finalidad de la síntesis es principalmente la evaluación de su actividad citotóxica, este compuesto debe ser obtenido con la pureza requerida. Por ello se modificó esta estrategia, de manera parcial en donde, en lugar de hacer reaccionar **48** con la diamina **50**, se hizo reaccionar **48** con la *p*-acetanilida, de tal forma que el producto obtenido se hidrolizaría y la amina formada sería la que reaccionaría con el cloruro de diacilo para dar lugar a **55** (Esquema 12).



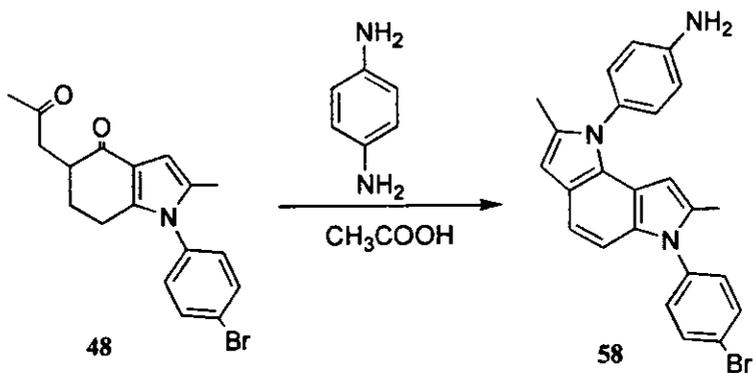
**ESQUEMA 12.** Ruta de obtención alterna del homodímero **55** a partir de **48**.

La reacción de **48** con *p*-aminoacetanilida procedió con 63% de rendimiento; el espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostró, la correspondiente al protón de la amida en 7.42 ppm y los hidrógenos del anillo de los respectivos pirroles en 6.41 y 5.55 ppm. Asimismo, el espectro de IR y el ion molecular obtenido por espectrometría de masas correspondieron adecuadamente al aducto **57**. El siguiente paso en esta serie de reacciones sería la hidrólisis de la amida. Los reportes describen condiciones desde suaves, como son fluoroborato de trietiloxonio (Hanessian y Hurley, 1967) y  $\text{NH}_2\text{NH}_2/\text{H}_2\text{O}$  (Keith et al., 1978), hasta agresivas como ácido clorhídrico

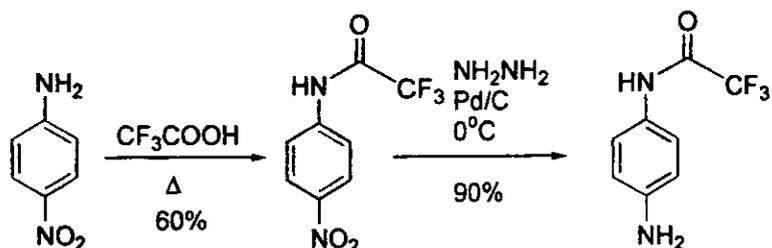
acuoso en reflujo (Dilbeck et al., 1978) o NaOH/H<sub>2</sub>O (Bender y Thomas, 1961). Por su estructura, es conveniente utilizar las condiciones más suaves ya que aunque el compuesto es aromático, los pirroles pueden sufrir apertura. Puesto que en ese momento no se contaba con fluoroborato de trietiloxonio, la reacción se intentó primeramente con hidracina y el resultado fue recuperación total de la materia prima. Un segundo intento se llevó a cabo con adaptación del método de hidrólisis de nitrilos con peróxido de hidrógeno (McIsaac et al., 1971) y el resultado fue también recuperación de la materia prima. Finalmente, se procedió tanto a la hidrólisis ácida como a la básica, y en este caso sí hubo reacción pero esta generó una mezcla de productos que por su cantidad no tuvo caso caracterizar.

Inmediatamente surgen dos propuestas de cambio sobre la misma estrategia: la primera, cambiar el grupo protector por otro más fácil de liberar y la segunda, bastante obvia, utilizar un equivalente de *p*-fenilendiamina en lugar de *p*-aminoacetanilida.

Paralelamente se exploraron las dos rutas. Así se hizo reaccionar **48** con 1,4-diaminobenceno en ácido acético a reflujo suave, en para obtener el pirroloindol aminado **58**; compuesto poco estable al ambiente, calor y a la gel de sílice. En su espectro de RMN <sup>1</sup>H se apreciaron las señales correspondientes a los metilos de los respectivos pirroles en 2.15 y 2.25 ppm, así como los hidrógenos de los mismos anillos en 5.6 y 6.37 ppm. Dos señales dobles correspondientes al anillo bencénico que integran para 1 cada cual en 6.55 y 6.82 ppm, confirmaron la conjugación del sistema; por su parte las señales de los dos fenilos aparecieron como se esperaba como dos sistemas AA' BB' en 6.85, 7.21, 7.25 y 7.62 ppm, y finalmente una señal ancha que desapareció después de la adición de D<sub>2</sub>O y que integra para 2 hidrógenos, corroboró la presencia del grupo amino.



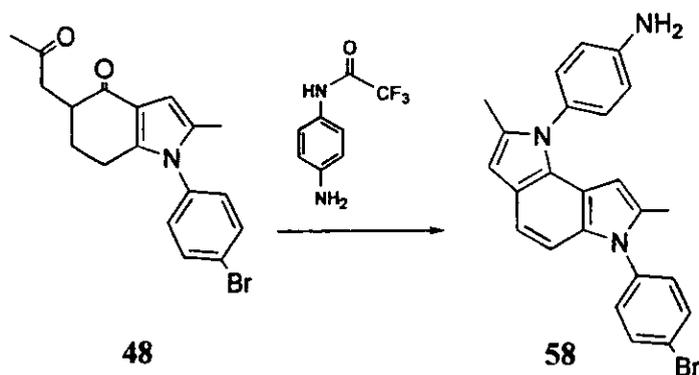
Por otra parte se cambió el grupo protector acetamida por trifluoroacetamida que es mucho más fácil de hidrolizar. Primero se tuvo que sintetizar la *p*-amino-trifluoroacetanilida mediante la trifluoroacetilación de la *p*-nitroanilina y posterior reducción de la misma.



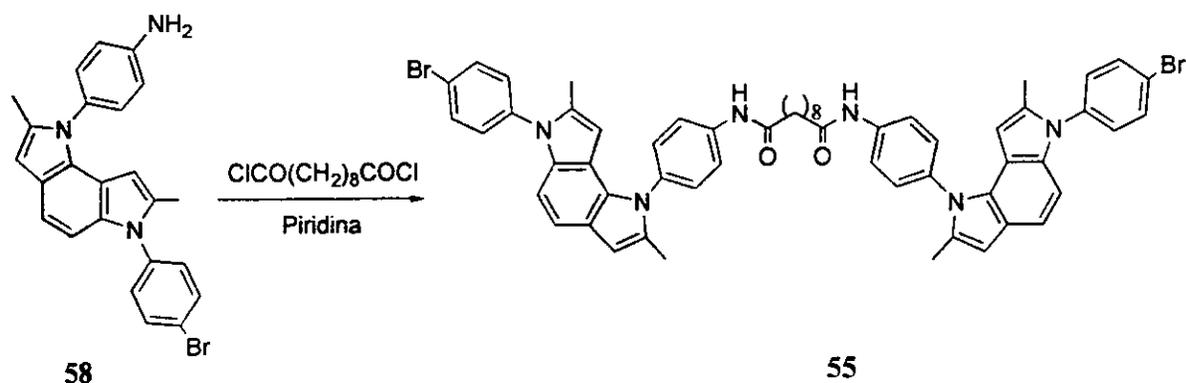
El rendimiento en el primer paso fue bajo (60%) comparado con los métodos descritos (Weigand y Geiger, 1956) que implican cloruro de trifluoroacetilo o bien anhídrido trifluoroacético (>95%); además el tiempo de reacción fue más largo y las condiciones riesgosas (ácido trifluoroacético, reflujo, 4 h). La razón de llevar a cabo el método aquí descrito, y no alguno de los reportados en la literatura, fue por la falta de los reactivos requeridos.

En el segundo paso, la reducción procedió con rendimientos de entre 10 y 90 %, dependiendo de la temperatura utilizada; esto es, que cuando la reacción se llevaba a cabo en baño de hielo, se obtenía un 90 % de rendimiento, mientras que cuando se aplicaba calor, el rendimiento se reducía a 10%. La explicación de esta diferencia es que cuando se aplica calor, la hidracina hidroliza el trifluoroacetilo y se obtiene 1,4-fenilendiamina. Esta observación resultó ser una ventaja pues se contaría con un excelente método suave de desprotección.

La reacción de **48** con *p*-aminotrifluoroacetanilida se llevó a cabo en ácido acético y el producto que se obtuvo fue el pirroloindol **58** con un 40 % de rendimiento, en donde la trifluoroacetamida se desprotegió en el mismo medio de la reacción.



El último paso ahora sería la condensación de la amina **58** con el cloruro de sebacoílo. Esta reacción se efectuó en acetona y baño de hielo, pero el ácido clorhídrico generado provocó descomposición del producto obtenido. Por lo tanto se cambió el disolvente por piridina y de esta manera se obtuvo el homodímero **55** (60% de rendimiento).



El espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostró las señales de los metilos de ambos pirroles en 2.12 y 2.24 ppm, además de los metilenos de la cadena alifática como señales múltiples en 1.63 (4H), 1.77 ppm (2H) y como triplete en 2.43 ppm (2H). Los protones aromáticos aparecen en 5.56 y 6.40 ppm (anillos pirrólicos) y entre 6.80 y 7.60 ppm el resto de los protones del núcleo pirroloindólico. Finalmente como en 7.53 ppm el protón base de amida. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostró la señal de carbonilo de amida en 171.7 ppm, así como el resto de las señales esperadas. Por su parte, el espectro de IR mostró la señal de estiramiento N-H y C=O de la amida en  $3435\text{ cm}^{-1}$  y  $1694\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. El ion molecular obtenido por espectrometría de masas de alta resolución fue  $m/z$  1026.8962  $\text{C}_{58}\text{H}_{54}\text{Br}_2\text{N}_6\text{O}_2$ .

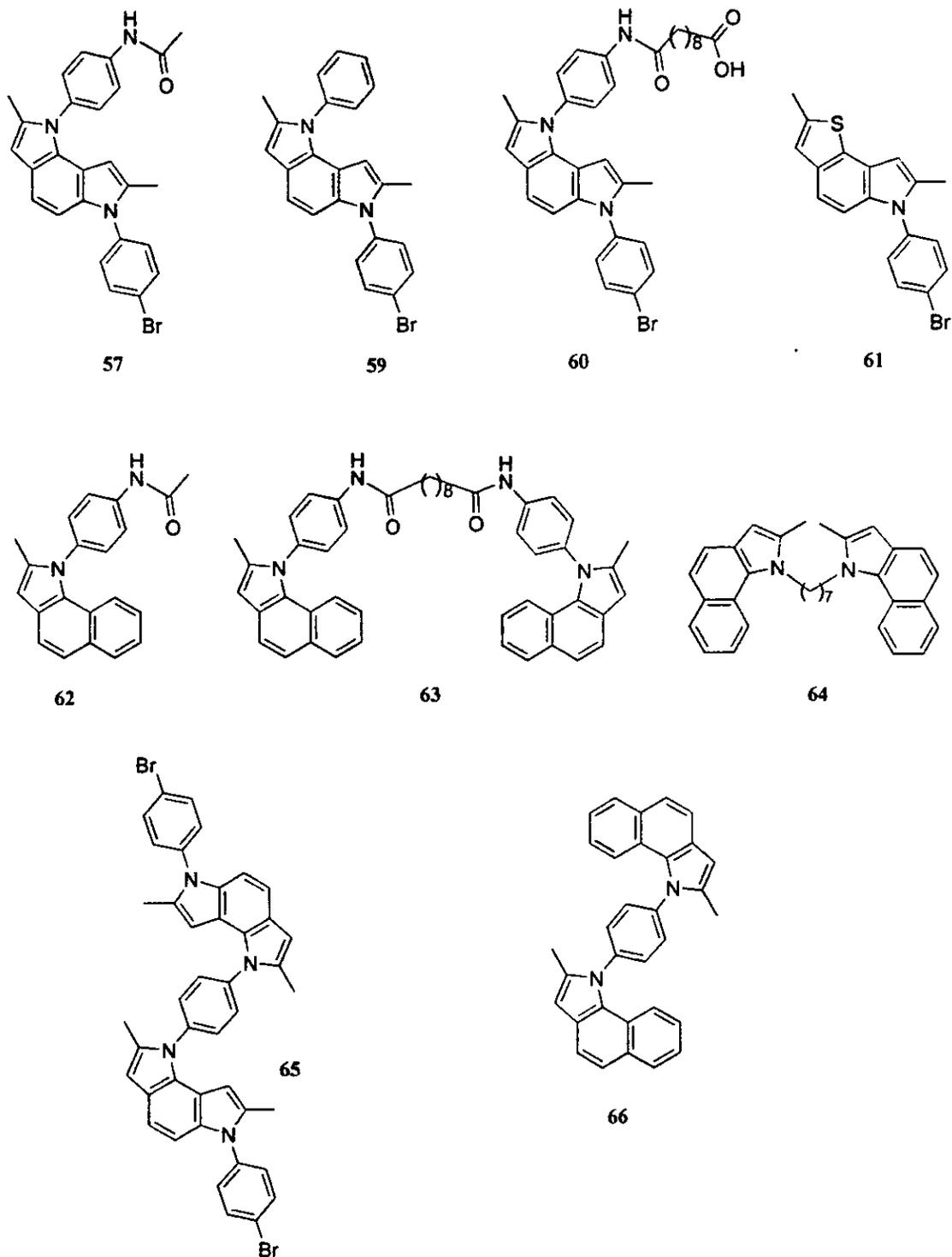
Es de particular importancia mencionar que el dímero obtenido resultó ser soluble en diclorometano y cloroformo, contrario a lo que se mencionó cuando éste se intentó obtener en ácido acético, bentonita y reflujo. Cabe recordar que se obtuvo conjuntamente con el producto de acetilación de la diamina **50**. En ese momento, todos los espectros de RMN fueron obtenidos en DMSO- $d_6$  y los de IR en pastilla por la insolubilidad mencionada. La mezcla del homodímero pirroloindol **55** y el subproducto de reacción **56** siempre fue obtenida por precipitación de la mezcla de reacción ya fuese con agua o bien por eliminación del disolvente al vacío. Hay que adicionar a estos datos que todas las diamidas obtenidas hasta el momento,

tanto en este trabajo como en los que lo anteceden como bis-benzoacridinonas unidas por la misma cadena puente (Martínez et al., 2000), han sido bastante polares e insolubles en los disolventes convencionales. Todo esto hizo pensar que el compuesto puro sería insoluble en cloroformo y como ya se mencionó, no ocurrió así. Lo que realmente es insoluble, es la mezcla 55-56 o bien 56. Esto obviamente se supo hasta contar con 55 en forma pura.

De esta manera, se llevó a cabo un último intento por obtener 55 a partir de 48 con la diamina 50. Esto fue en ácido acético a 80 °C en agitación por una hora. Aunque los rendimientos obtenidos fueron bajos (17.5%), si se obtuvo el pirroloindol deseado.

### **SÍNTESIS DE ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DEL PIRROLO[2,3-e]INDOL 55.**

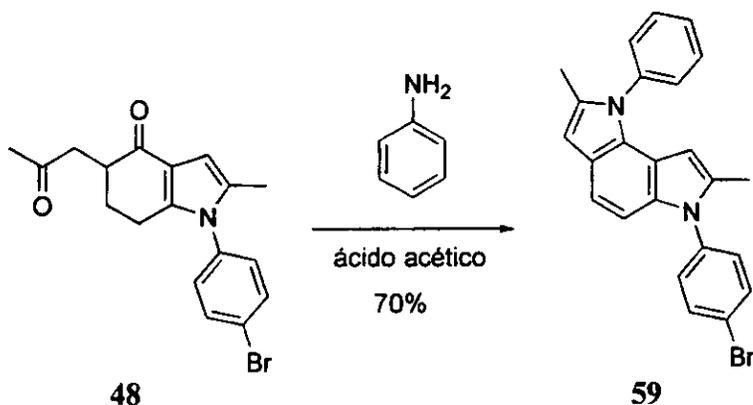
Como se mencionó, el principal interés en la obtención del bis-intercalador del ADN diseñado y sintetizado en esta tesis es el explorar su actividad citotóxica potencial. Independientemente de cual sea ésta, resulta interesante sintetizar análogos estructurales que permitan llevar a cabo un análisis de la relación estructura-actividad. Los compuestos seleccionados son los pirroloindoles 57, 59 y 60 así como el tiofenindol 61 y los derivados pirrolonaftalenos 62, 63, y 64. Asimismo, un par de compuestos de interés fueron el bis-pirroloindol 65 y el bis-pirrolonaftaleno 66 (Esquema 13). La decisión de seleccionar estas estructuras se explicará en la sección de discusión de actividad biológica. Estos compuestos son novedosos con excepción de 61 que a pesar de haber sido descrito se tuvo que sintetizar en el desarrollo de esta tesis mediante el método ya reportado (Martínez et al., 1998) para poder evaluar su actividad, y al igual que el pirroloindol 57, que fue obtenido como un intermediario en uno de los intentos por obtener 54 en esta tesis, no se tratarán en este capítulo. Los pirroloindoles 59 y 60 pueden ser sintetizados a partir del intermediario 48 y finalmente, en lo que respecta a los pirrolonaftalenos, se planteó una estrategia análoga a la descrita para la obtención los pirroloindoles, pero usando un material de partida diferente.



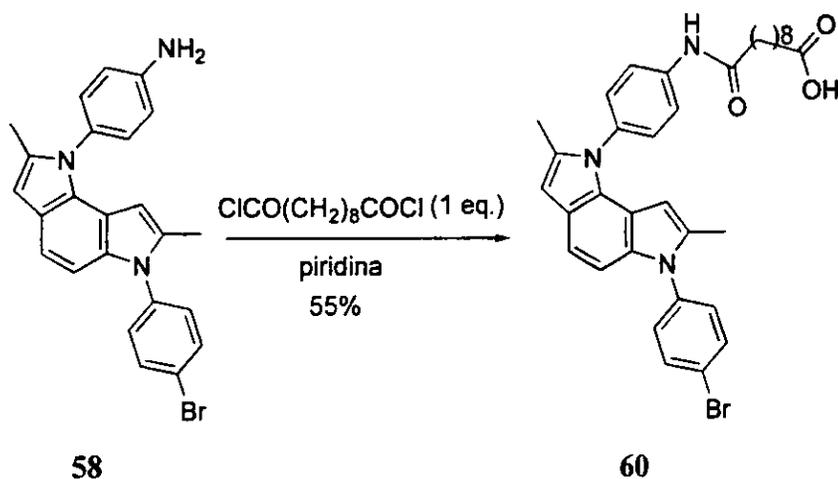
**ESQUEMA 13.** Análogos estructurales del pirroloindol 55 propuestos para evaluar actividad citotóxica.

## Síntesis de los derivados pirrolo[2,3-e]indoles

El primero en ser sintetizado fue **59**, mediante una condensación de **48** y anilina, dando lugar al pirroloindol deseado en un 70% de rendimiento.



Por su parte, el derivado **60** fue obtenido mediante reacción de la amina **58** con cloruro de sebacoilo en piridina.

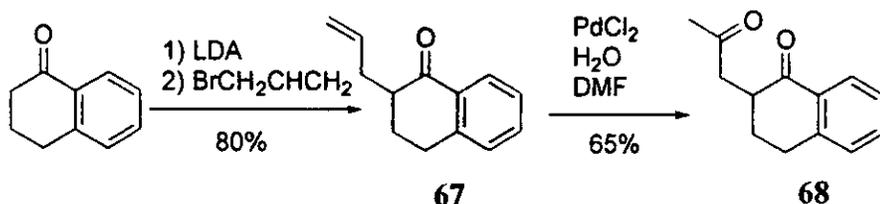


La espectroscopía de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de este compuesto fue casi igual a la obtenida para el dímero **55**, lo cual era de esperarse por la similitud estructural entre ambos compuestos. Lo que dio la pauta a definir que se trataba del monómero y no del dímero fue, en primer término, la señal para el protón del metileno vecino a la amida que en este caso se presenta como un triplete en 2.42 ppm y que integraba 2 a 1 con respecto al protón de la amida, mientras que los hidrógenos vecinos al grupo carboxílico se presentaba como una señal múltiple muy cerca al triplete mencionado (2.34 ppm). Por otra parte, en el espectro de IR aparecieron dos bandas en

3313  $\text{cm}^{-1}$  y 1708  $\text{cm}^{-1}$ , características de ácido caboxílico y otra más en 3436  $\text{cm}^{-1}$  típica de amida. Finalmente como confirmación definitiva fue la espectrometría de masas en donde se obtuvo un ion molecular a  $m/z$  615.

### Síntesis de los derivados pirrolonaftalenos.

Para la obtención de estos derivados, se empleó el mismo método que el utilizado en la síntesis de los pirroloindoles, pero en esta ocasión se partió de la  $\alpha$ -tetralona en lugar de la 1,3-ciclohexanodiona.

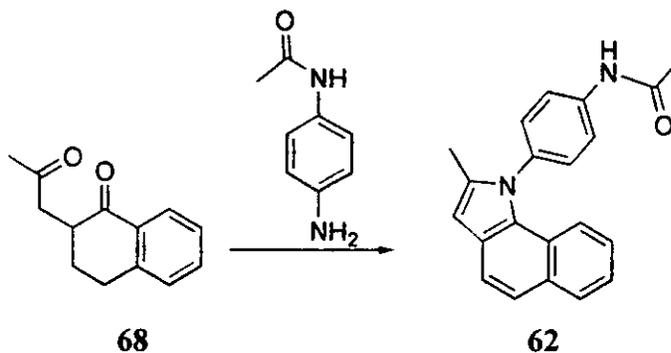


Así, la reacción de  $\alpha$ -tetralona con LDA, generado *in situ*, y su posterior tratamiento con bromuro de alilo, dio lugar al derivado alilado **67**. La reacción procedió con 80% de rendimiento y siempre se obtuvo adicionalmente la doble alquilación (5%).

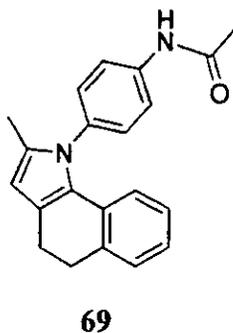
El compuesto **67** es un aceite de color amarillento que cristaliza a baja temperatura. Dentro de las señales más importantes en RMN  $^1\text{H}$  se encuentran las correspondientes a los protones vinílicos entre 5 y 6 ppm. La integral de estas señales con respecto a las demás fue un indicio de que se trataba del producto monoalquilado.

La oxidación de **67** con cloruro de paladio no presentó contratiempo y se obtuvo el derivado 1,4-dicarbonílico **68**. En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observó la señal del metilo adyacente al grupo carbonilo en 2.27 ppm. Entre 7 y 8 ppm se encontraron los hidrógenos de la porción aromática como una señal doble en 7.23 ppm, una triple en 7.3, otra triple en 7.47 y finalmente otra doble en 8 ppm, esta última desplazada a campo bajo por efecto de desprotección del grupo carbonilo. En el espectro de IR se apreciaron dos bandas típicas de carbonilo, una de cadena abierta (1715  $\text{cm}^{-1}$ ) y otra conjugada (1684  $\text{cm}^{-1}$ ).

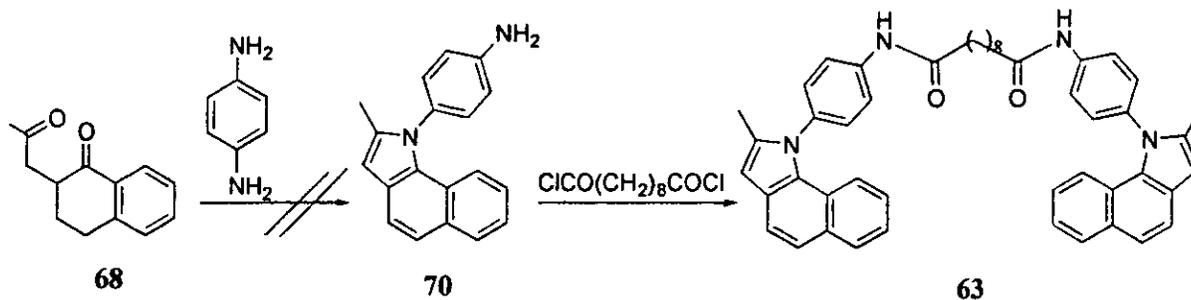
El derivado **68** fue el intermediario común para obtener el resto de los compuestos pirrolonaftalénicos. El primero en tratar de ser obtenido fue **62**, mediante la condensación de **68** con *p*-aminoacetanilida.



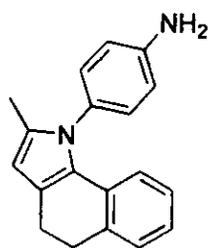
En esta reacción se obtuvo un sólido verde con rendimiento de 81%. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostró las señales del metilo e hidrógeno pirrólico, así como las señales del fenilo, de la porción bencénica del triciclo y la amida, pero adicionalmente se observaron dos señales que integraban para dos hidrógenos en 2.7 y 2.9 ppm. Esto indicó que la formación del pirrol había procedido, pero que no había ocurrido lo mismo con la aromatización. A pesar de los intentos por llevarla a cabo mediante calor como ocurrió en el caso de los pirroloindoles, no se tuvo el mismo éxito. El compuesto obtenido fue **69**.



La estrategia para obtener **63** fue estructurada a partir de la amina **70**, misma que se obtendría del derivado dicarbonílico **68**.

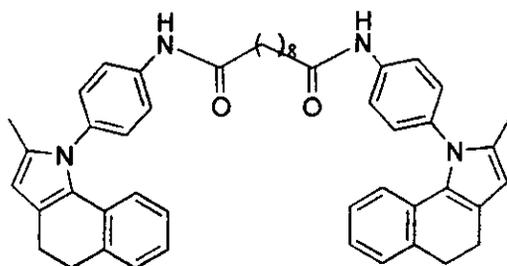


La reacción de **68** con la *p*-fenilendiamina procedió igual que el intento por obtener **62**, es decir, se llevó a cabo la condensación y formación del pirrol pero el triciclo no se arommatizó y se obtuvo **71** (75 %) en lugar de **70**.



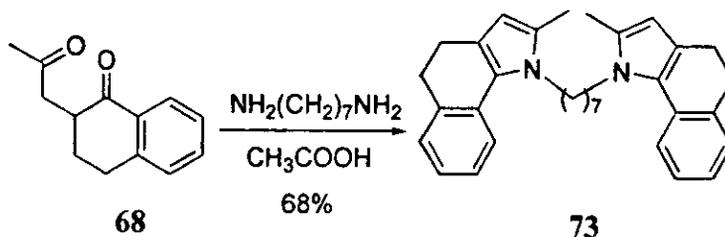
**71**

La reacción entre **71** y cloruro de sebacoilo en acetona procedió con descomposición, debido a la formación de ácido en el medio por lo que se cambiaron las condiciones de reacción y en lugar de utilizar acetona como disolvente se empleó piridina. El producto obtenido fue **72**.



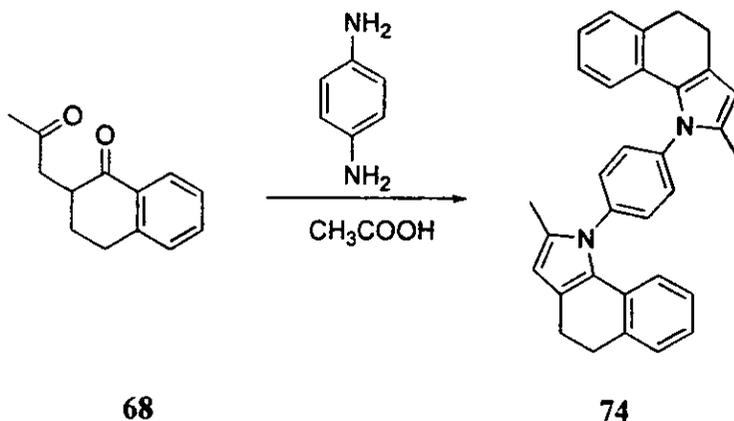
**72**

Concluyendo con esta serie, se procedió a la obtención de **64**. En este momento era de esperar que tampoco habría arommatización total del sistema, y que el producto de la reacción entre **66** y la 1,7-heptanodiamina sería el homodímero **73**. Efectivamente, el producto obtenido fue **73**.



## SÍNTESIS DE LOS HOMODÍMEROS 74 Y 65.

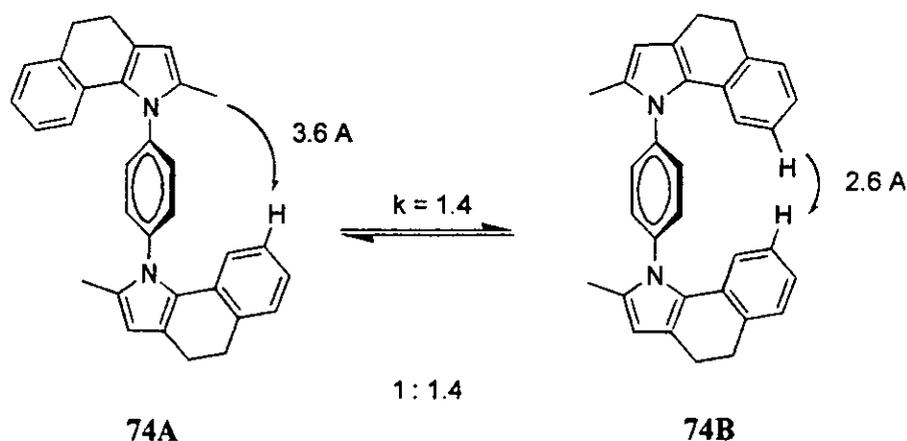
La reacción de dos equivalentes de **68** con 1,4-fenilendiamina dio lugar al homodímero **65**.



El espectro de RMN <sup>1</sup>H presentó algunas aparentes anomalías. La señal para los metilos apareció en 2.17 ppm y los metilenos en 2.70 y 2.93 ppm, como dos tripletes que integran para dos hidrógenos cada uno. En 5.99 ppm apareció la señal correspondiente al hidrógeno aromático del anillo del pirrol, en 7.42 ppm una señal en forma de singulete que integraba para dos hidrógenos, correspondientes a los protones del fenilo 1,4-disustituido, y en 6.94 y 7.19 ppm dos señales, una doble y una simple poco ancha de dos de los protones aromáticos del tricyclo. Sin embargo, fue aparentemente anómala la duplicidad de las otras señales, las de 6.30 y 6.56 ppm, que entre ambas integraban para un hidrógeno, mientras que las otras aparecían en 6.82 y 6.94 ppm y que igualmente integraban para un hidrógeno. El espectro de RMN <sup>13</sup>C mostró las señales para cada uno de los carbonos y no hubo duplicidad. Por su parte, el espectro de IR mostró como señales principales las bandas para estiramiento C-H y C-C aromáticos en 2937 y 1516 cm<sup>-1</sup>. De la espectrometría de masas se obtuvo un ión molecular a *m/z* 440 correspondiente al aducto deseado. La duplicidad de las señales en RMN hace pensar inmediatamente en dos conforméros de interconversión lo suficientemente lenta para ser detectada por este método. Cabe señalar que este comportamiento es común en los biarilos y que, cuando estos conforméros son aislables a temperatura ambiente, se les cataloga como atropoisómeros (Oki, 1983). Asimismo, no solo los biarilos presentan esta propiedad, sino también los terarilos (Chang y Adams, 1934).

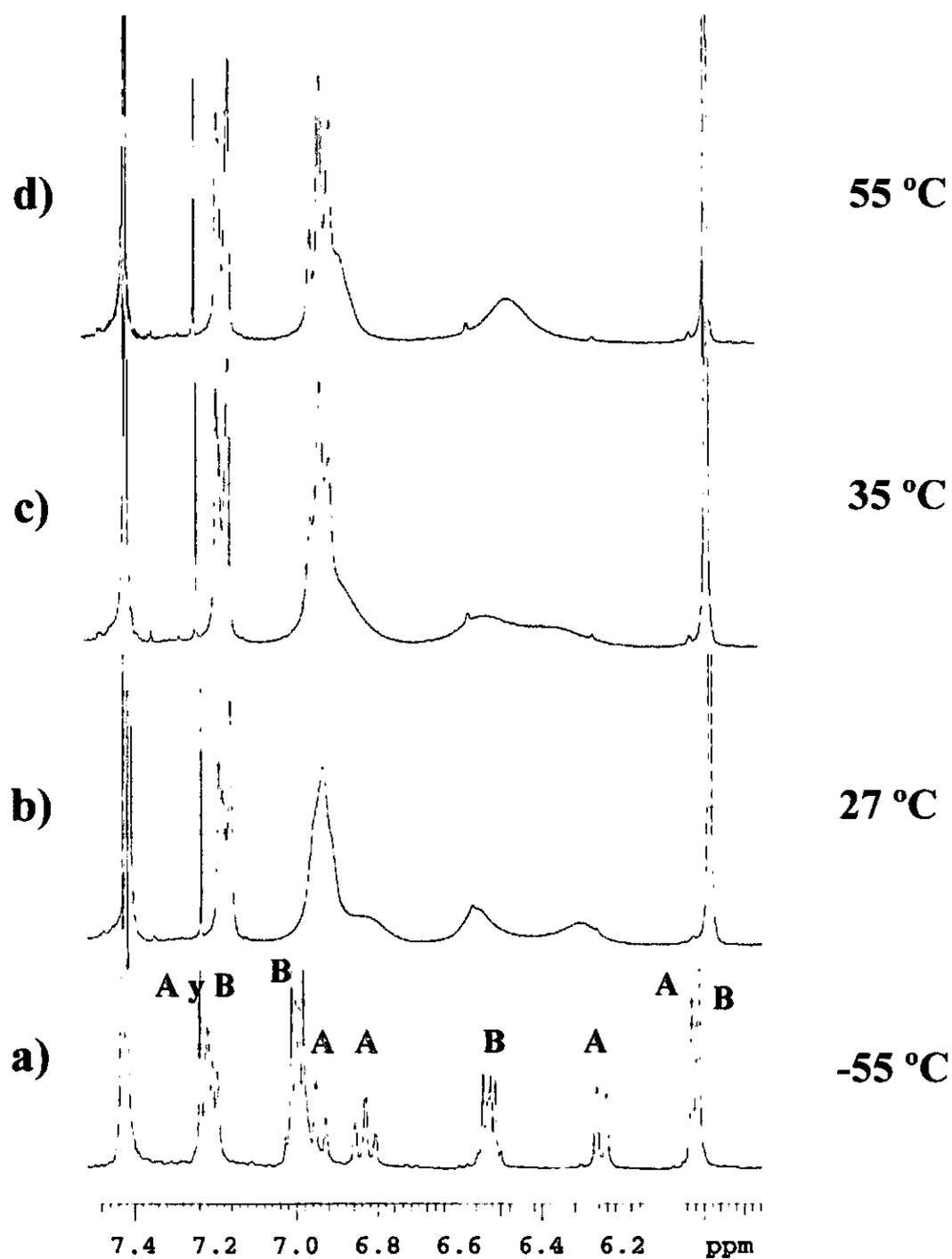
Para definir que la duplicidad de señales se trataba realmente de conforméros, primeramente se llevó a cabo la obtención del espectro de RMN <sup>1</sup>H con variación de temperatura (Figura 7), en donde se aprecia que a 55 °C (Figura 7d) se alcanzó la temperatura de coalescencia. Cuando

se baja la temperatura a 27 °C, el espectro que se obtuvo fue exactamente igual al obtenido originalmente (Figura 7b). Cuando la temperatura se bajó a -55 °C todas las señales se definieron y separaron (Figura 7a) y la misma separación de señales se presentó en el espectro de RMN <sup>13</sup>C. Mediante irradiaciones y experimentos COSY y HETCOR, se asignaron dos grupos de señales A y B (Figura 7a). Algunas de las señales del grupo B fueron complejas como la de 6.55 ppm, que se esperaría como una señal doble y aparece como señal múltiple. Sin embargo, cuando la señal del hidrógeno vecino (7.03 ppm) fue irradiada, la primera se convirtió en un singulete, lo que corroboraba que se trataba de un espectro de segundo orden. De esta forma, se confirmó la presencia de los conformeros **74A** y **74B**.



Por otra parte, en el experimento NOESY se apreció efecto nOe negativo entre las señales en 6.28 y 6.55 ppm, con lo que se determinó que además existía equilibrio entre ambos conformeros y finalmente mediante la integración de las señales, se pudo saber que el equilibrio se encuentra desplazado hacia una de las especies, ya que la proporción entre ellas fue de 1.4/1. El reto en este punto fue saber cuál de las conformaciones era la preferida.

Desde el descubrimiento del efecto estérico, muchos años después de descubrirse la preferencia conformacional en biarilos y terarilos (Christie y Kener, 1922), éste ha proporcionado la explicación del atropoisomerismo (Rieger, 1950; Bott et al., 1980). Se esperaría que la especie más favorecida fuese **74A**, ya que no hay aparentemente tanta repulsión estérica entre las porciones “*monoméricas*” como ocurre en **74B**. Este dato puede corroborarse mediante modelaje molecular, en donde después de la optimización geométrica de ambas estructuras con mecánica molecular y PM3, se observa en **74A** una distancia de



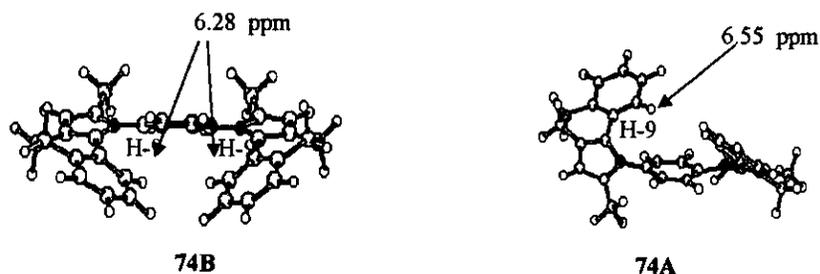
**Figura 7.** RMN  $^1\text{H}$  de 72 a diferente temperatura: a)  $-55^\circ\text{C}$ , b)  $27^\circ\text{C}$ , c)  $35^\circ\text{C}$  y d)  $55^\circ\text{C}$

aproximadamente 3.6 Å, entre el metilo del pirrol y el hidrógeno bencénico de su contraparte monomérica, mientras que la distancia entre los hidrógenos bencénicos más cercanos entre los monómeros en **74B** fue de 2.6 Å, es decir casi 1 Å de diferencia. La diferencia energética entre ambos conformeros fue menor a 1 kcal/mol, siendo **74A** el de menor energía.

No era posible saber directamente cuál grupo de señales correspondía a **74B**, pero si era posible saber cual corresponde a **74A**, mediante experimento nOe. Esto es que el protón, en ya sea 6.28 o 6.55 ppm, que presente efecto nOe con cualquiera de los metilos de pirrol, correspondería, junto con su conjunto de señales a **74A** y por descartación el otro conjunto pertenecería a **74B**. El experimento se llevó a -55 °C, pues es donde se definieron claramente y se asignaron las señales, incluyendo las de los metilos para cada conformero, adicionalmente la interconversión es considerablemente más lenta.

El experimento NOESY mostró claramente que esta interacción se llevó a cabo entre la señal en 6.28 ppm y la ubicada en 2.23 ppm. Es sorprendente que este grupo de señales correspondía a la especie menos poblada. En otras palabras, la especie mayoritaria en el equilibrio fue **74B**, que es la conformación estéricamente menos favorecida.

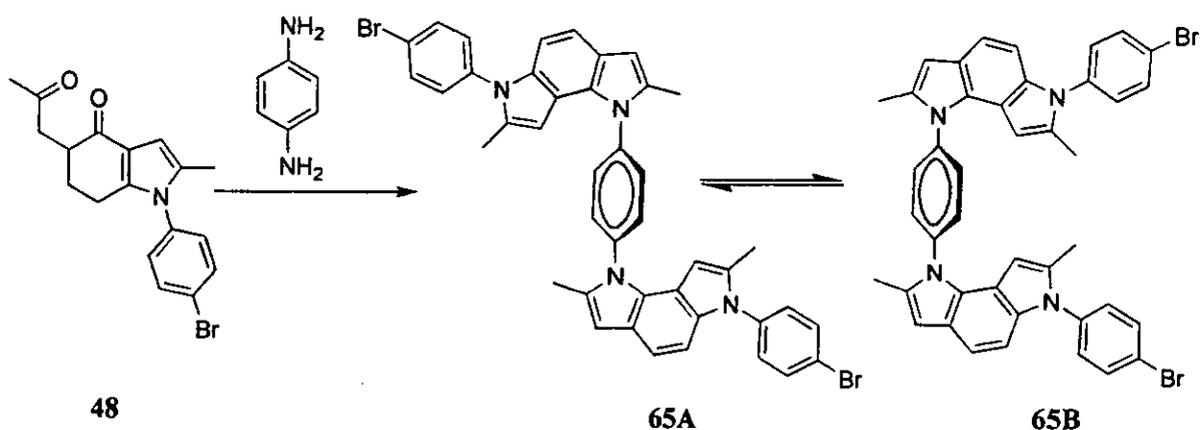
La señal del hidrógeno H-9 de **74B** se encuentra a campo bajo comparada con la generada por su homólogo de **74A**, lo cual se debe seguramente a un efecto de desprotección anisotrópica mutua entre ambos triciclos, por la cercanía de los anillos bencénicos.



**Figura 8.** Representación tridimensional de **74a** y **74B**.

Una probable explicación de esta preferencia conformacional podría encontrarse en el momento dipolar. La espectroscopía de RMN fue obtenida en  $\text{CDCl}_3$ , así que si **74B** que tiene un momento dipolar mayor que **74A** podría ser estabilizado por la polaridad del disolvente. Si esto fuese cierto, entonces el espectro de RMN  $^1\text{H}$  obtenido en un disolvente mucho menos polar debería modificar considerablemente la proporción. Sin embargo, cuando se obtuvo el espectro en benceno deuterado, la relación **74B/74A** cambió de 1.4/1 a 1.2/1, lo cual indica que la preferencia conformacional no está tampoco gobernada del todo por el momento dipolar de la molécula.

Cuando se llevó a cabo la condensación entre **48** y la 1,4-fenilendiamina, se obtuvo **65**, que mostró un comportamiento espectroscópico similar al de **74**.



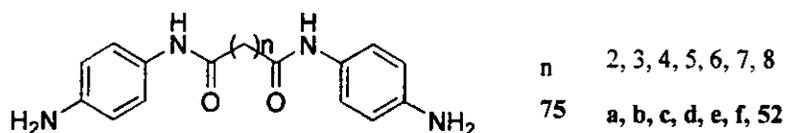
El espectro de RMN  $^1\text{H}$  muestra las señales esperadas para el sistema, pero también con duplicidad muy marcada en aquellas correspondientes a los hidrógenos y metilos pirrólicos en 5.62 y 5.92 ppm, que integran entre ambas para un hidrógeno, y en 2.40 y 2.47 ppm que integran para tres hidrógenos. El espectro de IR mostró señales para estiramiento C-H y C-C de aromáticos y el ion molecular obtenido por espectrometría de masas por FAB+ correspondió al peso molecular esperado de 752.

La diferencia en el espectro de RMN, con respecto al sistema terarilo **74**, es que las señales se encuentran mucho más definidas, lo cual es de esperarse pues la interconversión entre conformeros en implica un giro entre el enlace N-C por el que atraviesa un estado coplanar entre el tricyclo y el fenilo disustituido, inestable *per se*, que en **74** se ve considerablemente restringido por la presencia de los dos metilos pirrólicos, lo que ocasiona un incremento en el  $\Delta G^\ddagger$ .

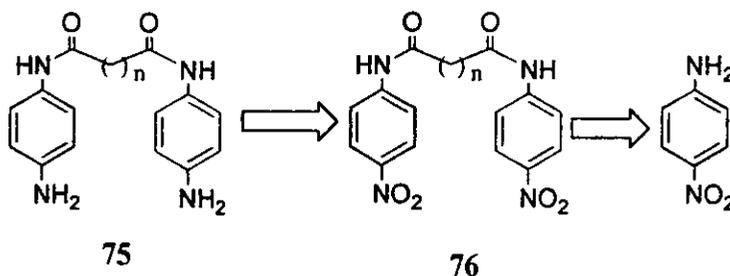
Como es sabido, la estereoquímica juega un papel muy importante en la actividad biológica y ni los atropoisómeros (Evans et al., 1993; COP et al., 2001) ni los intercaladores del ADN escapan de esta regla (Xiaogang et al., 2000). De ahí la importancia de conocer la preferencia conformacional de 74 y 65.

### SÍNTESIS DE N, N'-BIS (ARILALCANODIAMIDAS)

Otro grupo de compuestos que se sintetizaron, cuya razón de obtenerlas será discutido en la sección de actividad citotóxica, es aquel de las N,N'-bis(arilalcanodiamidas) 75a-f.

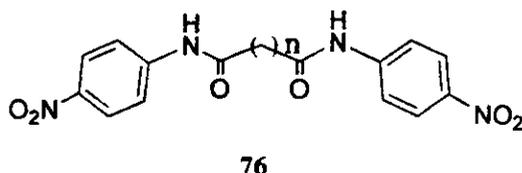


La síntesis de estos compuestos se llevó a cabo de la misma forma que se obtuvo la diamina 50, con los respectivos cloruros de diacilo:



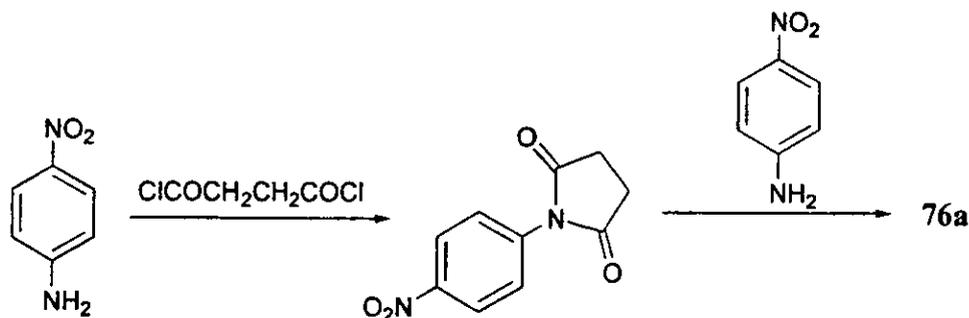
Así, el primer paso fue la reacción de la *p*-nitroanilina con el respectivo cloruro de diacilo, los compuestos obtenidos y sus rendimientos se muestran en la tabla III:

Tabla III. Rendimiento en la obtención de 76a-f y 52.



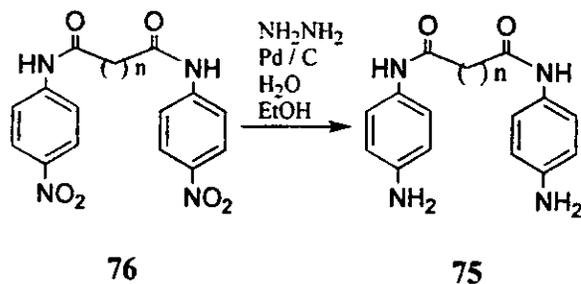
Compuesto #	n =	T. de reacción	Rendimiento (%)	P.f. (°C)
76a	2	12 h	18	286-288
76b	3	2 h	59	278-280
76c	4	2 h	62	280-285
76d	5	2 h	57	206-208
76e	6	2 h	49	220-222
76f	7	2 h	52	155-158
52	8	2 h	65	198-200

El rendimiento en la mayoría de los casos fue bueno y el más bajo fue cuando se condensó la amina aromática con el cloruro de succinilo, lo cual se debe muy probablemente a que la reacción procede principalmente por la vía intramolecular para dar lugar a la succinimida misma que reaccionaría muy lentamente con otra molécula de *p*-nitro anilina para dar lugar a la estructura deseada, esto se refleja claramente en el tiempo de reacción que es 6 veces mayor que en el resto de los casos.



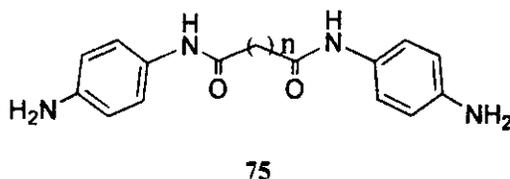
El siguiente paso consistió en la reducción de los grupos nitro. Hay una gran variedad de agentes reductores que se utilizan para reducir nitrocompuestos entre los que destacan el  $\text{SnCl}_2$  y  $\text{H}_2$  en Pd/C. Una variante de este último es utilizar hidracina, Pd/C y agua en etanol a

reflujo. Dado que estas condiciones de reacción son muy suaves se decidió utilizarlas en primera instancia.



En un principio esperamos tener algunos problemas con la reacción, ya que ésta se lleva a cabo en etanol y las bis-amidas son muy polares y poco solubles en alcohol metílico y etílico, sin embargo la reacción procedió con muy buenos rendimientos, aun sin haber solubilidad total del sustrato en el medio. Los resultados se resumen en la tabla IV:

**Tabla IV.** Rendimiento en la obtención de los compuestos **75a-f** y **50**.



Compuesto #	n =	Rendimiento (%)	P.f. (°C)
75a	2	92	232-234
75b	3	94	228-230
75c	4	93	238-240
75d	5	83	203-204
75e	6	87	211-212
75f	7	88	195-197
50	8	95	205-206

---

## ACTIVIDAD CITOTÓXICA



---

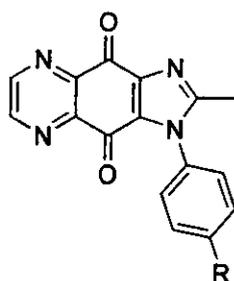
### ELECCIÓN DE LOS COMPUESTOS A EVALUAR

Como se mencionó en la sección de antecedentes, la aplicación más relevante de los intercaladores del ADN es la actividad citotóxica y, como se indicó, uno de los objetivos de esta tesis es evaluar dicha actividad, si es que existe, en el homodímero obtenido. Puesto que el diseño de fármacos es un área de la farmacia cuyo resultado sirve para el diseño de otros compuestos, con la finalidad de encontrar el fármaco más efectivo y menos tóxico, se consideró importante conocer no solamente la actividad citotóxica de **55**, sino además de otros análogos. Fue por este motivo que se sintetizaron los compuestos **57**, **59-61**, **69**, **72**, **73** y **75** (Figura 9), ya que podrían aportar información relacionada con la estructura y actividad de este nuevo grupo de agentes potencialmente citotóxicos. La razón de su elección, por la cual fueron sintetizados, se resume en la Figura 10 y se discute a continuación:

Los compuestos **57** y **60**, son los monómeros de **55**. La actividad de estos compuestos determinaría la importancia de contar con la estructura dimérica. Como se aprecia, **60** tiene, a diferencia de **57**, una cadena alifática de 8 metilenos y un carboxilo en el extremo de ésta, por lo que las interacciones con el ADN variarían entre ambos.

El derivado **59**, corroboraría la suposición de que la amida es requisito en estos compuestos para tener actividad citotóxica, tomando en cuenta que la inhibición enzimática (topoisomerasa) estaría dada por interacciones electrostáticas, sobre todo por puentes de hidrógeno. De igual manera, el compuesto **61**, daría información sobre el requerimiento de tener un grupo fenilpirrolil en esa posición y al igual que **59**, no tendría la capacidad de interactuar con enzimas como se desea.

Por su parte, el homodímero **72** difiere de **55** en la ausencia del grupo *p*-Br-pirrolilo. Como fue indicado, en trabajos paralelos a éste que se llevan a cabo actualmente, se ha notado la importancia de tener esta porción en algunos análogos. Hay además reportes que apoyan esta suposición como el descrito en compuestos de tipo imidazoquinoxalindionas **77** y **78**, en donde la actividad citotóxica disminuye casi 20 veces al cambiar un grupo *p*-Br-fenilo por un fenilo no sustituido (Yoo et al., 1998).



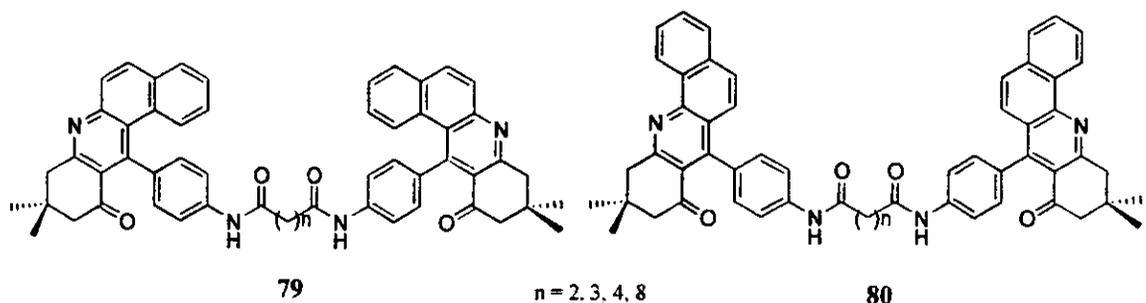
77 R=Br, IC<sub>50</sub>= 1.3μM (MKN 45)  
78 R=H, IC<sub>50</sub>= 22μM (MKN 45)

De esta forma **72** y **69**, darían información sobre la importancia de esa porción con respecto a **55** y **57**.

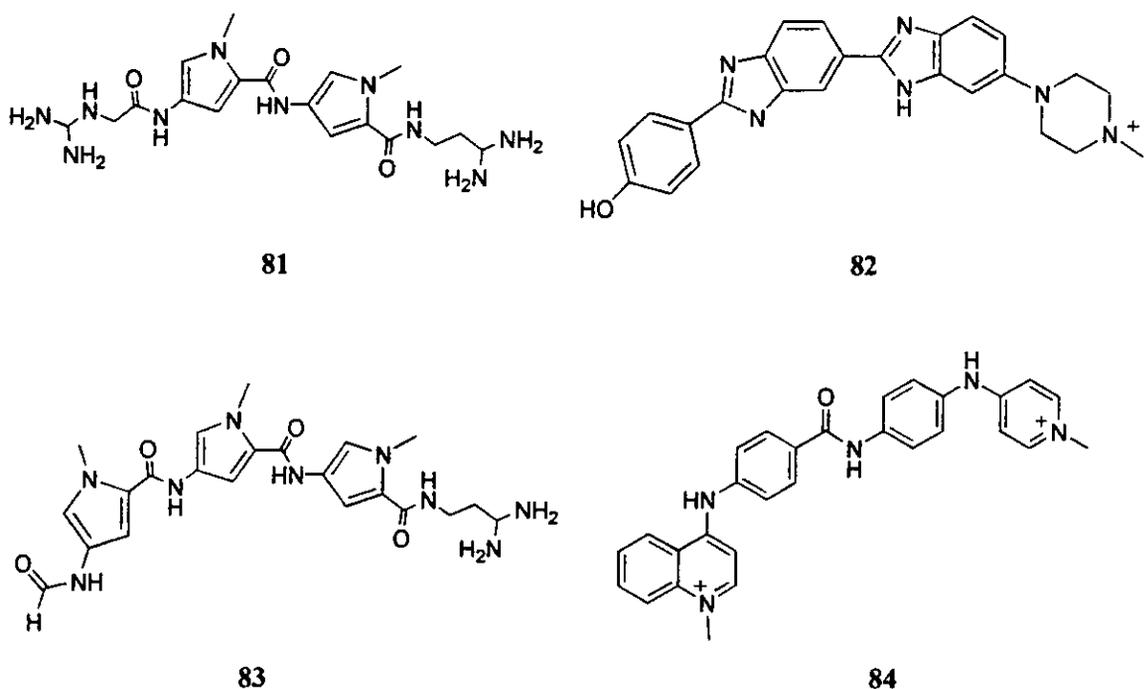
Asimismo se espera que el homodímero **73** también sea inactivo, pues, al igual que **59** y **61**, no sería capaz de interactuar enzimáticamente y su actividad se compararía con su análogo **72**.

Finalmente, los derivados **75**, fueron diseñados con la finalidad de aportar conocimiento relativo a la distancia que la cadena puente debe poseer. En un trabajo reciente, que

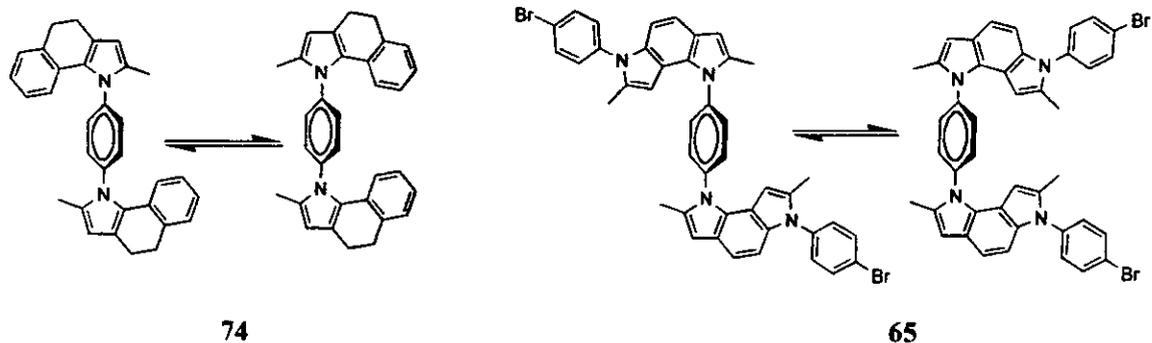
antecede a éste. se describió la síntesis y actividad citotóxica de las bis-benzoacridinonas **79** y **80** (Martínez et al., 2000), en donde se observó que algunos de estos compuestos eran activos y su actividad dependía de la cadena puente, que es la misma que posee **55**.



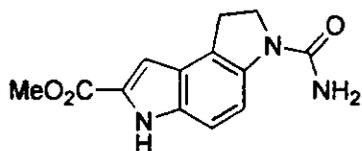
Cabe mencionar que esta cadena puente tiene características estructurales de reconocedor de surco y su analogía estructural con estos compuestos se puede apreciar cuando se compara con la netropsina **81**, Hoescht 33258 **82**, distamicina **83** y SN 6999 **84** (Wemer, 1997). De hecho la netropsina y la distamicina han sido utilizadas como cadena puente en bis-intercaladores (Elidáis et al., 1988).



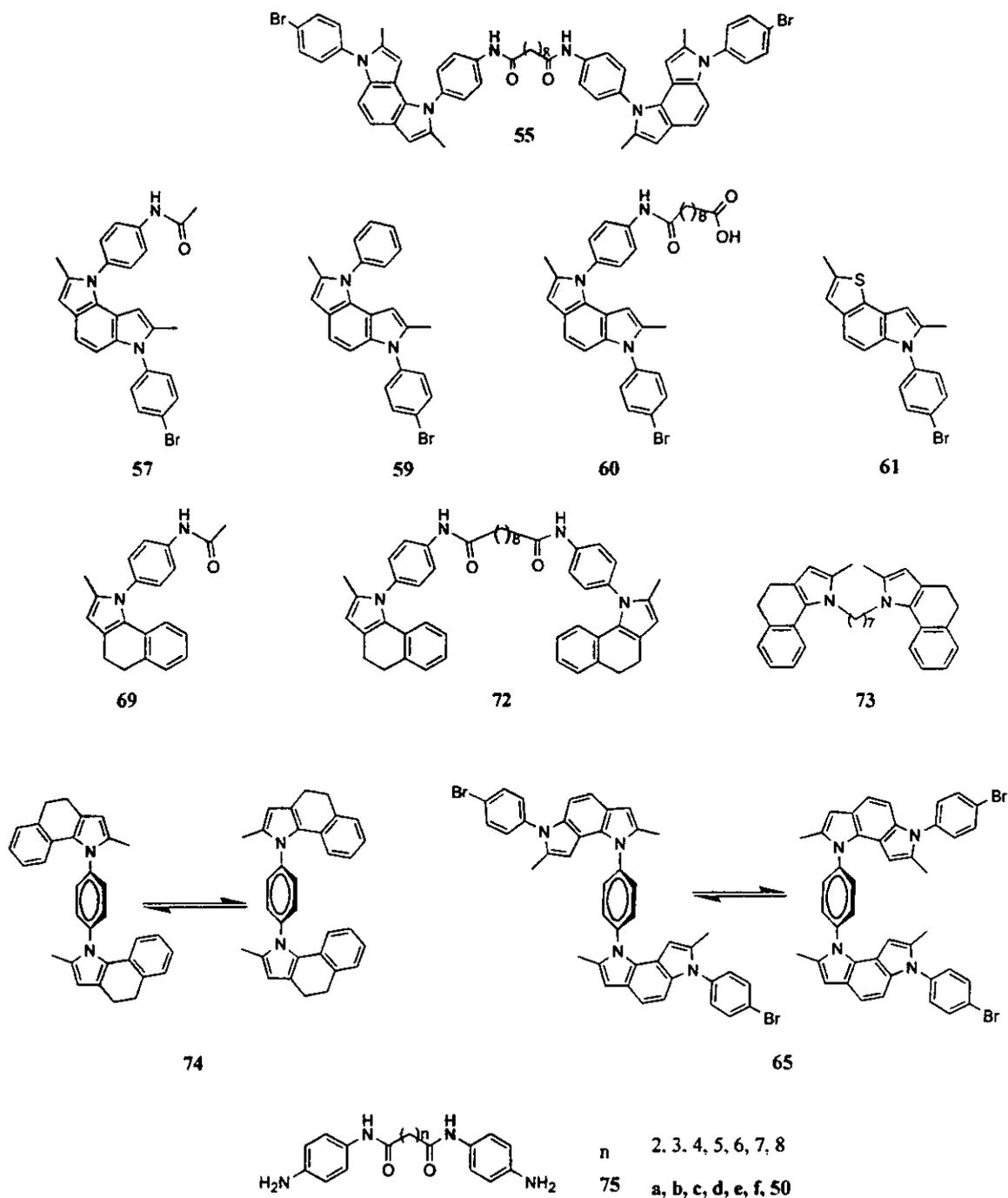
Por último, cabe señalar que los compuestos **74** y **65** son el resultado del interés por conocer su actividad ya que estos pueden actuar como intercaladores o bien como reconocedores de surco. Obviamente la bis-intercalación queda descartada.



El parecido estructural con reconocedores de surco es muy apreciable por ejemplo con **85** (Boger y Sakia, 1992).



**85**



**Figura 9.** Compuestos sometidos a evaluación de actividad citotóxica

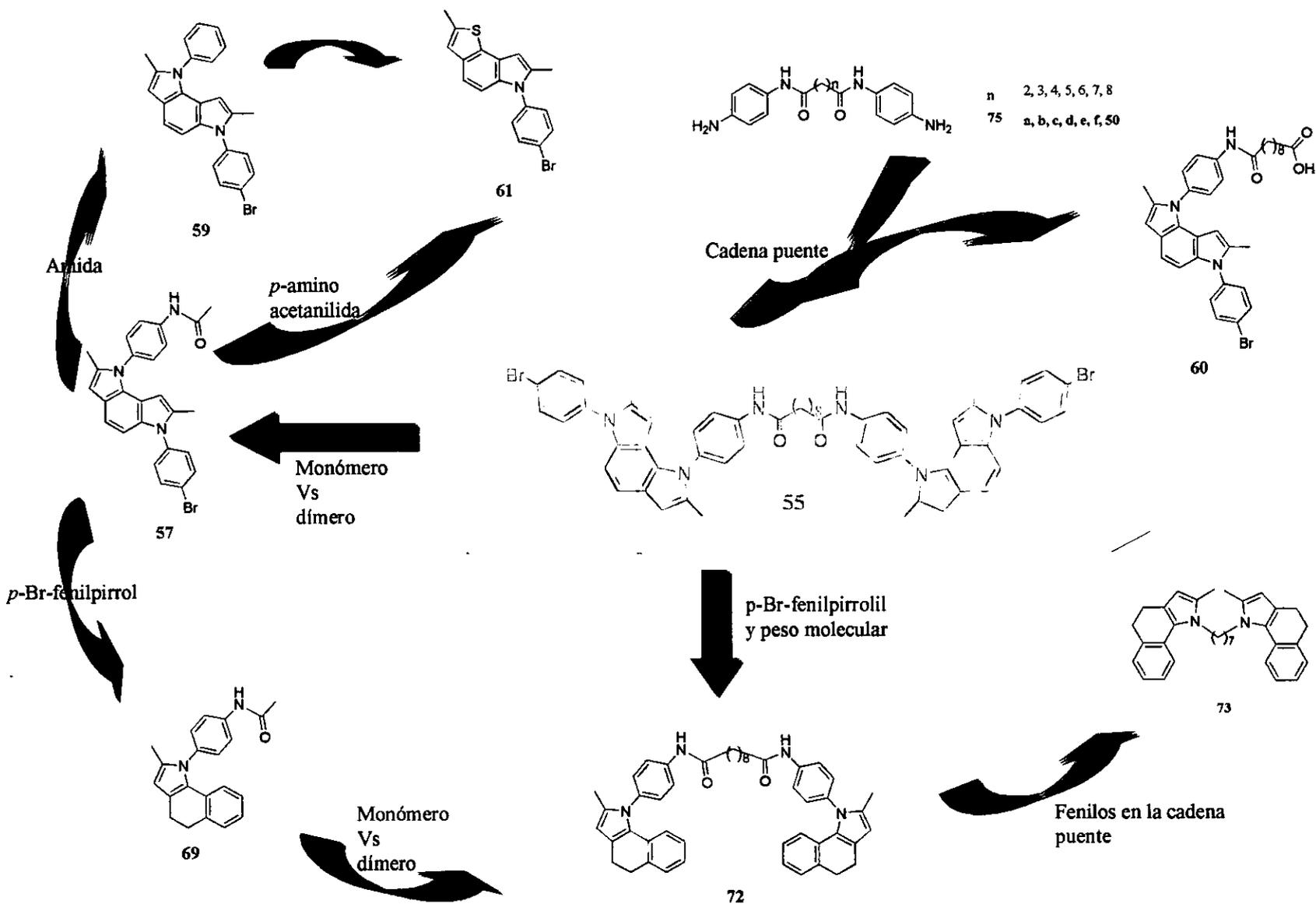


Figura 10. Información proporcionada por los cambios estructurales propuestos

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Las concentraciones utilizadas, para medir inhibición del crecimiento celular, fueron 3.1, 10, 31 y 100  $\mu\text{M}$ , siendo esta última la concentración más alta utilizada por el *National Cancer Institute* (NCI) para evaluar compuestos en un programa mundial (Boyd y Paull, 1995). Además de encontrarse descrito en un gran número de publicaciones relacionadas con el tema, el método utilizado en esta tesis para la evaluación de la actividad citotóxica de todos los compuestos fue el mismo utilizado por el NCI.

La caracterización de los compuestos evaluados como “activos” o “inactivos”, se ha adoptado, en este estudio, en función de la inhibición del crecimiento a la máxima concentración utilizada. Así, se consideran “inactivos” aquellos compuestos que a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  presentan menos del 50 % de inhibición del crecimiento. De la misma manera, con el fin de homogeneizar los resultados aquí obtenidos con respecto a los que arroja el NCI, cuando la  $\text{IC}_{50}$  se encuentra ligeramente mas alta a 100  $\mu\text{M}$ , el resultado se describe como: >100  $\mu\text{M}$ .

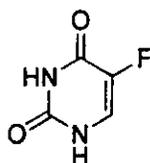
La primera evaluación citotóxica se llevó a cabo con el compuesto **61** en las líneas celulares NCI-H460 (pulmón), MCF7 (mama) y SF-268 (SNC).<sup>1</sup> El compuesto fue inactivo a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en las tres líneas celulares probadas.

Los resultados de la segunda evaluación citotóxica, que comprende a los derivados **55**, **57**, **59**, **69** y **65** se muestran en la tabla V.

**Tabla V .** Datos de actividad citotóxica de los compuestos **55, 57, 59, 69, 65**, daunomicina **1** y 5-fluorouracilo **86**.

Comp	P. M.	IC <sub>50</sub> [μM(±ds)]					
		PC-3 (Próstata)	U251 (SNC)	K562 (Leucemia)	Hep-2 (Hígado)	HCT-15 (Colon)	HeLa (Cérvico)
55	1026.90	>100	I	I	I	I	I
57	472.38	17.7 (2.5)	33.5 (2.4)	17.9 (7.9)	45.1 (4.6)	36.2 (1.6)	36.3 (5.2)
59	415.33	>100	I	I	I	I	I
69	752.54	>100	I	I	I	>100	I
65	316.40	25.3	>100	>100	I	I	>100
1	526	5X10 <sup>-5</sup>	1.8X10 <sup>-3</sup>	1.8X10 <sup>-2</sup>	1.5X10 <sup>-2</sup>	—	5X10 <sup>-9</sup>
86	118	1.14	2.05	0.85	1X10 <sup>-2</sup>	—	5X10 <sup>-9</sup>

I = Inactivo



**86**

El compuesto más activo fue **57**, el cual mostró actividad en todas las líneas celulares probadas con mejores resultados en PC-3. Todos los demás compuestos indicados en la tabla V mostraron cierto grado de citotoxicidad en la misma línea celular. La curva concentración-respuesta en esta línea mostró una tendencia similar en todos los compuestos probados.

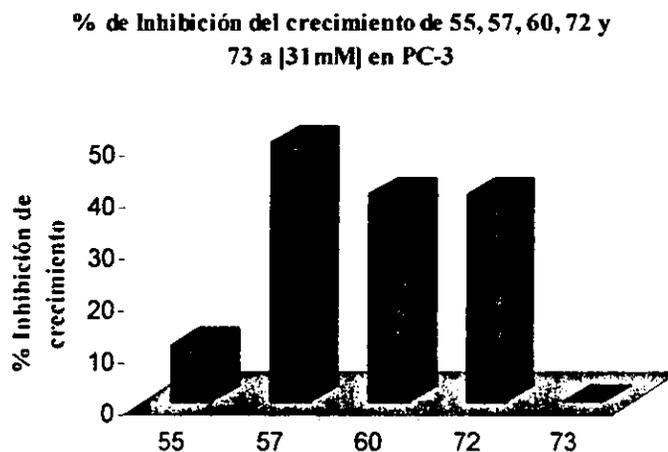
<sup>1</sup> Las líneas utilizadas en esta primer evaluación son diferentes a las que se discutirán posteriormente, ya que este ensayo fue llevado a cabo en el *National Cancer Institute*.

Como se mencionó, se esperaba que tanto el compuesto **59**, como **61** no mostraran actividad significativa por la ausencia de grupos capaces de llevar a cabo interacciones fuertes con enzimas, así que los resultados están de acuerdo con esta hipótesis.

Un resultado inesperado fue la notoria ausencia de citotoxicidad del homodímero **55**, aunque esta inactividad no es tan sorprendente si se considera su peso molecular, que se encuentra arriba de 1000. El hecho de que el monómero **57** tenga actividad pobre y que su bis análogo carezca de ella, indica que el peso molecular es una razón probable que influye en el comportamiento de **55**, ya que aunque hay fármacos que llegan a tener masa de cientos de kilo Daltones, como algunas proteínas, el intervalo apropiado es entre 100 y 1000 (Katzung, 1998).

Si se comparan los resultados de **57** y **59**, es claro que la acetamida es necesaria para la actividad citotóxica y, más aún, si la comparación es de **57** con **61**, queda claro que la 4'-acetanilida es una porción importante para la actividad. Adicionalmente, el grupo N-(4'-bromofenil)pirrolil parece incrementar la actividad, como puede apreciarse por la comparación en el comportamiento entre **57** y **69** en donde este último mostró poca actividad. Cabe señalar que **69** no está totalmente aromatizado, lo que puede afectar también la actividad.

Para corroborar que efectivamente es el peso molecular el que influye en la inactividad de **55**, se procedió a probar **72**. En efecto, este compuesto a una concentración 31  $\mu$ M mostró 40% de inhibición del crecimiento, mientras que a la misma concentración **55** solo mostró 11%. A esta misma concentración, **60** presentó 40% de inhibición mientras que **57** mostró 50%. Estos últimos datos fortalecen la hipótesis de que es el peso molecular y no la estructura lo que influye en la baja actividad de **55**. Finalmente, **73** fue totalmente inactivo, lo cual era también predecible. (Figura 11)



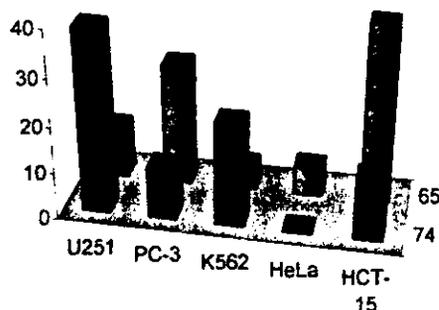
**Figura 11.** % de inhibición del crecimiento de 55, 57, 60, 72 y 73 en PC-3 a 31  $\mu$ M.

Por otra parte, **65** mostró, en el primer grupo de compuestos evaluados, actividad pobre en la línea PC-3 y muy baja o nula en el resto de las líneas probadas (Tabla V). Es conveniente reiterar que la actividad de este compuesto podría deberse a intercalación o a reconocimiento de surco y por lo tanto su actividad debe estar sujeta a las características estructurales de éstos, dependiendo de cuál sea su mecanismo de acción. También es importante recordar que la actividad puede estar sujeta a la conformación bioactiva. En estos puntos resultaría de gran ayuda medir también la actividad de **74**.

Hasta este punto, se ha establecido que el *p*-bromofenilo y la acetanilida son importantes en la actividad de estos compuestos, asimismo el peso molecular es también relevante. Haciendo un balance de estas características, y considerando que los compuestos discutidos anteriormente actúan a través de un mecanismo de acción similar, se podría predecir que la actividad de **74** sería menor que la de **65**. Asimismo puede existir un factor adicional digno de consideración que está relacionado con la diferencia estereoquímica de ambos

compuestos. Si se considera la premisa de que se requiere una conformación adecuada para la actividad citotóxica, se tiene que tomar en cuenta que **74** tiene una  $\Delta G$  de activación menor que **65**, lo que le permitiría a **74** tomar la conformación apropiada más fácilmente que **65**.

En la figura 12 se muestran los resultados de **74** y **65** a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ .



**Figura 12.** Comparación de la actividad citotóxica de **74** y **65**.

Sin embargo, aunque ambos compuestos presentan baja actividad, la diferencia es notoria: mientras **74** es superior en la línea U251, esto se invierte en HCT-15, en promedio, considerando la inhibición en las cinco líneas celulares, el porcentaje de inhibición del crecimiento es prácticamente igual (16%). De acuerdo a estos resultados es posible decir que: 1) La hipótesis manejada con respecto a la relación entre la conformación es parcialmente cierta (o falsa); o bien, 2) los compuestos **65** y **74** actúan mediante diferentes mecanismos de acción.

## ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS BIS-FENILALCANODIAMIDAS

Continuando con la serie de compuestos evaluados, se analiza el comportamiento de los compuestos **75**. La actividad citotóxica de estas bis-fenilalcanodiamidas en las líneas celulares PC-3, U251 y K562 se describe en la tabla VI:

**Tabla VI.** % de inhibición del crecimiento a una concentración de 31  $\mu\text{M}$  de **76**, **52**, **75** y **50**.

Comp. No.	R=R'	n	m. p.	PC-3	U251	K562
<b>76a</b>	NO <sub>2</sub>	2	286-288	0	0	<sup>2</sup>
<b>76b</b>	NO <sub>2</sub>	3	278-280	0	50	50.7
<b>76c</b>	NO <sub>2</sub>	4	280-285	0	>50	<sup>2</sup>
<b>76d</b>	NO <sub>2</sub>	5	206-208	5	23	<sup>2</sup>
<b>76e</b>	NO <sub>2</sub>	6	220-222	2	20	<sup>2</sup>
<b>76f</b>	NO <sub>2</sub>	7	155-158	>50	82	43.8
<b>52</b>	NO <sub>2</sub>	8	198-200	0	0	<sup>2</sup>
<b>75a</b>	NH <sub>2</sub>	2	232-234	16.8	15.4	67.4
<b>75b</b>	NH <sub>2</sub>	3	228-230	14.8	23.9	59.3
<b>75c</b>	NH <sub>2</sub>	4	238-240	4.7	23.9	51.6
<b>75d</b>	NH <sub>2</sub>	5	203-204	0	0	<sup>2</sup>
<b>75e</b>	NH <sub>2</sub>	6	211-212	21.3	20.5	54.2
<b>75f</b>	NH <sub>2</sub>	7	195-197	0	18.2	54.9
<b>50</b>	NH <sub>2</sub>	8	205-206	0	12.3	0

Como se ha mencionado a lo largo del texto, para el propósito de este análisis y por la estructura de estos compuestos, se considera que la actividad citotóxica de los derivados **75** es debida a la interacción con el ADN de tipo reconocedores de surco.

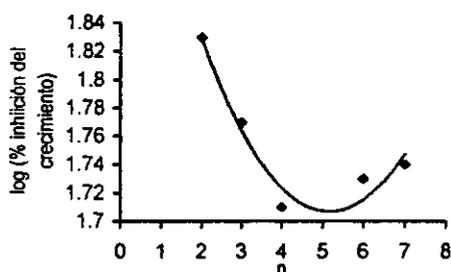
Aunque el grupo de los derivados nitrados **76** no estaba contemplado en el diseño, se decidió evaluar su actividad pues podrían enriquecer el estudio. En este grupo, los compuestos más activos fueron **76f** en PC-3 y U251 seguido por **76c** en U251. La IC<sub>50</sub> de **76f** fue 34.78 ( $\pm 5.9$ )  $\mu\text{M}$  en PC-3 y 3.84 ( $\pm 0.65$ )  $\mu\text{M}$  en U251 y la de **76c** de 32 ( $\pm 7$ )  $\mu\text{M}$  en U252. Aunque este resultado puede considerarse como “moderado”, estos compuestos son

<sup>2</sup> La actividad no fue evaluada.

mas activos que la distamicina A **83**, un reconocedor de surco conocido cuya  $IC_{50}$  en U251 es  $>100\mu M$ .

En lo que respecta al grupo de los derivados aminados **75a-f** y **50**, los compuestos **75a** ( $n=2$ ), **75b** ( $n=3$ ), **75c** ( $n=4$ ), **75e** ( $n=6$ ) y **75f** ( $n=7$ ) mostraron actividad moderada en K562 y prácticamente nula en las otras líneas. La actividad de **50** es anómala si se considera que la actividad se pierde al incrementar únicamente un metileno a la cadena con respecto a **75f**. Este grupo de compuestos, en contraste con el precedente, puede presentar interacciones intermoleculares con el ADN mediante puentes de hidrógeno entre las aminas aromáticas y los pares de bases del ADN ya sea directamente o a través de moléculas de agua.

La primer hipótesis que se viene en mente, dados los resultados, es que la inhibición del crecimiento es proporcional a la longitud de la cadena. sin embargo como se puede apreciar en los resultados (línea K562), en los primeros tres compuestos evaluados (**75a-c**) la actividad decrece y posteriormente se incrementa en los dos restantes (figura 13).



**Figura 13.** Tendencia de la citotoxicidad de **75** con respecto al número de metilenos en la línea celular K562.

La tendencia mostrada en la figura anterior no puede ser explicada únicamente en términos de solubilidad, longitud de la cadena o peso molecular, pues estos se incrementan

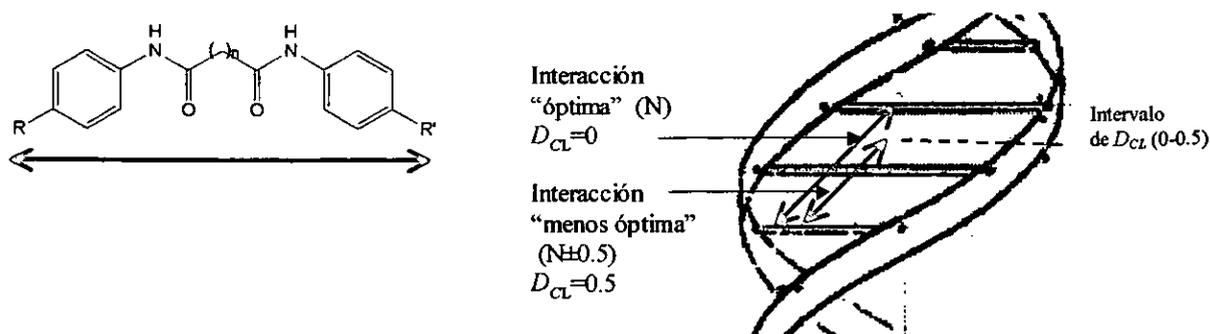
proporcionalmente conforme se aumenta el número de metilenos. Así, con la finalidad de explicar el comportamiento de esta serie, se llevó a cabo un estudio de relación estructura actividad cuantitativa (QSAR), no con fines de extrapolación, pues la cantidad de compuestos no lo permite, sino con fines de interpolación.

En un primer intento por llevar a cabo el estudio QSAR empleando el programa SciQSAR<sup>3</sup> se utilizaron 16 descriptores moleculares entre los que se incluyeron a los dependientes de la carga, de la estructura en términos tridimensionales, topológicos y lipofílicos. De estos 16 descriptores, la mayoría presentó correlación entre sí por lo que fueron descartados, mientras que con los restantes no se encontró una ecuación apropiada, por lo que se incorporó un nuevo descriptor molecular arbitrariamente denominado  $D_{CL}$ , relacionado con el reconocimiento topológico del ADN. Este descriptor fue obtenido a partir de la distancia de la molécula geoméricamente optimizada usando PM3 y la topología del ADN asumiendo que se requiere una distancia específica para un reconocimiento óptimo entre ambas moléculas. Cuantitativamente, fue obtenido de la siguiente manera:

La distancia entre los grupos amino, dividida entre  $4.202$  o  $3.4/\cos 36$  representa el número de pares de bases más uno que el ligante de surco debe reconocer, por lo tanto, si se resta el número entero más cercano al valor obtenido, el valor absoluto de la diferencia resultante será la separación relativa de reconocimiento y abarcará un intervalo de 0 a 0.5 siendo la interacción “más óptima” cero y la “menos óptima” de 0.5. Lo anterior puede ser apreciado en la figura 14 y en la *ecuación 1*.

---

<sup>3</sup> SciQSAR, versión 3.0. SciVision. Inc. (1998).



**Figura 14.** Representación esquemática de la interacción de las bis-(4-aminofenil)alcanodiamidas 74.

$$D_{CL} = |(\text{Distancia } \text{NH}_2\text{-NH}_2/4.202) - N| \quad \text{Ecuación 1}$$

En donde: N = número entero más cercano.

Considerando este descriptor, que es la primera vez que se refiere, fue posible llevar a cabo el estudio QSAR y formular una expresión matemática apropiada. La *ecuación 2* se consideró la más adecuada y contiene un descriptor topológico ( $D_{CL}$ ), de polarizabilidad/volumen (Sp.Pol) y de carga (ABSQ).

$$\text{Log (\%crecimiento)} = -20.55 \times 10^{-2} D_{CL} + 70.92 \times 10^{-2} \text{ABSQ} + 29.617 \text{SpPol} - 2.107 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$n = 5, r^2 = 0.99, F = 31782_{(1,3)}, \alpha < 0.05, s = 0.045$$

en donde:

$D_{CL}$  (ver *ecuación 1*)

$\text{ABSQ} = \sum_i |Q_i|$ , donde  $Q_i$  representa la carga en el átomo  $i$ ,

$\text{SpPol} = \sum_A |\alpha_A|/\text{Vol}$ , donde  $\alpha_A$  = promedio de la polarizabilidad atómica para el átomo A y Vol = volumen molecular.

La adecuada correlación entre la *ecuación 2* y los resultados experimentales se muestra en la tabla VII.

**Tabla VII.** Comparación de la actividad calculada, por la *ecuación 2*, Vs experimental

Comp	Log (%Inhibición)			$D_{CL}$	ABSQ	Sp.Pol
	Exp.	Calc.	$\Delta$ ( $\times 10^{-4}$ )			
75a	1.8286	1.8287	1	0.00939	4.496668	0.122193
75b	1.7730	1.7728	2	0.17833	4.560416	0.121323
75c	1.7126	1.7127	1	0.40287	4.663736	0.120606
75e	1.7339	1.7340	1	0.18722	4.875879	0.11932
75f	1.7395	1.7396	1	0.30619	5.268802	0.119391

Como puede apreciarse en la tabla VII, la actividad citotóxica calculada por la *ecuación 2*, concuerda bastante bien con la determinada experimentalmente. De acuerdo a esta ecuación se puede decir que la relación entre la distancia del entrecruzador de surco y el número de pares de bases están relacionados entre sí, ya que la primera es fundamental para el reconocimiento con el ADN ya sea, directamente, mediante puentes de hidrógeno con los pares de bases o, indirectamente, a través de moléculas de agua. Más aún, el descriptor  $D_{CL}$  tiene participación negativa en términos matemáticos, por lo que entre mayor sea el valor de este descriptor menor será el logaritmo del porcentaje de inhibición.

También resulta interesante que los descriptores que se encuentran en la *ecuación 2* están en concordancia con el mecanismo de acción de los entrecruzadores de surco: la carga ( $ABSQ$ ) y la polarizabilidad ( $SpPol$ ) están relacionados con interacciones repulsivas o atractivas con los surcos del ADN y el volumen contribuye con el atracamiento (docking) de la molécula.

Como se ha mencionado, la cadena puente de los bis-intercaladores tiene las características de reconocedor de surco e interacciona de manera similar con el ADN. Los resultados aquí expuestos, con respecto a 75a-75f, se pueden extrapolar a la cadena puente de bis-intercaladores y, dado su alto parecido estructural, a la cadena puente de los homodímeros estudiados en esta tesis; aunque es necesario considerar dos diferencias importantes:

En primer término las bis-4-aminofenilalcanodiamidas **75a-75f** reconocen al ADN a lo largo de toda la molécula entrecruzadora, mientras que la superficie de reconocimiento en la cadena puente está sujeta a la geometría que el bis-intercalador adopte una vez formado el complejo.

En segundo lugar, los grupos amino en los extremos de las alcanodiamidas analizadas juegan un papel importante en la afinidad, pero cuando estos se sustituyen por los intercaladores, la afinidad por el material genético está principalmente controlada por estos últimos.

Por estas razones, resulta difícil utilizar cuantitativamente el descriptor  $D_{CL}$  en bis-intercaladores del ADN mientras no se cuente con datos de la geometría de la intercalación, así sean simulados, tanto de los homodímeros diseñados y sintetizados en este trabajo, como los que se encuentran reportados en la literatura con distancias variables en el espaciador o cadena puente. Sin embargo, como otros tantos datos obtenidos en esta tesis, éste resulta enriquecedor y podrá en un momento dado aplicarse en el diseño de bis-intercaladores del ADN. Hasta este momento lo que sí queda claro es que la distancia en la cadena puente del homodímero **55** es importante en la actividad citotóxica y que ésta tiene actividad citotóxica *per se*.

---

## C O N C L U S I O N E S

---

1 La estrategia propuesta para llevar a cabo la obtención del homodímero **55** resultó ser muy adecuada, ya que dadas las modificaciones que se tuvieron que realizar, entre ellas la incorporación de diferentes sustituyentes en los nitrógenos del núcleo pirroloindólico con respecto al diseño original, la síntesis del compuesto deseado se hubiese complicado si se siguiese cualquiera de las otras rutas descritas. La estrategia utilizada en este trabajo, resulta apropiada para ser utilizada en la síntesis de este tipo de sistemas y se puede extrapolar para sintetizar análogos estructurales del dímero obtenido. Una ventaja adicional es que el material de partida (1,3-ciclohexanodiona) es simple y económico y tan solo se requieren 7 pasos para llegar al producto final. Estos puntos se aplican no solamente en la síntesis del homodímero **55**, sino además al resto de los compuestos pirroloindólicos y, más aún, en los derivados de la  $\alpha$ -tetralona, en donde el número de pasos se reduce a cinco.

2 La estrategia de diseño dio como resultado un homodímero pirroloindólico que fue poco activo frente a las líneas celulares probadas; sin embargo, su contraparte monomérica si presentó actividad que, aunque pobre en términos prácticos, es bastante aceptable si se considera que fue un compuesto activo entre 10 análogos estructurales sintetizados y probados.

3 Con los datos presentados en esta tesis, no es posible concluir que el mecanismo de acción molecular de estos compuestos sea la intercalación del ADN, pero dadas las características estructurales de los mismos, dicho mecanismo sí es factible. Aun demostrando que estos compuestos intercalan en el ADN, faltaría demostrar si llegan al núcleo celular, y si el mecanismo de citotoxicidad se daría en ese lugar. Ahora bien, suponiendo que eso ocurre, no se pueden descartar otros mecanismos de inhibición enzimática. Cabe mencionar que las antraciclinas, entre ellos la daunomicina que es probablemente el intercalador más importante por su actividad y uso, además de ser

intercaladores e inhibidores de la topoisomerasa presentan otros mecanismos de citotoxicidad como son efectos en membrana y daño a ADN mediante óxido-reducción (Rajski, 1998). La confirmación definitiva del mecanismo de acción compete a otras disciplinas.

4 De la comparación de actividad citotóxica de los compuestos evaluados, queda claro que no basta el triciclo, sino también la acetanilida y el *p*-Br-fenilo para que estos sistemas presenten actividad citotóxica.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

---

P A R T E  
E X P E R I M E N T A L

M E T O D O L O G Í A Q U Í M I C A

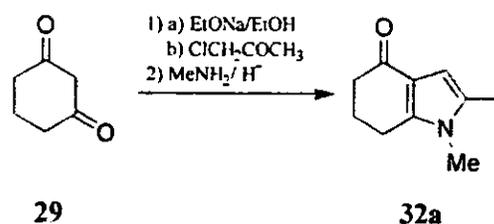
---

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Melt-temp II y se dan sin corregir. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro Nicolet FT Magna-IR 750. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN  $^1\text{H}$ ) y resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ) se obtuvieron en los equipos Varian Gemini 200 (200 MHz) y UNITY 300 (300 MHz); se utilizó  $\text{CHCl}_3\text{-d}$  como disolvente a menos que otro se indique; los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm) y se utilizó tetrametil silano (TMS) como referencia interna.

La espectrometría de masas se obtuvo en un espectrómetro de masas Jeol JMS AX505HA de doble enfoque empleándose la técnica de impacto electrónico y FAB.

Las separaciones cromatográficas se efectuaron en sílica gel 60 de malla 70-230 y la cromatografía en capa fina se realizó sobre cromatoplasmas de aluminio revestidas de sílica gel y se revelaron con yodo, sulfato cérico o con luz ultravioleta.

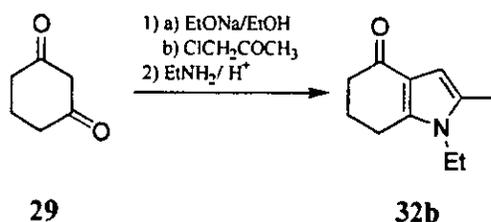
## 1.2-Dimetil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-4-oxo-indol 32a.



A un matraz de bola equipado con barra de agitación y puesto en baño de hielo, se le adicionan 50 ml. de etanol anhidro y 0.2 g de sodio. Esta mezcla se pone en agitación en atmósfera de nitrógeno hasta que el sodio reacciona totalmente. Posteriormente se le adiciona 1 gramo de 1,3-ciclohexanodiona (8.33 mmol) y la mezcla se deja en agitación por otras dos horas, para posteriormente adicionarle, a la misma temperatura, 0.76 ml de cloroacetona. Después de 7 horas de agitación en baño de hielo, se evapora el etanol a presión reducida y se obtiene una mezcla viscosa anaranjada. Esta mezcla de reacción se disuelve en 10 ml de tolueno en un matraz de bola equipado con tapón septum y dos cánulas, una para alimentar la mezcla con metilamina gaseosa y la otra dirigida a un matraz con solución de ácido clorhídrico. Se hace burbujear lentamente la metilamina por 30 minutos a la mezcla en agitación y baño de hielo. La solución obtenida se extrae con agua; la fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evapora a sequedad. Después de separación cromatográfica en sílica gel, usando como eluyente hexano:acetato de etilo 2:3, se obtiene un sólido amarillento que fue caracterizado como la indolona 32a.

IR (Película) 1641 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.14 (q, J = 4.5 Hz, 2H), 2.07 (d, J = 0.9 Hz, 3H), 2.44 (t, J = 4.5 Hz, 2H), 2.71 (t, J = 4.5 Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 6.25 (c, J = 0.9 Hz, 1H); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 12, 22, 23.6, 30.3, 37.7, 103, 119.5, 130.6, 143.6, 193.8; EM (IE): m/z 163 (M<sup>+</sup>, 100).

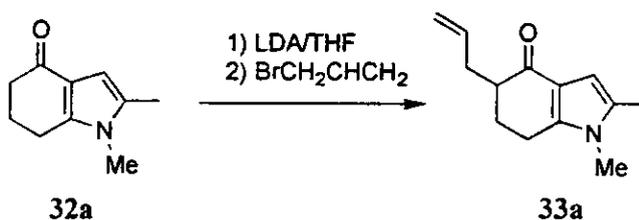
## 1-Etil-2-metil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-4-oxo-indol 32b.



A un matraz de bola equipado con barra de agitación y puesto en baño de hielo. se le adicionan 50 ml de etanol anhidro y 0.2 g de sodio; esta mezcla se pone en agitación en atmósfera de nitrógeno hasta que el sodio reacciona totalmente. Posteriormente se le adiciona 1 g de 1,3-ciclohexanodiona (8.33 mmol) y la mezcla se deja en agitación por otras dos horas. para posteriormente adicionarle, a la misma temperatura, 0.76 ml de cloroacetona. Después de 7 horas de agitación en baño de hielo, se evapora el etanol a presión reducida y se obtiene una mezcla viscosa anaranjada. Esta mezcla de reacción se disuelve en 10 ml de tolueno en un matraz de bola, se le adiciona una cantidad catalítica de ácido *p*-toluensulfónico y 4 ml de etilamina 2M en THF, la mezcla se somete a agitación magnética en baño de hielo. La solución obtenida se extrae con agua; la fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evapora a sequedad. Después de separación cromatográfica en sílica gel usando como eluyente hexano:acetato de etilo 1:2, se obtiene un solido blanquecino, con un 65 % de rendimiento. que fue caracterizado como la indolona **32b**.

IR (Película) 1638 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.29 (t, J= 7.3 Hz, 3H), 2.16 (q, J = 6.28 Hz, 2H), 2.23 (d, J = 1.02 Hz, 3H), 2.41 (m, 2H), 2.74 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 3.83 (c, J = 7.2 Hz, 2H), 6.25 (c, J = 0.9 Hz, 1H); EM (IE): m/z 177 (M<sup>+</sup>, 100).

#### 1-2-Dimetil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-4-oxo-5-(3-propenil)-indol **33a**.

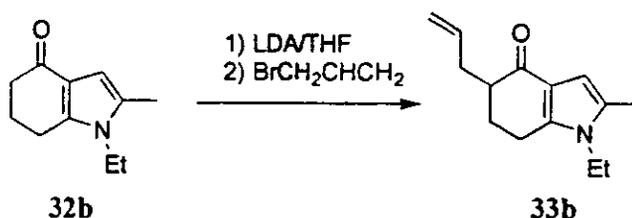


En un matraz de bola de 20 ml provisto con una barra de agitación magnética, conteniendo 5 ml de THF, puesto en baño de hielo seco-acetona, con atmósfera de nitrógeno se le adicionan 0.083 ml (0.6 mmol) de diisopropilamina y se deja enfriar por 5 min. mas para adicionarle 0.375 ml (0.6 mmol) de *n*-butilitio 1.6 M; esta solución se deja en agitación a la misma temperatura por otros 20 min. Posteriormente se le adicionan 0.1 g (0.6 mmol) de la tetrahidroindolona **32a** disueltos en 5 ml de THF anhidro y la mezcla se mantiene en agitación y a la misma temperatura por 2 h, para posteriormente adicionarle 0.207 ml de bromuro de alilo dejándolo en agitación por 4 h. Al final de este periodo, se le adicionan 5 ml de solución saturada de cloruro de amonio

y se lleva a cabo una extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad total. El material viscoso obtenido se separa por cromatografía en columna usando como eluyente hexano:acetato de etilo 1:1. Se obtiene **33a** como un sólido amarillento con rendimiento de 70%.

IR (Película)  $1638\text{ cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.9 (m, 1H), 2.21 (d,  $J = 1.2$  Hz, 3H), 2.2 (m, 2H), 2.4 (m, 1H), 2.68 (m, 1H), 2.7 (m, 1H), 2.73 (t, 1H), 3.41 (s, 3H), 5.05 (m, 2H), 5.83 (m, 1H), 6.25 (c,  $J = 1.2$  Hz, 1H); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.1, 20.8, 28, 30.2, 34.1, 45.7, 103.3, 116.3, 119.1, 130.7, 137.1, 142.8, 194.8; EM (IE):  $m/z$  203 ( $\text{M}^+$ , 100).

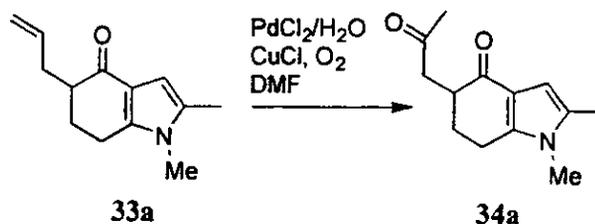
### 1-Etil-2-metil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-4-oxo-5-(3-propenil)-indol **33b**.



Se utilizó el mismo método que el descrito para la obtención de **33a**.

IR (Película)  $1650\text{ cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.28 (t,  $J = 7.24$  Hz, 3H), 1.91 (m, 1H), 2.19 (m, 2H), 2.22 (d,  $J = 0.86$  Hz, 3H), 2.4 (m, 1H), 2.69 (m, 1H), 2.76 (m, 2H), 3.82 (c,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 5.06 (m, 2H), 5.84 (m, 1H), 6.24 (c,  $J = 0.86$  Hz, 1H); RMN  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  11.9, 15.8, 20.7, 28.1, 34.1, 38.5, 45.7, 103.6, 116.3, 119.3, 129.9, 137, 142.2, 194.8; EM (IE):  $m/z$  217 ( $\text{M}^+$ , 75).

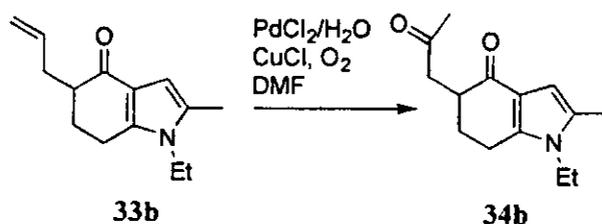
### 1-2-Dimetil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-4-oxo-5-(2-oxopropil)-indol **34a**.



En un matraz de bola de 20 ml se colocan 5 ml de DMF y se suspenden 0.02 g de  $\text{PdCl}_2$  (0.049 mmol), 0.049 g (0.49 mmol) de  $\text{CuCl}$  y 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Esta suspensión se pone en agitación en atmósfera de oxígeno por 20 h o hasta que la mezcla tome una coloración café claro, para posteriormente adicionarle 0.1 g (0.49 mmol) de la indolona **33a**. La mezcla se mantiene en agitación y atmósfera de oxígeno a temperatura ambiente por 4

h: pasado este periodo y confirmando desaparición de materia prima por cromatografía en placa fina, la suspensión se percola en una columna (3 cm de diámetro x 20 cm de largo) empacada con algodón usando como eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A la solución obtenida se le hacen extracciones sucesivas con agua (7 a 10) y la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad para dar lugar a un sólido oscuro. mismo que se purifica por cromatografía en columna para dar lugar a **34a** con 69 % de rendimiento. IR (Película)  $1647, 1717 \text{ cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.87 (m, 1H), 2.19 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.32 (dd,  $J = 17.1, 7.5 \text{ Hz}$ , 1H), 2.6 (t,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 1H). 2.75 (m, 2H), 2.95 (m, 1H), 3.18 (dd,  $J = 17.1, 5.1 \text{ Hz}$ , 1H), 3.39 (s, 3H), 6.21 (s, 1H); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12, 20.8, 21.9, 29.8, 30.2, 30.5, 42.6, 103.2, 118.9, 130.9, 143.1, 194.8, 208; EM (IE):  $m/z$  219 ( $\text{M}^+$ , 100).

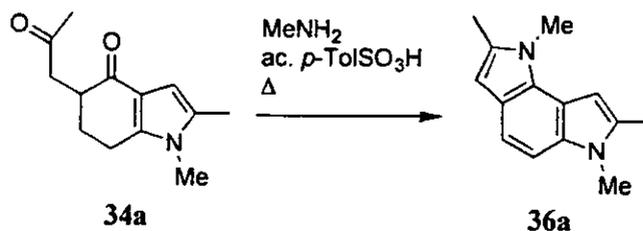
#### 1-Etil-2-metil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-4-oxo-5-(2-oxopropil)-indol **34b**.



Se utilizó el mismo método que el descrito para la obtención de **33a**.

IR (Película)  $1649, 1709 \text{ cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.28 (t,  $J = 12 \text{ Hz}$ , 3H), 1.9 (m, 1H), 2.21 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.32 (dd,  $J = 17.5, 7 \text{ Hz}$ , 1H), 2.8 (t,  $J = 6.6 \text{ Hz}$ , 1H), 2.8 (m, 2H), 2.97 (m, 1H), 3.21 (dd,  $J = 17.5, 5.1 \text{ Hz}$ , 1H), 3.82 (c,  $J = 12 \text{ Hz}$ , 2H), 6.2 (s, 1H); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  11.9, 15.8, 21.8, 29.7, 29.9, 30.5, 38.5, 42.6, 43.6, 103.6, 119, 130, 142.3, 193.8, 208; EM:  $m/z$  233 ( $\text{M}^+$ , 100).

#### 1,2,6,7-tetrametil-pirrolo[2,3-*e*]indol **36a**.

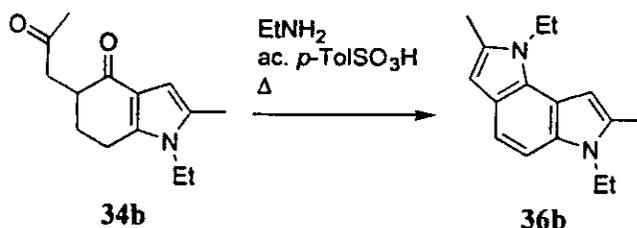


0.5 g del compuesto dicarbonílico **34a** y una cantidad catalítica de ácido *p*-toluensulfónico se disuelven en 20 ml de tolueno en un matraz de bola equipado con

tapón septum y dos cánulas. una para alimentar la mezcla con metilamina gaseosa y la otra dirigida a un matraz con solución de ácido clorhídrico. Se hace burbujear lentamente la metilamina por 30 minutos a la mezcla en agitación y baño de hielo. La solución obtenida se extrae con agua; la fase orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra la solución y se somete a reflujo por 2 h. Finalmente el disolvente se evapora a sequedad. Después de separación cromatográfica en sílica gel usando como eluyente hexano:acetato de etilo 8:2, se obtiene un sólido blanquecino, inestable en gel de sílice, que fue caracterizado como **36a**.

IR (Película)  $1438, 2930\text{ cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.42 (d,  $J = 0.9\text{ Hz}$ , 3H), 2.46 (d,  $J = 0.9\text{ Hz}$ , 3H), 2.88 (s, 3H), 2.88 (s, 3H), 3.7 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 6.26 (c,  $J = 0.9\text{ Hz}$ , 1H), 6.53 (m, 1H), 6.99 (dd,  $J = 8.7, 1.2\text{ Hz}$ , 1H), 7.27 (d,  $J = 8.5\text{ Hz}$ , 1H); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.7, 12.8, 29.7, 95.9, 100.2, 102.5, 113.35; EM (IE):  $m/z$  212 ( $\text{M}^+$ , 100).

### 1,6-Dietil-2,7-dimetil-pirrolo[2,3-e]indol **36b**.

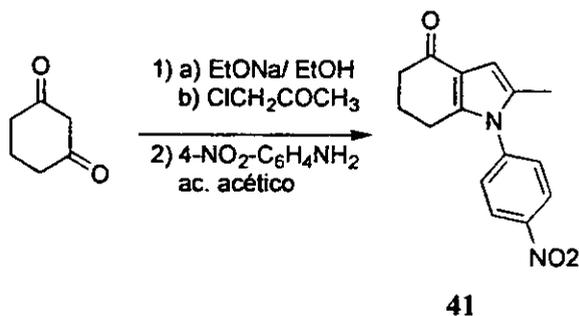


A un matraz de bola de 50 ml provisto de agitación magnética, se le adicionan 10 ml de tolueno y se disuelven en él 0.5 g (2.14 mmol) de **34b**, la mezcla se deja en agitación en baño de hielo por 10 minutos y se le adicionan 4.7 ml (10 mmol) de etilamina 2M disuelta en THF; la mezcla de reacción se mantiene en agitación magnética en baño de hielo por 30 minutos, pasado ese periodo, se pone a refluir por 8 h. La mezcla obtenida se extrae con lavados de agua, se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad. Se obtiene un aceite negro del cual se obtiene **36b** por cromatografía en columna con un 40 % de rendimiento.

IR (Película)  $1439, 2927, 2975\text{ cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.36 (t,  $J = 6.9\text{ Hz}$ , 3H), 1.44 (t,  $J = 7\text{ Hz}$ , 3H), 2.44 (d,  $J = 0.9\text{ Hz}$ , 3H), 2.48 (d,  $J = 0.8\text{ Hz}$ , 3H), 4.17 (c,  $J = 7\text{ Hz}$ , 2H), 4.34 (c,  $J = 7\text{ Hz}$ , 2H), 6.2 (c,  $J = 0.9\text{ Hz}$ , 1H), 6.44 (s, 1H), 7.02 (d,  $J = 8.4$

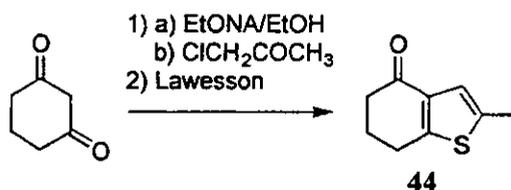
Hz, 1H), 7.28 (d, J = 8.5 Hz, 1H); RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  12.4, 12.6, 15.3, 16, 38, 39.2, 96.2, 100.5, 102.6, 112.6, 113.4, 120.4, 128.9, 131.6, 133; EM (IE):  $m/z$  240 ( $\text{M}^+$ , 100).

**1-(4'-nitrofenil)-2-metil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-4-oxo-indol 41.**



El primer paso de la reacción corresponde al mismo utilizado para la obtención de 32a; una vez obtenido el producto de alquilación, éste se coloca en un matraz de bola de 100 ml, al cual se le adicionan 15 ml de ácido acético, 1.5 g de bentonita, 1 g de 4-nitroanilina. La mezcla de reacción se pone a reflujo, utilizando como fuente de calor una lámpara de luz infrarroja, con agitación por 2 h; pasado este periodo se elimina el ácido acético a presión reducida y el líquido viscoso obtenido se lava con solución de bicarbonato de sodio al 7%. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad. La mezcla obtenida se separa por cromatografía en columna para dar lugar a 41 como un sólido anaranjado en un 55 % de rendimiento. P. f. 209-210 °C. IR (Película)  $1667\text{ cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.1 (s, 3H), 2.11 (m, 2H), 2.5 (m, 2H), 2.57 (m, 2H), 6.44 (s, 1H), 7.45 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 8.41 (d, J = 8.9 Hz, 2H); EM (IE):  $m/z$  270 ( $\text{M}^+$ , 100).

**2-Metil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-4-oxo-bezotiofeno 44.**

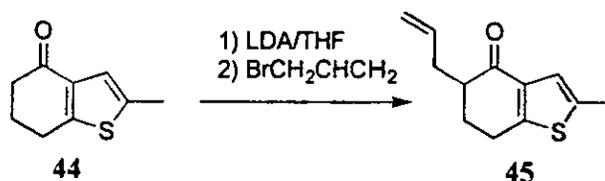


El primer paso de la reacción corresponde al mismo utilizado para la obtención de 32a. Una vez obtenido éste, se mezcla, en un matraz de bola equipado con refrigerante y

agitación magnética. se colocan 0.8 g de reactivo de Lawesson en 6 ml de benceno:dimetoxietano 5:1. La mezcla de reacción se pone en agitación a 45 °C por 3 h y transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente a sequedad. La mezcla se separa en columna cromatográfica usando hexano:acetato de etilo como eluyente en proporción 2:1 respectivamente. Se obtiene un aceite amarillento correspondiente a **44**, con un rendimiento de 60 %.

IR (Película) 1673  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2.15 (m, 2H), 2.19 (d,  $J = 1.32$  Hz, 3H), 2.47 (m, 2H), 2.83 (t,  $J = 6.26$ Hz, 2H), 7.06 (m, 1H); EM (IE):  $m/z$  270 ( $\text{M}^+$ , 100).

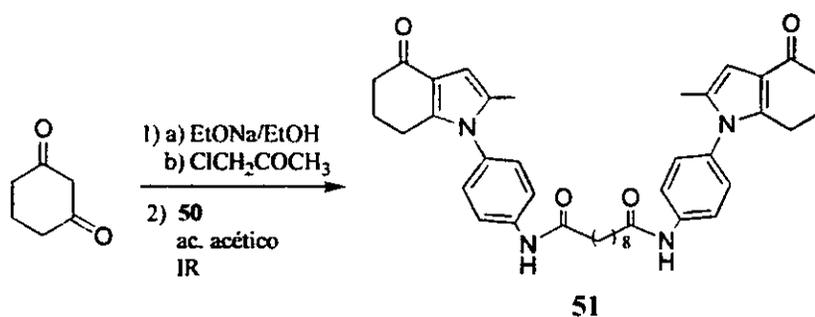
### 2-Metil-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-4-oxo-5-(3-propenil)-bezotiofeno **45**.



En un matraz de bola de 20 ml provisto con una barra de agitación magnética, conteniendo 5 ml de THF, puesto en baño de hielo seco-acetona, con atmósfera de nitrógeno se le adicionan 0.4 ml (3.31 mmol) de diisopropilamina y se deja enfriar por 5 minutos más para adicionarle 2.4 ml de *n*-butilitio 1.6 M; esta solución se deja en agitación a la misma temperatura por otros 20 minutos. Posteriormente se le adicionan 0.5 g de **44** disueltos en 5 ml de THF anhidro y la mezcla se mantiene en agitación y a la misma temperatura por 2 h, para posteriormente adicionarle 0.62 ml (7.26 mmol) de bromuro de alilo dejándolo en agitación por 4 h. Al final de este periodo, se le adicionan 5 ml de solución saturada de cloruro de amonio y se lleva a cabo una extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad total. El material viscoso obtenido se separa por cromatografía en columna usando como eluyente hexano:acetato de etilo 1:1. Se obtiene **45** como un aceite amarillento con punto de fusión  $< 10$  °C, con rendimiento de 50%.

IR (Película) 1675  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.9 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 2.19 (d,  $J = 1.34$  Hz, 3H), 2.2 (m, 1H), 2.41 (m, 2H), 2.7 (m, 1H), 2.85 (m, 1H), 5.04 (m, 1H), 5.11 (m, 1H), 5.82 (m, 1H), 7.06 (m, 1H); EM (IE):  $m/z$  206 ( $\text{M}^+$ , 100).

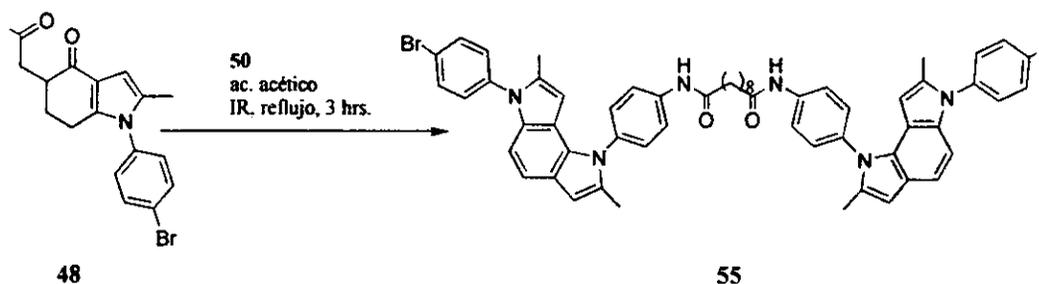
N,N'-[1-(4'-fenil)-2-metil-4,5,6,7-tetrahidro-1H-4-oxo-indolil]octanodiamida 51



El primer paso de la reacción corresponde al mismo utilizado para la obtención de 32a; 0.5 g del aceite viscoso anaranjado obtenido, se disuelve en 15 ml de ácido acético y a la mezcla se le adicionan 0.54 g (2.97 mmol) de la diamina 50 y 0.75 g de bentonita. La mezcla de reacción se pone a reflujo, utilizando como fuente de calor una lámpara de luz infrarroja, con agitación por 2 h; pasado este periodo se elimina el ácido acético a presión reducida y el líquido viscoso obtenido se lava con solución de bicarbonato de sodio al 7%. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad. La mezcla obtenida se separa por cromatografía en columna para dar lugar a 51 como un sólido amarillo en un 40 % de rendimiento.

IR (Película) 1623, 3309  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.65 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 2.31 (m, 3H), 2.2 (m, 2H), 2.5 (m, 1H), 6.18 (s, 1H), 7.3 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.75 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 10.19 (s, 1H); EM (FAB+):  $m/z$  646 ( $M^+$ ).

Ácido bis-({4-[6-(4-bromofenil)-2,7-dimetil-6H-1,6-diaza-as-andacen-1-il]-fenil}amida) 55

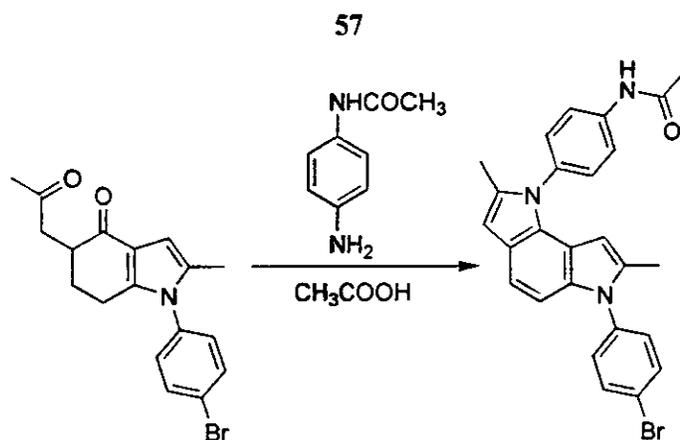


A una solución en agitación de 0.1 g (0.28 mmol) de la dicetona 48 disuelta en 10 ml de ácido acético a 80 C, se le adicionan 0.057 g (0.15 mmol) de la diamina 50 y la mezcla se mantiene en agitación. Después de una hora de reacción a temperatura de reflujo, el

ácido acético se neutraliza con solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 5% y se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y el disolvente se evapora a sequedad. Después de separación por cromatografía en columna hexano/acetato de etilo como eluyente. se obtiene 55 como un sólido verde con un 17 % de rendimiento.

P.f. 188-190 °C; IR ( $\text{CHCl}_3$ ),  $\nu$  3436, 3003, 1695, 1517; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.63 (m, 4 H), 1.77 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.43 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 5.56 (s, 1H), 6.4 (s, 1H), 6.83 (s,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.19 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.39 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.62 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.74 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H); RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  13.12, 13.21, 28.96, 29.08, 29.69, 37.73, 98.33, 101.78, 104.08, 113.27, 113.95, 120.1, 121.26, 128.3, 129.29, 129.43, 129.75, 130.04, 132.56, 133.66, 133.91, 135.17, 137.62, 137.83, 171.7; EM-AR calc. para  $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{Br}_2\text{N}_6\text{O}_2$  (FAB $^+$ ) 1026.8966. encontrado 1026.8962.

1-(4 $^\circ$ -(N-acetamida)fenil)-2,7-dimetil-6-(4 $^\circ$ -bromofenil)-pirrolo[2,3-e]indol

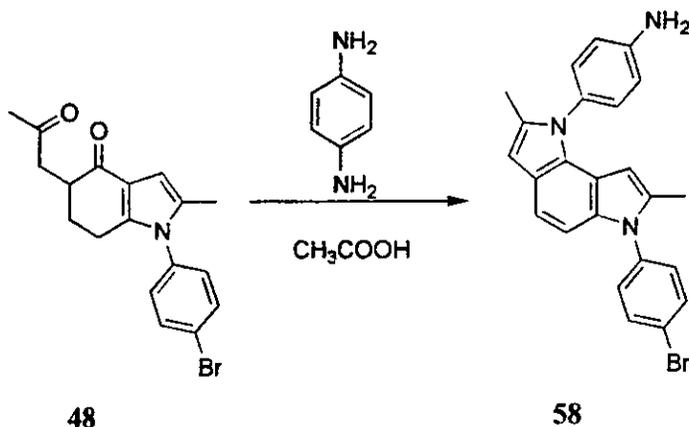


Se utilizó la misma técnica que en la obtención de 55 pero la amina en relación equimolar con respecto a 48.

P.f.130-132 °C (63 % rendimiento); IR ( $\text{CHCl}_3$ )  $\nu$  3437, 2927, 1693, 1516; RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.14 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.26 (d,  $J = 0.92$  Hz, 3H), 5.54 (s, 1H), 6.41 (c,  $J = 0.92$  Hz, 1H), 6.83 (dd,  $J = 8.56, 0.64$  Hz, 2H), 7.21 (d,  $J = 8.66$  Hz, 2H), 7.26 (d,  $J = 8.62$  Hz, 2H), 7.39 (dd,  $J = 8.6, 0.64$  Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.64$  Hz, 2H), 7.72 (d,  $J = 8.58$  Hz, 2H); RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  13.12, 13.21, 24.66, 98.33, 101.78, 104.08, 113.27, 113.95, 120.1, 121.26, 128.3, 129.29, 129.43, 129.75, 130.04, 132.56,

133.66, 133.91, 135.17, 137.62, 137.83, 168: EM-AR cal. para  $C_{26}H_{22}BrN_3O$  (FAB+) 472.3765, encontrado 472.3767.

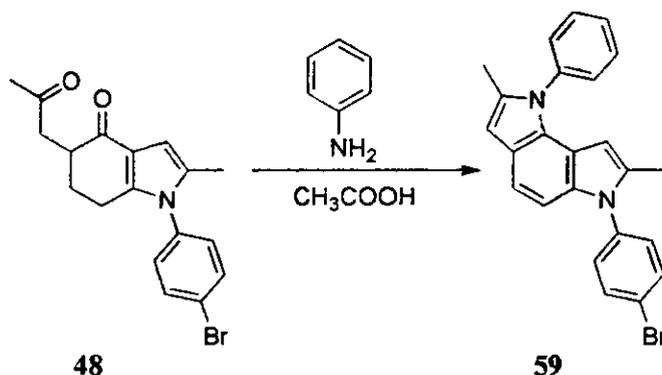
1-(4'-aminofenil)-2,7-dimetil-6-(4'-bromofenil)-pirrolo[2,3-e]indol 58.



En un matraz de bola de 50 ml, provisto de barra de agitación magnética, se colocan 15 ml de ácido acético y se disuelven 0.5 g (1.65 mmol) de la dicetona **48**. La mezcla se pone a reflujo suave y se le adiciona 0.178 g (1.65 mmol) de 1,4-fenilendiamina. La mezcla se mantiene en reflujo y agitación por 30 minutos y posteriormente se extrae el ácido acético con lavados sucesivos con agua y  $CHCl_2$  y otro más con solución de  $NaHCO_3$  al 7 % y  $CHCl_2$ . La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad. La mezcla se purifica por cromatografía en columna utilizando hexano:acetato de etilo (2:3) como eluyente obteniendo **58** como un sólido blanco.

IR ( $CHCl_3$ ) 1492, 3399  $cm^{-1}$ ; RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  2.15 (d,  $J = 0.9$  Hz, 3H), 2.25 (d,  $J = 0.9$  Hz, 3H), 3.6 (banda ancha, intercambia con  $D_2O$ , 2H), 5.6 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H), 6.37 (d,  $J = 0.9$  Hz, 1H), 6.55 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 9$ Hz), 7.21 (d,  $J = 8.4$  Hz, 4H), 7.25 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.62 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H).

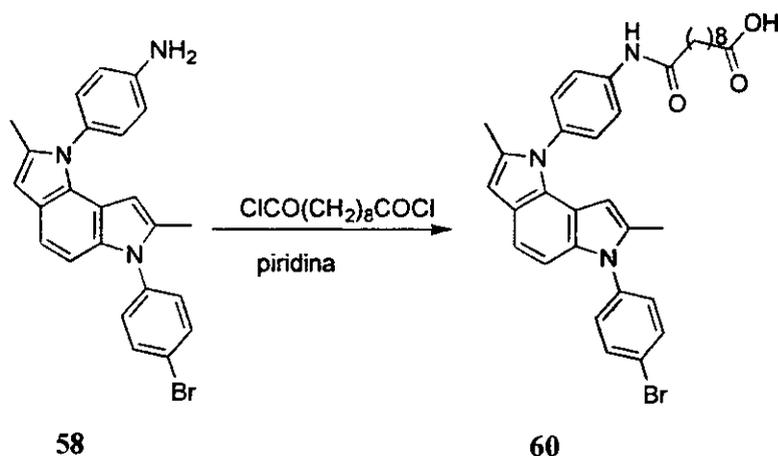
1-(4'-fenil)-2,7-dimetil-6-(4'-bromofenil)-pirrolo[2.3-e]indol 59



Se utilizó la misma técnica que en la descrita para la obtención de 57.

P.f.105-107 °C; (70 % rendimiento); IR  $\nu$  2924, 1595, 1495;RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  2.13 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 5.48 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.84 (dd,  $J = 8.52, 0.81$  Hz, 2H), 7.21 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.28 (d,  $J = 8.52$  Hz, 2H), 7.46 (dd,  $J = 7.95, 1.78$  Hz, 2H), 7.56 (dd,  $J = 7.9, 7.2$  Hz, 2H), 7.57 (d,  $J = 7.14$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.79$  Hz, 2H);RMN  $^{13}\text{C}$   $\delta$  13.15, 13.24, 98.23, 101.68, 104.03, 112.5, 113.89, 121.22, 128.06, 128.9, 129.18, 129.73, 132.54, 133.61, 133.84, 135.11, 137.59, 139.57; EM-AR cal. para  $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{Br}$  ( $\text{FAB}^+$ ) 414.0732. encontrado 414.0734.

Ácido ( {4-[6-(4-bromofenil)-2,7-dimetil-6H-1,6-diaza-as-andacen-1-il]-fenil} amida)decanodioico 60

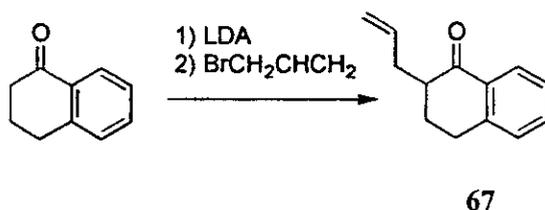


En un matraz de bola de 5 ml provisto con barra de agitación magnética, se disuelven en 2.5 ml de piridina anhidra 0.1g (0.23 mmol) de 58 y se ponen en agitación a temperatura

ambiente. A la solución, se le adiciona 0.05 ml (0.23 mmol) de cloruro de sebacoilo disueltos en acetona y la mezcla de reacción se deja en agitación por 14 h. Posteriormente esta mezcla se vierte en un matraz Erlen Meyer, se le agrega CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lleva a cabo una extracción con agua. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad. El sólido obtenido se purifica por cromatografía en columna con hexano:acetato de etilo (2:3) y se obtiene un sólido blanco correspondiente a **60**.

IR (Película) 1708, 3313 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1.35 (m, 8H), 1.63 (m, 2H), 1.77 (m, 2H), 2.13 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.29 (m, 2H), 2.42 (t, J = 7.14 Hz, 2H), 5.56 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 6.82 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.21 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.25 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.5 Hz), 7.55 (s, 1H), 7.61 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.74 (d, J = 8.4 Hz, 2H); EM (FAB+): m/z 613 (M<sup>+</sup>).

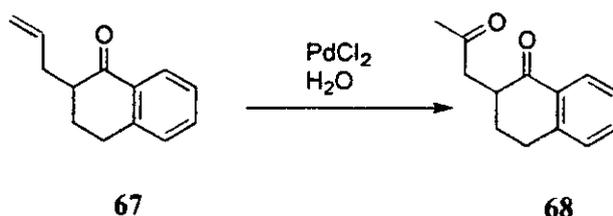
### 2-Alil-3,4-dihidro-2H-naftalen-1-ona **67**



En un matraz de bola de 20 ml provisto con una barra de agitación magnética, conteniendo 5 ml de THF, puesto en baño de hielo seco-acetona, con atmósfera de nitrógeno se le adicionan 0.96 ml (6.8 mmol) de diisopropilamina y se deja enfriar por 5 min. más para adicionarle 4.27 ml (6.84 mmol) de *n*-butilitio 1.6 M; esta solución se deja en agitación a la misma temperatura por otros 20 minutos. Posteriormente se le adicionan 1 g (6.84 mM) de la  $\alpha$ -tetralona disueltos en 5 ml de THF anhidro y la mezcla se mantiene en agitación y a la misma temperatura por 2 h, para posteriormente adicionarle 2.35 ml (27.4 mM) de bromuro de alilo dejándolo en agitación por 4 h. Al final de este periodo, se le adicionan 5 ml de solución saturada de cloruro de amonio y se lleva a cabo una extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad total. El material viscoso obtenido se separa por cromatografía en columna usando como eluyente hexano:acetato de etilo 9:1. Se obtiene **67** como un aceite viscoso incoloro que solidifica en baño de hielo.

P.f. <25°C; (80% rendimiento) IR (película) 3072, 2930, 1683; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.87 (m, 1H), 2.26 (m, 2H), 2.55 (m, 1H), 2.76 (m, 1H), 2.99 (dd, J = 7.5, 4.5 Hz, 2H), 5.06 (m, 1H), 5.11 (dc, J = 15, 2.1 Hz, 1H) 5.85 (m, 1H), 7.23 (dd, J = 7.5, 0.6 Hz, 1H), 7.29 (td, J = 7.2, 0.6 Hz, 1H), 7.45 (td, J = 7.2, 1.5 Hz, 1H), 8.03 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H), RMN <sup>13</sup>C δ 27.96, 28.61, 34.04, 47.19, 116.79, 126.57, 127.45, 128.69, 132.53, 133.17, 136.21, 144.04, 119.40; EM-AR Calc. para C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O (FAB<sup>+</sup>) 186.1045, encontrado 186.1052.

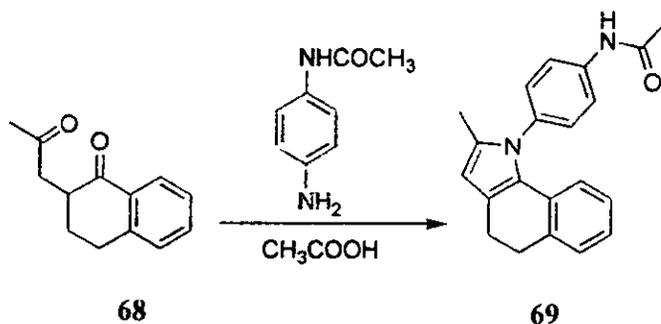
2-(2-Oxo-propil)-3,4-dihidro-2H-naftalen-1-ona **68**



En un matraz de bola de 20 ml se colocan 5 ml de DMF y se suspenden 0.246 g de PdCl<sub>2</sub> (1.38 mmol) y 1 ml de H<sub>2</sub>O. Esta suspensión se pone en agitación para posteriormente adicionarle 0.5 g (1.38 mmol) de **67**. La mezcla se mantiene en agitación y atmósfera de oxígeno a temperatura ambiente por 12 h; pasado este periodo y confirmando desaparición de materia prima por cromatografía en placa fina, la suspensión se percola en una columna (3 cm de diámetro x 20 cm de largo) empacada con algodón usando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. A la solución obtenida se le hacen extracciones sucesivas con agua (7 a 10) y la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad para dar lugar a un sólido oscuro, mismo que se purifica por cromatografía en columna para dar lugar a **68** con 65 % de rendimiento.

P.f. 90 °C; (65% rendimiento) IR (Película) ν 2933, 1715, 1682; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.92 (ddd, J = 25.8, 12.9, 4.41 Hz, 1H), 2.19 (m, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.45 (m, 1H), 2.95 (dt, J = 16.8, 2.76 Hz, 1H), 3.11 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 3.18 (dd, J = 19.5, 6 Hz, 1H), 7.25 (t, J = 7.68 Hz, 1H), 7.29 (t, J = 7.71 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 7.68, 1.38 Hz, 1H), 8.0 (dd, J = 7.68, 1.35 Hz, 1H); RMN <sup>13</sup>C δ 29.35, 29.45, 30.47, 43.82, 44.18, 126.58, 127.36, 128.72, 132.17, 133.35, 144.07, 199, 207.14; EM (IE<sup>+</sup>), m/z 202 (M<sup>+</sup> 19).

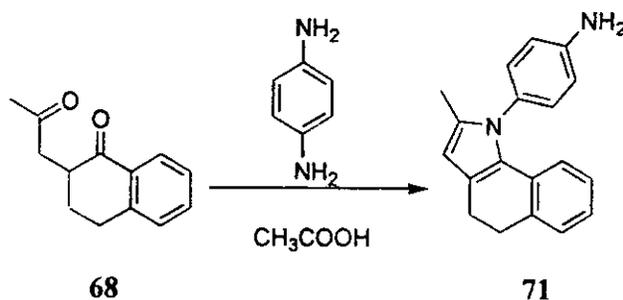
N-[4-(2-Metil-4,5-dihidro-benzo[g]indol-1-il)-fenil]acetamida **69**



Se utilizó la misma metodología que en la obtención de **59**.

P. f. 195-197 °C; (81 % rendimiento); IR (CHCl<sub>3</sub>)  $\nu$  3437, 2935, 1695, 1516; RMN <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  2.08 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.69 (t, J = 8 Hz, 2H), 2.91 (t, J = 8 Hz, 2H), 5.94 (s, 1H), 6.29 (dd, J = 7.46, 1.56 Hz, 1H), 6.79 (td, J = 7.42, 1.56 Hz, 1H), 6.89 (td, J = 7.42, 1.5 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 7 Hz, 1.56 Hz, 1H), 7.26 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.63 (d, J = 8.8 Hz, 2H); RMN <sup>13</sup>C  $\delta$  12.89, 22.46, 24.67, 30.88, 106.4, 120.05, 120.29, 122.48, 123.93, 125.92, 128.06, 128.77, 129.77, 132.06, 135.54, 135.88, 137.49, 168.36; EM-AR cal. para C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>ON<sub>2</sub> (IE<sup>+</sup>) 316.1576, encontrado 316.1570.

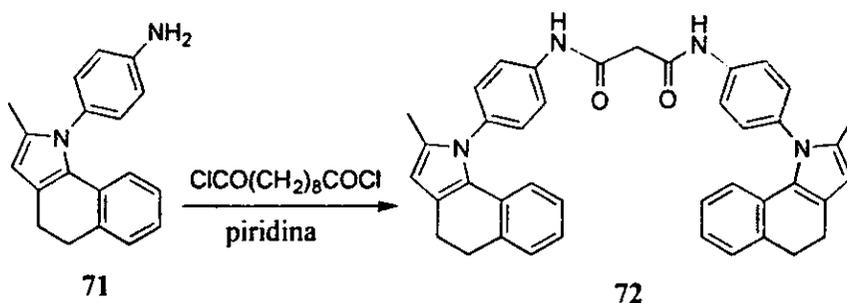
N-[4-(2-Metil-4,5-dihidro-benzo[g]indol-1-il)-fenil]amina **71**



Se utilizó la misma metodología que para la obtención de **58**.

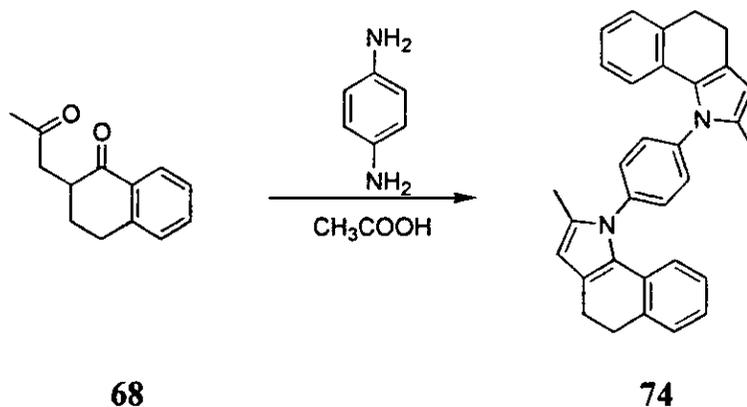
IR (Película) 1518, 3364, 3460 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  2.06 (s, 3H), 2.67 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.89 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.8 (señal ancha, intercambia con D<sub>2</sub>O, 2H), 5.9 (s, 1H), 6.4 (dd, J = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 6.76 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.82 (td, J = 7.2, 1.8 Hz, 1H), 6.88 (td, J = 7.4, 1.8 Hz, 1H), 7.07 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.13 (dd, J = 7.4, 1.7 Hz, 1H); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  12.8, 22.5, 31, 105.8, 115.5, 120, 121.8, 123.7, 125.9, 128, 129, 132.2, 135.5, 146; EM (IE): m/z 274 (M<sup>+</sup>, 100).

Ácido bis-([4-(2-Metil-4,5-dihidro-benzo[g]indol-1-il)-  
fenil]amida)decanodioico 72



En un matraz de bola de 5 ml provisto con barra de agitación magnética, se disuelven en 2.5 ml de piridina anhidra 0.05g (0.18 mmol) de 71 y se ponen en agitación a temperatura ambiente. A la solución, se le adiciona 0.02 ml (0.09 mmol) de cloruro de sebacoilo disueltos en acetona y la mezcla de reacción se deja en agitación por 14 h. Posteriormente esta mezcla se vierte en un matraz Erlen Meyer, se le agrega  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se lleva a cabo una extracción con agua. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad. El sólido obtenido se purifica por cromatografía en columna con hexano:acetato de etilo y se obtiene un sólido blanco correspondiente a 72. IR (Película)  $\nu$  1665, 3300  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.32 (m, 4H), 1.75 (m, 2H), 1.34 (d,  $J = 1.2$  Hz, 3H), 2.35 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.67 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 2.9 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 5.92 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H), 6.3 (d,  $J = 7.5$ , 1H), 6.79 (td,  $J = 7.5$ , 1.8 Hz, 2H), 6.88 (td,  $J = 7.5$ , 1.8 Hz, 1H), 7.13 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.24 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 9$  Hz, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.64 (d,  $J = 9$  Hz, 4H).

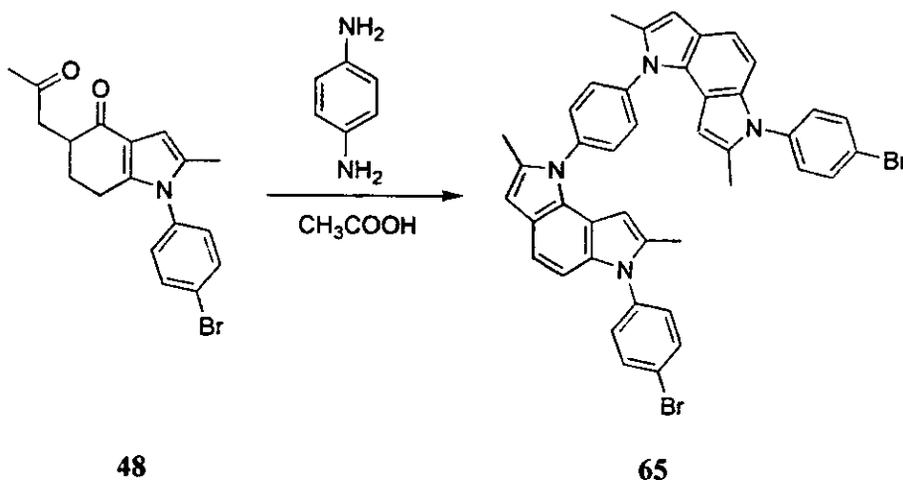
1,4-bis-(2-Metil-4,5-dihidro-benzo[g]indol-1-il)benzeno 74



Se utilizó la misma metodología que en la obtención de 65.

IR (CHCl<sub>3</sub>) 1516, 2937 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.16 (s, 3H), 2.7 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 2.99 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 5.99 (s, 1H), 6.3 y 6.56 (s's anchos, 1H), 6.82 y 6.94 (s's anchos, 1H), 6.94 (m, 1H), 7.19 (m, 1H), 7.42 (s, 2H); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 12.9, 22.5, 30.9, 106.9, 120, 123, 124.6, 125.8, 128.2, 129.3, 129.7, 135.7, 139.6; EM (IE): m/z 440 (M<sup>+</sup>, 100).

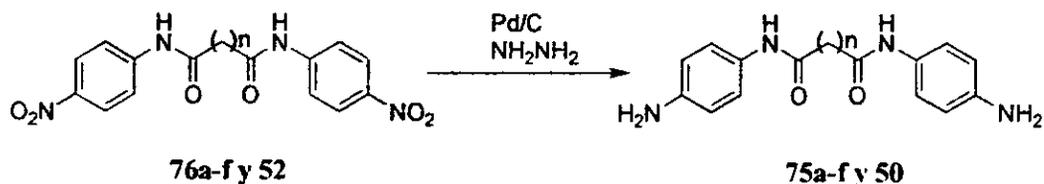
### 1,4-bis-[6-(4-bromo-fenil)-2,7-dimetil-6H-1,6-diaza-as-andacen-1-il] 65



En un matraz de bola de 50 ml, provisto de barra de agitación magnética, se colocan 15 ml de ácido acético y se disuelven 0.5 g (1.65 mmol) de la dicetona 48. La mezcla se pone a reflujo suave y se le adiciona 0.089 g (0.88 mmol) de 1,4-fenilendiamina. La mezcla se mantiene en reflujo y agitación por 30 minutos y posteriormente se extrae el ácido acético con lavados sucesivos con agua y CHCl<sub>2</sub> y otro más con solución de NaHCO<sub>3</sub> al 7 % y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad. La mezcla se purifica por cromatografía en columna utilizando hexano:acetato de etilo (3:2) como eluyente obteniendo 65 como un sólido amarillo.

IR (CHCl<sub>3</sub>) 1492, 2926 cm<sup>-1</sup>; RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.18 (s, 3H), 2.4 y 2.46 (s,s 3H), 5.62, 5.92 (s's, 1H), 6.5 (s, 1H), 6.89 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.68 (s, 2H); RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 13.4, 29.7, 98.4, 102.4, 104.3, 113.2, 121.4, 121.5, 129.7, 132.6, 133.7, 135.3, 137.5; EM (FAB<sup>+</sup>): m/z 752.

**N,N'-(4,4'-diaminofenil)alcanodiamidas 75a-f y 50.**



En un matraz de bola, provisto con agitación magnética, se colocan 10 ml de etanol, 0.046 g de Pd/C 5%, 0.818 ml (25.9 mmol) de hidracina, 0.93 ml de agua y 2.59 mmol del compuesto nitrado. La mezcla se somete a reflujo por 2 h y el sólido resultante se filtra y recristaliza en metanol para dar lugar al compuesto diaminado.

75a. p. f. 232.234 °C, 92%. RMN <sup>1</sup>H δ 2.52 (s, 4H), 4.78 (s, 4H), 6.47 (d, J = 9 Hz, 4H), 7.20 (d, J = 9 Hz, 4H), 9.51 (s, 2H).

75b. p. f. 228.230 °C, 94%. RMN <sup>1</sup>H δ 1.83 (c, J = 7 Hz, 2H), 2.25 (t, J = 7 Hz, 4H), 4.79 (s, 4H), 6.47 (d, J = 10 Hz, 4H), 7.20 (d, J = 10 Hz, 4H), 9.44 (s, 2H).

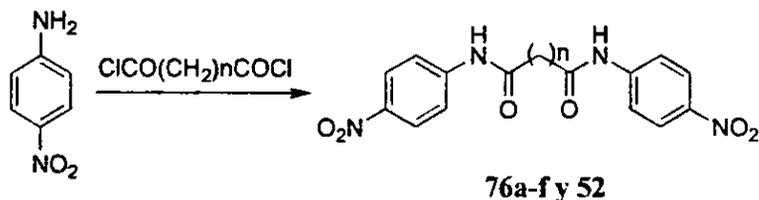
75c. p. f. 238-240 °C, 93%. RMN <sup>1</sup>H δ 1.56 (t, J = 7 Hz, 4H), 2.21 (t, J = 7 Hz, 4H), 4.81 (s, 4H), 6.46 (d, J = 9 Hz, 4H), 7.19 (d, J = 9 Hz, 4H), 9.43 (s, 2H).

75d. p. f. 203-204 °C, 83%. RMN <sup>1</sup>H δ 1.26-1.31 (m, 2H), 1.55 (c, J = 7 Hz, 4H), 2.19 (t, J = 7 Hz, 4H), 4.79 (s, 4H), 6.46 (d, J = 9 Hz, 4H), 7.17 (d, J = 9 Hz, 4H), 9.40 (s, 2H).

75e. p. f. 211-212 °C, 87%. RMN <sup>1</sup>H δ 1.25-1.35 (m, 4H), 1.56 (c, J = 7 Hz, 4H), 2.2 (t, J = 7 Hz, 4H), 4.74 (s, 4H), 6.47 (d, J = 9 Hz, 4H), 7.19 (d, J = 9 Hz, 4H), 9.39 (s, 2H).

75f. p. f. 195-197 °C, 88%. RMN <sup>1</sup>H δ 1.25-1.3 (m, 6H), 1.54 (c, J = 7 Hz, 4H), 2.19 (t, J = 7 Hz, 4H), 4.79 (s, 4H), 6.46 (d, J = 9 Hz, 4H), 7.18 (d, J = 9 Hz, 4H), 9.39 (s, 2H).

**N,N'-(4,4'-dinitrofenil)alcanodiamidas 76a-f y 52.**



A una solución 1.44 mmol de 4-nitroanilina en 15 ml de acetona, en baño de hielo, se le adicionan 0.72 mmol de cloruro de diacilo. Después de 2 h de agitación, la mezcla se

filtra y el sólido obtenido se lava con acetona y agua para dar lugar al compuesto dinitrado correspondiente.

76a. p. f. 286-288 °C, 18%, RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  2.75 (s, 2H), 2.32 (s, 2H), 7.8 (d,  $J = 9$  Hz, 4H), 8.19 (d,  $J = 9$  Hz, 4H), 10.65 (s, 2H).

76b. p. f. 278-280 °C, 59%, RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  1.92 (c,  $J = 7$  Hz, 2H), 2.45 (t,  $J = 7$  Hz, 4H), 7.8 (d,  $J = 9$  Hz, 4H), 8.18 (d,  $J = 9$  Hz, 4H), 10.52 (s, 2H).

76c. p. f. 280-285 °C, 63%, RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  1.64 (c,  $J = 6$  Hz, 4H), 2.42 (c,  $J = 6$  Hz, 4H), 7.82 (d,  $J = 9$  Hz, 4H), 8.19 (d,  $J = 9$  Hz, 4H), 10.53 (s, 2H).

76d. p. f. 206-208 °C, 57%, RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  1.34 (m, 2H), 1.62 (c,  $J = 7$  Hz, 4H), 2.38 (t,  $J = 7$  Hz, 4H), 7.79 (d,  $J = 8$  Hz, 4H), 8.16 (d,  $J = 8$  Hz, 4H), 10.46 (s, 2H).

76e. p. f. 220-222 °C, 49%, RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  1.26-1.38 (m, 4H), 1.60 (c,  $J = 7$  Hz, 4H), 2.37 (t,  $J = 7$  Hz, 4H), 7.8 (d,  $J = 9$  Hz, 4H), 8.17 (d,  $J = 9$  Hz, 4H), 10.46 (s, 2H).

76f. p.f. 155-158 °C, 52%. RMN  $^1\text{H}$   $\delta$  1.24-1.36 (c,  $J = 7$  Hz, 6H), 1.58 (c,  $J = 7$  Hz, 4H), 2.36 (t,  $J = 7$  Hz, 4H), 7.81 (d,  $J = 9$  Hz, 4H), 8.18 (d,  $J = 9$  Hz, 4H), 10.46 (s, 2H).

---

P A R T E  
E X P E R I M E N T A L

E N S A Y O S   D E   C I T O T O X I C I D A D

---

La actividad citotóxica del compuesto tiofenindólico **59**, fue medida en el *National Cancer Institute*, mientras que los ensayos de citotoxicidad del resto de los compuestos, se llevaron a cabo en el laboratorio de Pruebas de Actividad Biológica del Instituto de Química de la UNAM y por personal del mismo, empleando el mismo método utilizado por el *National Cancer Institute* (Skehan, 1990; Monks, 1991) que se describe brevemente a continuación. En placas de 96 pozos, se depositan aprox. 7500 células por pozo en suspensión y se incuban por 24 h a 37 °C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se les agregan 100 µL de la solución de los compuestos a probar diluidos en DMSO y se incuban por 48 h más a la concentración que se trate. Posteriormente, se fijan las células y éstas se tratan con sulforrodamida B para determinar la absorción a 500 nm. El porcentaje de inhibición del crecimiento se obtiene mediante la siguiente ecuación (Boyd, 1995):

$$\%IC = 100 [ (T-T_0) / (C-T_0) ]$$

en donde:

T = densidad óptica después de 48 h de exposición.

T<sub>0</sub> = densidad óptica a tiempo cero.

C = densidad óptica del control.

Las IC<sub>50</sub> se obtienen a partir de tres diferentes experimentos por duplicado utilizando concentraciones de 3.1, 10, 31 y 100 µM.

---

## REFERENCIAS

---

1. Adams, A.; Guss, J. M.; Collyer, C.A.; Denny, W.A.; Wakelin, L.P.G. *Biochemistry* **1999**, *38*, 9221-9233.
2. Assa-Munt, N.; Denny, W.A.; Leupin, W.; Kearns, D.R. *Biochemistry*, **1985**, *24*, 1441-1449.
3. Asseline, U.; Thuong, N.T. *New J. Chem.*, **1997**, *21*, 5-17.
4. Bailly, C.; Suh, D.; Waring, M.J.; Chaires, J.B. *Biochemistry*, **1998**, *37*, 1033-1045.
5. Bailly, C.; Waring, M. *Biochem. J.* **1998** (b), *330*, 81-87.
6. Bair, K.W.; Andrews, C.W.; Tuttle, R.L.; Knick, V.C.; Cory, M.; McKee, D.D., *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 1983-1990.
7. Bair, K.W.; Tuttle, R.L.; Knick, V.C.; Cory, M.; McKee, D.D., *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 2385-2393.
8. Baginski, M.; Fogolari, F., Briggs, M. *J. Mol. Biol.*, **1997**, *274*, 253-276.
9. Belmont, P.; Alarcón, K.; Demeunynck, M.; Lhomme, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 233-236.
10. Bender, M.L.; Thomas, R.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4183-4189.
11. Berger, J.M.; Gamblin, S.J.; Harrison, S.C.; Wang, J.C. *Nature*, **1996**, *379*, 225-232.
12. Berthet, N.; Constant, J.F.; Demeunynck, M.; Michon, P.; Lhomme, J., *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3346-3352.
13. Blackburn, G.M.; Kellard, B. *Chemistry and Industry*, **1986**, 607-613.
14. Boger, D.L.; Sakya, S.M. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1277-1284.
15. Bott, G.; Field, L.D.; Sternhell, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5618-5622.
16. Bowman, W.C.; Rand, M.J., *FARMACOLOGIA Bases bioquímicas y Patológicas*, 2ª Edición, **1984**, p3-16.
17. Boyd, D.B. in American Chemical Society Symposium Series **1997**, p. 346-356.
18. Boyd, M.R.; Paull, K.D. *Drug Dev. Res.* **1995**, *34*, 91-109.
19. Canellakis, E.S.; Shaw, Y.H.; Hanners, W.E.; Schwartz, R.A. *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, *418*, 277-289.
20. Capelle, N.; Barbet, J.; Dessen, P.; Blauquet, S.; Roques, B.P.; Le Peqc, J.-B. *Biochemistry*, **1979**, *18*, 3354-3362.

21. Cotter, T.G.; Lennon, S.V.; Glynn, J.G.; Martin, S.J. *Anticancer Res.* **1990**, *10*, 1153-1160.
22. Creech, H.J.; Preston, R.K.; Peck, R.M.; O'Connell, A.P. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 739-746.
23. Culotta, E.; Koshland, D.E. *Science*, **1993**, *262*, 1958-1961.
24. Chacón-García, L.; Cogordan J.A.; Martínez, R. *Molecular Interactions in the DNA-daunomycine complex*, 5o Congreso de América del Norte, **1997**, Cancún, Q.R.
25. Chacón-García, L. **2000**, Resultados no publicados. Se utilizó MOPAC 6. empleando AM1.
26. Chaires, J.B.; Priebe, W.; Graves, D.E.; Burke, T.G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5360-5364.
27. Chaires, J.B. *Antracycline Antibiotics*, W. Priebe, Editor. American Chemical Society Symposium Series, 1995, pp 156-167.
28. Chaires, J.B.; Leng, F.; Przewloka, T.; Fokt, I.; Ling, Y-H.; Perez-Soler, R.; Priebe, W. *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 261-266.
29. Chang, Ch.; Adams, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 2089-2092.
30. Christie, H.; Kenner, J. *J. Chem. Soc.* **1922**, *121*, 614-620.
31. Chunchatprasert, L.; Shannon, P.V.R. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1996**, 1787-1795.
32. Dai, W.-M.; Chow, Ch.W.; Zhou, L.; Ishii, A.; Lau, Ch.W.; Li, Q.; Hamaguchi, W.; Nishimoto, S.-i. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2789-2794.
33. Deady, L.W.; Desneves, J.; Kaye, A.J.; Finlay, G.J.; Baguley, B.C.; Denny, W.A. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 445-452.
34. Denny, W.A.; Rswcastle, G.W.; Baguley, B.C. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 814.
35. Dervan, P. *Science*, **1986**, *232*, 464-471.
36. Dilbeck, G.A.; Field, L.; Gallo, A.A.; Gargiulo, R.J. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4593-4596.
37. Drews, J. *Science*, **2000**, *287*, 1960-1964.
38. Eliadis, A.; Phillips, D.R.; Reiss, J.A.; Skorobogaty, A. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 1049-1052.
39. Esquerra, J.; Pedregal, C.; Lamas, C.; Barluenga, J.; Perez, M.; García-Martín, M.A.; González, J.M. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 5804-5812.

40. Evans, D.A.; Dinsmore, C.J.; Evrard, D.A.; DeVries, K.M.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6426-6427.
41. Ferlin, M.G.; Marzano, C.; Chiarlotto, G.; Baccichetti, F.; Bordin, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 827-837.
42. Fuller, W.; Waring, M.J. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1964**, *68*, 805-808.
43. Gabay, E.J.; DePaolis, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 562-564.
44. Gamage, S.A.; Figgitt, D.P.; Wojcik, S.J.; Ralph, R.K.; Ransijn, A.; Mauel, J.; Yardley, V.; Snowdon, D.; Croft, S.L.; Denny, W.A. *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 2634-2641.
45. Gamage, S.A.; Spicer, J.A.; Atwell, G.J.; Finlay, G.J.; Baguley, B.C.; Denny, W.A. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2383-2393.
46. Gronowitz, S. Thiophene and its derivatives, Parte 1-3, Wiley-Interscience, N.Y. **1986**.
47. Gupta, M.; Ali, R. *J. Biochem.*, **1984**, *95*, 1253.
48. Hanessian, S. *Tetrahedron Lett.* **1967**, *16*, 1549-1552.
49. Hansen, M.; Hurley, L., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 2421.
50. Hartwell, L.H.; Kastan, M.B. *Science*, **1994**, *266*, 1821-1828.
51. Jeffrey, A.M.; Jannette, K.W.; Blobstein, S.H.; Weinstein, I.B.; Beland, F.A.; Harvey, K.G.; Kassai, H.; Miura, I.; Nakanishi, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 5714-5715.
52. Jew, S.-S.; Kim, H.-J.; Roh, E.-Y.; Hong, Ch.; Kim, J.-K.; Lee, H.; Park, H.-g. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3203-3206.
53. Kadzhrishvili, D.O.; Dolidze, S.V.; Samsoniya, Sh. A.; Suvorov, N.N. *Khim. Geterrotsikl. Soedin.* **1990**, *3*, 346-348.
54. Kar, A.K.; Braun, P.D.; Wandless, T.J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 261-264.
55. Katzung, B. G., Basic and Clinical Pharmacology, Apleton and Lange, Stanford Connecticut, **1998**, p 3.
56. Keith, D.D.; Tortora, J.A.; Yang, R. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3711-3713.
57. Koreeda, M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 6720-6722.
58. Koop, B.; Straub, A.; Schäfer, H.J. *Tetrahedron Asymmetry*, **2001**, *12*, 699-702.
59. Kowalczyk, B.A.; Roberts, P.N.; McEwen, G.K.; Robinson III, J. *Org. Proc. Res. Dev.* **1997**, *1*, 355-358.
60. Leenders, R.G.G.; Scheeren, H.W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2975-2980.

61. Lenhinger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Principles of Biochemistry*, Worth; Nueva York, 1993.
62. Leng, F.; Priebe, W.; Chaires, J.B. *J. Med. Chem.*, 1998, 37, 1743-1752.
63. Lepecq, J.B.; Lebret, M.; Barbet, J.; Roques, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1975, 72, 2915.
64. Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.* 1961, 3, 18-30.
65. Liaw, Y-Ch.; Gao, Y-G.; Robinson, H.; van der Marel, G.A.; Van Boom, J.H.; Wang, A.H-J. *Biochemistry*, 1989, 28, 9913-9918.
66. Lipard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, 106, 6102-6104.
67. Liu, L.F. DNA Topology and its Biological Effects, Cazzarelli, N.R., Wang, J.C. Editores, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1990, pp 371-389.
68. Lomadze, N.Sh.; Chikvaidze, I.Sh.; Targamadze, N.L.; Kurkovskaya, L.N.; Samsoniya, Sh.A.; Suvorov, N.N.; *Khim. Geterotsikl. Soedin.* 1994, 9, 1197-1201.
69. Lown J. W., Hanstock, C.C. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, 104, 3214-3216.
70. March, J. *Advanced Organic Chemistry*, John Wiley and Sons. 1992, p 76.
71. Martínez, R.; Sandoval, O.J.; Avila, G. *J. Heterocyclic Chem.* 1998, 35, 585-589.
72. Martínez, R.; Cogordan, J.A.; Mancera, C.; Diaz, M.L. *Fármaco*, 2000, 55, 631-636.
73. McIsaac, J.E.; Ball, R.E.; Behrman, E.J. *J. Org. Chem.* 1971, 36, 3048-3050.
74. Mesmaeker, A.; Wenderborn, S.; Jouanno, Ch.; Fritsch, V.; Wolf, R.M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7, 1869-1874.
75. Merino, A.; Madden, Knut, R.; Lane, W.S.; Champoux, J.J.; Reinberg, D. *Nature*, 1993, 365, 227-229.
76. Mikata, Y.; Yokoyama, M.; Ogura, S.-i.; Occurra, I.; Kawasaki, M.; Maeda, M.; Yano, Sh. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 1243-1248.
77. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991, 83, 757-766.
78. Moreau, P.; Anizon, F.; Sancelme, M.; Prudhomme, M.; Bailly, C.; Sevére, D.; Riou, J.-F.; Fabbro, D.; Meyer, T.; Aubertin, A.-M. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 584-592.
79. Morokuma, K. *Acc. Chem. Res.*, 1977, 10, 294-300.
80. Nishio, T.; Okuda, N.; Kashima, C. *J. Heterocyclic. Chem.* 1988, 25, 1437-1438.

81. Oki, M. *Top. Stereochem.*, 1983, V. 41. pp 1-6.
82. Ostaszewski, R.; Wilczynska, E.; Wolszczak, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2995-2996.
83. Ortiz de Montellano. *Cytochrome p-450, Structure, Mechanism and Biochemistry*. N.Y., Ed. Plenum, **1986**, p 80.
84. Patterson. S.E.; Coxon, J.M.; Strekowski, L. *Bioorg. Med. Chem.*, **1997**, *5*, 277-281.
85. Pastor, Y.; Siro, J.; García-Navío, J. L.; Vaquero, J.J.; Rodrigo, M.; Ballesteros, M.; Alvarez-Builla. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*. **1995**, *5*, 3043-3048.
86. Peytou, V.; Condom, R.; Patiño, N.; Guedj, R.; Aubertin, A-M.; Gelus, N.; Baily, C.; Terreux. R.; Cabrol-Bass, D. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4042-4053.
87. Pindur, U.; Haber, M.; Sattler, K. *J. Chem. Edu.* **1993**, *70*, 263-272.
88. PLM, *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas*, 1997. **Rubilem®** (clorhidrato de daunorrubicina), p1727.
89. Potmesil, M.; Silver, R. *DNA Topology and its Biological Effects*. Cazzarelli, N.R., Wang, J.C. Editores, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1990. pp 391-407.
90. Propst, C.L., Perum, T.J. de. *Nucleic Acid Targeted Drug Design*., NuevaYork 1992.
91. Qian, X.; Tao, Z.-F.; Wei, D.; Sun, J. *Monatsh. Chem.* **1996**, *127*, 569-577.
92. Ramírez-Galicia, G.; Rubio, M.F.; Martínez, R. *Rev. Soc. Quim. Mex.* **2000**, *44*, 37-41.
93. Ramírez Ziramba, A. Tesis, CONALEP, México, D.F., **2000**.
94. Rajski, S.R.; Williams, R.M. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2759.
95. Reddy, M. R.; Parril, A. L. in *American Chemical Society Symposium Series* p. 1-11.
96. Redinbo, M.R.; Stewart, L.; Kuhn, P.; Champoux, J.J.; Wim, G.J. Hol. *Science*, **1998**, *279*, 1504-1513.
97. Remers, W.A.; Roth, R.H.; Gibs, G.J. Weiss, M.J. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 1232-1240.
98. Renh, C.; Pindur, U.; *Monatsh. Chem.*; **1996a**, *127*, 631-644.
99. Rehn, C.; Pindur, U. *Monatsh. Chem.*, **1996b**, *127*, 645-658.
100. Rieger, M.; Westheimer, F.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 19-28.
101. Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, NuevaYork **1983**.
102. Sakore, T.D.; Reddy, S.; Sobell, H.M. *J.Mol.Biol.*, **1979**, *135*, 763.
103. Shigeori, T.; Toshihiro, I.; Makoto, T. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, *21*, 1485-1487.

104. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.
105. Slifkin, M.A. *Molecular Interactions*, Vol. 2. Ratajczac and Orville-Thomas Ed.; John Wiley and Sons Ltd., N.Y., **1980** pp 271-303.
106. Spicer, J.A.; Gamage, S.A.; Atwell, G.J.; Finlay, G.J.; Baguley, B.C.; Denny, W.A. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1919-1929.
107. Spielmann, H.P., Wemmer, D.E., Jacobsen, J.P., *Biochemistry*, **1995**, *34*, 8542-8553.
108. SS, Este dato es tomado de la estadística oficial más reciente de la Secretaría de Salud del gobierno de México, que corresponde a **1996**; ver:  
<http://www.ssa.gob.mx/prop/estadis/index.html>
109. Stetter, v.H.; Lauterbach, R. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1962**, *655*, 20-26.
110. Stewart, B.W. *J. Nat. Canc. Inst.* **1994**, *86*, 1286-1296.
111. Stewart, L.; Redinbo, M.R.; Qiu, X.; Hol, W.G.M.; Champoux, J.J. *Science*, **1998**, *279*, 1534-1541.
112. Su, T.-L.; Chen, Ch.-H.; Huang, L.-F.; Chen, Ch.-H.; Basu, M.K.; Zhang, X.G.; Chou, T.-C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4741-4748.
113. Tanious, F.A., Yen, S.F., Wilson, W.D., *Biochemistry*, **1991**, *30*, 1813-1819.
114. Todd, A.K.; Adams, A.; Thorpe, J.H.; Denny, W.A.; Wakelin, L.P.G.; Cardin, C.J. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 536-540.
115. Via, L.D.; Gia, O.; Magno, S.M.; Santana, L.; Teijeira, M.; Uriarte, E. *J. Med. Chem.* **1998**, *42*, 4405-4413.
116. Voldoire, A.; Sancelme, M.; Prudhomme, M.; Colson, P.; Houssier, C.; Bailly, C.; Léonce, P.; Lambel, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 357-365.
117. Wakelin, L.P.G.; Waring, M.J. *J. Mol. Pharmacol.* **1974**, *10*, 544.
118. Wakelin, L.P.G.; Romanos, M.; Chen, T.K.; Glaubiger, E.S.; Canellakis, E.S.; Waring, U.J. *Biochemistry*, **1978**, *17*, 5057-5063.
119. Wang, A.H.-J.; Ughetto, G.; Quigley, G.J.; Hakoshima, van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Rich, A. *Science*, **1984**, *225*, 1115-1121.
120. Wang, J.C. *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 635-692.
121. Waring, M.J.; Bailly, C. *Gene*, **1994**, *149*, 69-79.
122. Wemer, D.E.; Dervan, P.B. *Curr. Op. Struct. Biol.* **1997**, *7*, 355-361.

123. Weygand, F.; Geiger, R. *Chem, Ber.*, **1956**, *89*, 647-652.
124. Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmacological Chemistry, 10<sup>a</sup> ed., Delgado, J.N. y Remers, W.A. Ed. Edit. Lippmest-Raven, **1998**.  
Pag. 38.
125. Wilson, W.D.; Wang, Y.H.; Chandrasekaran, S.; Yang, Baykin, D.W. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4989-4995.
126. Xiaogang, Q.; Trent, J.O.; Fokt, I.; Priebe, W.; Chaires, J. *Proc. Natl. Ac. Sci.* **2000**, *97*, 12032-12037.
127. Yoo, H-W.; Suh, M-E.; Park, S.W. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4761-4722.
128. Zaw, H.; Henry, P.M. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 1842-1847.
129. Zhou, B.-w.; Puga, E.; Sun, J.-s.; Garestier, T.; Helene, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10425-10428.

---

**ANEXO:**  
**PUBLICACIONES GENERADAS**

---

Eur. J. Med. Chem. 00 (2001) 00–00  
© 2001 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved  
PII: S0223-5234(01)01260-0/SCO

Short communication

## Cytotoxic activity and QSAR of *N,N'*-diarylalkanediamides

Luis Chacón-García, Roberto Martínez\*

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, Coyoacán,  
04510 Mexico DF, Mexico

Received 28 February 2001; revised 10 July 2001; accepted 11 July 2001

**Abstract** – The one- and two-step syntheses of *N,N'*-(dinitrophenyl)alkanediamides and *N,N'*-(diaminophenyl)alkanediamides from 4-nitroaniline were carried out. These compounds were subjected to cytotoxic evaluation against different tumoural cell lines. A QSAR analysis for the aminated series, introducing a QSAR descriptor ( $D_{Cl}$ ) designed herein for groove binders, reveals that the activity in the K562 cell line is related to the charge, polarisability, volume and length of the molecules. © 2001 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

cytotoxic activity / QSAR / *N,N'*-diarylalkanediamides

### 1. Introduction

Among compounds with cytotoxic activity, the most important groups are those that interact reversibly with DNA without forming covalent bonds, such as DNA intercalators or groove binders. Some of the former are drugs used for cancer therapy, e.g. Daunorubicin, employed in leukaemia treatment. Amides have attracted attention in medicinal chemistry not only because of their antitumoural activity [1] but also in the treatment of other illnesses. In particular, some *N,N'*-diaryldiamides have been investigated as antibacterial agents [2] or HIV inhibitors [3] but not, to our knowledge, as cytotoxic agents. In a recent study we described the synthesis of bis-benzacridinones in which the linker portion was a diaryldiamide chain (*figure 1*) [4].

Taking into account the important role of the linker in the DNA bis-intercalators in recognising the double helix, and then increasing the affinity for this [5, 6], we decided to explore the cytotoxic activity of

these portions against tumoural cell lines, using amino **1a–g** and nitro **2a–g** groups instead of the chromophore groups.

### 2. Chemistry

The *N,N'*-diarylalkanediamides were obtained from *p*-nitroaniline. In this method, 4-nitroaniline (2 equiv.) was condensed with the corresponding diacylchlorides (1 equiv.) in acetone while being cooled in an ice bath, leading to the formation of the respective *N,N'*-(4,4'-dinitrophenyl)alkanediamides. The products obtained were precipitated, filtered and washed with acetone. Chromatographic purification was not necessary. Yields varied from 50 to 65%, with the exception of the reaction with succinyl chloride, for which the yield was very low (18%). In neither case were the reactions carried out in the presence of an additional base.

The *N,N'*-(4,4'-diaminophenyl)alkanediamides were obtained by reduction of the nitrated compounds with hydrazine and palladium/carbon in ethanol at reflux temperature and recrystallised from methanol with yields over 80% in all the cases (*figure 2*).

\* Correspondence and reprints:  
E-mail address: robmar@servidor.unam.mx (R. Martínez).

### 3. Pharmacological results and discussion

#### 3.1. Cytotoxic activity

Compounds **1a–f** and **2a–f** were evaluated for cytotoxic activity in cultures of PC-3, U251 and K562 cells. The results are given in *table 1*.

For the purpose of this study, and because of the structure of the diaryldiamides described herein, we consider the cytotoxic activity of these compounds to be due to an interaction with DNA as groove ligands [7].

In the group of nitrated compounds studied, the most active was **1f** in the PC3 and U251 cell lines followed by **1c**. The  $IC_{50}$  of **1f** was  $34.78 (\pm 5.9) \mu\text{M}$  in PC-3 and  $3.84 (\pm 0.65) \mu\text{M}$  in U251 and of **1c**  $32 (\pm 0.7) \mu\text{M}$  in U251.<sup>1</sup> Although this result is moderate, **1f** is considered to be active. The potency of this is high if compared with Distamycin A, a known groove binder, whose  $IC_{50}$  in U251 is over  $100 \mu\text{M}$ .

Compound **1a** exhibited no activity in any line, while compounds **1b**, **1d**, and **1e** showed almost negligible activity in all entries.

With respect to the group of the aminated compounds, **2a** ( $n = 2$ ), **2b** ( $n = 3$ ), **2c** ( $n = 4$ ), **2e** ( $n = 6$ ) and **2f** ( $n = 7$ ) showed medium activity in K562 (**2d** was not probed in this line) and very little cytotoxicity in all the others. This set of compounds, in contrast with the preceding, could have additional intermolecular interactions with DNA due to hydrogen bonds between the amine group at the end of the molecule and base pairs, either directly or through water molecules. It is probably

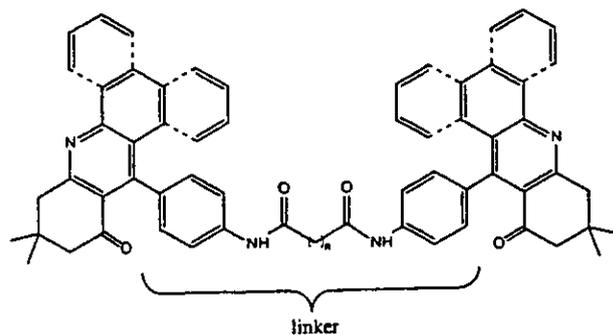


Figure 1. Structure of bis-benzacridines with the linker portion shown.

<sup>1</sup>  $IC_{50}$  of this compound was evaluated by duplicate in three different experiments using concentrations of 3.1, 10, 31 and  $100 \mu\text{M}$ .

due to these increased interactions that almost all compounds in this group present cytotoxicity. One obvious hypothesis for these systems would be that the inhibition of the growth is proportional to the length of the chain. However, it is easily seen from the results (K562) that in the first three compounds (**2a–c**) there is a decrease in the percentage of inhibition followed by an increase in compounds **2e–f** (see *figure 3*).

#### 3.2. QSAR

The above results indicate that the activity cannot be explained only in terms of liposolubility, chain length or molecular weight. To address this point, a QSAR analysis of these compounds was carried out.<sup>2</sup> Since the number of compounds was small, the study was made for the purpose of interpolation, not for extrapolation. Due to the high correlation between almost all 16 of the descriptors used by the program, it was not possible to carry out the QSAR analysis with the remaining descriptors, and it was necessary to incorporate a new descriptor ( $D_{CL}$ ) related to the topological recognition of DNA. This descriptor was obtained from the length of the molecule geometrically optimised using PM3, assuming that a specific length is required for an optimal recognition of the double helix, as shown in *figure 4*. The distance within the molecule between the extreme groups ( $\text{NH}_2\text{--NH}_2$ ), divided by 4.202 or  $3.4/\cos 36^\circ$ , should in principle be the number of gaps (or base pairs plus one) that the cross-linker will recognise. Therefore, if the closest whole number to this value is subtracted from its value, the resulting difference will be the separation of the optimal (zero) or the worst (0.5) relative recognition. This can be appreciated in *figure 4* and Eq. (1).

$$D_{CL} = |(\text{NH}_2\text{--NH}_2 \text{ distance}/4.202) - N| \quad (1)$$

where  $N$  is the closest whole number.

Considering this descriptor it was possible to formulate a mathematical expression, Eq. (2) was found to be the best expression, containing the topological ( $D_{CL}$ ), polarisability/volume (Sp.Pol) and charges (ABSQ) descriptors.<sup>3</sup>

<sup>2</sup> QSAR analysis was made by multiple linear regressions. All descriptors considered (with exception of  $D_{CL}$ , see below) were taken from SCIQSAR, version 3.0, SciVision, Inc., 1998. Statistical criteria for avoidance chance were carefully taken into account.

<sup>3</sup> Linear estimation and Student's  $t$ -distribution ( $\alpha = 0.05$ ) between these descriptors discarded  $H_0$ .

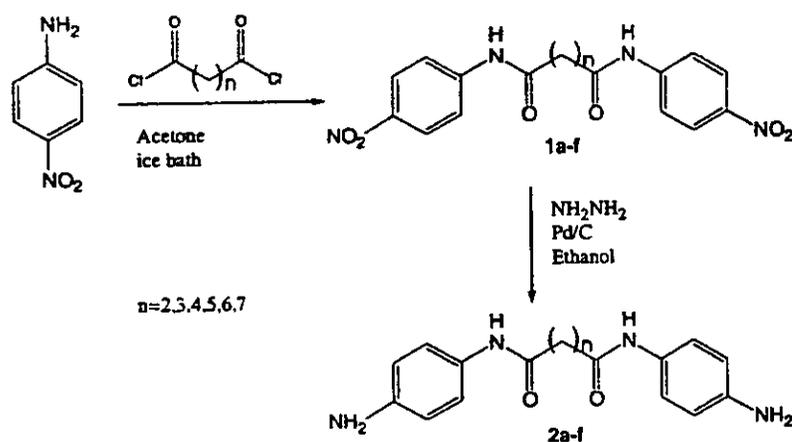


Figure 2. Synthesis of the *N,N'*-diarylkankediamides **1a–f** and **2a–f**.

Table I. Percentage of inhibition of the growth (at 31  $\mu$ M concentration).<sup>a</sup>

Comp.	<i>n</i>	M.p.	PC-3 (prostate)	U251 (CNS)	K562 (leukaemia)
<b>1a</b>	2	286–288	0	0	<sup>b</sup>
<b>1b</b>	3	278–280	0	50	50.7
<b>1c</b>	4	280–285	0	> 50	<sup>b</sup>
<b>1d</b>	5	206–208	5	23	<sup>b</sup>
<b>1e</b>	6	220–222	2	20	<sup>b</sup>
<b>1f</b>	7	155–158	> 50	82	43.8
<b>2a</b>	2	232–234	16.8	15.4	67.4
<b>2b</b>	3	228–230	14.8	23.9	59.3
<b>2c</b>	4	238–240	4.7	23.9	51.6
<b>2d</b>	5	203–204	0	0	<sup>b</sup>
<b>2e</b>	6	211–212	21.3	20.5	54.2
<b>2f</b>	7	195–197	0	18.2	54.9

<sup>a</sup> A concentration of 31  $\mu$ M was chosen because it represents the medium point between log  $-4$  and log  $-5$ , which is the range where inhibition of the growth was found.

<sup>b</sup> Activity was not measured.

$$\log(\% \text{ growth}) = -20.55 \times 10^{-2} D_{CL} + 70.92 \times 10^{-2} \text{ABSQ} + 29.617 \text{Sp.Pol} - 2.107, \quad n = 5, \quad r^2 = 0.99, \quad F = 31782_{(1,3)}, \quad \alpha = 0.05, \quad s = 0.045 \quad (2)$$

where  $D_{CL}$  (see Eq. (1));  $\text{ABSQ} = \sum_i |Q_i|$ , where  $Q_i$  is the charge on the  $i$ th atom;  $\text{Sp.Pol} = \sum_A |\alpha_A| / \text{Vol}$ , where  $\alpha_A$  is the average atomic hybrid polarisability for atom  $A$  and  $\text{Vol}$  is the molecular volume of the molecule.

The good correlation between Eq. (2) and the experimental data can be seen in table II.

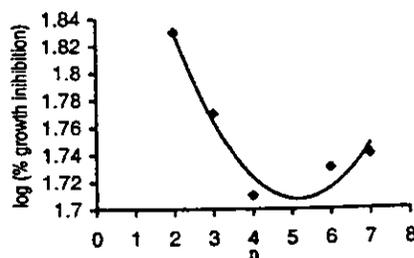


Figure 3. Behaviour of the inhibition of the growth in K562 cell vs. the number of methylenes (*n*) in the alkyl chain of the amino series.

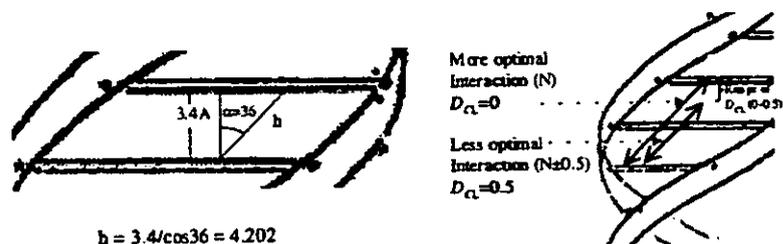


Figure 4.

Table II. Comparison of the calculated data from Eq. (2) with experimental.

Comp.	log (%inhib)			Dist. N–N <sup>a</sup>	$D_{CL}$	ABSQ	Sp.Pol
	Exp.	Calc.	$\Delta$ ( $\times 10^{-4}$ )				
2a	1.8286	1.8287	1	16.85	0.00939	4.496668	0.122193
2b	1.7730	1.7728	2	17.56	0.17833	4.560416	0.121323
2c	1.7126	1.7127	1	19.32	0.40287	4.663736	0.120606
2e	1.7339	1.7340	1	21.8	0.18722	4.875879	0.11932
2f	1.7395	1.7396	1	22.3	0.30619	5.268802	0.119391

<sup>a</sup> Distance between amines groups, taken from the geometry optimised using PM3. ALCHEMY 2000, version 2.05. Tripos, Inc., 1998.

#### 4. Conclusions

The molecules described in this study are easily obtained and the significant activity and high selectivity displayed by some of them is noteworthy.

The results from Eq. (1) are in agreement with the molecular mechanism of action proposed for these compounds. Firstly, the relative length between the cross-linker and the number of DNA base pairs that it will recognise through H-bonds, directly or by water molecules, is given by  $D_{CL}$ . It is noteworthy that the length in DNA groove ligands is still continuing to be a topic in the design of this kind of molecules [8–10]. Secondly, as is expected for cross-linker agents, charges (ABSQ) and polarisability (Sp.Pol) are directly related to repulsive and/or attractive interactions with the DNA grooves. Finally, volume contributes to the correct docking of the molecule.

Unfortunately, the presence of more than seven methylenes in the alkyl chain could present additional factors that affect the activity, such as additional degrees of freedom, many more than one low energy conformation, the marked effect of the partition coefficient, etc. In these cases another mathematical expression should be sought.

However, the descriptor  $D_{CL}$  can be used in this and any other structurally different cross-linker and could be very useful in the design of DNA bis-intercalating compounds in the spacer region.

#### 5. Experimental protocols

##### 5.1. Chemistry

All melting points are uncorrected. The IR spectra were recorded in a Nicolet FT-55X spectrophotometer. The <sup>1</sup>H-NMR spectra were determined in a Varian FT-200 instrument. All NMR spectra were obtained with the pulse sequence as part of the spectrometer's software and were determined in DMSO-*d*<sub>6</sub>. Chemical shifts are expressed in  $\delta$  (ppm) relative to TMS as internal standard and coupling constants *J* in Hz.

##### 5.1.1. General procedure for the preparation of the *N,N'*-(4,4'-dinitrophenyl)alkanediamides

Diacyl chloride (0.72 mmol) was added to a solution of 4-nitroaniline (1.44 mmol) in 15 mL of acetone at 5 °C. After stirring for 2 h, the mixture was filtered and washed with acetone to afford 1a–c.

5.1.1.1. *N,N'*-Bis(4-aminophenyl)ethanediamide (**1a**)

M.p. 286–288 °C. 18% yield. <sup>1</sup>H-NMR: δ 2.75 (s, 2H), 2.32 (s, 2H), 7.8 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 8.19 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 10.65 (s, 2H).

5.1.1.2. *N,N'*-Bis(4-aminophenyl)propanediamide (**1b**)

M.p. 278–280 °C. 59% yield. <sup>1</sup>H-NMR: δ 1.92 (q, *J* = 7 Hz, 2H), 2.45 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 7.8 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 8.18 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 10.52 (s, 2H).

5.1.1.3. *N,N'*-Bis(4-aminophenyl)butanediamide (**1c**)

M.p. 280–285 °C. 63% yield. <sup>1</sup>H-NMR: δ 1.64 (q, *J* = 6 Hz, 4H), 2.42 (s, *J* = 6 Hz, 4H), 7.82 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 8.19 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 10.53 (s, 2H).

5.1.1.4. *N,N'*-Bis(4-aminophenyl)pentanediamide (**1d**)

M.p. 206–208 °C. 57% yield. <sup>1</sup>H-NMR: δ 1.34 (m, 2H), 1.62 (q, *J* = 7 Hz, 4H), 2.38 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 7.79 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 8.16 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 10.46 (s, 2H).

5.1.1.5. *N,N'*-Bis(4-aminophenyl)hexanediamide (**1e**)

M.p. 220–222 °C. 49% yield. <sup>1</sup>H-NMR: δ 1.26–1.38 (m, 4H), 1.60 (q, *J* = 7 Hz, 4H), 2.37 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 7.8 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 8.17 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 10.46 (s, 2H).

5.1.1.6. *N,N'*-Bis(4-aminophenyl)heptanediamide (**1f**)

M.p. 155–158 °C. 52% yield. <sup>1</sup>H-NMR: δ 1.24–1.36 (q, *J* = 7 Hz, 6H), 1.58 (q, *J* = 7 Hz, 4H), 2.36 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 7.81 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 8.18 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 10.46 (s, 2H).

5.1.2. General procedure for the preparation of the *N,N'*-(4,4'-diaminophenyl)alkanodiamides

Ethanol (10 mL), Pd/C 5% (0.046 g), hydrazine (0.818 mL, 25.9 mmol), water (0.93 mL) and **1a–c** (2.59 mmol) were mixed in a round bottom flask. The mixture was refluxed for 2 h. The resulting solid was dissolved in methanol with heat and filtered at vacuum. Methanol was eliminated upon precipitation of a solid that was filtered and crystallised from methanol to afford **2a–c**.

5.1.2.1. *N,N'*-Bis(4-nitrophenyl)ethanediamide (**2a**)

M.p. 232–234 °C. 92% yield. <sup>1</sup>H-NMR: δ 2.52 (s, 4H), 4.78 (s, 4H), 6.47 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 7.20 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 9.51 (s, 2H).

5.1.2.2. *N,N'*-Bis(4-nitrophenyl)propanediamide (**2b**)

M.p. 228–230 °C. 94% yield. <sup>1</sup>H-NMR: δ 1.83 (q, *J* = 7 Hz, 2H), 2.25 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 4.79 (s, 4H), 6.47 (d, *J* = 10 Hz, 4H), 7.20 (d, *J* = 10 Hz, 4H), 9.44 (s, 2H).

5.1.2.3. *N,N'*-Bis(4-nitrophenyl)butanediamide (**2c**)

M.p. 238–240 °C. 93% yield. <sup>1</sup>H-NMR: δ 1.56 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 2.21 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 4.81 (s, 4H), 6.46 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 7.19 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 9.43 (s, 2H).

5.1.2.4. *N,N'*-Bis(4-nitrophenyl)pentanediamide (**2d**)

M.p. 203–204 °C. 83% yield. <sup>1</sup>H-NMR: δ 1.26–1.31 (m, 2H), 1.55 (q, *J* = 7 Hz, 4H), 2.19 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 4.79 (s, 4H), 6.46 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 7.17 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 9.40 (s, 2H).

5.1.2.5. *N,N'*-Bis(4-nitrophenyl)hexanediamide (**2e**)

M.p. 211–212 °C. 87% yield. <sup>1</sup>H-NMR: δ 1.25–1.35 (m, 4H), 1.56 (q, *J* = 7 Hz, 4H), 2.2 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 4.74 (s, 4H), 6.47 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 7.19 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 9.39 (s, 2H).

5.1.2.6. *N,N'*-Bis(4-nitrophenyl)heptanediamide (**2f**)

M.p. °C. 88% yield. <sup>1</sup>H-NMR: δ 1.25–1.3 (m, 6H), 1.54 (q, *J* = 7 Hz, 4H), 2.19 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 4.79 (s, 4H), 6.46 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 7.18 (d, *J* = 9 Hz, 4H), 9.39 (s, 2H).

5.2. Cytotoxic activity

The tumoural cell lines were supplied by the National Cancer Institute. The cytotoxicity assays were carried out at 5000–7500 cells mL<sup>-1</sup> as reported by Skehan et al. [11] and Monks et al. [12] using the sulforhodamine B (SRB) protein assay to estimate cell growth. The percentage growth was evaluated spectrophotometrically in a Bio kinetics reader spectrophotometer.

Acknowledgements

We thank CONACYT (32633-E) and DGAPA-UNAM (IN206598) for financial support. L.C.G. thanks CONACYT for a doctoral fellowship support. We also thank M.T. Ramirez Apan for obtaining the biological data. Contribution No. 0000 from Instituto de Química, UNAM.

References

- [1] Lown J.W., Drug Dev. Res. 34 (1995) 145–183.
- [2] Kubicova L., Waisser K., Kunes J., Kralova K., Odlerova Z., Slosarek M., Janota J., Svoboda Z., Molecules 5 (2000) 714–726.

- [3] Serradji N., Bensaid O., Martin M., Kan E., Dereuddre-Bosquet N., Redeuilh C., Huet J., Heymans F., Lamouri A., Clayette P., Dong C.Z., Dormont D., Godfroid J.-J., *J. Med. Chem.* 43 (2000) 2149–2154.
- [4] Martínez R., Cogordan J.A., Mancera C., Diaz M.L., *Il Farmaco* 55 (2000) 631–636.
- [5] Canellakis E.S., Shaw H.Y., Hanners W.E., Schwartz R.A., *Biochim. Biophys. Acta* 418 (1976) 277–289.
- [6] Wakelin L.P.G., Romanos M., Chan T.K., Glaubiger D., Canellakis E.S., Waring M.J., *Biochemistry* 17 (1978) 5057–5063.
- [7] The structural analogy with some groove binders is seen for example when compared with compounds cited in Ref. [8] and Cozzi, P., *Farmaco* 56 (2001) 57–65.
- [8] Wemmer D.E., De van P.B., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7 (1997) 355–361.
- [9] Bhattacharya S., Thomas M., *Tetrahedron Lett.* 41 (2000) 5571–5575.
- [10] Ryabinin V.A., Sinyakov A.N., Soultrait V.R., Caumont A., Parissi V., Zakharova O.D., Vasyutina E.L., Yurchenko E., Bayandin R., Litvak S., Tarrago-Litvak L., Nevinsky G.A., *Eur. J. Med. Chem.* 35 (2000) 989–1000.
- [11] Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R., *J. Nat. Cancer Inst.* 82 (1990) 1107–1112.
- [12] Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Pauli K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J., Boyd M., *J. Nat. Cancer Inst.* 83 (1991) 757–765.

# Synthesis and In vitro Cytotoxic Activity of Pyrrolo[2,3-e]indole derivatives and a dihydro benzoindole analogue

Luis Chacón-García and Roberto Martínez\*

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior,  
Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510, México, D.F..

robmar@servidor.unam.mx

## Abstract

The synthesis of pyrrolo[2,3-e]indole derivatives with the structural characteristics of DNA bis- and mono-intercalators are described. A dihydro benzoindol analogue was also synthesized to elucidate the major structural requirements for cytotoxic activity. A biological evaluation of the test compounds was carried out in six different tumoral cell lines. The factors that affect the cytotoxic activity appear to be molecular weight, the substituents on the phenyl group and the presence of an amide group capable of strong interactions such as hydrogen bonding.

Keywords: Pyrrolo[2,3-e]indole / Synthesis/ Cytotoxic Activity /

## 1. Introduction

The discovery of new compounds with antitumoral activity has become one of the most important goals in medicinal chemistry. The interest in this area has come about for a variety of reasons, including an increase in the frequency of cancer and multi-drug resistance. One important group of chemotherapeutic agents used in cancer therapy comprises molecules that interact with DNA. This group includes compounds that form covalent bonds between the drug and the target, and ligands that bind non-covalently to DNA. The former are alkylating agents and the latter are groove binders and intercalators.

DNA intercalators are molecules that insert between the base pairs of the DNA without denaturalizing it [1]. This insertion causes conformational changes in the double helix such as increase in the phosphate-sugar angles and the distance between base pairs [2, 3]. DNA intercalators have common structural characteristics such as planarity and aromaticity. DNA bis-Intercalators are the respective homo- or hetero-dimers bridged by a linker [4, 5], which resembles a DNA groove ligand. This structural arrangement produces polar and hydrogen-bonding donor and/or acceptor groups that are capable of better DNA recognition.

Once the DNA-intercalator complex forms, it is primarily stabilized by hydrogen bonds, van der Waals forces, hydrophobic effects and/or molecular orbital interactions [6-12]. The cytotoxic effect of DNA intercalators is a consequence of the inhibition of Topoisomerase I or II through the stabilization of the DNA-intercalator-Topo complex [13], as has been suggested for camptothecin [14]. The stabilization of the DNA-intercalator-Topo complex occurs as a result of hydrogen bonding between the

intercalator and the amino acids of the enzyme. Finally, cell death takes place, probably due to the intervention of protein p53 as a consequence of the preceding events that cause DNA damage [15, 16].

The design of new cytotoxic agents that act as DNA intercalators should take into account the theoretical considerations outlined above. With these considerations in mind, we designed molecules with the structural characteristics of DNA Intercalating and Bis-intercalating compounds using pyrrolo[2,3-e]indole as the aromatic portion. Compounds of this type were chosen so as to investigate angular chromophores, which have received little attention in the literature. In addition, compounds containing this structure have not been explored in this field, although some studies have been made of compounds of the type of pirroloindole [17].

As mentioned above, it is important that a part of the molecule can form hydrogen bonds in order to achieve enzymatic inhibition. In the present work an amide group was chosen to fulfill this need, because of its additional polar nature. It is important to note that in some acridine derivatives with high cytotoxicity, such as AMSA [18], the phenyl ring plays an essential role in the antitumoral activity. Hence, we decided to incorporate *p*-acetanilide moiety into the structure. A schematic of the homodimer resulting from the design process is shown in *Figure 1*.

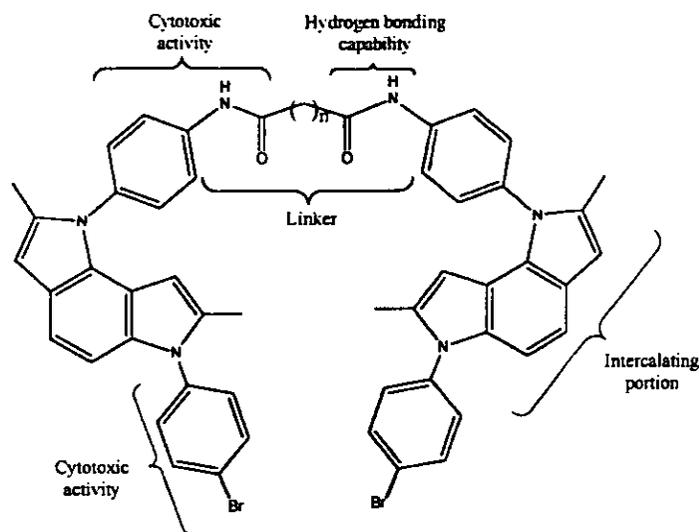
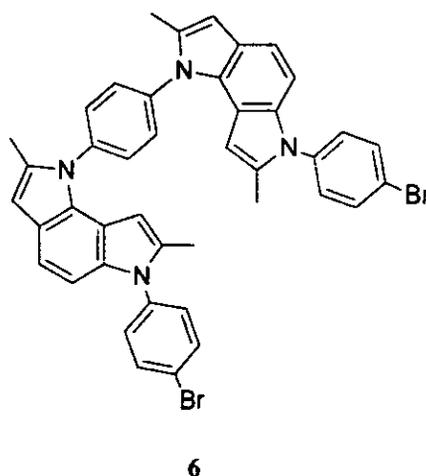
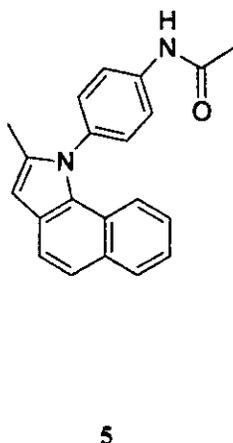
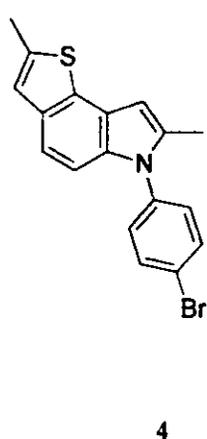
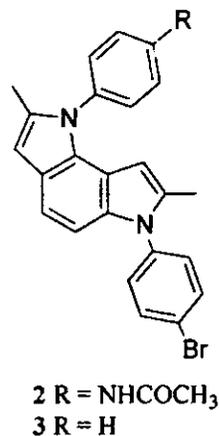
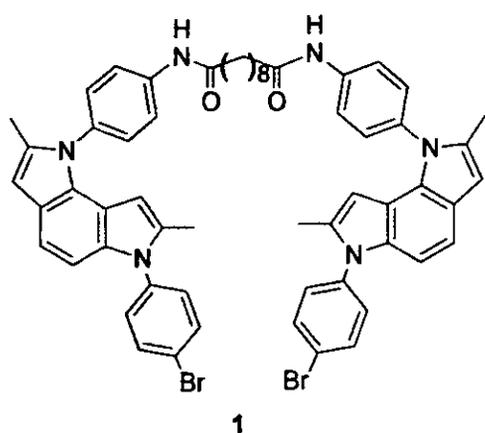


Figure 1. Schematic representation of the homodimer.

The decision to place eight methylenes in the bis derivative was made taking into consideration the neighbor-exclusion principle, which states that the length of the chain should be sufficient to accommodate the torsion necessary for bis-intercalation [19, 20]. The *p*-bromophenyl group was incorporated into the structure because it has shown cytotoxic activity in analogues synthesized by our group. Taking into account the factors outlined above, structures 1 and 2 were designed.

To test the importance of the 4'-acetamide portion we designed a structure that replaced the acetanilide in 2 by a phenyl (Structure 3), while to test the importance of one of the *p*-Br-phenylpyrrole segments we replaced the *p*-Br-phenylpyrrole by a benzene (Structure 5).



In addition, the previously reported compound 4 [21] was incorporated in the cytotoxic evaluation, because it is known that thiophene is a bioisosteric group of benzene. Compound 4 is considered because its activity reflects the necessity of having a pyrrole substituent instead of another aromatic portion in that region.

Structure 6 was designed to test the behavior of a homodimer bridged by only a phenyl group. While it was expected that bis intercalation would not occur for this structure, mono intercalation and DNA groove recognition are still possible.

## 2. Chemistry

Homodimer 1 was obtained from 1,3-cyclohexanedione [21] via the steps shown in Figure 2. In this synthesis pathway, the two pyrrole moieties were constructed in different steps. Although there are two other methodologies described for the synthesis of this skeleton, the method used here is more convenient. One of these methods consists of the cyclization of *m*-phenylenedihydrazones by Fisher's indole synthesis [22], and the other method requires the bis-anulation of arylacetylenes [23]. In both of these reports, pyrrolo indoles with the same substitution in both nitrogen atoms are described.

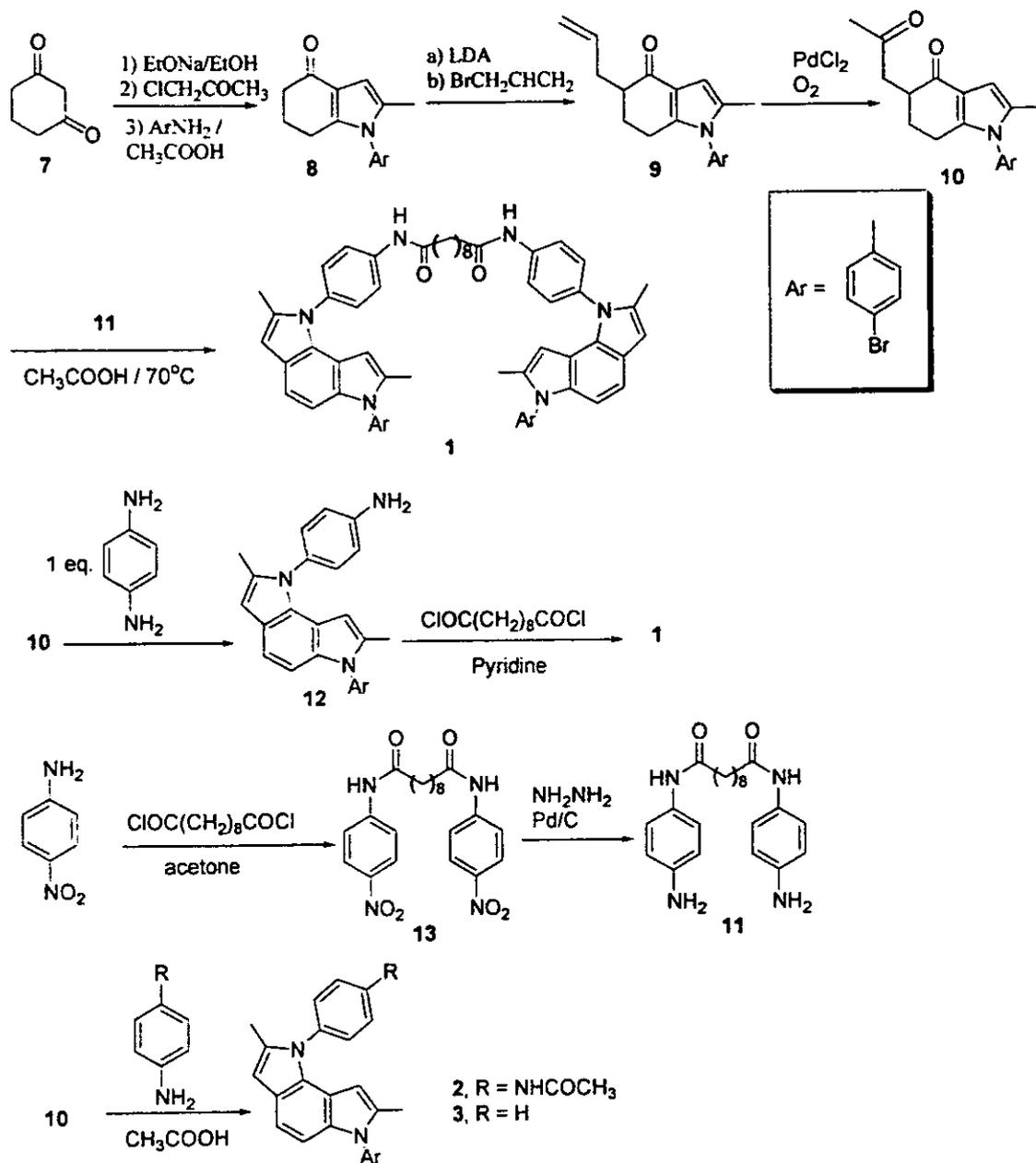


Figure 2 Synthesis of compounds 1-3

Using our method, the anion of the 1,3-cyclohexanedione 7 formed with EtONa in ethanol was reacted with chloroacetone to give the 1,4-dicarbonyl derivatives. This derivative was reacted with *p*-bromophenyl aniline by a Paal Knorr reaction to obtain 8 in moderate yield (50%). Reaction of the tetrahydro indolone 8 with LDA, generated *in situ*, and subsequent addition of an excess of allyl bromide gave 9 with yields corresponding to 80 %. Oxidation of 8 with PdCl<sub>2</sub> gave 10, which is the intermediate from which the rest of the pyrroloindole compounds can be obtained. In another Paal-Knorr reaction, 10 was reacted with decanodioic acid bis-[(4-amino-phenyl)-amide] 11 to give 1. Diamide

11 was obtained by condensation of 4-nitroaniline with sebacyl chloride in acetone to give 13, followed by reduction with  $\text{NH}_2\text{NH}_2$  and Pd/C in ethanol. The condensation of 10 with 4'-aminoacetanilide and aniline yielded compounds 2 and 3, respectively (Figure 2).

An alternative synthetic pathway explored for 1 was the reaction of 9 with 1,4-diaminobenzene to give 12, followed by reaction with sebacyl chloride in pyridine, as shown in Figure 2. The primary problem of this synthetic route was the poor yield due to the instability of 12, which was difficult to separate because of its decomposition in silica and alumina.

To last of the pyrroloindole group of molecules, dimeric compound 6, was obtained by reaction of 2 equivalents of 10 with 1 equivalent of 1,4-diaminobenzene in acetic acid, as shown in Figure 3. Two conformers 6a and 6b were identified from the duplicity of the  $^1\text{H}$  NMR signals detected at 5.92 and 5.62 ppm, corresponding to the "endo" pyrrole hydrogen and its respective neighbor methyl groups. Variation of the temperature confirmed the presence of both isomers, which have a distereoisomeric relationship (Figure 3).

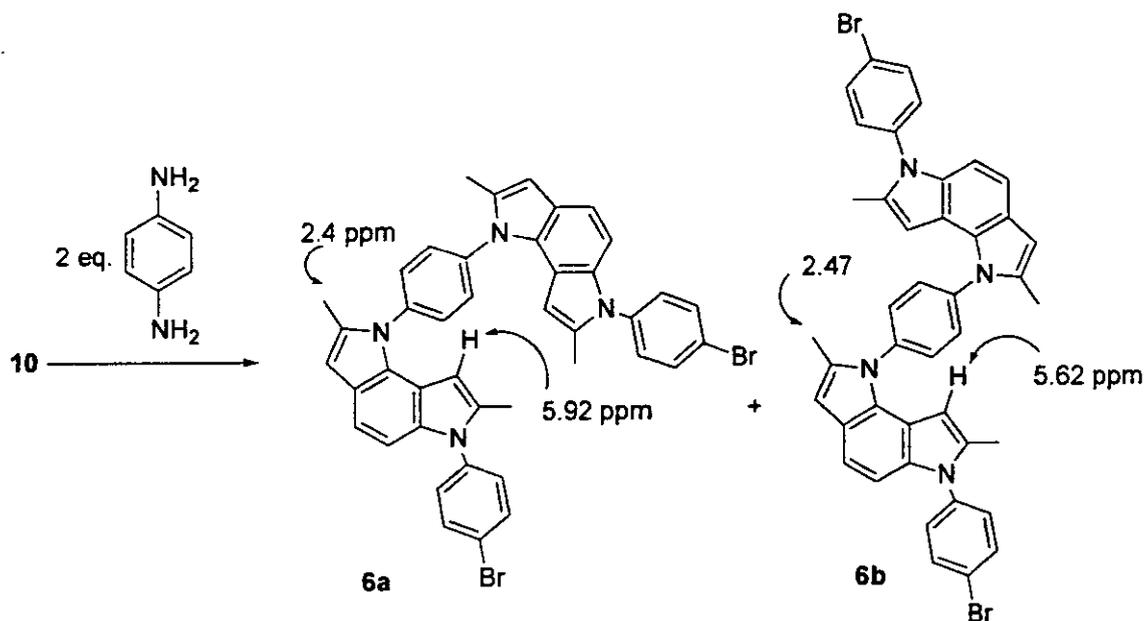


Figure 3. Synthesis of 6a and 6b

Benzoindol 5 was tried to be synthesized using the same strategy as that described above for the pyrroloindoles, but with  $\alpha$ -Tetralone 14 as the starting material. In this synthetic pathway the anion, formed from the reaction of  $\alpha$ -Tetralone and LDA, reacted with allyl bromide to give the allyl derivative 15 which, under the same conditions used in the oxidation of 9, results in the 1,4 dicarbonyl derivative 16. Reaction of 16 with 4-aminoacetanilide, under the conditions described earlier, did not give the expected product 5, but afforded instead the non-aromatized 17. It is interesting that, whereas

pyrroloindoles **1**, **2**, **3** and **6** tend to aromatize in the same reaction conditions. **16** did not show any tendency toward aromatization, even after hours at reflux in acetic acid.

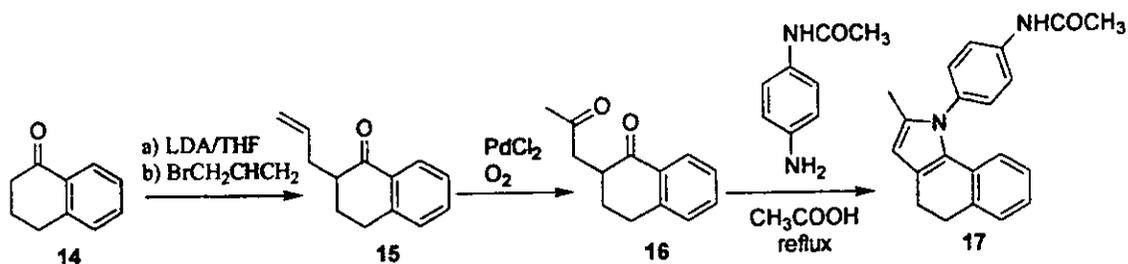


Figure 4 Synthesis of **17**

As expected for dihydro benzene derivatives, **17** is not a flat molecule, unlike the other compounds in the series.

Although compound **17** is not absolutely flat, and is not aromatized, it still maintains a structural analogy with the desired adduct. We therefore included it in the panel of compounds to be investigated.

### 3. Biological results and discussion

The first cytotoxic evaluation was made with **4**. This compound showed no significant activity in NCI-H460 (Lung), MCF7 (Breast) or SF-268 (CNS) cell line. Because of its inactivity, no further evaluation was necessary.

Compounds **1**, **2**, **3**, **6** and **17** were evaluated for cytotoxic activity in cultures of PC-3 (prostate), U251 (CNS), K562 (leukemia), Hep (Liver), HeLa (cervix), and HCT-15 (colon) cells. The results are given in *Table I*.

Table I Cytotoxic evaluation of compounds **1**, **2**, **3**, **6** and **17**

Comp	M.W	IG <sub>50</sub> [μM(±sd)]					
		PC3 (Prostate)	U251 (CNS)	K562 (Leukemia)	Hep-2 (Liver)	HCT-15 (Colon)	HeLa (Cervix)
<b>1</b>	1026.90	>100	N.A. <sup>1</sup>	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<b>2</b>	472.38	17.7 (2.5)	33.5 (2.4)	17.9 (7.9)	45.1 (4.6)	36.2 (1.6)	36.3 (5.2)
<b>3</b>	415.33	>100	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<b>6</b>	752.54	>100	N.A.	N.A.	N.A.	>100	N.A.
<b>17</b>	316.40	25.3	>100	>100	N.A.	N.A.	>100
Ad <sup>2</sup>		5X10 <sup>-5</sup>	1.8X10 <sup>-4</sup>	1.8X10 <sup>-2</sup>	1.5X10 <sup>-2</sup>	-	5X10 <sup>-5</sup>
5-FI <sup>3</sup>		1.14	2.05	0.82	1X10 <sup>-2</sup>	-	5X10 <sup>-5</sup>

The most active compound is **2**, which showed activity in all the cell lines probed with the best result in PC-3. All of the compounds listed in *Table I* showed some degree of activity in the PC-3 cell line. The dose-response curves in the PC-3 cell line show similar trends for all of these compounds.

<sup>1</sup> N.A. = Non-active

<sup>2</sup> Ad = Adriamycin

<sup>3</sup> 5-FI = 5-Fluorouracil

As mentioned above, compound **3** was not expected to show significant activity because it lacks groups capable of interacting strongly with an enzyme. The results are in agreement with this hypothesis.

An unexpected result of the cytotoxicity tests, however, is the remarkable loss of cytotoxicity of dimer **1**, although this decrease in activity is less surprising when one considers the high molecular weight of this compound (up to 1000). The fact that monomer **2** has a greater activity than its bis analogue indicates that molecular weight is the most probable factor influencing the behavior of **1**.

Comparison of the results for **2** and **3** makes it clear that the acetamide group is necessary for cytotoxic activity, and moreover comparison of **2** with **4** indicates that the 4-acetanilide portion is also important for activity. In addition, the N-(4'-bromophenyl)-pyrryl portion appears to increase activity, as shown by the difference in behavior between **2** and **17**, which showed only a small amount of activity. In this last instance, however, aromaticity may also play an important role in determining the relative activities. To test this, compound **5** will be synthesized and evaluated.

## 4. Experimental protocols

### 4.1 Chemistry

Melting points are uncorrected. The IR spectra were recorded on a Nicolet FT-55X spectrophotometer. The  $^1\text{H}$  NMR spectra were determined on a Varian FT-200 and Varian FT-300 instrument in  $\text{CDCl}_3$  unless other solvent specified. Chemical shift are expressed in  $\delta$  (ppm) relative to TMS as internal standard and coupling constants ( $J$ ) in Hz. Mass spectra were recorded using a JEOL SX-102 mass spectrometer using the direct inlet system with an ionization energy of 70 eV, an emission current of 100  $\mu\text{A}$  and ion source temperature of 150  $^\circ\text{C}$ .

#### 4.1.1. General procedure for the synthesis of **1-3**, **6** and **17**:

##### 4.1.1.1. Decanedioic acid bis-({4-[6-(4-bromo-phenyl)-2,7-dimethyl-6H-1,6-diaza-as-andacen-1-yl]-phenyl}amide) **1**.

To a stirred solution of (0.1 g, 0.28 mmol) of **10** in 5 ml of acetic acid at 80  $^\circ\text{C}$ , diamine **11** (0.057 g, 0.15 mmol) was added. After 1h of reflux and magnetic stirring, acetic acid is neutralized with a solution of 5%  $\text{NaHCO}_3$  in water in a separation funnel with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . After reduction of the solvent, previously dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  under reduced pressure, **1** was obtained, by recrystallization (0.14 g, 50%) or by chromatographic purification in silica gel 1:1 hexane/AcOEt (0.05 g, 17.5%) from the obtained mixture, as a green solid.

M.p. 188-190  $^\circ\text{C}$ ; IR  $\nu$  3436, 3003, 1695, 1517;  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  1.63 (m, 4 H), 1.77 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 2.24 (s, 3H), 2.43 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 5.56 (s, 1H), 6.4 (s, 1H), 6.83 (s,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.19 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.39 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.62 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.74 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  13.12, 13.21, 28.96, 29.08, 29.69, 37.73, 98.33, 101.78, 104.08, 113.27, 113.95, 120.1, 121.26, 128.3, 129.29, 129.43, 129.75, 130.04, 132.56, 133.66, 133.91, 135.17, 137.62, 137.83, 171.7; HRMS calcd. for  $\text{C}_{58}\text{H}_{54}\text{Br}_2\text{N}_6\text{O}_2$  (FAB $^+$ ) 1026.8966, found 1026.8962.

4.1.1.2. *N*-[4-[6-(4-Bromo-phenyl)-2,7-dimethyl-6H-1,6-diaza-as-indacen-1-yl]-phenyl]-acetamide **2**.

M.p. 130-132 °C (63 % yield); IR  $\nu$  3437, 2927, 1693, 1516;  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  2.14 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.26 (d,  $J = 0.92$  Hz, 3H), 5.54 (s, 1H), 6.41 (q,  $J = 0.92$  Hz, 1H), 6.83 (dd,  $J = 8.56, 0.64$  Hz, 2H), 7.21 (d,  $J = 8.66$  Hz, 2H), 7.26 (d,  $J = 8.62$  Hz, 2H), 7.39 (dd,  $J = 8.6, 0.64$  Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.64$  Hz, 2H), 7.72 (d,  $J = 8.58$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  13.12, 13.21, 24.66, 98.33, 101.78, 104.08, 113.27, 113.95, 120.1, 121.26, 128.3, 129.29, 129.43, 129.75, 130.04, 132.56, 133.66, 133.91, 135.17, 137.62, 137.83, 168; HRMS calcd. for  $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{BrN}_3\text{O}$  (FAB $^+$ ) 472.3765, found 472.3767.

4.1.1.3. 6-(4-Bromo-phenyl)-2,7-dimethyl-1-phenyl-1,6-dihydro-1,6-diaza-as-indacene **3**.

M.p. 105-107 °C; (70 % yield); IR  $\nu$  2924, 1595, 1495;  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  2.13 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 5.48 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.84 (dd,  $J = 8.52, 0.81$  Hz, 2H), 7.21 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.28 (d,  $J = 8.52$  Hz, 2H), 7.46 (dd,  $J = 7.95, 1.78$  Hz, 2H), 7.56 (dd,  $J = 7.9, 7.2$  Hz, 2H), 7.57 (d,  $J = 7.14$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.79$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  13.15, 13.24, 98.23, 101.68, 104.03, 112.5, 113.89, 121.22, 128.06, 128.9, 129.18, 129.73, 132.54, 133.61, 133.84, 135.11, 137.59, 139.57; HRMS calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{Br}$  (FAB $^+$ ) 414.0732, found 414.0734.

4.1.1.4. 1,4-Bis-[6-(4-Bromo-phenyl)-2,7-dimethyl-1,6-dihydro 1—6-diaza-as-indacene]-benzene **6**.

M.p. 97 °C dec; (45 % yield); IR  $\nu$  2927, 1515, 1493.  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  2.18 (s, 3H), 2.4 and 2.5 (s's, 3H), 5.62 and 5.92 (s br, 1H), 6.5 (s, 1H), 6.89 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 7.23 (d,  $J = 8.52$  Hz, 2H), 7.32 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.65 (d,  $J = 8.52$  Hz, 2H), 7.68 (s, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  13.36, 29.69, 98.41, 102.37, 104.3, 113.21, 114, 121.41, 121.44, 129.75, 132.57, 132.64, 133.77, 135.29, 137.5; MS (FAB $^-$ )  $m/z$  752.

4.1.1.5. *N*-[4-(2-Methyl-4,5-dihydro-benzo[g]indol-1-yl)-phenyl]acetamide **17**.

M.p. 195-197 °C; (81 % yield); IR  $\nu$  3437, 2935, 1695, 1516;  $^1\text{H}$  NMR  $\delta$  2.08 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.69 (t,  $J = 8$  Hz, 2H), 2.91 (t,  $J = 8$  Hz, 2H), 5.94 (s, 1H), 6.29 (dd,  $J = 7.46, 1.56$  Hz, 1H), 6.79 (td,  $J = 7.42, 1.56$  Hz, 1H), 6.89 (td,  $J = 7.42, 1.5$  Hz, 1H), 7.14 (dd,  $J = 7$  Hz, 1.56 Hz, 1H), 7.26 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  12.89, 22.46, 24.67, 30.88, 106.4, 120.05, 120.29, 122.48, 123.93, 125.92, 128.06, 128.77, 129.77, 132.06, 135.54, 135.88, 137.49, 168.36; HRMS calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{ON}_2$  (EI $^+$ ) 316.1576, found 316.1570.

4.1.2. Synthesis of Decanedioic acid bis-[(4-amino-phenyl)-amide] **11**.

Ethanol (10 ml), Pd/C 5% (0.046 g), Hydrazine (0.818 ml, 25.9 mmol), water (0.93 ml) and **13** (2.59 mmol) were mixed in a bottom flask. The mixture was refluxed for 2h. The resulting solid was dissolved in methanol in heat and filtered at vacuum. Methanol was eliminated up precipitation of a solid that was filtered and crystallized from methanol to afford **11**

M.p. 199-201 °C, (90 % yield); IR  $\nu$  3379, 1699;  $^1\text{H}$  NMR (dms $o$ - $d_6$ )  $\delta$  1.25 (s br, 4H), 1.55 (m, 2H), 2.33 (t,  $J = 11.13$  Hz, 2H), 4.79 (s br, 2H), 7.77 (d,  $J = 13.8$  Hz, 2H), 8.14 (d,  $J = 13.86$  Hz, 2H), 10.47 (s, 1H).

#### 4.1.3. Decanedioic acid bis-[(4-nitro-phenyl)-amide 13.

Sebacoyl chloride (0.172 g, 0.72 mmol) was added to a solution of 4-Nitroaniline (0.198 g, 1.44 mmol) in 15 ml of acetone at 5 °C. After 2 h stirring, the mixture was filtered and washed with acetone to afford 13.

M.p. 193-195 °C; (55 % yield); IR  $\nu$  3398, 3286, 3307, 2929, 1650;  $^1\text{H NMR } \delta$  (dmsod<sub>6</sub>) 1.27 (s br, 4H), 1.54 (m, 2H), 2.19 (t,  $J = 11.3$  Hz, 2H), 7.77 (d,  $J = 13.5$  Hz, 2H), 8.14 (d,  $J = 13.6$  Hz, 2H), 10.47 (s, 1H).

#### 4.1.4. 2-Allyl-3, 4-dihydro-2H-naphthalen-1-one 15.

To a solution of diisopropylamine (0.96 mL, 6.8 mM) in 20 mL of THF anhydrous, under nitrogen atmosphere at -78 °C, n-butilithium 1.6 M (4.27 mL, 6.84 mM) were added with continues magnetic stirring. After 1 h,  $\alpha$ -tetralone (1g, 6.84 mM) was added, and the reaction was maintained at the same temperature with stirring for 2 h more. After this time, allyl bromide (2.35 mL, 27.4 mM) was added and the reaction mixture was raised at room temperature. After 12 h of stirring, reaction flask was putted in a dry ice bath and ammonium chloride was added. Then, excess of THF was evaporated and extractions with water and methylene chloride were performed. The organic phase was dried with anhydrous sodium sulfate and filtered. Solvent reduction gave a viscose material containing 15. Purification in column chromatography 9:1 hexane/AcOEt, gave 15 as colorless oil, which solidify at low temperature.

M.p. <25°C; (80% yield) IR 3072, 2930, 1683;  $^1\text{H NMR } \delta$  1.87 (m, 1H), 2.26 (m, 2H), 2.55 (m, 1H), 2.76 (m, 1H), 2.99 (dd,  $J = 7.5, 4.5$  Hz, 2H), 5.06 (m, 1H), 5.11 (dq,  $J = 15, 2.1$  Hz, 1H) 5.85 (m, 1H), 7.23 (dd,  $J = 7.5, 0.6$  Hz, 1H), 7.29 (td,  $J = 7.2, 0.6$  Hz, 1H), 7.45 (td,  $J = 7.2, 1.5$  Hz, 1H), 8.03 (dd,  $J = 7.6, 1.5$  Hz, 1H),  $^{13}\text{C NMR } \delta$  27.96, 28.61, 34.04, 47.19, 116.79, 126.57, 127.45, 128.69, 132.53, 133.17, 136.21, 144.04, 119.40; HRMS calcd. for  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}$  (FAB<sup>+</sup>) 186.1045, found 186.1052.

#### 4.1.5. 2-(2-Oxo-propyl)-3,4-dihydro-2H-naphthalen-1-one 16.

$\text{PdCl}_2$  (0.246 g, 1.38 mM) was added to a magnetically stirred solution of 10 mL of DMF and 1 mL of distilled water. After 5 min., 15 (0.5 g, 1.38 mM) dissolved in 2 mL of DMF were added dropwise. The stirring was maintained for 12 h; the mixture was then percolated in a column packed with cotton using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  as solvent. Then DMF was eliminated with consecutive washes with water. Solvent was reduced and purification in column chromatography gave 16 as a green solid.

M.p. 90 °C; (65% yield) IR  $\nu$  2933, 1715, 1682;  $^1\text{H NMR } \delta$  1.92 (ddd,  $J = 25.8, 12.9, 4.41$  Hz, 1H), 2.19 (m, 1H), 2.27 (s, 3H), 2.45 (m, 1H), 2.95 (dt,  $J = 16.8, 2.76$  Hz, 1H), 3.11 (m, 1H), 3.15 (m, 1H), 3.18 (dd,  $J = 19.5, 6$  Hz, 1H), 7.25 (t,  $J = 7.68$  Hz, 1H), 7.29 (t,  $J = 7.71$  Hz, 1H), 7.47 (dd,  $J = 7.68, 1.38$  Hz, 1H), 8.0 (dd,  $J = 7.68, 1.35$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C NMR } \delta$  29.35, 29.45, 30.47, 43.82, 44.18, 126.58, 127.36, 128.72, 132.17, 133.35, 144.07, 199, 207.14; MS (EI<sup>+</sup>),  $m/z$  202 ( $\text{M}^+ - 19$ ).

## 4.2. Cytotoxic activity

The  $IG_{50}$  for compound 2 was obtained from three different experiments performed in duplicate, whereas for all other compounds it was obtained from one experiment performed in duplicate.

All of the experiments were carried out at four different concentrations (3.1, 10, 31 and 100  $\mu$ M).

The tumoral cell lines PC-3, U251 and K562 were supplied by the National Cancer Institute. Cytotoxicity assays were carried out at 5000 to 7500 cells/ml, as reported by Skehan et al. and Monks et al., who used the sulforhodamine B (SRB) protein assay to estimate cell growth [24, 25]. The percentage growth was evaluated spectrophotometrically in a Bio kinetics reader spectrophotometer.

Cytotoxic activity of 4, was measured by the National Cancer Institute with the same procedure mentioned above.

**Acknowledgment.** We thank CONACYT (32633-E) and DGAPA-UNAM (IN206598) for financial support. L. Chacón-García thanks CONACYT for doctoral fellowship support. We also thank M.T. Ramírez Apan for obtaining the biological data, R. Patiño, H. Rios, L. Velazco and J. Perez for technical assistance. Contribution No. 0000 from Instituto de Química, UNAM.

## REFERENCES

- [1] Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 18.
- [2] Wang, J. C. *J. Mol. Biol.* 89 (1974) 783-801.
- [3] Keller, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72 (1975) 4876-4880.
- [4] Lipard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 6102-6104
- [5] Wright, R. G.; Wakelin, L. P. G.; Fields, A.; Acheson, R. M.; Waring, M. S. *Biochemistry* 19 (1980) 5825.
- [6] Adams, A.; Guss, M.; Collyer, C.; Denny, W. A.; Wakelin, L. P. G. *Biochemistry* 38 (1999) 9221-9233.
- [7] Rehn, C.; Pindur, U. *Monatsh. Chem.* 127 (1996) 631-644
- [8] Peterson, S.E.; Coxon, J. M.; Strekowski, L. *Bioorg. Med. Chem.* 5 (1997) 277-281.
- [9] Baginski, M.; Fogolari, F.; Briggs, M. J. *Mol. Biol.* 274 (1997) 253-267.
- [10] Chaires, J.B. *Anthracycline antibiotics*, Waldemar Priebe Ed. American Chemical Society Symposium Series. (1995) pp 156-167.
- [11] Waring, M. J. *Bailly, C. Gene* 149 (1994) 69-79.
- [12] Rehn, C.; Pindur, U. *Monatsh. Chem.* 127 (1996) 645.
- [13] Nelson, E. M.; Tewey, K. M.; Liu, L. F. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 81 (1984) 1361-1365.
- [14] Redinbo, M. R.; Stewart, L.; Kuhn, P.; Champoux, J. J.; Hol, W. G. *J. Science* 279 (1998) 504-513.
- [15] Culota, E.; Koshland, D. E. *Science* 262 (1993) 1958-1961
- [16] Fritsche, M.; Haessler, C.; Brandner, G.; *Oncogene* 8 (1993) 307-318.
- [17] Chunchatprasert, L.; Shanon, P. V. R.; *J. Chem. Soc., PerkinTrans. 1* (1996) 1787-1795.
- [18] Legha, S. S. Guterman, J. U.; Hall, S. W.; Benjamin, R. S.; Burgess, M. A.; Valdivieso, M.; Bodey, G. P. *Cancer. Res.* 38 (1978) 3712-3716.

- [19] Wakelin, L. P. G.; Romanos, M.; Chen, T. K.; Glaubiger, D.; Canellakis, E.S., Waring, M. J. *Biochemistry* 19 (1978) 5057-5063.
- [20] Canellakis, E. S.; Shaw, Y. H.; Hanners, W. E., Schwartz, R. A. *Bichim. Biophys. Acta* 418 (1976) 277-289.
- [21] Martínez, R.; Sandoval, J.; Avila, G. J. *Heterocyclic Chem.* 35 (1998) 585-589.
- [22] Kadzhrishvili, D.O.; Dolidze, S.V.; Samsoniya, S. A.; Suvorov, N. N. *Khim. Geterotsikl. Soedin.* 3 (1990) 346-348.
- [23] Ezquerro, J.; Pedregal, C.; Lamas, C.; Barluenga, J.; Perez, M.; García-Martín, M.A.; González, J. M. *J. Org. Chem.* 61 (1996) 5804-5812.
- [24] Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Nat. Cancer Inst.* 82 (1990) 1107-1112.
- [25] Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Nat. Cancer Inst.* 83 (1991) 757-765.