



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**SÍNTESIS, MODELADO MOLECULAR Y ACTIVIDAD CITOTÓXICA IN VITRO DE  
DERIVADOS DE TIAZOLO[5,4-B]QUINOLINA E IMIDAZO[4,5-B]QUINOLINA**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. EN C. MARCO ANTONIO LOZA MEJÍA



TUTOR: DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

---

---

## **JURADO ASIGNADO**

Dr. Joaquín Tamariz Mascarúa	Presidente
Dr. Martín Andrés Iglesias Arteaga	Vocal
Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano	Vocal
Dr. Francisco Hernández Luis	Vocal
Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez	Secretario

## **LUGARES DONDE SE ELABORÓ EL PROYECTO:**

Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá de Henares

Parte de los resultados de esta tesis se presentaron en el 42º Congreso Nacional de Química. Guadalajara, Jal. Septiembre 2007.

---

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Rafael Castillo Bocanegra por sus consejos, por la confianza depositada en mí, por compartir sus experiencias, por impulsarme en mi preparación no sólo doctoral, sino también personal.

A los miembros de mi Comité Tutelar Dr. Joaquín Tamariz Mascarúa y Dr. Roberto Martínez por su gran apoyo, sus críticas y sus consejos en la realización y mejora de este proyecto y por el interés mostrado en mi formación doctoral.

A los miembros de mi Comité Tutelar Ampliado Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano y Dr. Rogelio Rodríguez Sotres y a los miembros del jurado Dr. Martín Andrés Iglesias Arteaga, Dr. Francisco Hernández Luis y Dr. Luis Demetrio Miranda Gutiérrez por sus objetivos comentarios y sugerencias para mejorar mi trabajo de tesis.

Al Dr. Alfonso Lira Rocha por sus comentarios, su orientación, su constante interés en la realización del proyecto, por siempre procurar por mi formación doctoral y personal y por su invaluable amistad.

A la Dra. Angelina Quintero (†) cuyo interés y propuestas al inicio del proyecto fueron parte importante para los avances que se han logrado.

Al Dr. Antonio Lorente Pérez y la Dra. María José Fernández por su dirección y amistad en la realización de mi estancia de investigación en la Universidad de Alcalá de Henares.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por la realización de los experimentos de inhibición de la ADN topoisomerasa II y por sus apuntes, su visión y sus sugerencias críticas. Al M. en C. Ignacio González Sánchez por las aportaciones hechas al avance de la parte bioquímica del proyecto.

Al Dr. Juan Antonio Cogordán Ramírez por su interés, discusiones y sugerencias en la realización de los estudios de modelado molecular.

Al M. en C. José Solano Becerra por la determinación de la actividad citotóxica de los derivados sintetizados dentro de nuestro grupo de trabajo.

Al Pas.QFB Kémish Adrián López Rodríguez y al Pas.QFB Juan Francisco Cortés Benítez, por el apoyo técnico en la síntesis del núcleo de imidazoquinolina.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios de doctorado (becario 195671) y para la realización de mi estancia doctoral en la Universidad de Alcalá de Henares a través del Programa de Becas Mixtas.

---

---

---

***A Sonia.  
A mis padres. A mi hermano.***

---

<b>INDICE</b>	<b>i</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>iv</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2.ANTECEDENTES</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Algunos aspectos bioquímicos del cáncer</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Terapia citotóxica del cáncer</b>	<b>3</b>
<b>2.3 Agentes intercalantes</b>	<b>8</b>
<b>2.4 ADN topoisomerasa II</b>	<b>10</b>
<b>2.5 Fármacos antitumorales que afectan la actividad de la ADN topoisomerasa II</b>	<b>13</b>
<b>2.6 Derivados de acridina</b>	<b>19</b>
2.6.1 Derivados de carboxamidoacridina	20
2.6.2 Derivados bisintercalantes	21
2.6.3 Derivados híbridos de acridina	22
2.6.4 Derivados de 9-anilinoacrdina	23
<b>2.7 Diseño de nuevos fármacos mediante analogía</b>	<b>25</b>
2.7.1 Ventajas y desventajas del diseño de fármacos por analogía	25
2.7.2 Bioisosterismo	26
<b>2.8 Tiazolo[5,4-<i>b</i>]quinolinas como bioisósteros de acridina</b>	<b>26</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS</b>	<b>31</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>5. ANALISIS DE RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Parte química</b>	<b>36</b>
5.1.1 Derivados de tiazolo[5,4- <i>b</i> ]quinolina	36
5.1.2 Derivados de imidazo[4,5- <i>b</i> ]quinolina	46
<b>5.2 Modelado molecular de compuestos tricíclicos anilino sustituidos</b>	<b>57</b>
5.2.1 Modelado molecular de las moléculas aisladas	57
5.2.2 Modelado molecular de los complejos de intercalación con ADN	65
<b>5.3 Modelado molecular de derivados de tiazolo[5,4-<i>b</i>]quinolina empleados para el análisis de relación estructura-actividad</b>	<b>72</b>
<b>5.4 Análisis estructura-actividad citotóxica</b>	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>85</b>
<b>7. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>86</b>
<b>7.1. Síntesis</b>	<b>86</b>
7.1.1. Materiales	86
7.1.2. Cromatografía	86
7.1.3. Descripción de las síntesis.	87

---

---

<b>7.2. Parte de modelado molecular</b>	<b>102</b>
7.2.1. Análisis conformacional y cálculo de propiedades electrónicas de las moléculas aisladas	102
7.2.2. Modelado molecular de los complejos de intercalación con distintas secuencias de ADN	102
<b>7.3. Evaluación de la actividad citotóxica</b>	<b>103</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>104</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>110</b>
Anexo 1. Artículos publicados	111
Anexo 2. Espectros	131
Anexo 3. Estancia de investigación	189
Anexo 4. Imágenes de los compuestos analizados como entidades aisladas	202
Anexo 5. Imágenes de los complejos de intercalación	214

## RESUMEN

El término cáncer es usado para identificar un grupo de enfermedades cuyas características son la alteración morfológica y funcional de las células afectadas, seguida de su proliferación descontrolada y que invaden, desplazan y destruyen a otros tejidos sanos del organismo. Constituye un grave problema de salud pública, estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que actualmente es la causa del 13% de las defunciones a nivel mundial. La falta de selectividad de los quimioterápicos actuales y el desarrollo de resistencia por parte de las células tumorales hacen necesaria la búsqueda de sustancias que tengan mayor selectividad sobre células tumorales, reduciendo con ello el número de efectos secundarios en el paciente y mejorando las probabilidades de remisión.

En el presente trabajo se muestra el diseño, la síntesis, el modelado molecular y la evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* de derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina e imidazo[4,5-*b*]quinolina, que son compuestos bioisostéricos a los derivados de 9-anilinoacridina. Asimismo, se establecieron modelos de relación estructura-actividad citotóxica para los compuestos tricíclicos 9-anilino sustituidos que han sido sintetizados dentro del grupo de trabajo.

En la parte química, se sintetizaron tres nuevos derivados de 2-metiltio[5,4-*b*]quinolina y seis nuevos derivados de 2-alquilaminotiazolo[5,4-*b*]quinolina mediante una ruta divergente. Para la síntesis del núcleo de imidazo[4,5-*b*]quinolina, un sistema tricíclico poco reportado en la literatura, se desarrolló una ruta sintética novedosa que permite la incorporación de diversos sustituyentes en las posiciones 2, 3 y 9 de este núcleo tricíclico, lográndose la obtención de ocho derivados con este tipo de estructura. Todos los productos finales novedosos se caracterizaron por sus datos espectroscópicos y espectrométricos.

Con el propósito de establecer algunos parámetros comunes o diferencias entre los compuestos con mayor citotoxicidad y aquellos con poca o nula actividad se estudiaron, mediante modelado molecular, derivados de 9-anilinoacridina, 9-anilino-2-metiltio[5,4-*b*]quinolina y 9-anilino-2-metilimidazo[4,5-*b*]quinolina como entidades aisladas y en complejos de intercalación con diferentes secuencias de ADN. Los resultados mostraron que el momento dipolar, la energía de los orbitales frontera y la geometría del complejo de intercalación son factores relevantes para la afinidad de los compuestos por el ADN y para su citotoxicidad.

Se obtuvieron los datos de actividad citotóxica *in vitro* de los derivados sintetizados en algunas líneas celulares. El análisis de relación estructura-actividad mostró que valores adecuados de la energía del LUMO y la magnitud y orientación del momento dipolar, son parámetros que influyen en la actividad citotóxica de derivados tricíclicos anilino-sustituidos sin cadenas alquilamínicas en su estructura, mientras que el logP y el área polar superficial influyen en los derivados 2-alquilaminosustituidos.

Los compuestos que carecen de grupos alquilamino parecen tener un mecanismo de citotoxicidad diferente al de los compuestos que poseen estos grupos en su estructura, esto se reflejó en los ensayos de inhibición de la ADN topoisomerasa II en los que los compuestos 2-alquilamino sustituidos tuvieron menor actividad que los 2-metiltio sustituidos, a pesar de su mayor citotoxicidad.

## ABSTRACT

The term cancer is used to identify a group of diseases which is characterized by morphological and functional alteration of cells, followed by their uncontrolled proliferation, that invade, displace and destroy healthy tissues of the body. Cancer constitutes a major public health issue. According to World Health Organization (WHO) statistics this illness accounts for 13% of the deaths worldwide. Research in chemotherapy focuses on discovering and designing new substances that display greater selectivity on tumor cells thus reducing the number of adverse effects and improving the probabilities of remission.

In this work, the design, synthesis, molecular modeling and *in vitro* cytotoxic activity evaluation of thiazolo[5,4-*b*]quinoline and imidazo[4,5-*b*]quinoline derivatives, which are bioisosteric compounds of 9-anilinoacridines are presented. Also, structure-cytotoxic activity relationship models were developed for the 9-anilino substituted compounds that have been synthesized in our group.

In the chemistry part, three new derivatives of 2-methylthiothiazolo[5,4-*b*]quinoline and six new novel derivatives of 2-alkylaminothiazolo[5,4-*b*]quinoline were synthesized by a divergent route. For the synthesis of the imidazo[4,5-*b*]quinoline derivatives, a tricyclic system scarcely reported in literature, a novel synthetic route was developed. This route allows the incorporation of diverse substituents in positions 2, 3 and 9 of the tricyclic nucleus. All novel compounds were characterized by their spectroscopic and spectrometric data.

With the purpose of finding some common parameters or significant differences between highly cytotoxic compounds and those with low or null activity, some 9-anilinoacridine, 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline and 9-anilinoimidazo[4,5-*b*]quinoline derivatives were studied by molecular modeling as isolated species and in intercalation complexes with different DNA sequences. The results indicate that dipole moment, frontier orbitals energy and geometry of the intercalation complexes are relevant factors for DNA affinity and cytotoxicity of 9-anilino substituted compounds.

Cytotoxic activities of the synthesized compounds were determined by MTT protocol, data was used to establish structure-activity relationship (SAR) models. Appropriate values of LUMO energy and magnitude and orientation of dipole moment are relevant factors for cytotoxicity of 9-anilino substituted compounds with no alkylamino chains in their structure, whereas logP and polar superficial area are more important factors in 2-alkylamino substituted derivatives.

These findings indicate that compounds with no alkylamino groups seem to have a different mechanism of cytotoxicity. This was reflected in DNA topoisomerase II inhibition assay results where 2-alkylamino substituted compounds had lower activity than 2-methylthio substituted derivatives despite their higher cytotoxicity.

# 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial. Estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) estiman que en 2008 7.6 millones de personas fallecieron de alguno de los tipos de cáncer, representando el 13% de las muertes a nivel mundial y se prevé que en los próximos 10 años, 84 millones de personas mueran por esta enfermedad, el 70% en países del tercer mundo.<sup>1</sup> El término cáncer es usado para identificar un grupo de enfermedades cuyas características son la alteración morfológica y funcional seguida de la proliferación descontrolada de las células de un tejido, que invaden, desplazan y destruyen a otros tejidos sanos del organismo.<sup>2</sup>

Aunque es difícil de precisar cuándo se empezaron a usar sustancias para tratar este padecimiento, la quimioterapia del cáncer inició alrededor de 1940 con el descubrimiento de las propiedades antitumorales de las mostazas nitrogenadas y de la aminopterina, un antimetabolito del ácido fólico. Los avances en el área de la bioquímica permitieron el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de la enfermedad.<sup>3</sup>

Sin embargo, la quimioterapia tiene sus inconvenientes:

1. La efectividad del quimioterápico dependerá de la naturaleza del cáncer, ya que no existe un agente efectivo para todos los tipos.
2. Las células tumorales llegan a desarrollar resistencia a los quimioterápicos empleados.
3. Los quimioterápicos no son selectivos y afectan también a células sanas. A pesar de que las células neoplásicas difieren de las células normales en sus requerimientos nutritivos, no difieren lo suficiente en el aspecto biológico y bioquímico. Las células que también se dividen rápidamente suelen verse afectadas, ocasionando diversos efectos secundarios que dependerán del paciente y el fármaco empleado.

Esto se ve reflejado en una baja eficacia del tratamiento y en una pobre calidad de vida con beneficios mínimos para el paciente. Para solucionar estos problemas la investigación en quimioterapia se enfoca a descubrir y diseñar sustancias que incrementen el número de fármacos para combatir la enfermedad, que tengan mayor selectividad sobre células tumorales, reduciendo con ello el número de efectos secundarios en el paciente y mejorando las probabilidades de remisión.

Una de las estrategias más empleadas para la obtención de nuevos fármacos es la modificación estructural de una molécula patrón que muestra actividad. Durante el periodo de 2000-2003, la mayoría de los fármacos aprobados por la FDA surgieron del diseño de nuevos análogos que mejoraron alguna de las propiedades de la molécula original. Los análogos pueden ser directos (que tienen similitud estructural y funcional con la molécula patrón), estructurales (tienen estructura similar a la molécula patrón pero diferentes propiedades farmacológicas) y funcionales (difieren estructuralmente de la molécula patrón, pero tienen un perfil farmacológico similar).<sup>4</sup>

En el presente trabajo se muestran el diseño, la síntesis, el modelado molecular y la evaluación citotóxica *in vitro* de derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina e imidazo[4,5-*b*]quinolina. Éstos poseen una estructura análoga a la de los derivados de 9-anilinoacridinas, que son compuestos han mostrado actividad citotóxica importante.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Algunos aspectos bioquímicos del cáncer

Aún cuando el cáncer está asociado a un incremento en el número de células y a alteraciones en los mecanismos que regulan el nacimiento de nuevas células y su proliferación, actualmente se sabe que alteraciones en los mecanismos de apoptosis también son importantes en ciertos tipos de cáncer. El cáncer se distingue de otros procesos formadores de tumores por su capacidad de invadir otros tejidos.<sup>5</sup>

El proceso por el cual se inicia la formación de tumores o tumorogénesis no está totalmente esclarecido. Sin embargo, se sabe que la acumulación de mutaciones en genes claves puede desencadenar el proceso, ya que, desde el punto de vista evolutivo, estas mutaciones favorecen el crecimiento de las células mutantes sobre sus vecinas.<sup>6</sup> Las formas aberrantes de estos genes son denominadas oncogenes y contribuyen a los procesos de transformación, aumentando la división celular o disminuyendo la sensibilidad o propensión celular a la muerte. Se ha demostrado que una sola mutación no es capaz de desencadenar el proceso, sino que se requieren al menos de dos oncogenes activados para dar células con un diferente fenotipo.<sup>7</sup> Esto llevo a postular que la tumorogénesis es un proceso de varios pasos intermedios antes de llegar a neoplasmas letales.

La carcinogénesis es el proceso que lleva a mutaciones genéticas inducidas por factores químicos o físicos. Conceptualmente, este proceso puede dividirse en 3 etapas: iniciación, promoción y progresión.<sup>8</sup> La primera etapa involucra un cambio genético irreversible, en la siguiente hay un aumento en la proliferación de las células, y finalmente en la progresión se da una acumulación de mutaciones que llevan a la adquisición de un fenotipo maligno o invasivo.

En el modelo de tumorogénesis en piel de ratón, se han logrado identificar estas etapas. En este modelo la etapa de iniciación se da cuando un compuesto o su metabolito forman un aducto con el ADN, lo que ocasiona una inserción o eliminación de bases, translocación cromosomal o amplificaciones. Si el daño en el ADN no es reparado, puede haber alteraciones permanentes y mutaciones en el genoma que pueden conducir a la activación de oncogenes o a la inactivación de genes supresores de tumores. La etapa de promoción es un proceso reversible en la cual un agente químico estimula la proliferación de las células iniciadas o mutadas. En el caso del modelo de tumorogénesis en piel de ratón, estas células no generan tumores sino hasta después de dosis repetidas de ésteres de forbol.<sup>8</sup> Finalmente, en la etapa de progresión se ha observado que varios agentes iniciadores también pueden llevar a la progresión del tumor.

Las células tumorales tienen ciertas diferencias respecto a las células normales. Esto es importante para el establecimiento de dianas biológicas para tratar la enfermedad. Algunas de estas diferencias son:<sup>9</sup>

- Alteraciones observadas *in vitro*
  - Cambios citológicos: Aumento del número y/o tamaño del núcleo, formación de cúmulos (*clusters*) de células.
  - Alteraciones en el crecimiento celular: Disminución de la sensibilidad a los factores que detienen el crecimiento celular, pérdida de la adhesión, pérdida en el control del ciclo celular, resistencia a la apoptosis.
  - Cambios en la estructura y funcionalidad de la membrana celular.

- 
- Pérdida de las interacciones en la matriz extracelular.
  - Pérdida de la respuesta a agentes que inducen la diferenciación celular.
  - Mecanismos de transducción de señales alterados.
  
  - Alteraciones observadas *in vivo*
    - Incremento en la expresión de oncogenes debidos a alteraciones en los cromosomas.
    - Disminución en la expresión de los genes supresores de tumores.
    - Alteraciones en los patrones de mutilación del ADN.
    - Sobreproducción de los factores de crecimiento.
    - Incremento en los niveles de las proteínas implicadas en la síntesis de los ácidos nucleicos.
    - Producción de antígenos oncofetales.
    - Capacidad de evitar la respuesta inmune del hospedero.

La etiología del cáncer no es del todo clara; sin embargo, se sabe que existen varios factores que pueden inducir el padecimiento:<sup>2</sup>

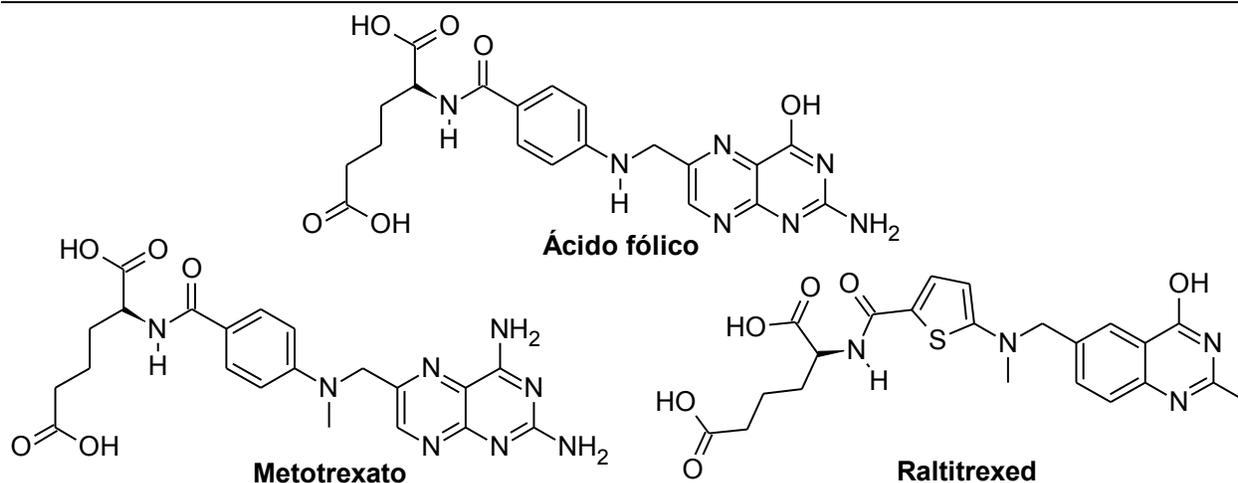
- Predisposición genética.
- Carcinogénesis química.
- Desajuste hormonal.
- Radiaciones.
- Virus y parásitos.

El tratamiento del cáncer incluye la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia.<sup>2,5</sup> Esta última se basa en la actividad citotóxica de algunos compuestos que posean cierta selectividad sobre las células tumorales.

## 2.2. Terapia citotóxica del cáncer

Aunque los agentes citotóxicos para el tratamiento del cáncer tradicionalmente se han clasificado por su mecanismo de acción, también pueden ser agrupados por el sitio de acción al cual van dirigidos. De manera general se pueden agrupar en cuatro categorías: enzimas específicas, microtúbulos, receptores de hormonas y de factores de crecimiento y ácidos nucleicos.<sup>2</sup>

- Enzimas específicas. Un ejemplo clásico de estos fármacos lo constituyen los antimetabolitos. Son sustancias que compiten con metabolitos normales por determinados sistemas enzimáticos, o bien, contribuyen a formar metabolitos anormales que luego interrumpen el ciclo metabólico. A pesar de que fueron de los primeros quimioterápicos, aún son usados en la clínica; por ejemplo, algunos antimetabolitos del ácido fólico como el metotrexato o el raltitrexed,<sup>10</sup> cuyas estructuras se muestran en la Figura 1, son parte del tratamiento del cáncer colorrectal y de algunos linfomas. Otro ejemplo es el 5-fluorouracilo usado en el tratamiento de cáncer colorrectal y mamario, e incluso un profármaco, la capecitabina, ha sido aprobado recientemente.<sup>11</sup>



**Figura 1.** Antimetabolitos del ácido fólico.

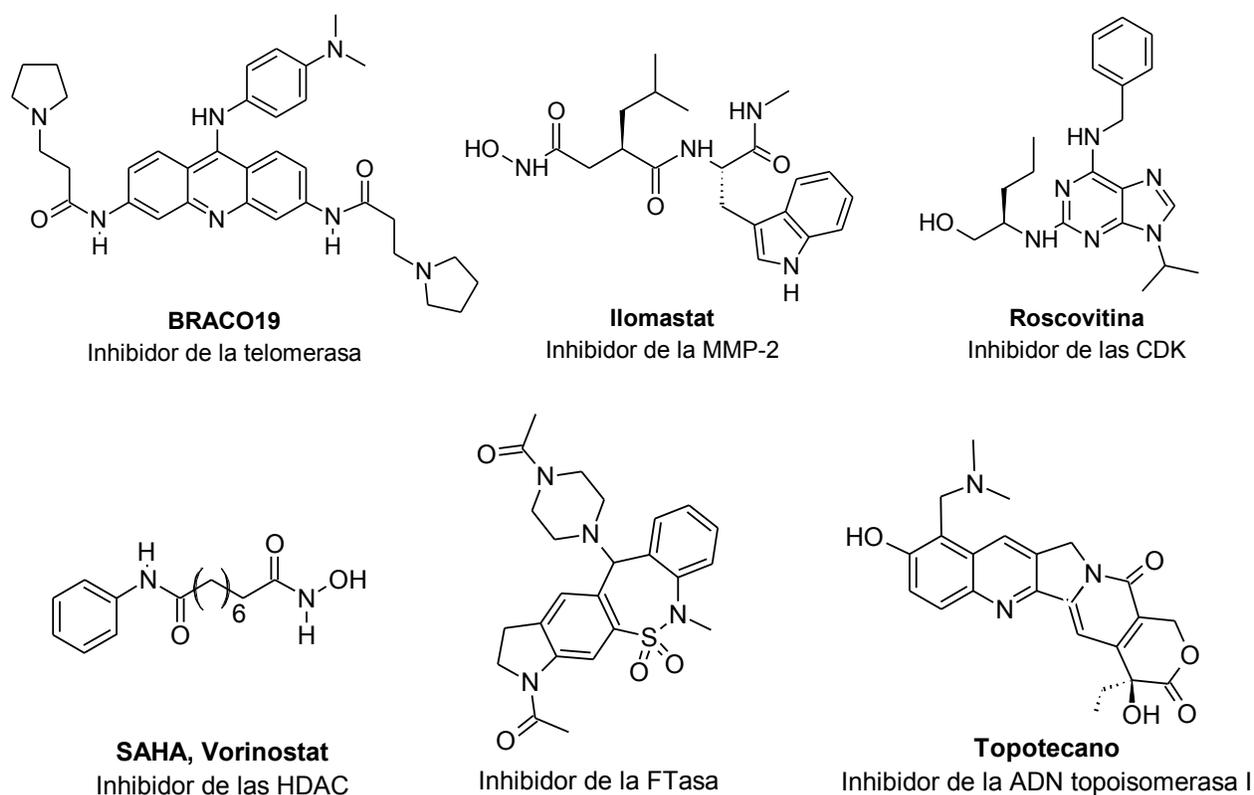
Existen varios tipos de enzimas que también son potenciales dianas para el tratamiento del cáncer. Estas enzimas participan en la regulación del ciclo celular, en la expresión de algunos genes y en la síntesis y reparación del ADN y, frecuentemente, están sobreexpresadas en las células tumorales. Dentro de estos blancos enzimáticos se encuentran:

- *Telomerasa*. Los telómeros son secuencias repetidas de 5'-GGTTAG-3' que protegen a los términos de los cromosomas de eventos de fusión, la longitud de estos telómeros disminuye con cada división celular. La enzima telomerasa añade múltiples copias de la secuencia 5'-GGTTAG-3' al final del telómero, revirtiendo su degradación e incrementando la capacidad replicativa de las células. Los inhibidores de esta enzima normalmente se unen a la secuencia terminal del telómero, impidiendo la acción de la telomerasa.<sup>12,13</sup>
- *Metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP, en inglés)*. Las enzimas de la familia de las MMP son endopeptidasas dependientes de zinc, capaces de degradar varios componentes de la matriz extracelular (MEC) y están involucradas en varios procesos fisiológicos. La invasividad y la metástasis son procesos de varias etapas que involucran la degradación proteolítica de la MEC y alteraciones de las interacciones célula-MEC-célula y migración de la célula tumoral.<sup>14,15</sup>
- *Cinasas dependientes de ciclina (CDK, en inglés)*. Las CDK son serina-treonina cinasas cuya actividad depende de la unión y activación de ciclinas, estos complejos heterodiméricos de cinasa-ciclina fosforilan varios sustratos, involucrados en el control de la transcripción y del ciclo celular en respuesta a varios estímulos.<sup>16,17</sup>
- *Enzimas deacetilasas de las histonas (HDAC, en inglés)*. Las HDAC catalizan la remoción de grupos acetilo de los residuos de las proteínas, incluidas las histonas, afectando la expresión genética, la diferenciación celular y la apoptosis. Además de la sobreexpresión de las HDAC, se han observado mutaciones e inactivación en las acetiltransferasas de las histonas (HAT) en varios tipos de cáncer.<sup>18,19</sup>
- *Farnesiltransferasa (FTasa)*. La FTasa y otras enzimas relacionadas son metaloenzimas que catalizan el primer paso de una serie de modificaciones que dirigen la localización de las proteínas en la membrana. Esto se lleva a cabo mediante la transferencia de un isoprenoide a sus proteínas blanco. Por otra parte, hay mutaciones que activan la oncoproteína Ras que están presentes en el 30% de

los casos de cáncer y en el 90% de los de cáncer pancreático. Dado que la proteína Ras debe estar prenilada para su localización en la membrana y para participar en la transformación celular, constituye un blanco para potenciales agentes antitumorales.<sup>20,21</sup>

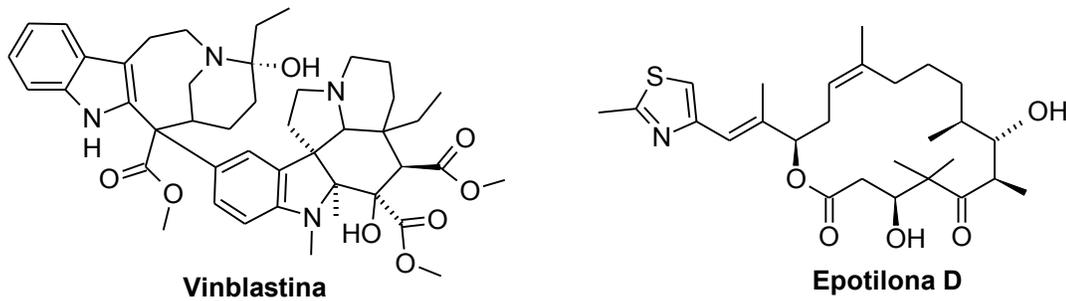
- *ADN topoisomerasas (Topo)*. El estado topológico del ADN está regulado por las topoisomerasas existiendo dos tipos: Topo I y Topo II. Estas enzimas son esenciales en los mamíferos y remueven los nudos en el material genético mediante rupturas transitorias en las cadenas de fosfato de la doble hélice. Este estado de ruptura transitoria del ADN es potencialmente letal para la célula por lo que los inhibidores de estas enzimas normalmente actúan estabilizando este estado en el que el ADN está roto.<sup>22-24</sup> Más adelante se ampliará sobre el mecanismo de acción de estas enzimas y sus inhibidores.

En la Figura 2 se muestran las estructuras de algunos inhibidores enzimáticos descritos en los párrafos anteriores.



**Figura 2.** Inhibidores enzimáticos.

- **Microtúbulos**. El papel fundamental de los microtúbulos en la división celular y en la mitosis los hace un blanco interesante para el tratamiento del cáncer. Los agentes que tienen como diana los microtúbulos, como los que se muestran en la Figura 3, se pueden clasificar en aquellos que despolimerizan los microtúbulos (como la vinblastina y la colchicina) y en los que incrementan su polimerización (como el paclitaxel y las epotilonas). La interrupción de la dinámica de los microtúbulos es la manera en que estos agentes inhiben la proliferación celular.<sup>25,26</sup>

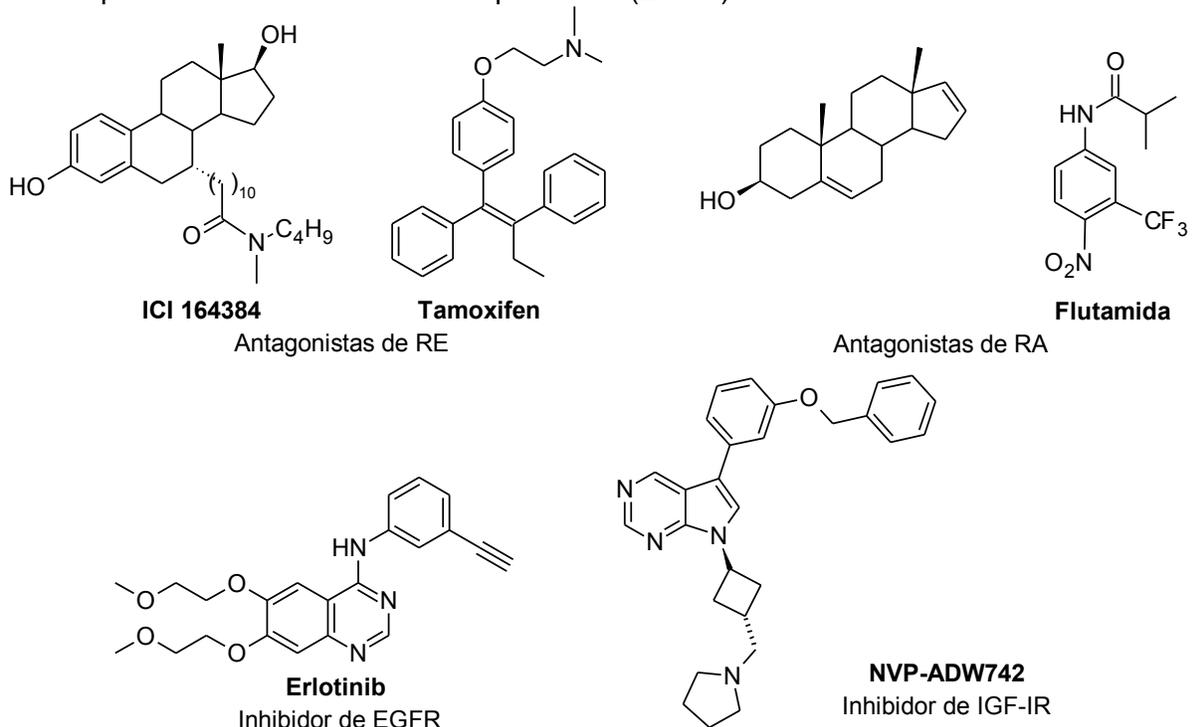


**Figura 3.** Inhibidores mitóticos.

• **Receptores de hormonas y factores de crecimiento.** Este tipo de blancos surgieron a partir de la observación de que en algunos tipos de cáncer ciertos receptores están sobreexpresados y son necesarios para el crecimiento de las células tumorales.

◦ *Receptores de hormonas.* La estimulación de los receptores estrogénico (RE) y androgénico (RA) juega un papel importante en el crecimiento de sus células blanco. Por lo tanto la supresión de esta estimulación con el uso de antagonistas de dichos receptores constituye una manera de tratar algunos tipos de cáncer como el de mama (bloqueando el RE) o el de próstata (con antagonistas de RA). Estos antagonistas pueden ser o no ser de naturaleza esteroidal como se ejemplifica en la Figura 4.<sup>27,28</sup>

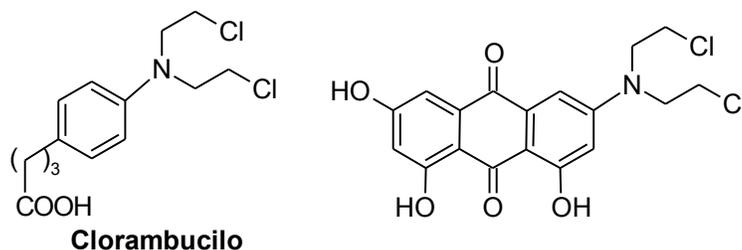
◦ *Factores de crecimiento.* Algunos fármacos que tienen en este tipo de dianas su sitio de acción (por ejemplo el erlotinib cuya estructura se muestra en la Figura 4), han sido aprobados para su uso en la clínica, lo que ha impulsado la investigación en esta área. Se sabe que la activación de estos receptores está implicada en los aspectos de supervivencia y de proliferación de las células tumorales evitando la apoptosis, además de que inducen la producción de factores angiogénicos y promueven la invasión hacia otros tejidos. Dentro de estos receptores se encuentran el receptor de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-IR) y el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR).<sup>29,30</sup>



**Figura 4.** Antagonistas de los receptores de hormonas y factores de crecimiento.

- Ácidos nucleicos. Dentro de esta categoría los agentes pueden clasificarse de acuerdo a la manera en que se unen al ADN, ya sea de manera covalente (agentes alquilantes) o no covalente (ya sea al surco menor o por intercalación)

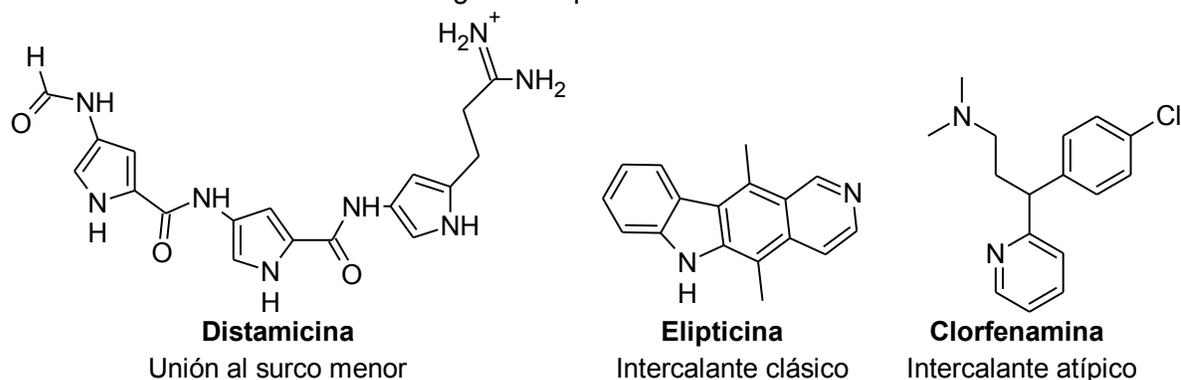
- *Unión covalente.* Los radicales alquílicos cedidos por compuestos de este tipo se unen con el nitrógeno de la posición 7 de las moléculas de guanina del ADN, de esta forma producen su desorganización estructural e incluso la formación de puentes entre cadenas próximas de dichas moléculas (*cross linking*). Algunos de los inconvenientes de estos fármacos se han resuelto incorporando cromóforos acarreadores que se unen al ADN por intercalación, como se ilustra con el derivado tricíclico de la Figura 5.<sup>31,32</sup>



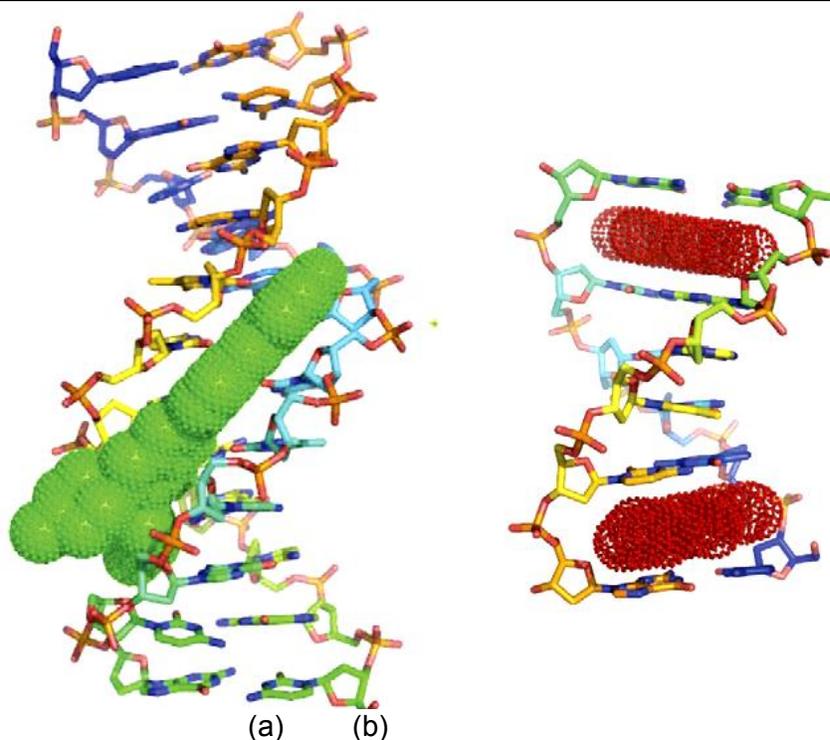
**Figura 5.** Agentes alquilantes

- *Unión al surco menor.* La unión al surco menor del ADN por parte de estos agentes es estabilizada a través de puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals, tienen alta selectividad por secuencias específicas de ADN, aunque preferentemente se unen a secuencias ricas en adenina-timina (A-T). Varias sustancias de este grupo poseen en sus estructuras (Figura 6) sistemas heterocíclicos de 5 ó 6 miembros unidos por enlaces amida y grupos básicos que se encontrarían en su forma protonada a pH fisiológico.<sup>33-35</sup>

- *Unión por intercalación.* La intercalación involucra la inserción de una molécula plana entre los pares de bases. La Figura 7 muestra la diferencia que existe entre el modo de unión al surco menor y el modo de unión por intercalación. Aunque la intercalación se ha asociado con sistemas policíclicos, intercalantes atípicos que carecen de sistemas fusionados empiezan a ser reconocidos. Normalmente la presencia de grupos básicos, catiónicos o electrofílicos es necesaria para que tengan actividad antitumoral y a sus estructuras se han incorporado grupos reactivos para unirse de manera covalente al ADN o cationes metálicos que inducen la ruptura hidrolítica o fotolítica de la cadena de fosfatos.<sup>33, 36-38</sup> Estos compuestos y su mecanismo de acción se tratan en el siguiente apartado.



**Figura 6.** Estructuras de algunos agentes que se unen al ADN de forma no covalente.



**Figura 7.** Unión al ADN a través del surco menor (a, NDB-8bna) y por intercalación (b, NDB-1z3f).<sup>33</sup>

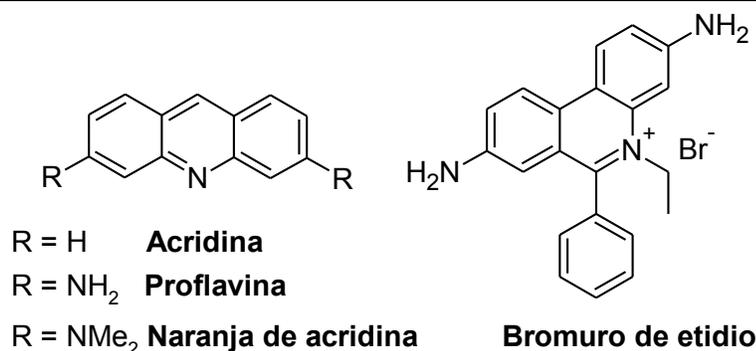
## 2.3 Agentes intercalantes

A partir del descubrimiento del ácido desoxirribonucleico (ADN) las propiedades estructurales que le permiten funcionar como centro de almacenamiento de la información genética, así como las interacciones de ciertos ligantes con los ácidos nucleicos han sido el objeto de intensas investigaciones.<sup>39</sup> La capacidad que puedan tener ciertas sustancias de interactuar con el ADN interfiriendo con la transcripción o la replicación, pasos necesarios para el crecimiento y división celular, las ubica como quimioterápicos potenciales.

Los ácidos nucleicos pueden interactuar de manera reversible con una gran variedad de especies químicas, entre las que se incluyen moléculas de agua, especies iónicas, moléculas orgánicas de bajo peso molecular y macromoléculas, pudiendo interaccionar de tres formas:<sup>40</sup>

- Unión a lo largo de la hélice. Estas interacciones son poco específicas y normalmente son a través de interacciones electrostáticas.
- Interacciones en el surco menor o surco mayor.
- Intercalación.

La interacción de moléculas orgánicas con el ADN se empezó a estudiar con los agentes intercalantes, siendo el bromuro de etidio, la proflavina, la acridina o el naranja de acridina de los primeros en ser estudiados. Lerman<sup>41</sup> observó que la adición de alguno de estos compuestos a una solución de ADN cambiaba la viscosidad y coeficiente de sedimentación del ADN, lo que lo llevó a proponer que un cierto cambio estructural en el ADN era promovido por este tipo de sustancias a través del mecanismo de intercalación, formándose un complejo entre el ligante y el ADN. Este tipo de comportamiento se ha descrito para un gran número de sistemas policíclicos aromáticos.<sup>42</sup>



**Figura 8.** Agentes intercalantes clásicos.

El proceso de intercalación inicia con la transferencia del ligante de un ambiente acuoso a una zona hidrofóbica en los surcos del ADN. Este proceso puede ser considerado como favorable debido a la naturaleza no polar del ligante, pasando a un estado de transición donde las bases del ADN se separan 3.4 Å, para formar la cavidad donde se intercalará el ligante (aunque en la práctica esta separación suele ser menor debido a cambios en la forma de la doble hélice) lo que requiere cambios en los ángulos de torsión de la cadena de fosfato-azúcar.<sup>43</sup> Este complejo ADN-intercalante es estabilizado por fuerzas no covalentes como fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o de transferencia de carga, aunque también se ha propuesto la interacción de orbitales frontera.<sup>44-49</sup> Algunos experimentos para determinar la interacción con el ADN se muestran en la Tabla 1, los experimentos para determinar la interacción con el ADN deben de ser complementados con aquellos para determinar si la interacción es a través del surco mayor o el surco menor.<sup>33,50</sup>

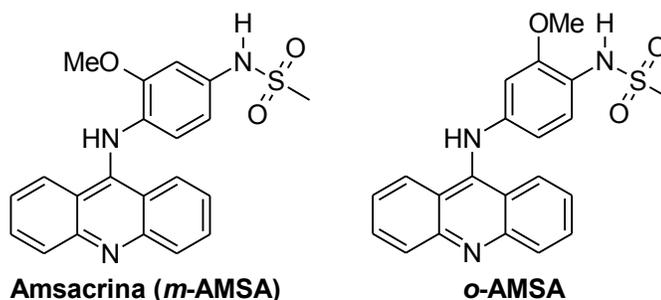
**Tabla 1.** Experimentos para demostrar la interacción de moléculas orgánicas con el ADN<sup>50</sup>

Interacción con el ADN	Determinación del modo de interacción
Aumento en la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) por estabilización de la doble hélice.	Experimentos de viscosidad. El aumento en la longitud lineal del ADN conlleva un aumento en la viscosidad, característico en los intercalantes y es la prueba más concluyente.
Cambio en los máximos de absorción en espectroscopia UV.	Titulación por desplazamiento de bromuro de etidio de los sitios de intercalación.
Experimentos de diálisis competitiva. Permite determinar de manera preliminar si existe selectividad por alguna secuencia.	Experimentos de dicroísmo eléctrico lineal. Permite determinar si la unión es por intercalación (dicroísmo negativo) o por el surco menor (dicroísmo positivo).
Incremento en la emisión de fluorescencia.	Cristalografía de rayos X.
Titulación calorimétrica isotérmica. Útil para determinar los parámetros termodinámicos.	Experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup> H o <sup>31</sup> P.
Cambios en el espectro de dicroísmo circular.	

Por otra parte, los estudios computacionales ofrecen la posibilidad de mejorar y/o ampliar la información adquirida del trabajo experimental, permitiendo tener un conocimiento detallado de la influencia de la secuencia de bases, del ambiente que rodea al sitio de intercalación y de la relación entre estructura-energía del complejo resultante.<sup>51</sup>

Aunque existe cierta correlación entre la capacidad de intercalarse al ADN y la actividad biológica de un compuesto, la citotoxicidad no depende únicamente de este factor. Sin

embargo, la actividad antineoplásica de los intercalantes del ADN no reside únicamente en su capacidad de intercalarse entre las bases. Esto queda ejemplificado al comparar la actividad de la amsacrina o *m*-AMSA con respecto a su isómero de posición *o*-AMSA (Figura 9). Este último tiene una afinidad 10 veces mayor por el ADN en comparación a la amsacrina, sin embargo ésta tiene mayor actividad citotóxica que *o*-AMSA.<sup>52</sup> La diferencia estriba en que la amsacrina es capaz de afectar la actividad de la enzima ADN topoisomerasa II.<sup>52,53</sup> Algunos aspectos relevantes de esta enzima se tratan a continuación.



**Figura 9.** Amsacrina y su isómero de posición *o*-AMSA

## 2.4 ADN topoisomerasa II

La gran cantidad de información genética representa un gran reto para las células en términos de organización, accesibilidad y segregación del genoma. Durante los procesos en los cuales el ADN toma parte, la topología de la doble hélice cambia notablemente e inevitablemente pueden llegar a formarse nudos debido al sobreenrollamiento de la misma lo que dificulta los procesos necesarios para la replicación y la transcripción, pues se dificulta la separación de las dos hebras e incluso puede dar lugar a fallas durante la mitosis ocasionando la muerte celular.<sup>54,55</sup> La topología del ADN es modulada por enzimas conocidas como topoisomerasas mediante la ruptura transitoria de la cadena de azúcar-fosfatos de una o ambas hebras.<sup>55, 56</sup>

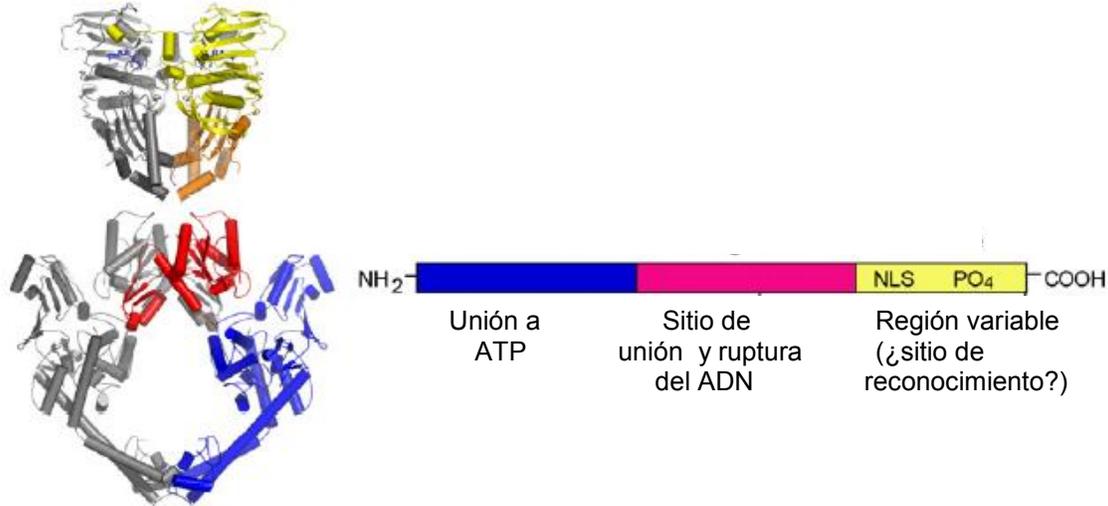
Todos los tipos de ADN topoisomerasa presentan dos características, la primera es la capacidad de romper y unir la cadena de fosfatos del ADN a través de la formación de un enlace covalente entre un residuo de tirosina y un grupo fosfato del ADN y la segunda característica es que permite el paso de una hebra o un dúplex de ADN a través de la apertura formada por la ruptura del ADN, lo que disminuye el estrés torsional creado por el sobreenrollamiento.<sup>54-56</sup>

Se han descrito tres familias de ADN topoisomerasas dependiendo del modo en que realizan su actividad catalítica:<sup>57</sup>

- Tipo I-5'. Rompen una hebra del ADN a través de la formación de un enlace covalente de 5'-fosfotirosina.
- Tipo I-3'. Primero se unen al dúplex de ADN y después rompen una hebra a través de la formación de un enlace covalente de 3'-fosfotirosina.
- Tipo II. Rompen ambas hebras del ADN a través de la formación de un par de enlaces covalentes de 5'-fosfotirosina y son dependientes de ATP. Estas enzimas son esenciales y están altamente conservadas en las especies.

Las enzimas del tipo II están constituidas por dos homodímeros que, en las células eucariotas, pesan entre 160 y 180 kDa en los que se reconocen tres dominios (Figura 10). En el primero se encuentra una región de unión al ATP, en el segundo se localiza el residuo activo de

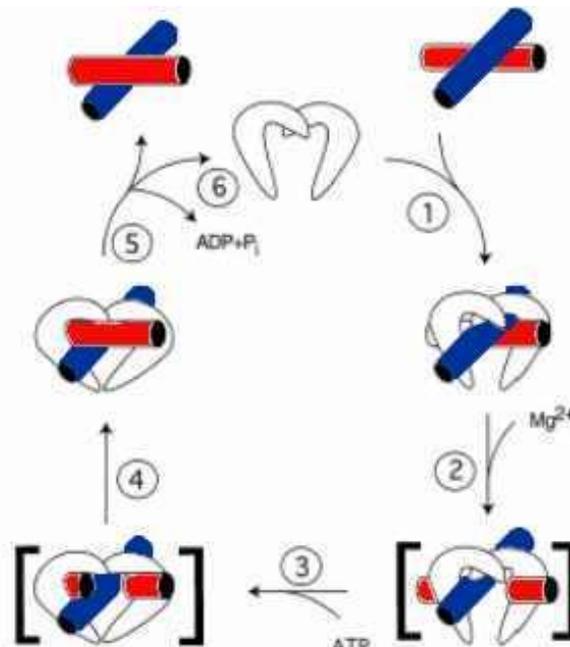
tirosina y el tercero es una región variable entre las diferentes especies que tienen esta enzima y cuya función no ha sido esclarecida, aunque se ha sugerido que participa en el reconocimiento de la topología del ADN.<sup>58,59</sup>



**Figura 10.** Dominios de la ADN topoisomerasa II.

En el ser humano existen dos isoformas denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ .<sup>55,57,60</sup> Se sabe que la concentración de la isoforma  $\beta$  es constante a lo largo del ciclo celular, mientras que la concentración de la isoforma  $\alpha$  se incrementa durante las fases  $G_2$  y M del ciclo celular.

El ciclo catalítico de la enzima puede ser descrito en seis pasos,<sup>53-58</sup> y se ilustra en la Figura 11:



**Figura 11.** Ciclo catalítico de la enzima ADN topoisomerasa II. Se muestra una hebra del ADN en azul y la otra en rojo.<sup>53</sup>

1. *Unión al ADN.* Esta unión no requiere la presencia de cofactores. La especificidad de la enzima por el ADN está dada principalmente por la secuencia primaria del sustrato y ésta varía entre especies (Tabla 2), aunque hay cierta preferencia por regiones donde haya

secuencias alternadas de bases púricas y pirimidínicas. Sin embargo, la afinidad y la actividad catalítica de la enzima está dada por el estado topológico del ADN, ya que la enzima reconoce preferentemente regiones enrolladas, pero no reconoce regiones donde el ADN se encuentra relajado.<sup>61</sup>

**Tabla 2.** Secuencias de nucleótidos preferidas por las ADN topoisomerasas II en ausencia de fármacos<sup>61</sup>  
**Dirección 3'→5'**

Especie	-5	-4	-3	-2	-1	RUPTURA DEL ADN	+1	+2	+3	+4	+5	+6	+7	+8
Humano isoforma $\alpha$	No A	No T	A, no C	*	C, no A		*	*	*	*	No T	*	T, no G	C, no A
Humano isoforma $\beta$	*	*	No C	G	*		T	*	*	*	No T	*	T, no G	C
Ratón	C	G	No G	No T	No A		A	*	*	*	No T	T	A	C
<i>Drosophila</i>	T	*	A, T	A	C		A	T	T	*	A	T	*	*

\* Indica que no hay preferencia.

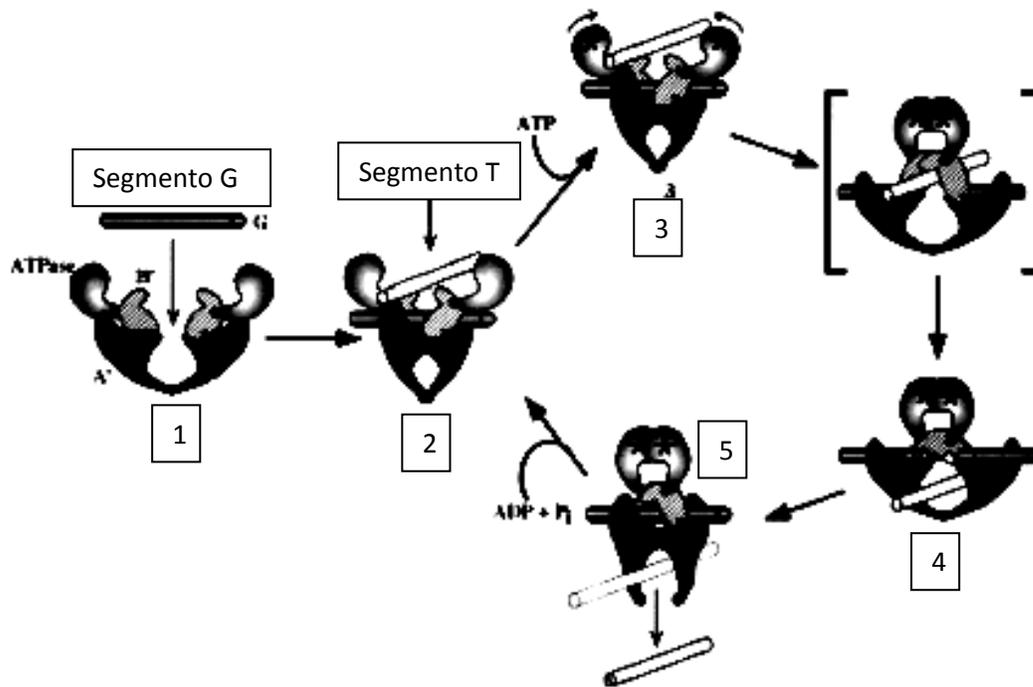
2. *Ruptura de las hebras de ADN y formación de complejo previo a la traslocación.* En presencia de un ion divalente ( $Mg^{2+}$ ), la enzima corta ambas hebras del ADN estableciendo enlaces covalentes entre los residuos activos de tirosina y los nuevos grupos fosfato terminales 5'. Cabe señalar que en este punto se establece un equilibrio ruptura-unión de las hebras.

3. *Traslocación.* En este paso se incorpora ATP lo cual provoca que se dé la traslocación. Aunque no se conocen los detalles de este cambio conformacional, se supone que la enzima en algún momento adopta una forma de pinza lo cual ha sido confirmado por estudios cristalográficos. Mediante estos estudios se ha postulado un modelo de “dos puertas” el cual se ilustra en la Figura 12. En este modelo la enzima se une a dos dúplex de ADN denominados G y T [*gap* (G) y *transport* (T), pasos 1 y 2]. Cuando se une el ATP se induce un cambio conformacional en la enzima pasando de una forma de “pinza abierta” a una de “pinza cerrada” y al mismo tiempo se da la unión covalente de la enzima con el segmento G a través del residuo activo de tirosina con un grupo fosfato 5' (paso 3), ocurriendo así, el paso del segmento T a través del espacio formado entre los segmentos G rotos (paso 4), saliendo de la “pinza” y volviendo a unirse el segmento G (paso 5).<sup>61,62</sup>

4. *Complejo post-traslocación.* En este paso se establece un equilibrio ruptura-unión de las hebras similar al del paso 2.

5. *Hidrólisis del ATP.* La hidrólisis del ATP permite la liberación del ácido nucleico, mediante el cambio conformacional de “pinza cerrada” a “pinza abierta”.

6. *Reciclaje de la enzima.*



**Figura 12.** Modelo de "dos puertas" para la traslocación.<sup>62</sup>

La ruptura del ADN es necesaria para que la enzima lleve a cabo su función, pero los complejos ADN-topoisomerasa II son transitorios en la naturaleza y su concentración está altamente regulada. Si los niveles de topoisomerasa bajan o su actividad está disminuida las células mueren por falla mitótica.<sup>63,64</sup> Sin embargo, el instante en el que las hebras del ADN se encuentran rotas es un momento potencialmente letal para la célula, ya que si alguna de las enzimas que participan en la replicación o en la transcripción (como las helicasas o las polimerasas) intentan pasar a través del ADN, la acción de éstas puede romper de manera definitiva la doble hélice; esto aunado a la interrupción de los procesos en los que el ADN forma parte, activan los mecanismos de recombinación/reparación.<sup>65</sup> Si el daño no es reparado y se acumulan más regiones de ADN roto, pueden presentarse aberraciones cromosomales que inducen los mecanismos de apoptosis. Esto hace que se considere a la ADN topoisomerasa II como una enzima genotóxica, ello es aprovechado por algunos fármacos antitumorales como se verá más adelante.

## 2.5 Fármacos antitumorales que afectan la actividad de la ADN topoisomerasa II

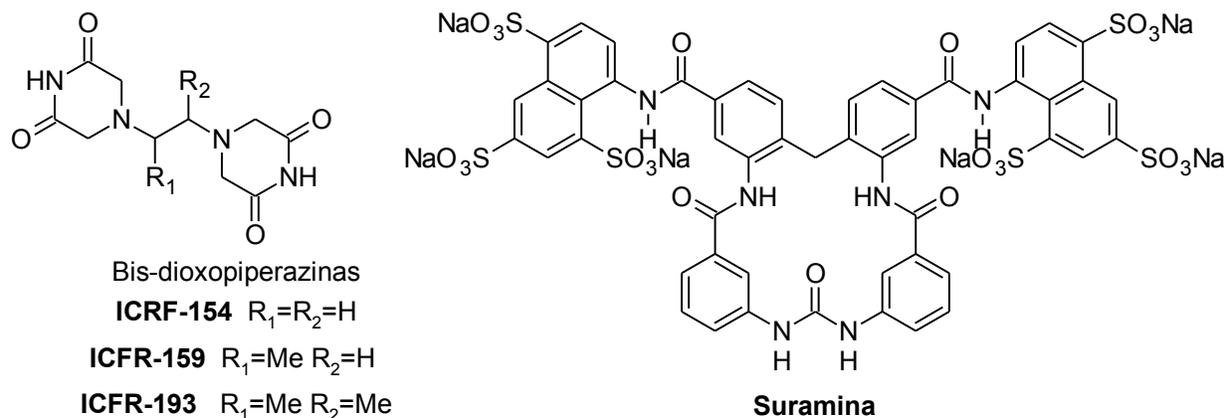
La ADN topoisomerasa II es diana de algunos fármacos usados en el tratamiento del cáncer. Actualmente seis fármacos de este tipo han sido aprobados por la FDA (Tabla 3) y están presentes en la mitad de los tratamientos mono o multi-fármaco para el tratamiento de varios tipos de cáncer.<sup>66</sup>

**Tabla 3.** Fármacos inhibidores de la ADN topoisomerasa II aprobados por la FDA.<sup>66</sup>

Fármaco	Tipo	Año de aprobación	Indicación terapéutica
Doxorrubicina	Antraciclina	1974	Linfomas (*) Cáncer de mama (*) Sarcomas (*) Sarcoma de Kaposi Leucemia
Daunorrubicina	Antraciclina	1979	Leucemia linfocítica aguda (*)
Idarrubicina	Antraciclina	1990	Leucemia mielógena aguda
Mitoxantrona	Antraquinona	1987	Leucemia aguda Cáncer de mama Linfomas
Etopósido	Podofilotoxina	1984	Cáncer testicular (*) Cáncer de pulmón (*) Linfomas Sarcoma de Ewing Sarcoma de Kaposi Cáncer de ovario
Tenipósido	Podofilotoxina	1992	Leucemia linfoblástica aguda (*)

(\*) Tratamiento de primera elección.

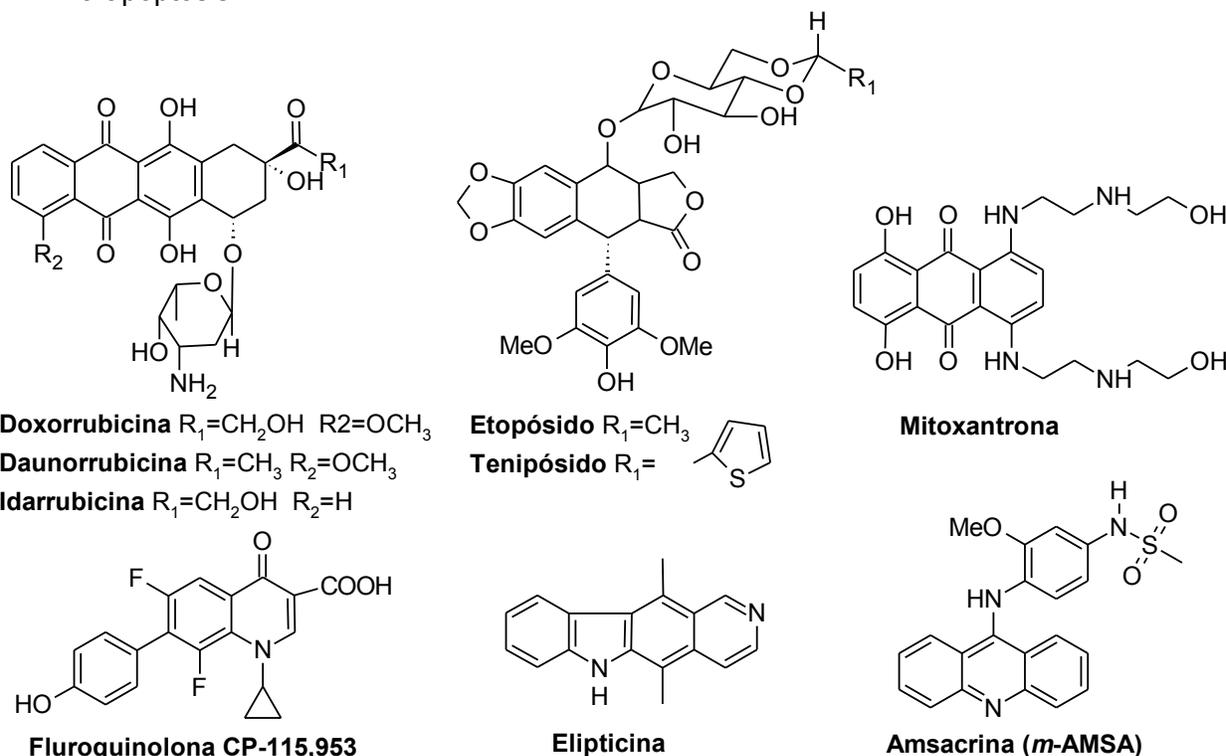
Dentro de los fármacos que afectan la actividad de la ADN topoisomerasa II existen dos tipos, los inhibidores catalíticos y los estabilizadores del complejo ADN-enzima.<sup>62,67</sup> El mecanismo de acción de los primeros (Figura 13) es a través de la interrupción de algún paso del ciclo catalítico de la enzima, por ejemplo las *bis*-dioxopiperazinas actúan inhibiendo el paso 5 (hidrólisis del ATP) al unirse a la región de unión al ATP.<sup>67</sup>

**Figura 13.** Ejemplos de inhibidores catalíticos de la ADN topoisomerasa II.

A diferencia de los inhibidores catalíticos los fármacos estabilizadores del complejo ADN-enzima (Figura 14), actúan estabilizando el complejo tóxico en el cual las hebras de ADN permanecen rotas. Al estar rotas las hebras, la respuesta celular incluye los siguientes fenómenos:<sup>65, 67, 68</sup>

- Activación de las rutas de reparación. Durante el proceso de reparación del ADN es posible que haya inserciones o deleciones de bases, las cuales pueden darse en genes vitales para el desarrollo celular.

- Alteraciones en el ciclo celular. En células que tienen copias funcionales de p53, el producto del gen supresor de tumores p53, se ha observado interrupción del ciclo celular en las fases G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> después del tratamiento con estabilizadores del complejo ADN-topoisomerasa II. Sin embargo, se ha demostrado que el etopósido y la doxorubicina son capaces de inducir apoptosis independientemente del status de p53, por lo que no está claro qué tipo de mecanismos intervienen en la interrupción del ciclo celular.
- Activación de otras vías de señalización. El daño inducido puede activar otra serie de fenómenos como la elevación de la concentración de ceramidas lo cual puede conducir a apoptosis.



**Figura 14.** Ejemplos de estabilizadores del complejo ADN-enzima.

Los fármacos que estabilizan el complejo ADN-topoisomerasa son referidos en la literatura como *topoisomerase poisons* por su capacidad de convertir a esta enzima en una potente toxina celular. Estos fármacos incrementan los niveles de los complejos ADN-topoisomerasa por inhibición de la capacidad de la topoisomerasa de volver a unir a las hebras rotas o por un incremento de la velocidad de ruptura de las hebras, mediante cualquiera de los mecanismos se incrementan tanto la concentración como la tiempo de vida de los complejos de ADN roto.<sup>69</sup> Los aspectos morfológicos y bioquímicos de las células afectadas por este tipo de compuestos son similares a los observados en la apoptosis. Si bien los fármacos que actúan por esta vía afectan a las células que expresan ADN topoisomerasa, aquellas que se encuentran en proliferación o transformación son más sensibles, debido a que los requerimientos de esta enzima son mayores por lo que estos fármacos tienen buena respuesta clínica en aquellos tipos de cáncer más agresivos.<sup>65,66</sup>

Los estabilizadores de los complejos ADN-topoisomerasa pueden interactuar de manera covalente o no covalente con el ADN o con la enzima. Los agentes intercalantes caen dentro de la segunda categoría, aunque dentro de ésta hay otros compuestos cuya interacción con el

ADN (como las podofilotoxinas) no es por intercalación. Se ha postulado que el mecanismo de acción de estos fármacos ocurre mediante la formación de un complejo ternario enzima-ADN-fármaco en el que se altera el equilibrio ruptura-unión de las hebras del ADN, favoreciéndose el estado en el cual las hebras permanecen rotas; esto se ha observado en el caso del etopósido y la amsacrina.<sup>68</sup>

Una vez formado el complejo ternario, la acción de las polimerasas y las helicasas provoca la ruptura de las hebras de ADN y esto puede desencadenar la apoptosis. Por otra parte, de acuerdo al modelo de posición del agente intercalante (*positional poison model*), la unión de este tipo de compuestos al ADN aumenta la probabilidad de que la alteración topológica, provocada por la intercalación, sea reconocida por la ADN topoisomerasa II y se forme el complejo ternario, lo que estimula la ruptura de las hebras del ADN. Esto llevó al estudio del modo de unión al ADN de los fármacos, según se muestra en la Tabla 4.<sup>59,61</sup> Cabe señalar que anteriormente se pensaba que algunos agentes mixtos tenían solamente propiedades intercalantes; sin embargo, se ha observado que la interacción con el surco menor es importante para su actividad citotóxica.<sup>53,60, 61</sup>

**Tabla 4.** Modo de unión de algunos agentes intercalantes al ADN<sup>61</sup>

Enzima a la que inhiben	Intercalador puro	Unión a surco menor	Mixtos
Topoisomerasa I		Terbenzimidazoles	Indolocarbazoles
Topoisomerasa II	Elipticina	Estreptonigrina	Antraciclinas Amsacrina Bisantreno Mitoxantrona
Ambas	Saintopina		Actinomicina D

Asimismo, también se ha estudiado la selectividad de los agentes intercalantes por determinadas secuencias de bases. Estos estudios han mostrado que existe cierta preferencia de los agentes intercalantes por algunas secuencias de bases del ADN que se encuentran en la región donde ocurre la ruptura de las hebras catalizada por la ADN topoisomerasa II. Esto llevó a proponer una clasificación de los agentes intercalantes basada en la región donde estimulan la ruptura de las hebras (Tabla 5).<sup>61</sup> Por ejemplo la doxorubicina corresponde al tipo -1 porque preferentemente estimulará la ruptura de las hebras si existe una base adenina, una posición antes (en dirección 3' → 5') del sitio de ruptura, mientras que la amsacrina lo hará si existe una base adenina una posición después del sitio de ruptura, por lo que se le clasifica de tipo +1.

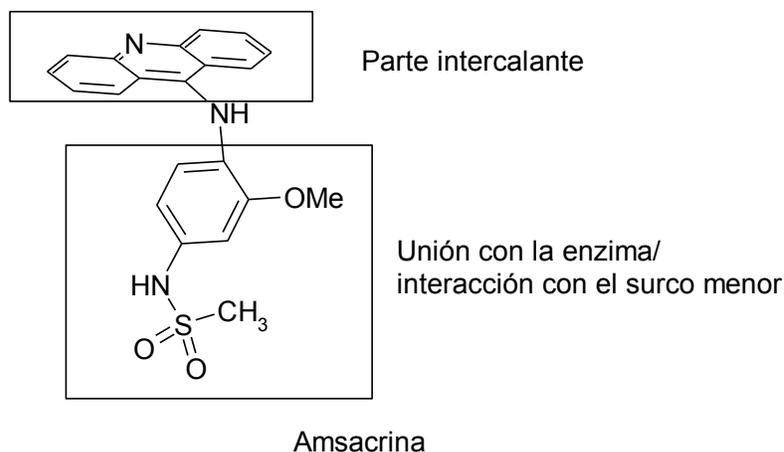
**Tabla 5.** Clasificación basada en las regiones donde estimulan la ruptura de las hebras.<sup>61</sup>

Tipo -1		Tipo +1		Tipo +2	
Fármaco	Base	Fármaco	Base	Fármaco	Base
Doxorrubicina	A	Amsacrina	A	Estreptonigrina	T
Etopósido	C	Bisantreno	A		
Mitoxantrona	C/T				
Elipticina	T				

Los estudios de modelado molecular aportaron mayor información para la comprensión del mecanismo de acción de estas sustancias. Por ejemplo al comparar las estructuras de mínima energía de algunos de los agentes mixtos, se sugirió que aquellos fármacos con afinidad por secuencias de ADN similares compartían un farmacóforo.<sup>70</sup> La estructura del

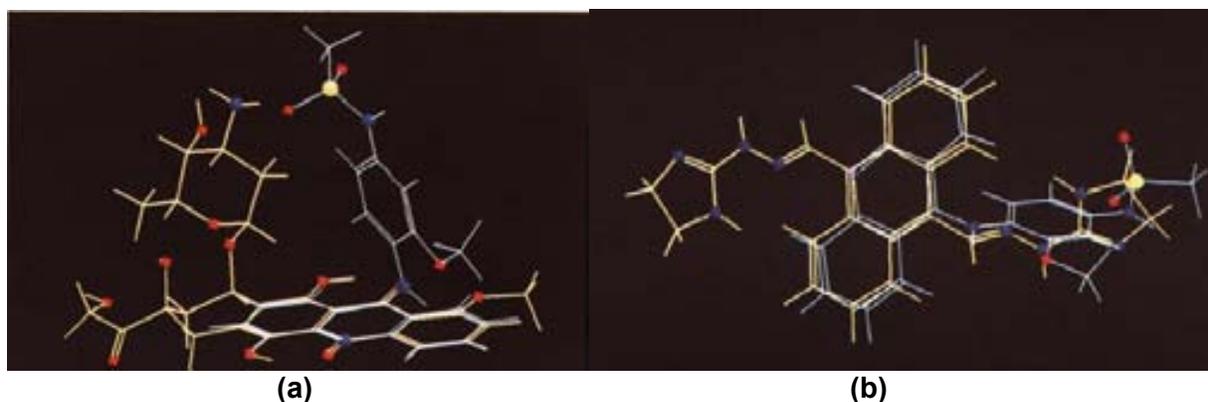
farmacóforo para los agentes intercalantes estabilizadores del complejo ADN-enzima puede considerarse de la siguiente forma (Figura 15):<sup>53,61,70</sup>

- Un sistema anular plano que se intercala en el ADN.
- Una cadena lateral que interactúa con la enzima y con el surco menor.



**Figura 15.** Farmacóforo postulado para los agentes intercalantes estabilizadores del complejo ADN-topoisomerasa II

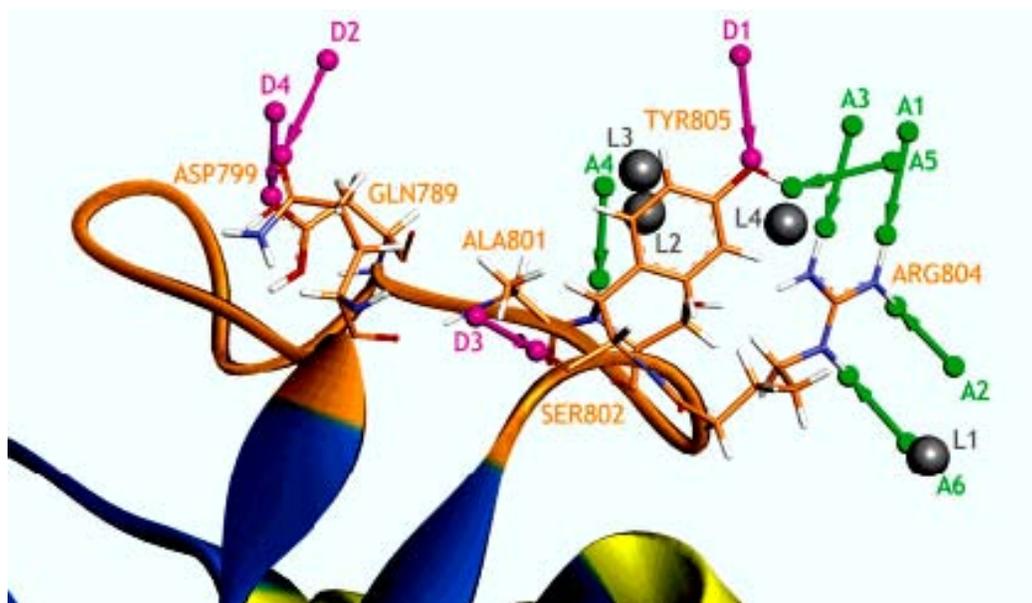
Además se sugirió que la posición de estos dominios es importante para definir la preferencia por alguna secuencia de ADN. Por ejemplo al comparar la amsacrina (tipo +1) con la daunorrubicina (tipo -1) se observó que no era posible hacer coincidir la cadena lateral si superponía el sistema planar (Figura 16a), en cambio al comparar la amsacrina con el bisantreno (ambos de tipo +1) sí había esta coincidencia, aunque la segunda cadena lateral del bisantreno no tiene coincidencia en la amsacrina (Figura 16b).<sup>70</sup> En el caso de isómeros estructurales del bisantreno y la amsacrina se observó que tenían los mismos dominios; sin embargo, la alteración del arreglo espacial y de la densidad electrónica afectaban la interacción con el ADN.<sup>71</sup>



**Figura 16.** Superposición de la estructura de la amsacrina con daunorrubicina (a) y bisantreno (b).<sup>70</sup>

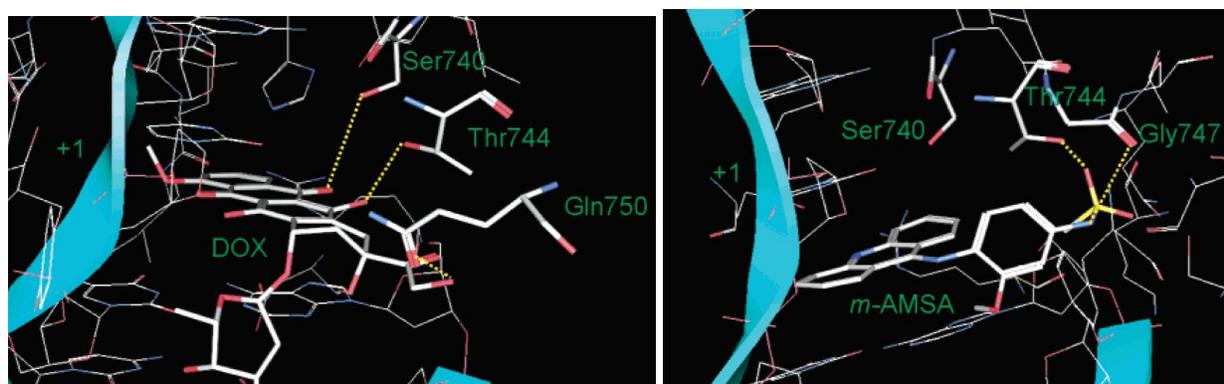
Estudios más recientes basados en el modelado por homología en la enzima topoisomerasa II de levadura,<sup>72</sup> permitieron confirmar y ampliar la información sobre el farmacóforo de la Figura 15 incluyendo regiones hidrofóbicas y de formación de puentes de hidrógeno para las cadenas laterales, como se ilustra en la Figura 17. De este estudio cabe resaltar que aunque inicialmente no se incluyó la capacidad intercalante como un aspecto del

farmacóforo, durante el estudio la mayoría de los compuestos que se ajustaron a dicho modelo poseían sistemas policíclicos planares.



**Figura 17.** Farmacóforo propuesto en la referencia 72. En el sitio activo de la topoisomerasa II. Las esferas grises (L1-L4) indican regiones hidrofóbicas, los puntos magenta indican zonas de donadores de puentes de hidrógeno (D1-D4) y los puntos verdes zonas para átomos aceptores de puentes de hidrógeno (A1-A6).

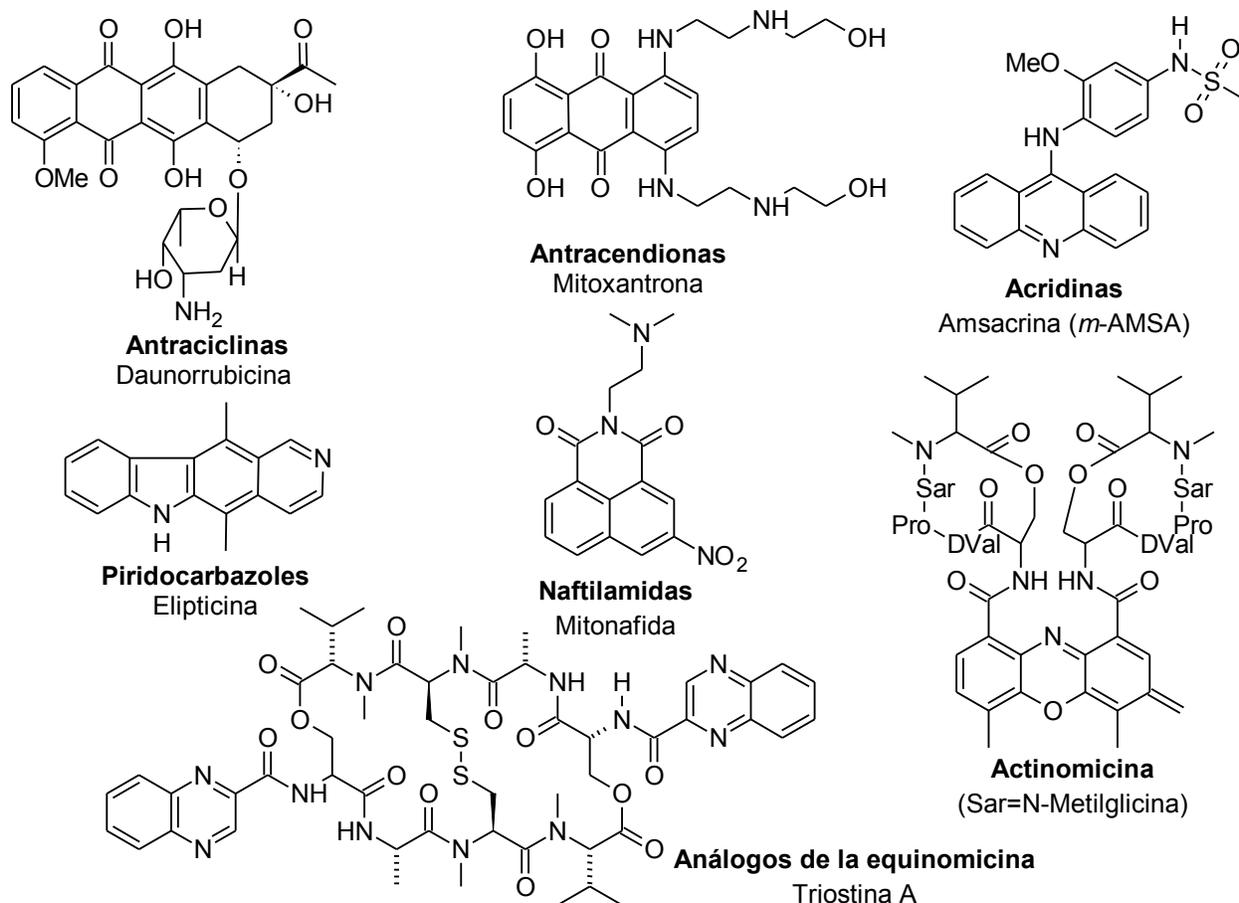
En otro estudio computacional sobre los complejos ternarios de ADN-enzima-fármaco,<sup>73</sup> se encontró que los residuos de Ser740, Thr 744, Gly 747 y Gln 750 son importantes para la unión del fármaco con la enzima (Figura 18). Por otra parte, se observó que en el caso de las antraciclinas el cromóforo además de intercalarse puede tener la capacidad de interactuar con residuos de la topoisomerasa II, mientras que en el caso de derivados de acridina como la amsacrina la interacción con la enzima la realiza solamente la cadena lateral, especialmente con los átomos de oxígeno del grupo metansulfonamido. Esto permitiría explicar algunas de las diferencias encontradas en cuanto a la actividad antitumoral y más específicamente de la capacidad de afectar la actividad de la topoisomerasa de ciertos agentes intercalantes.



**Figura 18.** Aminoácidos importantes para la unión de la doxorubicina (A) y la amsacrina (B) con la topoisomerasa en el complejo ternario ADN-enzima-fármaco<sup>73</sup>

Sin embargo, hay que destacar que la actividad citotóxica de estos fármacos no está ligada únicamente a su capacidad de intercalación o de alteración de la actividad de la topoisomerasa II. Varios estudios recientes han encontrado que hay poca o ninguna relación entre la citotoxicidad y la inhibición de la topoisomerasa y que la permeabilidad celular es un factor importante para que los compuestos tengan actividad biológica.<sup>44,74-76</sup>

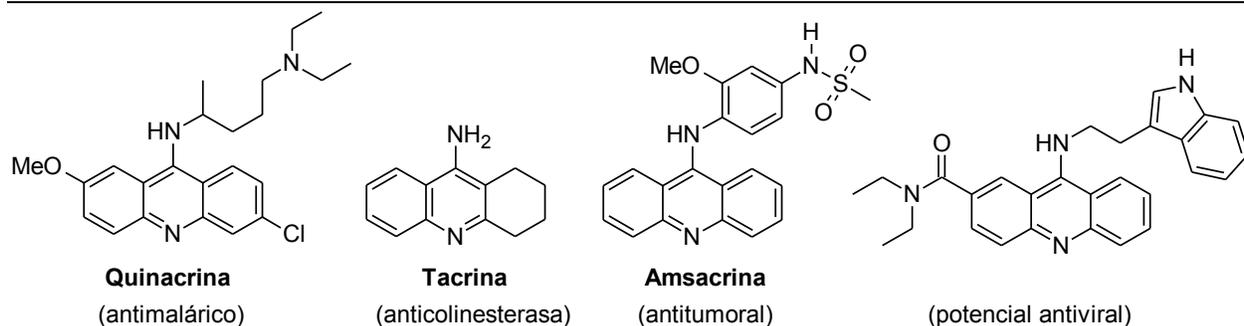
Las estructuras de algunos intercalantes-estabilizadores del complejo ADN topoisomerasa se muestran en la Figura 19, dentro de ellos destacan los derivados de la acridina tanto por su importancia histórica en el diseño de fármacos como su utilidad terapéutica. Esta clase de compuestos se trata a continuación.



**Figura 19.** Compuestos intercalantes, estabilizadores del complejo ADN-topoisomerasa.

## 2.6 Derivados de acridina

Los derivados de acridina fueron usados inicialmente como pigmentos en el siglo XIX y fue hasta 1920 cuando se consideró su actividad terapéutica como antibióticos. Aún en la actualidad se les sigue empleando como antisépticos (euflavina) y han encontrado uso como antimaláricos, inhibidores de la colinesterasa para el tratamiento del Alzheimer, antitumorales y potenciales antivirales (Figura 20).<sup>77</sup>



**Figura 20.** Derivados de acridina con actividad biológica.

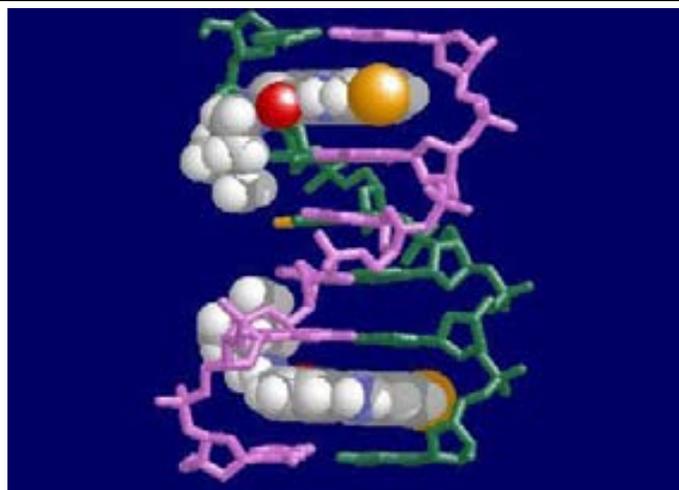
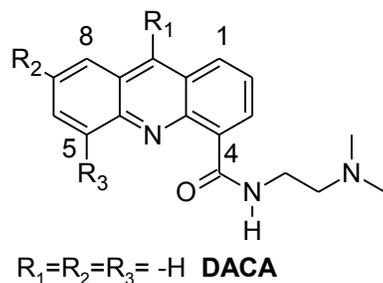
El núcleo de acridina se encuentra en varios compuestos, tanto de origen natural o sintético, como núcleo tricíclico o formando parte de otras estructuras policíclicas (particularmente de alcaloides marinos), que han mostrado alta citotoxicidad y capacidad de alterar la actividad de la ADN topoisomerasa e incluso algunos compuestos están en estudios de fase clínica. La variedad de estructuras es amplia y a continuación se muestran sólo algunos ejemplos representativos.

### 2.6.1 Derivados de carboxamidoacridina

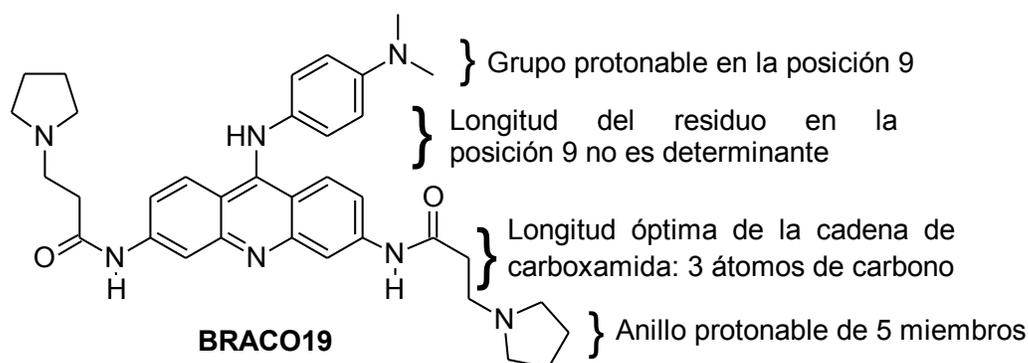
El grupo *N,N*-dimetilamino y grupos similares se han incorporado a núcleos tricíclicos a fin de incrementar su afinidad por el ADN y elucidar su influencia en la actividad biológica.<sup>40,78</sup> Esta estrategia se empleó para obtener algunos derivados de acridina con este grupo en la posición 4 e incluso DACA (Figura 23) se encuentran en pruebas clínicas de fase I/II. Estudios de relación estructura-actividad mostraron que la cadena de carboxamida debe estar en la posición 4, con dos grupos metileno entre el grupo dimetilamino terminal y el nitrógeno de la amida el cual debe estar sin sustituir; también se observó que grupos electroattractores en la posición 5 favorecían la actividad citotóxica en tumores sólidos.<sup>79-80</sup>

Para estos compuestos se encontró que había una gran correlación entre la actividad citotóxica y la afinidad al ADN, lo que llevó a estudios detallados de sus interacciones con el ADN mediante análisis por cristalografía de rayos X de los complejos de análogos 7-bromados con la secuencia d(CGTAACG)<sub>2</sub>. De estos estudios se postuló que la unión al ADN ocurre a través de la formación de un puente de hidrógeno entre la cadena protonada de *N,N*-dimetilamonio y un átomo de nitrógeno de la guanina (Figura 23).<sup>81-82</sup> Estos hallazgos llevaron a postular que la interacción de la cadena de carboxamida con el ADN induce cambios topológicos que son reconocidos por la topoisomerasa, induciendo la formación del complejo ternario.<sup>83</sup>

Otra serie de derivados interesantes de las carboxamidoacridinas, aunque no tienen a la topoisomerasa como diana enzimática, son los llamados agentes dirigidos a telómeros o TTAs (*Telomere Targeting Agents*).<sup>84</sup> Estos agentes tienen la capacidad de inducir la formación de cuádruples de guanina dentro del ADN, inhibiendo indirectamente la actividad de la telomerasa (apartado 2.2). Dentro de estos destacan los derivados como BRACO19, para el cual se han establecido los requerimientos estructurales básicos para poder inhibir la actividad de la telomerasa como la presencia de un grupo protonable en la posición 9, la longitud de la cadena de carboxamida y un anillo protonable de 5 miembros al final de la cadena alquílica (Figura 24).<sup>85</sup> En estos momentos la investigación se enfoca en derivados de BRACO19 metabólicamente más estables.



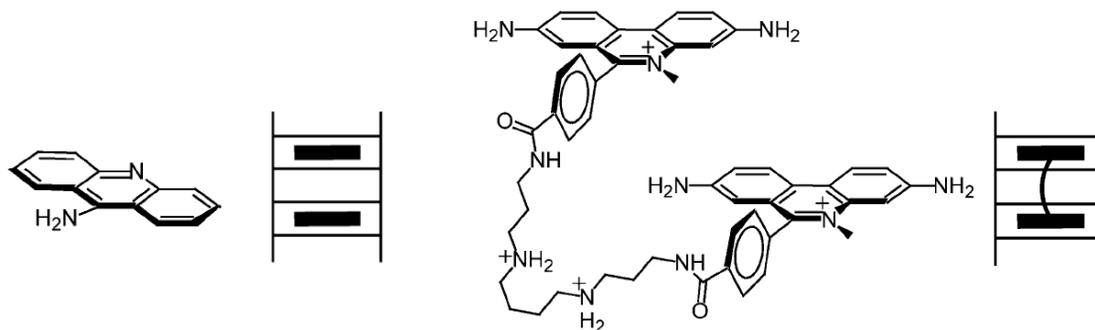
**Figura 23.** Estructura de DACA y modelo de su interacción con el ADN.<sup>82</sup>



**Figura 24.** Requisitos estructurales en TTAs derivados de carboxamidoacridina.

### 2.6.2 Derivados bisintercalantes

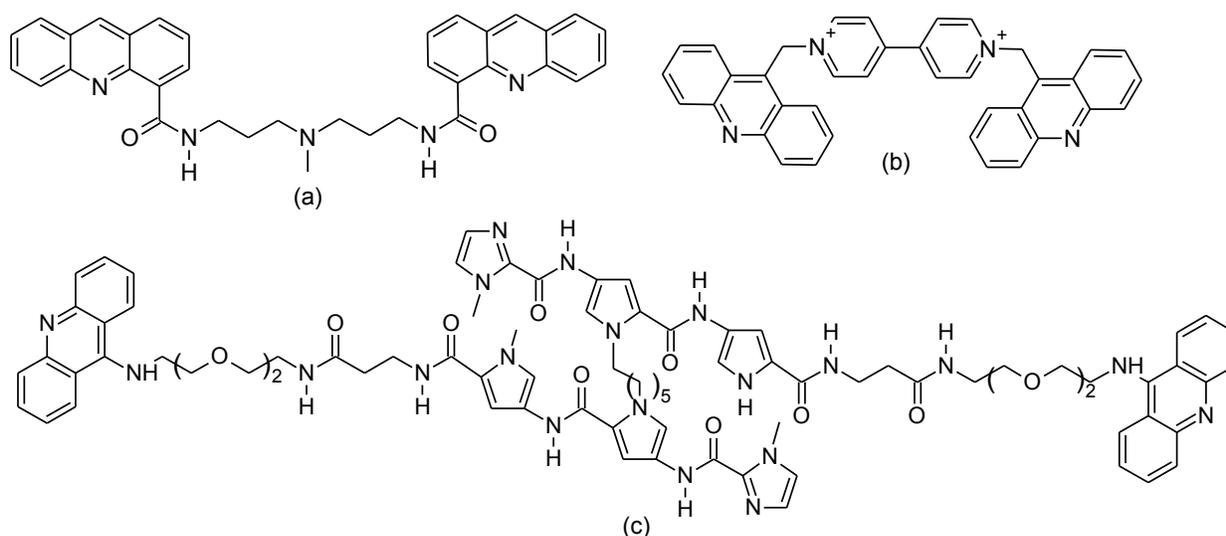
El interés en intercalantes polifuncionales, surgió de la posibilidad de mejorar la afinidad de los monointercalantes. Los agentes poli-intercalantes se obtienen mediante un sistema policíclico unido mediante cadenas enlazantes de longitud variable (normalmente catiónicas), siendo posible colocar dos o más unidades policíclicas (Figura 25) En principio, estos agentes tendrían una mayor selectividad por secuencias largas de ADN y una menor constante de disociación.<sup>40,86</sup>



**Figura 25.** Modelos de mono y bisintercalación.<sup>86</sup>

Estudios llevados a cabo con las bisacridinas (Figura 26a) demostraron que la forma y tamaño del núcleo policíclico y la conformación de la cadena enlazante son determinantes en la capacidad de formar los complejos de bisintercalación, además de que la funcionalización del policiclo es un factor crítico para mejorar la actividad citotóxica.<sup>87,88</sup> Dado que la conformación de la cadena es importante, se han colocado cadenas rígidas entre los cromóforos con buenos resultados.<sup>89</sup> Otras estrategias en cuanto a la modificación del enlazante son los derivados con cadenas de viológeno (Figura 26b), estos compuestos mostraron una buena afinidad al ADN, además de que producen la rotura selectiva fotoinducida de ADN plasmídico y de ADN circular de monohebra sencilla. Se ha estudiado además el mecanismo de rotura del ADN por vía fotoquímica.<sup>90</sup>

Un enfoque reciente se basa en el diseño racional de la cadena que une a los policiclos, haciendo que ésta se una a los surcos mayor o menor de manera selectiva y permitiendo los núcleos de acridina unirse mediante intercalación (Figura 26c), lo cual ha resultado en compuestos con capacidad de afectar la actividad de la ADN topoisomerasa y con posibilidad de unirse de manera altamente selectiva a secuencias específicas de ADN.<sup>86,91,92</sup>



**Figura 26.** Estructura de algunos agentes bisintercalantes. (a) Estructura “clásica” (b) Estructura con enlazante tipo viológeno (c) Bisintercalante con diseño racional del enlazante.

### 2.6.3 Derivados híbridos de acridina

Los ácidos nucleicos se pueden alterar químicamente mediante la rotura del esqueleto que constituye cada una de las cadenas. Estas modificaciones se pueden producir por diferentes vías: a) oxidación del anillo de ribosa o desoxirribosa, b) alquilación u oxidación de las bases nucleicas y c) rotura nucleofílica del esqueleto fosfodiéster.<sup>77,93</sup> Los agentes que producen estos cambios pueden ser desde productos naturales a complejos de metales de transición o formas reducidas del oxígeno altamente reactivas. Dada la afinidad del núcleo de acridina por el ADN, este sistema tricíclico ha sido usado para obtener moléculas bifuncionales que posean mayor especificidad y citotoxicidad.<sup>40,44,77,94</sup> Algunos ejemplos se describen a continuación y algunas estructuras representativas en la Figura 27.

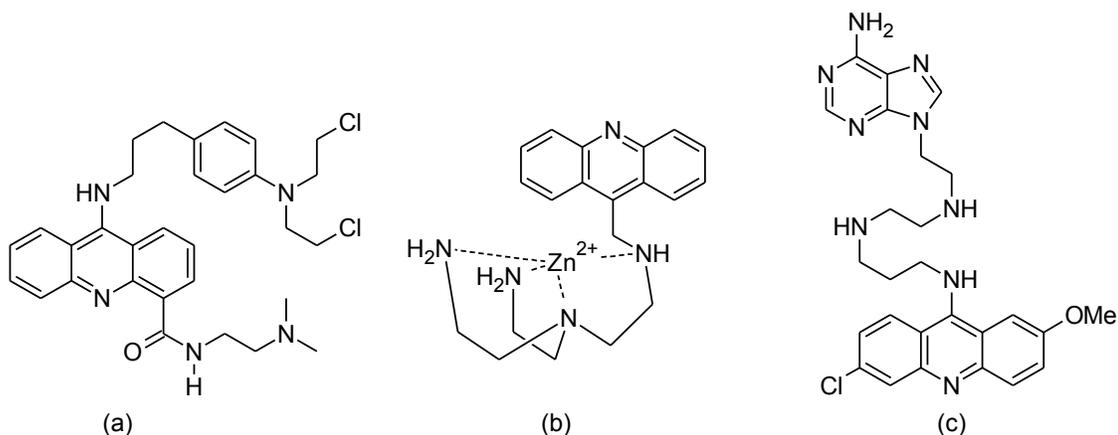
- *Derivados híbridos alquilantes.* Estos compuestos fueron de las primeras moléculas híbridas en ser sintetizadas al incorporarse cadenas con residuos de mostazas nitrogenadas

(Figura 27a).<sup>95</sup> Recientemente otros grupos alquilantes han sido incorporados como derivados de imidazoles bis-hidroximetil sustituidos,<sup>96</sup> la duocarmicina<sup>97</sup> y el cisplatino.<sup>98</sup>

- *Terapia fotodinámica.* El interés por estos derivados surge de la observación de la muerte de células tumorales tratadas con derivados policíclicos (como algunos colorantes o porfirinas) al ser irradiadas debido a la formación de especies reactivas de oxígeno, dando lugar a la terapia fotodinámica.<sup>99-100</sup> Dentro de las estructuras incorporadas al núcleo de acridina se encuentran derivados de psoraleno<sup>101</sup>, porfirina<sup>102</sup> y complejos de algunos cationes metálicos (Figura 27b).<sup>38,103</sup> Dada su habilidad de escindir la hebra de ADN a veces se les refiere como fotonucleasas.

- *Inhibidores de la reparación del ADN.* Estos son compuestos heterodiméricos en los cuales un residuo de acridina se une a una base púrica (Figura 27c) y que se diseñaron para reconocer sitios abásicos en el ADN, estos son sitios que sufrieron de delección de base y que son inducidos por varios factores, entre ellos agentes quimioterápicos.<sup>104</sup> Estas moléculas están constituidas de tres unidades: una unidad intercalante, una base púrica de reconocimiento para el sitio abásico y una cadena enlazante poliamínica para poder estabilizar el complejo mediante interacciones electrostáticas con la cadena de fosfatos. A pesar de su alta toxicidad y nula actividad antitumoral, se ha observado que tienen sinergismo con agentes alquilantes.<sup>105</sup>

- *Terapia antisentido.* Los oligonucleótidos antisentido (ODNs) son pequeñas secuencias de ADN o ARN sintético, diseñados para interactuar con secuencias específicas de ARN (o de ADN, en ese caso se llama terapia antígeno) e inhibir a la síntesis de la proteína que está codificada en esa secuencia, bloqueando así la progresión de una determinada enfermedad.<sup>106,108</sup> La principal limitante en este tipo de terapia es que los ODNs deben poder pasar por las membranas biológicas y evitar la degradación por las DNAsas. Para ello, los ODNs se modifican químicamente o se les une a un ligante. Entre los ligantes empleados están derivados de acridina los cuales dieron mejor resultado *in vitro* que cuando se usó el ODN solo.<sup>109</sup>



**Figura 27.** Estructuras de algunos agentes híbridos de acridinas con (a) residuos alquilantes (b) residuos unidos a cationes metálicos (c) inhibidores de la reparación del ADN.

#### 2.6.4 Derivados de 9-anilinoacridina

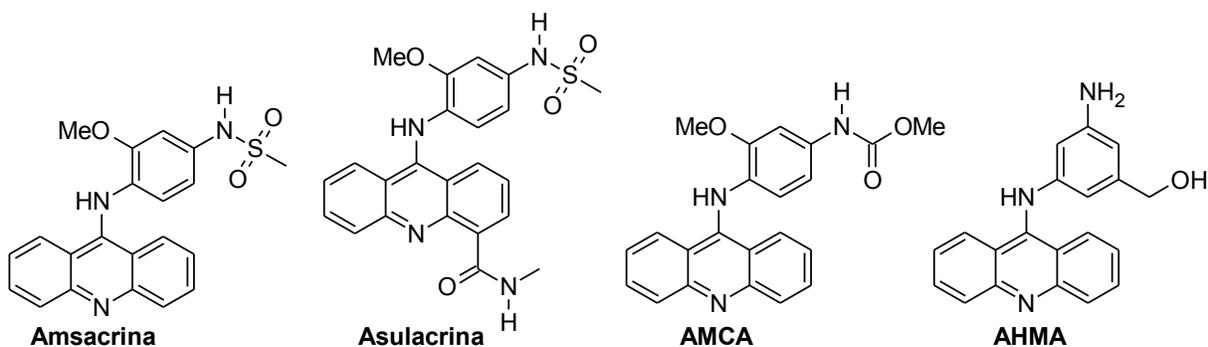
Los trabajos de los grupos de B. F. Cain, G. J. Atwell, W. A. Denny y B. C. Baguley dieron un gran impulso a los derivados de las 9-anilinoacridinas como antitumorales y constituyen uno de los ejemplos más relevantes en el desarrollo de las relaciones estructura-actividad.<sup>110,111</sup>

El primero de los derivados de 9-anilinoacridina que mostró actividad citotóxica importante fue la 9-(4-aminoanilino)acridina. A partir de este compuesto se realizaron estudios para encontrar los requerimientos estructurales asociados a la actividad de este tipo de compuestos. La eliminación de un anillo bencénico dio derivados de quinolina inactivos, con lo que se demostró la importancia del sistema tricíclico<sup>112</sup> y estudios posteriores con derivados de fenoxiacridina y feniltioacridina<sup>113</sup> demostraron que el átomo de nitrógeno en la posición 9 del núcleo de acridina también es importante.

En uno de los estudios de relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR, por sus siglas en inglés) más grandes que se hayan realizado sobre cualquier clase de compuestos, Denny y colaboradores estudiaron el efecto sobre la actividad citotóxica de factores estéricos, hidrofóbicos y electrónicos de diversos sustituyentes en el anillo de anilino.<sup>114,115</sup>

De estos estudios se concluyó que estos compuestos debían tener grupos electrodonadores en el anillo de anilina. Esto puede asociarse a las interacciones que ocurren en el sitio de acción ya sea mediante la unión del núcleo de acridina al ADN (a través de la modificación del pKa del nitrógeno de la acridina) o de la unión anillo de anilino a la enzima (a través de patrones específicos de densidad electrónica). Se observó que la presencia de grupos electroattractores disminuía la actividad citotóxica. Cabe señalar que se observó consistencia en la influencia de estos factores antes mencionados al evaluar la actividad citotóxica tanto *in vitro* como *in vivo* y en las determinaciones de su afinidad al ADN.

Estas investigaciones llevaron al diseño y síntesis de la amsacrina, que fue el primer compuesto que se evaluó en ensayos con topoisomerasa II purificada y que se emplea en algunos países para el tratamiento de la leucemia. A partir de este compuesto han surgido un gran número de derivados de 9-anilinoacridina que han mostrado actividad citotóxica importante (Figura 28).



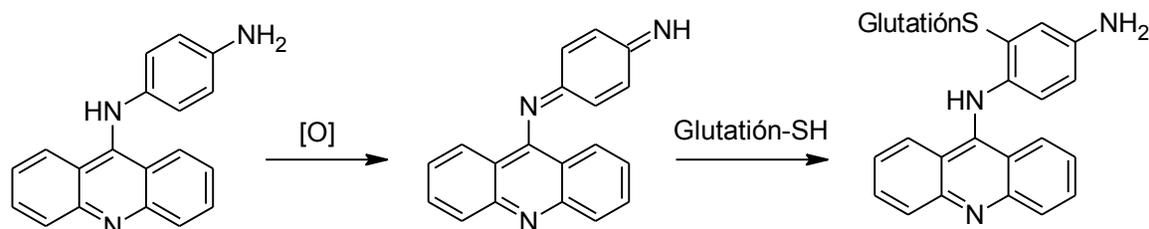
**Figura 28.** Derivados de 9-anilinoacridina con actividad citotóxica.

- **Asulacrina.**<sup>116</sup> Es el derivado 4-*N*-metilcarboxamida de la amsacrina y mostró buena actividad antitumoral contra cáncer de mama y pulmón. Este compuesto llegó a estudios de fase clínica II y en este momento se están desarrollando nuevas formulaciones que permitan solventar algunos de los problemas presentados en dichos estudios.<sup>117</sup>

- ***m*-AMCA.**<sup>118</sup> Es el análogo 4'-carbamato de la amsacrina, mostró mejor actividad citotóxica y antitumoral *in vitro* e *in vivo* que la amsacrina, incluso en líneas celulares que eran resistencia a amsacrina, presentó diferente afinidad y selectividad al ADN que la amsacrina, postulándose que dicha diferencia era debido al grupo carbamato.<sup>119</sup>

- **AHMA y sus derivados.**<sup>120</sup> Estos derivados surgieron para evitar el metabolismo que sufren los derivados 4-amino sustituidos a diiminoquinonas (Figura 29).<sup>121</sup> AHMA tuvo una vida

media larga en plasma humano y tuvo actividad antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. También se ha demostrado que AHMA y sus derivados son potentes inhibidores de la ADN topoisomerasa II. En un estudio posterior se prepararon los derivados O-acilderivados y carboxamidas de AHMA.<sup>122</sup> Los resultados obtenidos de este estudio mostraron un efecto estérico negativo y la importancia de la presencia de los grupos amino e hidroximetilo para la actividad citotóxica. Además se sugirió que el cambio en el perfil citotóxico por la presencia de sustituyentes en el anillo de anilino podría ser atribuido a factores estéricos, lipofílicos y electrónicos que afectan la interacción de esta parte de la molécula con el ADN o la ADN topoisomerasa.



**Figura 29.** Ruta metabólica de las 9-(4'-aminoanilino)acridinas.

A pesar de su gran potencial terapéutico, estos derivados presentan algunos problemas, siendo los más significativos la falta de selectividad hacia células tumorales, la generación de resistencia y problemas en su perfil ADME. Como una alternativa, recientemente han surgido nuevos análogos bioisostéricos a las 9-anilinoacridinas, en los que se reemplaza el núcleo de acridina por un nuevo sistema tricíclico y han mostrado buena actividad citotóxica. A fin de poder explicar este enfoque, se revisan brevemente algunos conceptos importantes para la obtención de nuevos fármacos mediante esta estrategia.

## 2.7 Diseño de nuevos fármacos mediante analogía

### 2.7.1 Ventajas y desventajas del diseño de fármacos por analogía

El término analogía es empleado para describir similitud estructural y/o funcional. Aplicando este término al diseño de fármacos la definición implica que el análogo de una molécula existente comparte similitud química y/o terapéutica con la molécula original. Dado que el diseño de nuevos fármacos con estructura innovadora, resulta complicada e incierta debido a que su potencial uso terapéutico no está validado.<sup>123</sup> En este sentido el diseño de análogos ofrece ciertas ventajas en cuanto a que su potencial uso terapéutico sería similar al fármaco inicial. El uso de esta metodología está tan extendido que dos terceras partes del mercado farmacéutico son de moléculas surgidas de programas de diseño por analogía.<sup>124</sup>

Los objetivos usuales del diseño por analogía son la identificación y el desarrollo de una versión mejorada de la molécula original. Algunas ventajas y desventajas de esta estrategia son:<sup>124</sup>

- *El análogo posiblemente tendrá la actividad farmacológica del prototipo.* La inversión en la molécula nueva dará un fármaco con una actividad terapéutica conocida, pero el propietario de la molécula original posiblemente tendrá ventajas tecnológicas y científicas sobre sus competidores.

- *Disponibilidad de la información.* Los farmacólogos podrán saber que tipo de pruebas tendrán que hacer a la nueva molécula en base a la información obtenida en el desarrollo de la molécula original, aunque este enfoque limita la originalidad de la investigación.

---

---

- *Factores económicos.* Debido a que no hay necesidad de invertir en investigación básica este enfoque puede ser adecuado para industrias farmacéuticas pequeñas. Sin embargo, en cuanto a ganancias puede representar una desventaja ya que habrá una mayor competencia.

- *Se pueden encontrar nuevas propiedades.* Puede ocurrir que durante el desarrollo de análogos, la nueva molécula posea propiedades que el prototipo no posee, en este caso el análogo puede resultar una molécula líder de un nuevo proyecto. De esta manera pueden encontrarse nuevos usos para fármacos ya establecidos. Como ejemplos de los anteriores esta la talidomida (sedativo, luego usado como inmunosupresor),<sup>125</sup> la quinacrina (un clásico antimalárico, presentó actividad anti-prión),<sup>126</sup> y el sildenafil (diseñado como cardiotónico, empleado para la disfunción eréctil).<sup>127</sup> Esto ha dado lugar al programa PASS -Prediction of Activity Spectra for Substances-<sup>128</sup> y a la aproximación SOSA -Selective Optimization of Side Effects-<sup>129-131</sup> para el diseño de nuevos fármacos basándose en este paradigma.

### 2.7.2 Bioisosterismo

Una de las estrategias más empleadas en el diseño de fármacos mediante analogía es el reemplazo isostérico, en particular cuando se desea no sólo mejorar las propiedades farmacológicas, sino también para ganar información en cuanto a la selectividad hacia determinado receptor o isoformas del mismo.<sup>132</sup> El término isótero fue propuesto por Erlenmeyer definiéndolo como “*elementos, moléculas o iones que presentan el mismo número de electrones en su capa de valencia*”,<sup>133</sup> su contribución incluye la proposición de que elementos en el mismo grupo de la Tabla periódica son isostéricos entre sí y la creación del concepto de anillos electrónicamente equivalentes. El término de bioisótero fue introducido posteriormente por Friedman para compuestos estructuralmente relacionados y ejercieran su actividad sobre un mismo receptor ya sea de manera agonista o antagonista. Posteriormente Thornber amplió el concepto para referirse a subunidades, grupos o moléculas que tuvieran propiedades fisicoquímicas semejantes y que producen efectos biológicos similares.<sup>134</sup>

El uso del bioisosterismo como herramienta para el diseño de fármacos requiere un conocimiento previo de los parámetros físicos, químicos, electrónicos y conformacionales que resultarán del reemplazo bioisostérico a fin de poder predecir los posibles efectos farmacológicos. Los aspectos más relevantes a considerar son:<sup>132</sup>

- Tamaño, volumen y distribución electrónica de los átomos involucrados en el reemplazo y su efecto en la polarizabilidad y conformación molecular.
- La alteración de parámetros relacionados con la solubilidad como el logP y el pKa.
- La reactividad química de los grupos funcionales o las subunidades bioisotéricas, principalmente para poder predecir los potenciales productos de biotransformación y su relevancia en el perfil toxicológico.
- La capacidad de formar puentes de hidrógeno inter o intramoleculares que pudieran alterar la conformación de la molécula u otros parámetros fisicoquímicos.

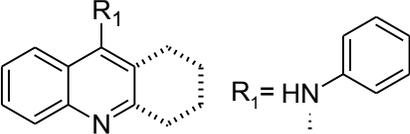
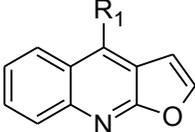
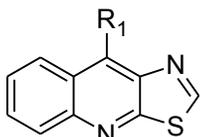
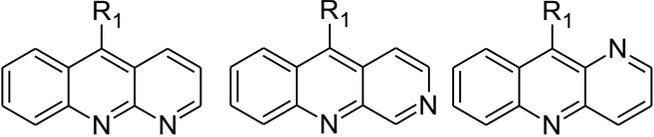
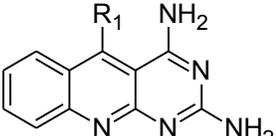
Esta estrategia ha sido de utilidad en el desarrollo de nuevos agentes antitumorales y se ha empezado a utilizar para derivados de 9-anilinoacridina como se comenta en el siguiente apartado.

## 2.8 Tiazolo[5,4-*b*]quinolinas como bioisósteros de acridina

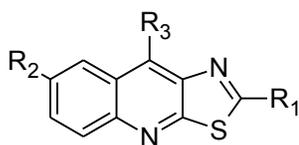
Dentro del desarrollo de nuevos agentes antitumorales, la estrategia de reemplazo bioisostérico, en particular el reemplazo anular, ha sido muy empleada<sup>135-137</sup> y en el caso de los

agentes intercalantes se ha observado que la incorporación de anillos heterocíclicos de 5 o 6 miembros a compuestos tricíclicos con actividad citotóxica, incrementa la actividad del compuesto original aún en líneas de células tumorales resistentes al fármaco original.<sup>138-139</sup> A pesar de estos hechos, este enfoque no había sido utilizado en derivados de 9-anilinoacridina, aunque recientemente nuevos derivados tricíclicos con sustituyentes de anilina han sido sintetizados y mostraron actividad citotóxica. Las estructuras de algunos bioisómeros de las 9-anilinoacridina, que se han sintetizado y evaluado se muestran en la Tabla 6.<sup>140-148</sup>

**Tabla 6.** Algunos derivados bioisostéricos de las 9-anilinoacridina

	
Anillos de 5 miembros, 1 heteroátomo	 furo[2,3- <i>b</i> ]quinolina <sup>140-2</sup>
Anillos de 5 miembros, 2 heteroátomos	  pirazolo[3,4- <i>b</i> ]quinolina <sup>143</sup> tiazolo[5,4- <i>b</i> ]quinolina <sup>144-5</sup>
Anillos de 6 miembros, 1 heteroátomo	 benzoaftiridinas ("azacridinas") <sup>146-7</sup>
Anillos de 6 miembros, 2 heteroátomos	 pirimido[4,5- <i>b</i> ]quinolina (como antimaláricos) <sup>148</sup>

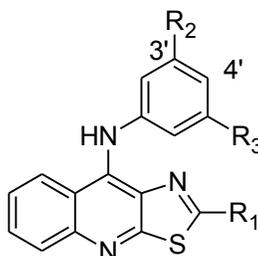
En nuestro grupo de trabajo se han sintetizado y evaluado varios derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina. La actividad citotóxica de estos compuestos de este tipo fue demostrada inicialmente por Álvarez-Ibarra y colaboradores.<sup>149</sup> Ellos prepararon algunos derivados sustituidos en la posición 2 o en la posición 9 con un sustituyente alquildiamino. Algunos de estos derivados mostraron tener actividad citotóxica en las líneas celulares P-388 (neoplasma linfático murino), A-549 (carcinoma de pulmón humano) y HT-29 (tumor de colon humano) como se muestra en la Tabla 7. Se observó que es importante para la actividad de este tipo de compuestos una baja densidad de carga en la posición 7 y una cadena lateral flexible en las posiciones 2 ó 9 con dos nitrógenos básicos con un pKa de 7.5 a 10.

**Tabla 7.** Actividad citotóxica *in vitro* de tiazolo[5,4-*b*]quinolinas metilto y alquilamino sustituidas<sup>149</sup>

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	CI <sub>50</sub> (μM)		
			P-388	A-549	HT-29
SCH <sub>3</sub>	H	OH	>70.2	>70.2	>70.2
SCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	>66.9	>66.9	>66.9
SCH <sub>3</sub>	F	OH	>66.1	>66.1	>66.1
EDA	H	OH	5.7	7.2	7.2
EDA	CH <sub>3</sub>	OH	3.3	5.6	3.3
EDA	F	OH	1.6	2.9	5.0
SCH <sub>3</sub>	H	PDA	6.0	6.0	6.0
SCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	PDA	5.4	5.4	5.4
SCH <sub>3</sub>	H	PDA2	12.1	12.1	12.1

EDA= NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NEt<sub>2</sub> PDA = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NEt<sub>2</sub> PDA2 = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NMe<sub>2</sub>

Posteriormente, en nuestro grupo de trabajo se sintetizaron y se determinaron la actividad citotóxica *in vitro* y las propiedades intercalantes de derivados de 9-anilino tiazolo[5,4-*b*]quinolina.<sup>144</sup> Estos compuestos incluyeron un grupo alquilamino o metilto en la posición 2 y sustituyentes electrodonadores en la posición 3'. Se evaluó la actividad citotóxica en diferentes líneas celulares (MCF-7 de mama, HeLa de cérvix, SW480 y SW620 de colon y K-562 de leucemia) y la unión al ADN de estos compuestos mediante desplazamiento de bromuro de etidio, los resultados se muestran en la Tabla 8. De estos resultados se observó que la introducción de una cadena de 2-(*N,N*-dietilamino)etilamino mejoró notablemente la actividad citotóxica. Por otra parte la presencia de un grupo amino en el anillo de anilino mejora ligeramente la actividad. Todos los compuestos fueron capaces de desplazar al bromuro de etidio del ADN lo que sugiere que se unen al ácido nucleico mediante intercalación.

**Tabla 8.** Actividad citotóxica *in vitro* y capacidad de unión al ADN de 9-anilino tiazolo[5,4-*b*]quinolinas<sup>144</sup>

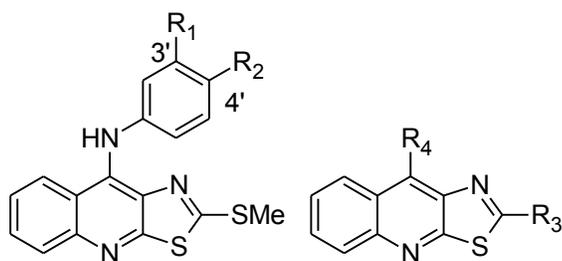
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	CI <sub>50</sub> (μM)					Unión al ADN (mM)	
			MCF-7	HeLa	SW480	SW620	K-562	Q <sub>max</sub> <sup>a</sup>	Q <sub>50</sub> <sup>b</sup>
SMe	H	H	>200	>200	>200	>200	>200	4.17	13.62
SMe	NH <sub>2</sub>	H	74.3	176.5	>200	>200	143.4	8.18	6.96
SMe	NHAc	H	132.3	>200	>200	153.9	85.3	15.04	18.45
SMe	NH <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> OH	138.5	>200	>200	183.9	143.4	17.86	22.64
EDA	H	H	16.6	15.96	37.7	21.6	16.8	24.31	52.46
Amsacrina			7.41	9.5	27.7	16.7	19.9	n.d.	n.d.

EDA= -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NEt<sub>2</sub> n.d. No determinado

<sup>a</sup>Unión máxima al ADN. <sup>b</sup>Concentración para disminuir el 50% de fluorescencia atribuible al bromuro de etidio.

La baja actividad de estos compuestos comparada con la de los derivados de acridina, de los cuales son isómeros, hizo pensar en qué otro de tipo de factores pudieran estar involucrados, por lo que se evaluó el efecto de otros sustituyentes en las posiciones 3' y 4' y el efecto del cambio de posición en la molécula de la cadena de 2-(*N,N*-dietilamino)etilamino.<sup>145</sup> Los resultados de la actividad citotóxica y de unión aparente al ADN de los derivados sintetizados en dicho estudio, se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Actividad citotóxica *in vitro* y capacidad de unión al ADN de derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolinas<sup>145</sup>



		CI <sub>50</sub> (μM)					Unión al ADN (mM)	
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	HeLa	C-33	SW480	SW620	K-562	Q <sub>max</sub> <sup>a</sup>	Q <sub>50</sub> <sup>b</sup>
Cl	H	69.37	129.33	110.69	129.73	80.26	2.60	1.29
CN	H	7.75	15.08	28.68	43.75	8.01	7.84	11.54
OMe	H	25.34	75.41	66.65	26.58	22.17	6.65	3.71
CF <sub>3</sub>	H	43.34	59.73	65.13	62.28	67.06	1.62	0.53
NO <sub>2</sub>	H	152.21	>200	>200	160.82	>200	n.d	n.d
OH	H	>200	146.12	146.95	146.34	173.34	16.45	7.64
NHMe	H	46.22	133.98	101.38	118.69	46.85	9.89	4.18
H	Cl	123.86	>200	>200	145.95	79.45	1.84	2.19
H	OMe	>200	>200	>200	110.80	77.20	3.73	9.48
H	CN	140.02	>200	>200	>200	120.01	12.81	14.26
COEDA	H	21.69	19.95	13.60	19.72	12.54	23.08	16.57
R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	HeLa	C-33	SW480	SW620	K-562	Q <sub>max</sub>	Q <sub>50</sub>
SMe	EDA	12.97	9.06	27.97	16.87	7.85	46.00	9.44
EDA	Cl	12.86	9.35	19.48	15.22	9.28	26.24	11.10
Amsacrina		9.50	8.80	27.70	16.70	19.90	n.d	n.d
AHMA		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	47.79	7.36

EDA= -NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NEt<sub>2</sub> n.d. No determinado.

<sup>a</sup>Unión máxima al ADN. <sup>b</sup>Concentración para disminuir el 50% de fluorescencia atribuible al bromuro de etidio.

De estos datos se desprendieron los siguientes aspectos:

- La actividad citotóxica se favorece por la presencia de una cadena de 2-(*N,N*-dietilamino)etilamino, independientemente de su posición en la molécula, aunque la afinidad al ADN mejora si se encuentra en la posición 9.
- La presencia de grupos electroattractores en el anillo de anilina, de manera general, favorece la actividad biológica respecto a los grupos electrodonadores.

- Es importante para la actividad la presencia de un grupo aceptor en la formación de puentes de hidrógeno en el anillo de anilina.
- El patrón de sustitución en el anillo de anilina es crítico para la actividad citotóxica, siendo la posición 3' la más favorecida.
- De manera general los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina se unen de manera menos eficiente al ADN que los de acridina, aunque hay que resaltar que los experimentos se realizaron en ADN de alto peso molecular, sin tener alguna secuencia específica.

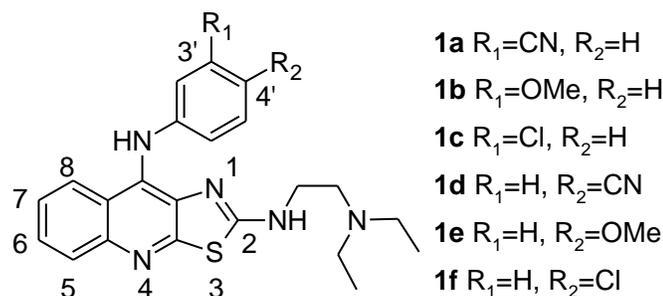
A pesar de la información adicional obtenida, aún se requerían obtener mayores datos para poder refinar el modelo que permitiera, posteriormente, la preparación de compuestos más activos. Por otra parte, durante los ensayos de citotoxicidad se observó que estos compuestos presentaron problemas de solubilidad lo cual también podría causar una disminución en la actividad biológica. Para abordar esta problemática se planteó la síntesis de nuevos derivados tricíclicos, lo cual se discute dentro del siguiente apartado.

### 3. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

La necesidad de incrementar la base de datos para refinar el modelo propuesto sobre los requerimientos estructurales para mejorar la actividad citotóxica de los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina y aumentar la solubilidad de los derivados 2-metilto sustituidos, llevaron a proponer algunas estrategias para el diseño y síntesis de nuevos derivados que aportaran mayor información y que resultara en la obtención de compuestos más eficaces. Cabe mencionar que dada la complejidad del problema, fue necesario abodar el problema desde varios puntos de vista los cuales se detallan a continuación.

#### a) Incorporación de nuevos sustituyentes en la posición 2.

Dado que el patrón de sustitución en el anillo de anilina influye en la actividad citotóxica de los derivados de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina y que la incorporación de un grupo alquilamino en el núcleo de tiazolo[5,4-*b*]quinolina favorece la actividad citotóxica y la unión al ADN, puede suponerse que los derivados de 2-alkilamino-9-anilino[5,4-*b*]quinolina adecuadamente sustituidos en el anillo de anilina tendrían una mayor actividad citotóxica. Los sustituyentes elegidos para su incorporación al anillo de anilina fueron los grupos ciano (grupo electroattractor, fue el que mejor se comportó en los derivados 2-metilto sustituidos), metoxilo (grupo electrodonador) y un átomo de cloro (influye en la lipofilia de la molécula) en las posiciones 3' y 4'. Las estructuras de los compuestos propuestos se ilustran en la Figura 30.

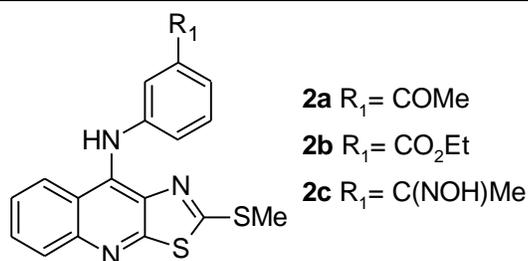


**Figura 30.** Derivados de 9-anilino-2-alkilaminotiazolo[5,4-*b*]quinolina propuestos.

Dentro del grupo de trabajo se han sintetizado compuestos para evaluar la influencia de la longitud de la cadena<sup>150</sup> y su libertad conformacional,<sup>151</sup> así como la presencia de un átomo de flúor en la posición 7,<sup>152</sup> ya que se ha reportado que esto favorece la actividad citotóxica en los derivados de 9-hidroxitiazolo[5,4-*b*]quinolina.<sup>149</sup> Los resultados de actividad citotóxica de dichos compuestos se emplearían para poder obtener un mejor modelo para la actividad citotóxica de los derivados de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina.

#### b) Incorporación de otros sustituyentes en la posición 3'

Para probar la hipótesis de que se necesitan grupos electroattractores y grupos formadores de puentes de hidrógeno en la posición 3' del anillo de anilina en los derivados 2-metilto sustituidos, se propone la síntesis de derivados sustituidos en la posición 3' con grupos carbonílicos (cetona, éster) y con un grupo oxima. Los derivados propuestos se ilustran en la Figura 31.



**Figura 31.** Derivados de 9-anilino-2-metiltiazolo[5,4-*b*]quinolinas sustituidos en la posición 3' del anillo de anilina.

c) *Cambio de núcleo tricíclico. Reemplazo del anillo de tiazol por otro anillo heterocíclico*

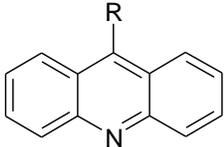
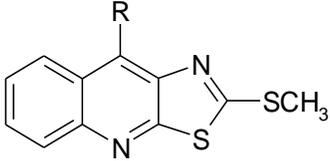
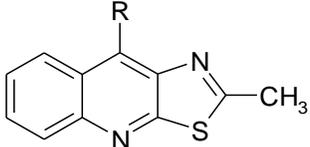
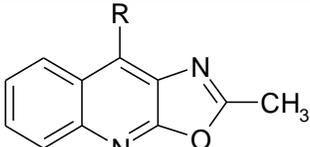
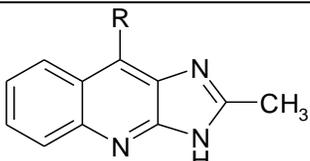
Es notable el hecho de que los derivados de 9-anilinoacridina y 9-anilino-tiazolo[5,4-*b*]quinolina<sup>145</sup> y aún de 4-anilino-furo[2,3-*b*]quinolina<sup>140-142</sup> no cumplan de la misma forma con los requerimientos estructurales para mostrar actividad citotóxica. Por otra parte, los derivados de 2-metiltio-9-anilino-tiazolo[5,4-*b*]quinolina anteriormente estudiados presentan inconvenientes como su baja solubilidad y su susceptibilidad a ser metabolizadas a las correspondientes sulfonas, siendo éstas menos activas.<sup>149</sup> Para abordar esta problemática se propone el estudio de un nuevo núcleo tricíclico.

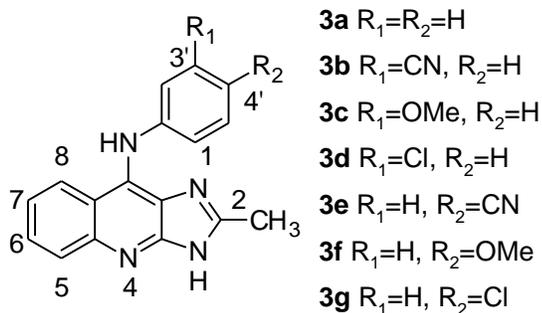
Para la elección del nuevo sistema tricíclico se consideraron como parámetros de referencia el logP y el momento dipolar. Este último se observó que era un parámetro importante para la actividad citotóxica en estudios preliminares de relación estructura-actividad de las tiazolo[5,4-*b*]quinolinas.<sup>145</sup> Bajo este enfoque se calcularon estos parámetros para derivados de acridina, tiazolo[5,4-*b*]quinolinas, imidazo[4,5-*b*]quinolinas y oxazolo[5,4-*b*]quinolinas 9-anilino sustituidos empleando el programa Spartan'04<sup>153</sup> y con el método semiempírico PM3 (Tabla 10).

Se observó que al reemplazar el átomo de azufre de la posición 3 del sistema tricíclico por átomos de oxígeno o nitrógeno hubo una disminución del logP, lo que hace pensar que los derivados de oxazolo[5,4-*b*]quinolina e imidazo[4,5-*b*]quinolina tendrían menores problemas de solubilidad que los de tiazolo[5,4-*b*]quinolina. Por otra parte, el valor numérico del momento dipolar disminuyó al cambiar el grupo metiltio por un grupo metilo. En algunos agentes intercalantes derivados de la elipticina, se ha observado que un aumento en el valor del momento dipolar resulta en una disminución de la citotoxicidad<sup>154</sup> por lo que el cambio del grupo metiltio por un grupo metilo resultaría favorable.

Para elegir el núcleo a estudiar, se consideró que el átomo de oxígeno, al ser un átomo más electronegativo, no favorecería las interacciones  $\pi-\pi$  en las oxazoloquinolinas en comparación con el resto de los núcleos. Además el núcleo de imidazoquinolina ofrece como ventaja adicional que se pueden incorporar sustituyentes en los átomos de nitrógeno del anillo de imidazol lo cual ampliaría la posibilidad de usar este núcleo en estudios posteriores. Para observar si el cumplimiento de los requerimientos estructurales en el anillo de anilina en derivados tricíclicos anilino sustituidos se ve afectado por el cambio de núcleo tricíclico, se propuso la síntesis de los derivados de 9-anilino-2-metilimidazo[4,5-*b*]quinolina ilustrados en la Figura 32.

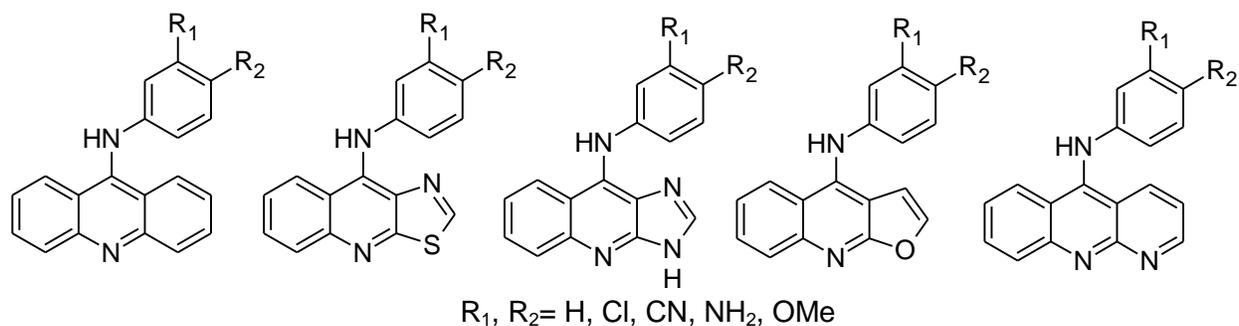
**Tabla 10.** Comparación de logP y momento dipolar de algunos núcleos tricíclicos

R= -NHC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	LogP (Ghose-Crippen)	Momento dipolar (Debye)
	5.00	2.04
	5.96	3.05
	5.21	1.87
	3.85	1.39
	3.77	1.58

**Figura 32.** Derivados de 9-anilinoimidazo[4,5-*b*]quinolina propuestos.*d) Modelado molecular de compuestos tricíclicos*

Además de la síntesis de los derivados propuestos y de la determinación de su actividad citotóxica, se propuso el uso de la química computacional como herramienta para aportar mayor información que permitiera proporcionar las características estructurales relevantes para la citotoxicidad de diferentes núcleos tricíclicos anilino sustituidos. Para ello se eligieron varios sistemas tricíclicos 9-anilino sustituidos (Figura 33) y se propuso el cálculo de algunas propiedades electrónicas y geométricas, a fin de observar similitudes o diferencias entre los

distintos núcleos tricíclicos que pudieran relacionarse con la actividad citotóxica en estudios de relación estructura-actividad posteriores.



**Figura 33.** Compuestos propuestos para su estudio por modelado molecular como entidades aisladas

Por otra parte, los estudios computacionales ofrecen la posibilidad de tener un conocimiento detallado de la influencia de la secuencia de bases, del ambiente que rodea al sitio de intercalación y de la relación entre estructura y energía del complejo resultante,<sup>51</sup> por lo que se decidió realizar la construcción de varios complejos de intercalación *in silico*, para estudiar si el remplazo isostérico del núcleo tricíclico en derivados de 9-anilinoacridina afecta la geometría y la energía de formación de los complejos de intercalación resultantes con diferentes secuencias de ADN, ya que se ha sugerido que la posición que tenga el agente intercalante de los complejos de intercalación sería un factor relevante en las propiedades citotóxicas.<sup>154</sup>

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la influencia de diversos sustituyentes en el anillo de anilina en la actividad citotóxica de derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina e imidazo[4,5-*b*]quinolina.

### Objetivos particulares

1. Sintetizar derivados de 2-{2-(*N,N*-dietilamino)etil}amino}-9-anilino-tiazolo[5,4-*b*]quinolina con distintos sustituyentes en las posiciones 3' y 4' del anillo de anilina
2. Sintetizar derivados de 9-anilino-2-metilimidazo[4,5-*b*]quinolina con distintos sustituyentes en las posiciones 3' y 4' del anillo de anilina
3. Realizar estudios de modelado molecular de derivados de 9-anilinoacridina, 9-anilino-2-metil-tiazolo[5,4-*b*]quinolina y 9-anilino-2-metilimidazo[4,5-*b*]quinolina como entidades aisladas los cuales incluyen: obtención del conformero más estable, propiedades electrostáticas, descriptores QSAR y superficies de propiedades electrónicas, empleando métodos semiempíricos y *ab initio*.
4. Realizar estudios de modelado molecular de algunos derivados tricíclicos anilino sustituidos en complejos de intercalación con diferentes secuencias de ADN y obtener valores de energía de formación aparente y de algunos parámetros geométricos.
5. Determinar la actividad citotóxica de los derivados propuestos en diversas líneas celulares.
6. Establecer una relación de estructura-actividad preliminar para este tipo de compuestos.

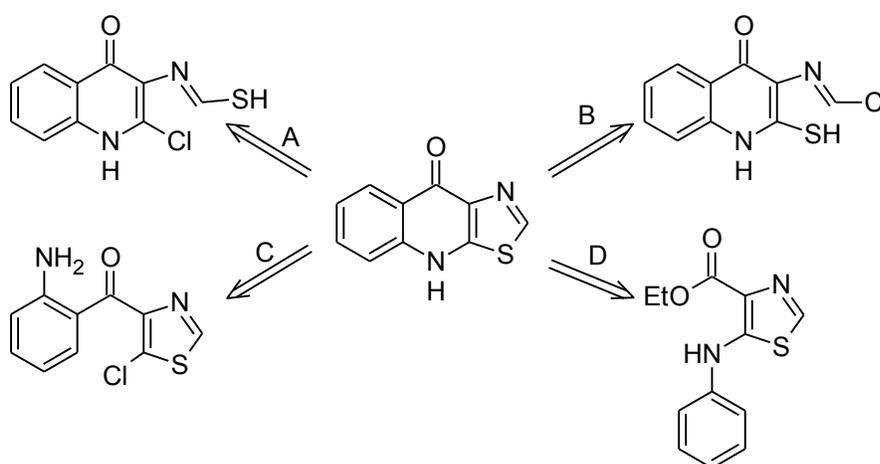
## 5. ANALISIS DE RESULTADOS

### 5.1 Parte química

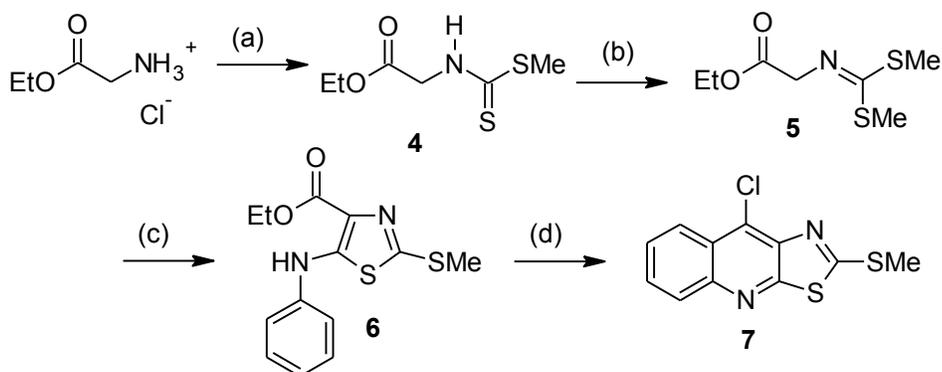
#### 5.1.1 Derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina

##### 5.1.1.1 Parte sintética

La formación del sistema tricíclico puede racionalizarse de cuatro formas, que se ilustran en la Figura 34. La ruta D en la cual se usa como precursor al 4-(etoxicarbonil)-5-(fenilamino)-2-(metiltio)tiazol es la propuesta por Álvarez-Ibarra<sup>149</sup> y fue la utilizada en este trabajo, tal como se describe en la Figura 35.



**Figura 34.** Análisis retrosintético de la formación del núcleo de tiazolo[5,4-*b*]quinolina.<sup>149</sup>



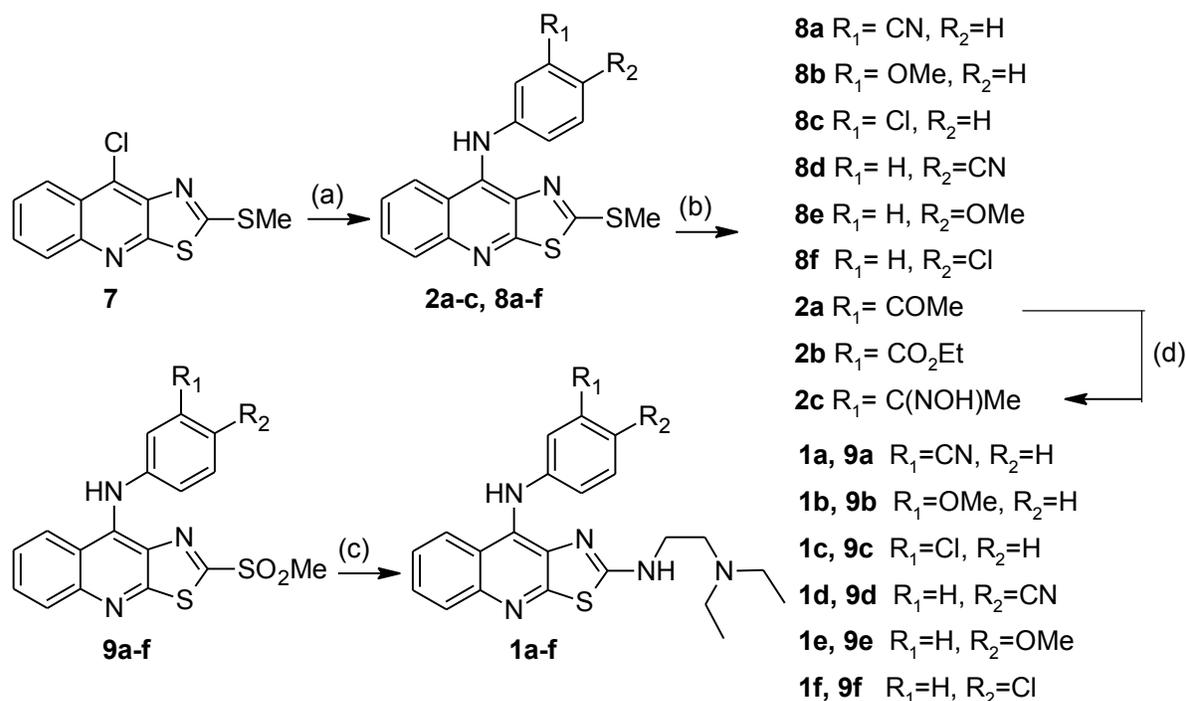
- (a) 1. CS<sub>2</sub>/TEA, 40 °C; 2. MeI, reflujo.<sup>155</sup> (b) MeI/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, acetona, reflujo.<sup>156</sup>  
 (c) 1. *t*-BuOK/THF anhidro, -75 °C; 2. PhNCS, -75 °C → temperatura ambiente/16 h.<sup>157</sup>  
 (d) PPA/POCl<sub>3</sub>, 130-135 °C/4 h<sup>144</sup>

**Figura 35.** Ruta sintética para la formación del núcleo de tiazolo[5,4-*b*]quinolina.

Para la obtención del compuesto **5** se cambió la ruta empleada anteriormente<sup>149,156</sup> y se adaptó la reportada por Almerico y colaboradores<sup>155</sup> dando buenos resultados al incrementar el

rendimiento del 45% al 70%, a partir del glicinato de etilo. La preparación de los compuestos **6** y **7** se realizó como se está reportado sin modificaciones.<sup>144,145,149</sup>

A partir del compuesto **7** se obtuvo el resto de los derivados como se muestra en el esquema de la Figura 36. Primeramente se incorporó el anillo de anilina adecuadamente sustituido por desplazamiento del átomo de cloro en la posición 9 para obtener los compuestos **2a-c** y **8a-8f** con rendimientos cercanos al 85%. Para obtener la oxima **2c** se hizo reaccionar el compuesto **2a** con clorhidrato de hidroxilamina en metanol a reflujo con un rendimiento del 90%. Para la incorporación del residuo de 2-(dietilamino)etilamino en la posición 2, se oxidó previamente el grupo tioéter a la sulfona correspondiente con peróxido de hidrógeno en ácido acético (75-85% de rendimiento) y posteriormente se incorporó la amina alifática. Para este último paso se probaron varias condiciones de reacción y de purificación, las cuales se muestran en la Tabla 11.



(a)  $\text{ArNH}_2$ , MeOH, HCl (ó *p*-TsOH 0.2 eq), reflujo 8 h; (b) AcOH/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%), 24 h; (c) 2-(*N,N*-dietilamino)etilamina, DMF, 0 °C, 3 h; (d)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ , MeOH reflujo.

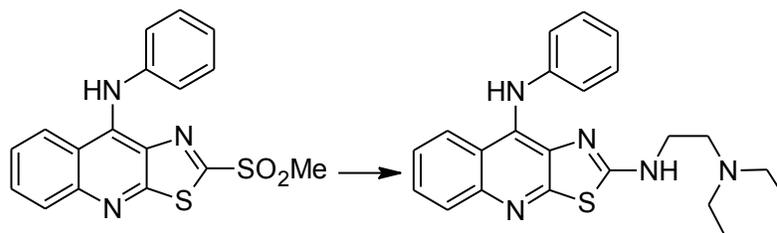
**Figura 36.** Ruta sintética para la preparación de derivados de 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinolina.

La suavidad de las condiciones de reacción y lo sencillo del trabajo de reacción (ver parte experimental) motivó a explorar el tipo de sustituyentes que se podrían añadir a la posición 2. En particular se decidió probar la incorporación de aminoácidos, por la variedad de las cadenas laterales en los distintos aminoácidos lo que permitiría ampliar los estudios de relación estructura-actividad sobre esta parte de la molécula. Por otra parte, se ha reportado la incorporación de aminoácidos a otras estructuras base de fármacos antitumorales con relativo éxito.<sup>158</sup>

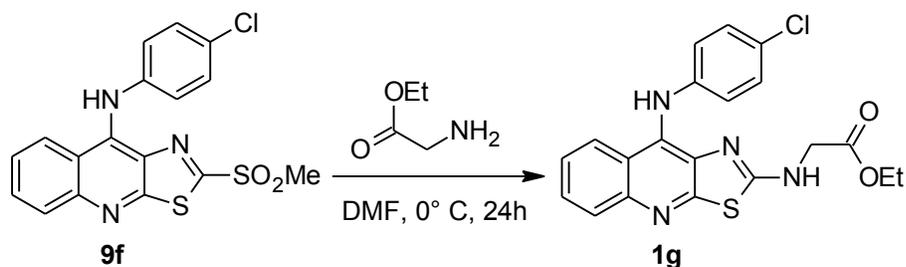
De manera inicial se exploró la reacción del compuesto **9f** con glicina como se ilustra en la Figura 37; sin embargo, se encontró que la incorporación no procedía. Entonces se optó por emplear el glicinato de etilo como materia prima inicial lo que permitió obtener el producto de la incorporación en la posición 2 empleando una metodología similar para la preparación de los

compuestos **1a-f**. Esto amplía la posibilidad de incorporar nuevos residuos al núcleo de tiazolo[5,4-*b*]quinolina, permitiendo modular propiedades como la solubilidad, estabilidad metabólica o afinidad a posibles sitios receptores (ADN, residuos de aminoácidos en enzimas como la topoisomerasa II) que se verían reflejadas en cambios en su actividad farmacológica, particularmente en su citotoxicidad.

**Tabla 11.** Condiciones de reacción ensayadas para la obtención de derivados de 9-(fenilamino)-2-[2-(*N,N*-dietilamino)etilamino]tiazolo[5,4-*b*]quinolina

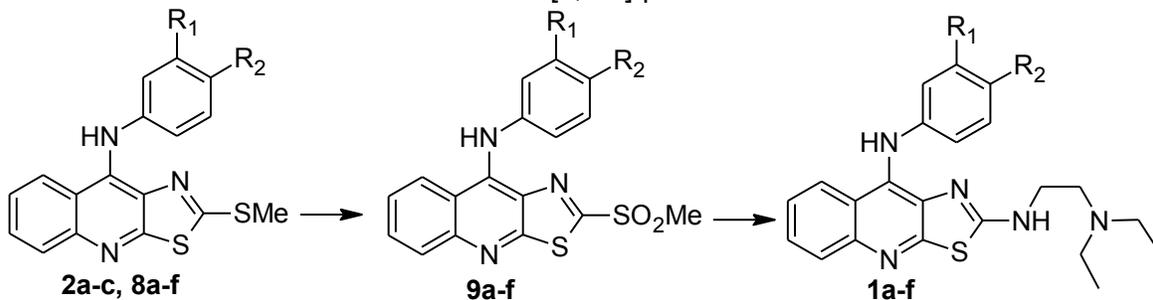


Condiciones de reacción	Trabajo de reacción	Rendimiento
5eq. 2-( <i>N,N</i> -dietilamino)etilamina, 130° C, 20 minutos	Extracción con diclorometano, cromatografía en columna	30%
2eq. 2-( <i>N,N</i> -dietilamino)etilamina THF 50° C, 6 h	Eliminación del disolvente, extracción con diclorometano, cromatografía en columna	30%
2eq. 2-( <i>N,N</i> -dietilamino)etilamina, DMF, temperatura ambiente, 1.5 h	Precipitación con disolución saturada de NaCl, tratamiento con éter isopropílico caliente	45%
2eq. 2-( <i>N,N</i> -dietilamino)etilamina, DMF, 0 °C, 3 h	Precipitación con disolución saturada de NaCl, tratamiento con éter isopropílico caliente	70%



**Figura 37.** Preparación de derivados sustituidos con aminoácidos.

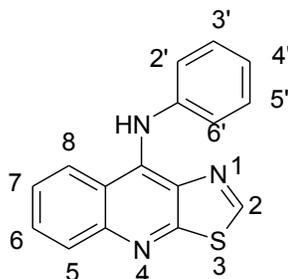
En general los rendimientos en cada uno de los pasos para la obtención de estos compuestos son de moderados a buenos (Tabla 12), no se requiere purificación por cromatografía y en general se obtienen puros por precipitación con agua y posteriores lavados con acetona (compuestos **2a**, **2b** y **8a-f**), THF (compuestos **9a-f**) o éter isopropílico caliente (compuestos **1a-f**). Por otra parte esta secuencia de síntesis permite la incorporación de residuos de diferente naturaleza en las posiciones 2 y 9 lo cual es relevante para estudios detallados de relación estructura-actividad, por lo que esta ruta de síntesis puede considerarse adecuada para la obtención de estos compuestos.

**Tabla 12.** Rendimientos obtenidos durante la preparación de los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Serie 8	Serie 9	Serie 1
CN	H	86%	82%	69%
OMe	H	85%	76%	50%
Cl	H	85%	83%	70%
H	CN	88%	83%	61%
H	OMe	88%	80%	65%
H	Cl	85%	73%	63%
COMe	H	85%	---	---
CO <sub>2</sub> Et	H	85%	---	---
C(NO <sub>2</sub> )Me	H	91%	---	---

### 5.1.1.2 Análisis espectroscópico

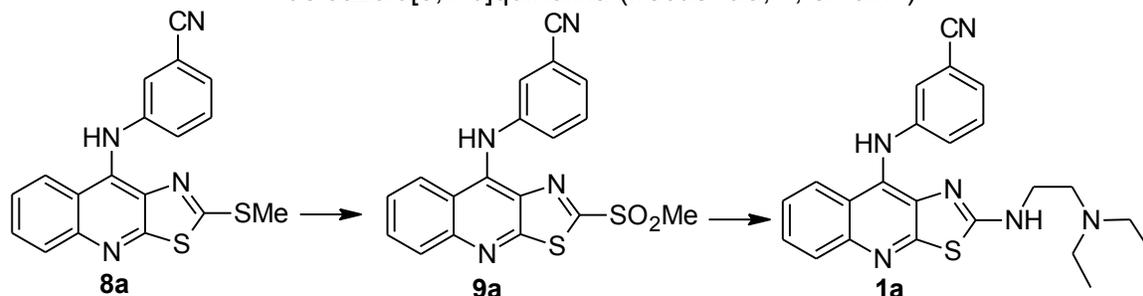
La elucidación estructural de todos los compuestos se realizó por el análisis de sus espectros de infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) y de <sup>13</sup>C (RMN-<sup>13</sup>C) en algunos casos y de espectrometría de masas (EM). En estos espectros se observó la presencia de patrones característicos que permitieron la identificación de los compuestos y asignación de las señales encontradas. La numeración empleada es la descrita en la Figura 38 y la asignación de las bandas y señales observadas se encuentra descrita para cada compuesto de estructura novedosa en la parte experimental, por lo que aquí sólo se comentarán los aspectos más relevantes y algunas Tablas que resumen las bandas o señales más importantes para la caracterización estructural. Los espectros de las estructuras novedosas se encuentran en el anexo 4.

**Figura 38.** Numeración empleada para la asignación de las señales en los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina.

En los espectros de IR de estos compuestos se observaron varias bandas que fueron útiles para confirmar que las reacciones se habían llevado a cabo. La incorporación de la anilina en la posición 9 se verificó por la aparición de una banda alrededor de 3100 cm<sup>-1</sup> que se asignó al enlace N-H del residuo de anilina, además de la presencia de otras bandas atribuibles a los grupos funcionales presentes en el anillo de anilina (por ejemplo 2230 cm<sup>-1</sup> correspondiente al

grupo CN). La oxidación del grupo tioéter a la correspondiente sulfona se confirmó por la aparición de bandas alrededor de  $1330\text{ cm}^{-1}$  y  $1150\text{ cm}^{-1}$ . La desaparición de estas últimas y la aparición de bandas entre  $2900\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$  indicó la incorporación de la 2-(*N,N*-dietilamino)etilamina. En la Tabla 13 se muestra un resumen de estas observaciones para el caso de los compuestos sustituidos con un grupo CN en la posición 3'.

**Tabla 13.** Bandas relevantes en IR para la caracterización de los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina (frecuencia,  $\nu$ , en  $\text{cm}^{-1}$ )



Grupos funcionales	<b>8</b> <sup>145</sup>	<b>9a</b> <sup>150</sup>	<b>1a</b>
<b>HNAr</b>	3245 (N-H)	3435 (N-H)	3311 (N-H)
<b>Aromaticidad (-C=C-)</b>	1573, 1550, 1498, 1473, 1433	1572, 1543, 1498, 1469, 1423	1600, 1560, 1476
<b>SMe</b>	1286	-----	-----
<b>SO<sub>2</sub>Me</b>	----	1333, 1149 (S-O)	-----
<b>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NEt<sub>2</sub></b>	----	-----	2966, 2810 (C-H)
<b>Otras bandas importantes</b>	2231 (CN)	2223 (CN)	2227 (CN)

La asignación de las señales de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H, se realizó con base a su desplazamiento químico, a la obtención de las constantes de acoplamiento, a espectros bidimensionales en algunos casos y a la comparación con reportes previos.<sup>144,145,149</sup> Se pudo establecer el siguiente patrón de señales para el sistema de tiazolo[5,4-*b*]quinolina (en DMSO-*d*<sub>6</sub>):

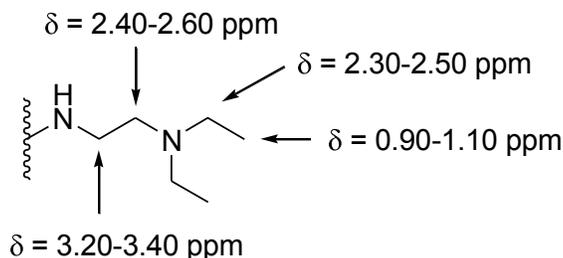
- H-7, señal doble de doble de doble ( $J = 8.4, 6.9, 1.2\text{ Hz}$ ), entre 7.60 y 7.70 ppm
- H-6, señal doble de doble de doble ( $J = 8.4, 6.9, 1.2\text{ Hz}$ ), entre 7.80 y 7.90 ppm
- H-5, señal doble de doble ( $J = 8.4, 1.2\text{ Hz}$ ), entre 7.95 y 8.05 ppm
- H-8, señal doble de doble ( $J = 8.4, 1.2\text{ Hz}$ ), entre 8.45 y 8.65 ppm
- La señal del grupo amino que une al anillo de anilino con el sistema tricíclico (-NHAr) se observa como una señal simple ancha, entre 9.5 y 10.5 ppm.

Otras señales como las del anillo de anilina dependen de los sustituyentes presentes por lo que su desplazamiento y forma varía mucho.

En el caso de los sustituyentes de la posición 2 se encontraron los siguientes patrones (en DMSO-*d*<sub>6</sub>):

- Grupo metiltio (compuestos **2a-c**, **8a-f**): Señal simple entre 2.30 y 2.60 ppm.
- Grupo metilsulfonilo (compuestos **8a-f**): Señal simple entre 3.30 y 3.50 ppm. Es de observar como la señal de este grupo metilo se desplaza a campo más bajo respecto al grupo metiltio por efecto de los átomos de oxígeno unidos al átomo de azufre vecino.

- Cadena de 2-(*N,N*-dietilamino)etilamino:
  - Grupo *N,N*-dietilamino: Señal triple ( $J = 7.2$  Hz) entre 0.90-1.10 ppm correspondiente al grupo metilo y señal cuádruple ( $J = 7.2$  Hz) entre 2.30 y 2.50 ppm correspondiente al grupo metileno.
  - Cadena de etilamina: Señal triple ( $J = 6.9$  Hz) entre 2.40 y 2.60 ppm correspondiente al metileno unido a la amina terciaria y señal cuádruple ( $J = 6.9$  Hz) entre 3.20 y 3.40 ppm correspondiente al metileno unido a la amino secundaria. La multiplicidad de esta última señal cambió a señal triple en el experimento de intercambio con agua deuterada lo que permitió su asignación inequívoca. La figura 39 muestra gráficamente las asignaciones aquí descritas.



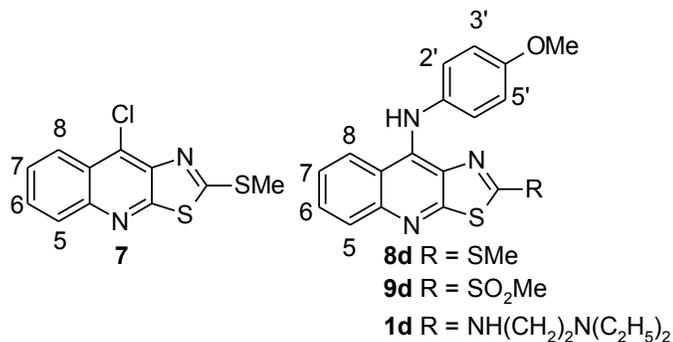
**Figura 39.** Desplazamiento químico ( $\delta$ , ppm) de los protones de la cadena de 2-(*N,N*-dietilamino)etilamina

La Tabla 14 muestra la variación de las señales de acuerdo al cambio de sustituyentes en las posiciones 2 y 9. Aunque sólo se muestra para los compuestos 4'-OMe sustituidos, este comportamiento fue constante en el resto de los compuestos.

En esta tabla se aprecia que la sustitución de un átomo de cloro en la posición 9 por un anillo de anilina tuvo un ligero efecto sobre el desplazamiento químico hacia campo bajo de las señales del núcleo tricíclico, la más notable es sobre H-8, lo que sugiere un efecto de protección del anillo de anilina. La oxidación del átomo de azufre del grupo metiltio tuvo un efecto notable sobre el desplazamiento químico hacia campo bajo del grupo metilo pero no sobre los del núcleo tricíclico, en cambio la sustitución por una cadena de alquilamino desplazó las señales a campos más altos, lo que indica un incremento en la densidad electrónica en el sistema de tiazoloquinolina.

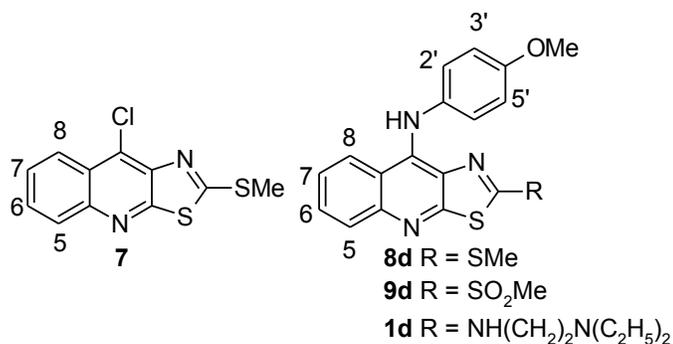
A fin de contar con mayor información sobre el efecto de la sustitución sobre la densidad electrónica del núcleo de tiazolo[5,4-*b*]quinolina, se realizaron los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de los compuestos anteriores, mostrándose los datos obtenidos en la Tabla 15. En éstos, se puede apreciar el efecto desprotector del grupo metilsulfonilo principalmente sobre el átomo de carbono de la posición 2 (C-2) como podría esperarse. Es de notar que el desplazamiento químico de C-2 en los derivados **7** y **9d** es similar ( $\delta = 172$  y  $173$  ppm respectivamente) mientras que en los derivados **8a-f**<sup>145</sup> la señal se encuentra a campo más alto ( $\delta = 161$  ppm). Esto es importante porque sólo en el compuesto **7** y en los derivados de la serie **9** se pueden incorporar aminas alifáticas, pero no en los derivados de la serie **8**,<sup>145</sup> lo cual puede explicarse por una menor densidad electrónica en la posición 2 en el caso del compuesto **7** y los derivados de la serie **9**, en comparación con los de la serie **8**.

**Tabla 14.** Señales en RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **7** y los compuestos 4'-OMe sustituidos (DMSO- $d_6$ , desplazamiento en ppm, constantes de acoplamiento, J, en Hertz)



	<b>7</b> <sup>144</sup>	<b>8d</b> <sup>145</sup>	<b>9d</b>	<b>1d</b>
<b>Me</b>	2.88 (s)	2.28 (s)	3.23 (s)	-----
<b>H-5</b>	8.05 (d, J=8.7)	7.95 (d, J= 8.4)	7.97 (m)	7.79 (dd, J= 8.7, 0.9)
<b>H-6</b>	7.70 (dd, J= 8.7, 6.9)	7.90 (t, J= 8.4,6.9)	7.94 (m)	7.52 (ddd; J= 8.7, 6.9, 0.9)
<b>H-7</b>	7.65 (dd, J= 8.7, 6.9)	7.64 (t, J= 8.4, 6.9)	7.65 (dd, J= 8.7, 6.9)	7.36 (ddd; J= 8.7, 6.9, 0.9)
<b>H-8</b>	8.35 (d, J= 8.7)	8.66 (d, J= 8.4)	8.65 (d, J= 8.7)	8.06 (dd, J= 8.7, 0.9)
<b>H-2'</b>	-----	7.28 (d, J= 8.4)	7.32 (d, J= 8.7)	6.80 (m, 4H)
<b>H-3'</b>	-----	6.98 (d, J= 8.4)	7.00 (d, J= 8.7)	6.80 (m, 4H)
<b>H-4'</b>	-----	-----	-----	-----
<b>H-5'</b>	-----	6.98 (d, J= 8.4)	7.00 (d, J= 8.7)	6.80 (m, 4H)
<b>H-6'</b>	-----	7.28 (d, J= 8.4)	7.32 (d, J=8.7)	6.80 (m, 4H)
<b>NHAr</b>	-----	10.68 (sa)	10.71 (sa)	8.29 (s,1H)
<b>Otros</b>	-----	OMe 3.77 (s)	OMe 3.81 (s)	0.88 (t, J=7.2, 6H) 2-CH <sub>3</sub> ; 2.41(q, J=7.2, 4H) 2-CH <sub>2</sub> ; 2.45 (t, J= 6.9, 2H) CH <sub>2</sub> ; 3.23 (q, J= 6.9, 2H) NHCH <sub>2</sub> ; 3.68 (s, 3H) OCH <sub>3</sub> 8.13 (br, t, J= 6.9) -NH

**Tabla 15.** Señales en RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto **7** y los compuestos 4'-OMe sustituidos (DMSO- $d_6$ , desplazamiento en ppm)



No. C	<b>7</b> <sup>144</sup>	<b>8d</b> <sup>145</sup>	<b>9d</b>	<b>1d</b>
<b>Me</b>	15.3	15.3	40.71	----
<b>C-2</b>	172.0	161.3	173.8	160.6
<b>C-3a</b>	145.6	133.7	132.6	133.6
<b>C-4a</b>	126.9	139.7	139.9	137.0
<b>C-5</b>	129.8	127.8	128.3	126.8
<b>C-6</b>	131.2	133.1	133.0	132.8
<b>C-7</b>	128.1	125.9	124.9	123.6
<b>C-8</b>	124.5	125.1	124.4	123.2
<b>C-8a</b>	124.8	117.1	116.7	120.8
<b>C-9</b>	160.1	158.3	158.6	159.9
<b>C-9a</b>	142.1	130.2	128.6	127.8
<b>C-1'</b>	----	145	147.3	144.9
<b>C-2'</b>	----	121.8	126.7	120.5
<b>C-3'</b>	----	114.4	113.8	113.3
<b>C-4'</b>	----	155	157.7	153.8
<b>C-5'</b>	----	114.4	113.8	113.3
<b>C-6'</b>	----	121.8	126.7	120.5
<b>Otros</b>	----	OMe, 56.1	OMe, 55.46	OMe, 55.1

Para asignar la geometría de la oxima **2c** se realizó un experimento NOESY. Al observarse la interacción del protón del grupo oxima (NOH) con los protones del grupo metilo, pero no con los protones del anillo de anilina (Figura 40) se pudo asignar la geometría del enlace como *E*. Adicionalmente, se observó una interacción débil de los protones del anillo de anilina con los protones del grupo metilico (interacción SMe-H6' en la Figura 40), lo que sugiere que el anillo de anilina guarda una relación oblicua y no ortogonal con el núcleo tricíclico. Esta situación había sido reportada para estos derivados previamente<sup>145</sup> y se observó también en los estudios de modelado molecular realizados en este trabajo y que se comentan más adelante.

Un argumento adicional que soporta la asignación de la geometría del enlace de la oxima proviene del análisis de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , de los compuestos **2a** y **2c**. Si la geometría del enlace de la oxima fuera *E*, se debería observar un efecto de protección sobre el átomo de carbono del grupo metilo  $\alpha$  al grupo hidroximino por compresión estérica debido a la cercanía del átomo de oxígeno del grupo hidroximino con el grupo metilo.<sup>159</sup> En el caso del compuesto **2a**, el desplazamiento químico del átomo de carbono del grupo metilo es de  $\delta = 26.82$  ppm, mientras que para el compuesto **2c** es de  $\delta = 11.50$  ppm (Figura 41), observándose el efecto de protección antes mencionado que permite asignar la geometría del enlace como *E*.

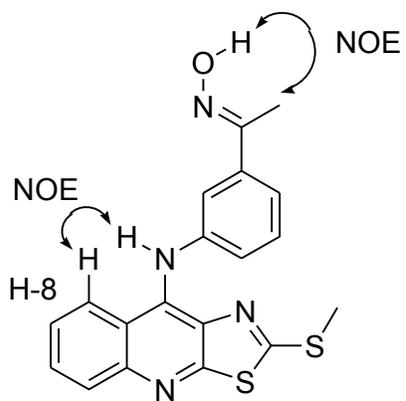
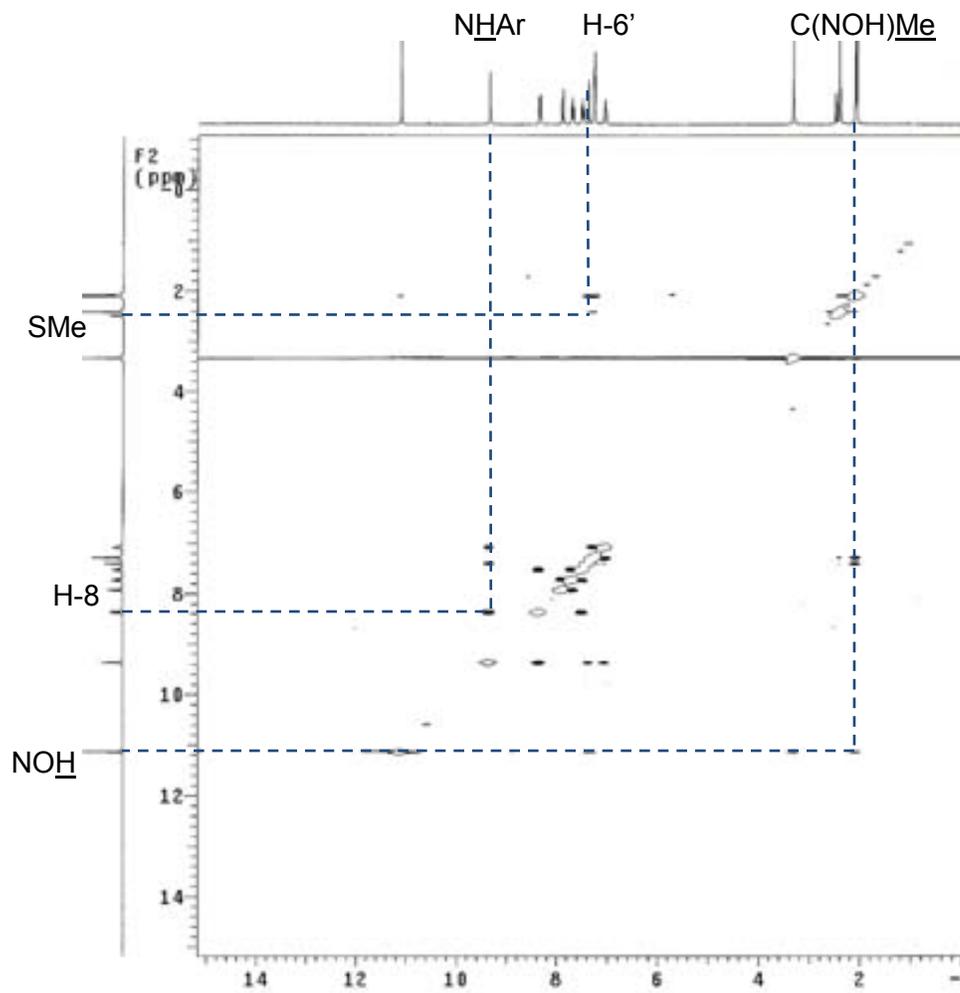
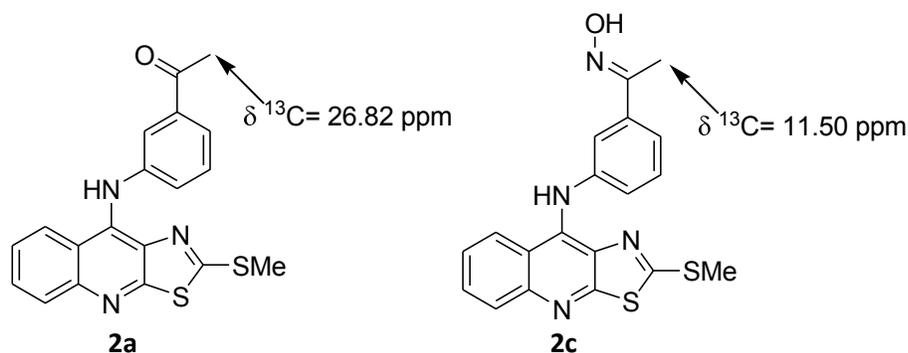
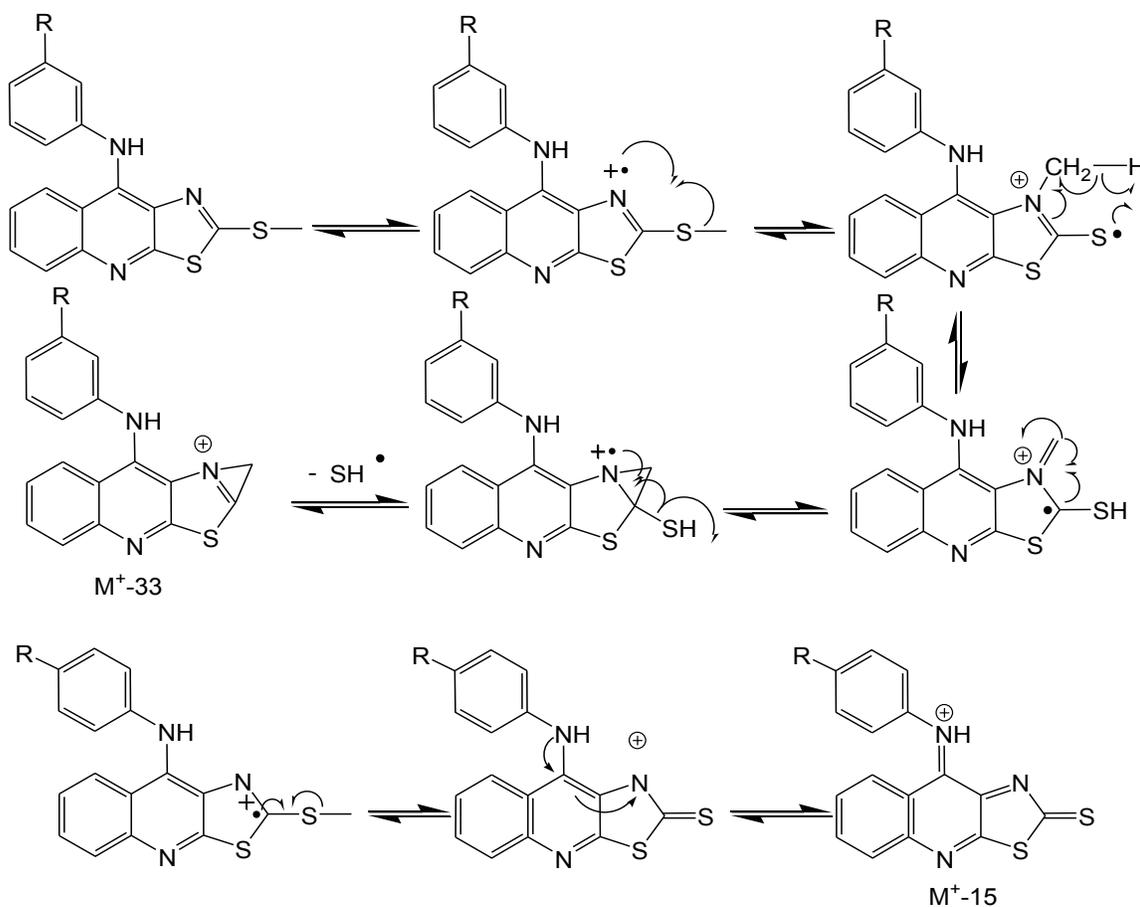


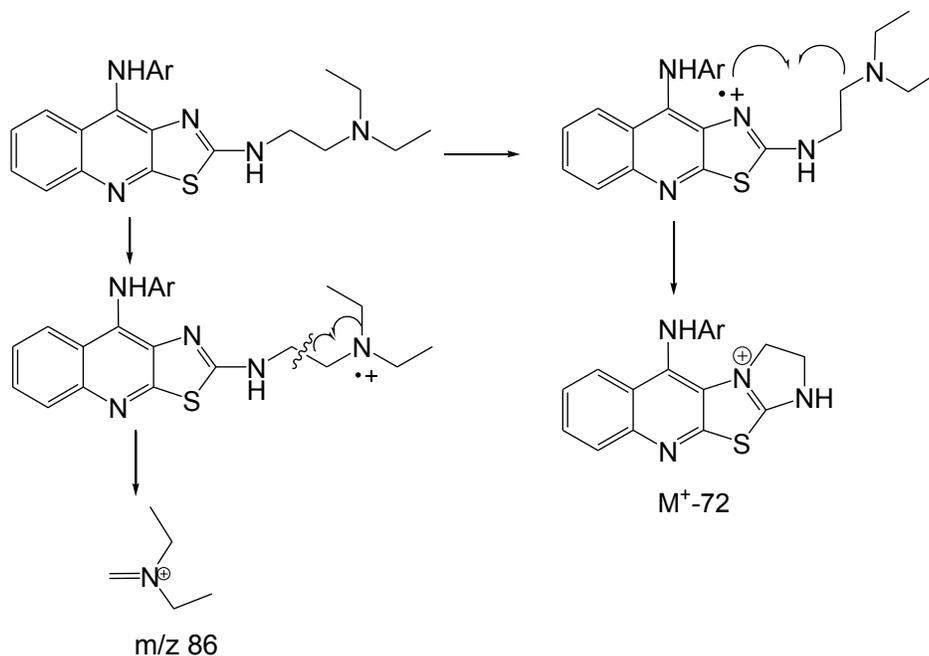
Figura 40. Espectro NOESY del compuesto 2c.



**Figura 41.** Desplazamiento químico en RMN  $^{13}\text{C}$ , del grupo metilo a a los grupos carbonilo e hidroximino de los compuestos **2a** y **2c**, respectivamente.

En cuanto a los espectros de espectrometría de masas, debido a la técnica por la cual fueron obtenidos (FAB), se obtuvo poca información respecto a los patrones de fragmentación. Algunos patrones de fragmentación generales se muestran en la Figura 42. En todos los casos el ion molecular ( $\text{M}^+$  o  $\text{M}^+ + 1$ ) coincidió con el peso molecular esperado para la estructura propuesta.





**Figura 42.** Posibles patrones de fragmentación para los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina.

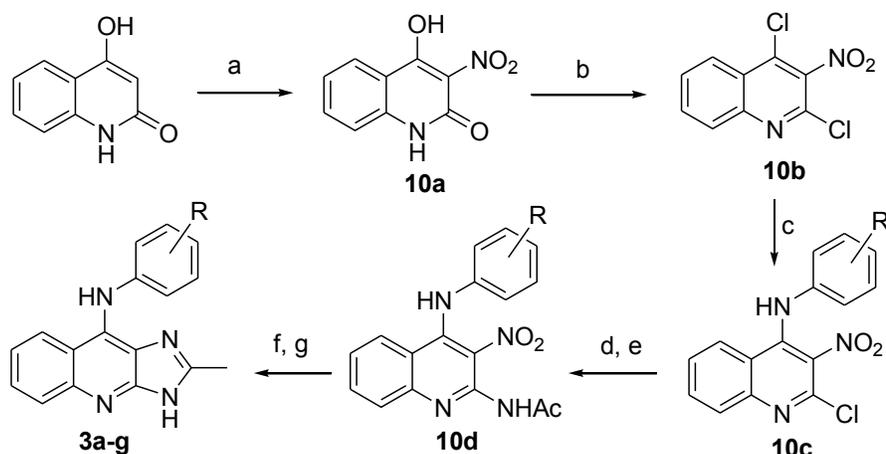
### 5.1.2 Derivados de imidazo[4,5-*b*]quinolina

#### 5.1.2.1 Parte química

El núcleo de imidazo[4,5-*b*]quinolina no está ampliamente reportado en la literatura existiendo pocas referencias sobre su síntesis.<sup>160,161</sup> Se propusieron dos rutas a partir de diferentes precursores para su preparación (rutas “A” y “B”), las cuales se desarrollaron de manera simultánea, y a continuación se comentan los resultados obtenidos.

#### Ruta “A”

La secuencia de síntesis propuesta como ruta “A” se muestra en la Figura 43. Inicia a partir de la 4-hidroxi-2-quinolona comercial sometida a una reacción de nitración con ácido acético y ácido nítrico daría el derivado 3-nitrosustituido **10a**, el cual se haría reaccionar con oxiclورو de fósforo para obtener el derivado 2,4-diclorado **10b**. Estas dos reacciones se encuentran reportadas en la literatura.<sup>162,163</sup> Mediante una reacción de sustitución nucleofílica se desplazaría selectivamente el átomo de cloro de la posición 4<sup>164</sup> con una amina aromática para dar el compuesto **10c**, posteriormente el otro átomo de cloro se sustituiría con una amina haciendo reaccionar el compuesto **10c** con amoníaco a presión, posteriormente se acetila el grupo amino incorporado para obtener el compuesto **10d**. Finalmente, por reducción del grupo nitro y por una reacción de ciclocondensación con ácido acético llevaría a formar el anillo de imidazol y se obtendrían los compuestos deseados **3a-g**.



R = -H, (**3a**) 3'-CN (**3b**), 3'-OMe (**3c**), 3'-Cl (**3d**), 4'-CN (**3e**), 4'-OMe (**3f**), 4'-Cl (**3g**)  
 a)  $\text{HNO}_3/\text{AcOH}$ ; <sup>162</sup> b)  $\text{POCl}_3$  <sup>163</sup> o  $\text{PhPOCl}_2$ ; <sup>164</sup> c)  $\text{NHAr}/\text{TEA}$ , 0 °C; <sup>164</sup> d)  $\text{NH}_3, \text{MeOH}$ ; <sup>165</sup>  
 e)  $\text{Ac}_2\text{O}$ ; f)  $\text{H}_2, \text{Pd/C}$ ; g)  $\text{AcOH}$ , reflujo

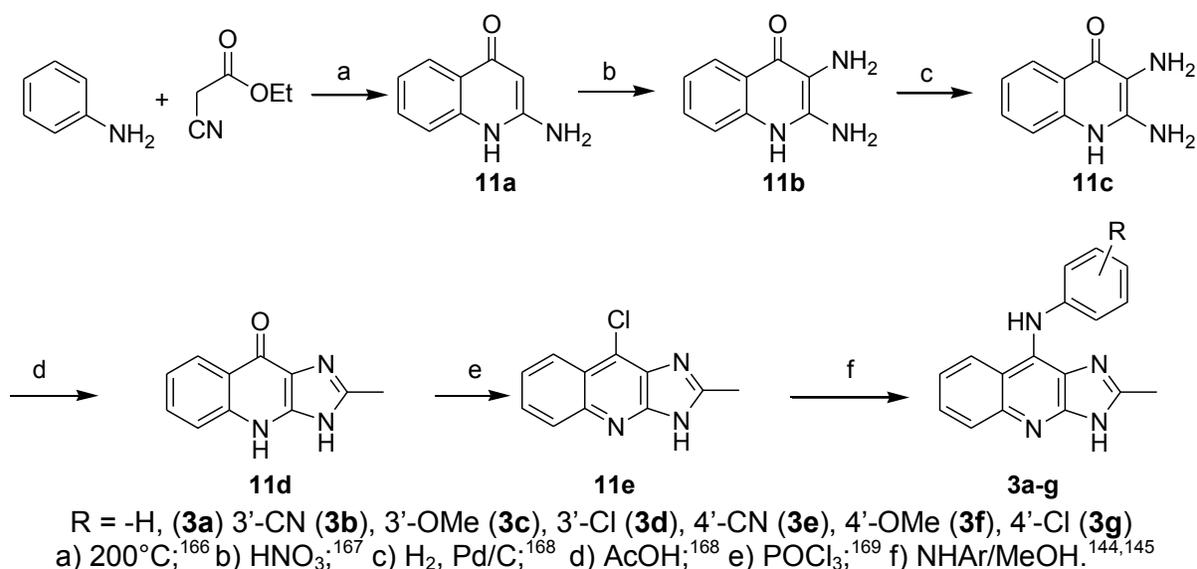
**Figura 43.** Ruta propuesta para la obtención de 9-anilinoimidazoquinolinas (ruta "A").

Al realizar las reacciones propuestas, el derivado **10a** se obtuvo un rendimiento de 75%. La reacción se realizó tanto con la 4-hidroxi-2-quinolona pura así como con su sal sódica hidratada, (ésta última tiene un menor costo) sin que hubiera cambios en el curso o el rendimiento de la reacción. La obtención del derivado **10b** se logró en un rendimiento del 60% y aunque la técnica reportada<sup>163</sup> indica que se puede emplear el crudo de reacción en pasos subsecuentes sin ningún proceso de purificación, fue necesario realizar lavados con metanol frío para poder obtener un producto sin impurezas no que afectarían en el siguiente paso. El compuesto **10b** se hizo reaccionar con 4-cloroanilina a baja temperatura en condiciones básicas y se logró el desplazamiento selectivo del átomo de cloro en posición 9, lo que se verificó por RMN  $^1\text{H}$  y EM; sin embargo, el proceso de purificación fue difícil, ya que el producto se descompuso en la columna de sílice y por recristalización se recuperaba sólo una pequeña cantidad del producto, dando rendimientos del 35%.

A pesar de varios intentos en que se modificaron las condiciones de reacción y de purificación del producto **10c**, no se lograron incrementar los rendimientos en la obtención de este producto, por lo que esta ruta no se continuó ya que estos intermediarios eran los claves para obtener el resto de los derivados y se obtuvieron mejores resultados con la ruta B. Además, dados los objetivos de la tesis (obtener varios derivados de una misma estructura base), convenía más una síntesis divergente en los últimos pasos de la secuencia.

### Ruta "B"

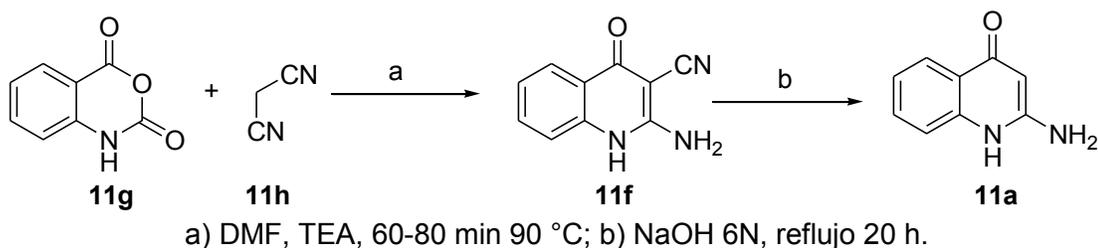
La segunda ruta propuesta se ilustra en la Figura 44 y parte de la 2-amino-4-quinolona (compuesto **11a**), la cual se obtiene de la reacción de la anilina con cianoacetato de etilo a alta temperatura.<sup>166</sup> Mediante una reacción similar a la nitración para obtener el compuesto **10a**,<sup>162</sup> se obtendría el compuesto 2-amino-3-nitro sustituido **11b** el cual por reducción daría el compuesto 2,3-diaminado **11c**, el cual se mediante una reacción de ciclocondensación con ácido acético permitiría obtener el compuesto tricíclico **11d**.<sup>168</sup> Éste último se trataría con oxiclورو de fósforo para obtener el compuesto 9-cloro sustituido **11e** y finalmente por sustitución del átomo de cloro se obtendrían los compuestos finales deseados **3a-g**.



**Figura 44.** Ruta propuesta para la obtención de 9-anilinoimidazoquinolinas (ruta "B").

La propuesta original para la obtención del compuesto **11a** consideró la reacción entre anilina y cianoacetato de etilo a 200 °C. A escala de 1 g se obtuvieron rendimientos del 30%, sin embargo intentos por escalar la reacción resultaron en rendimientos aún menores (15-20%), esto aunado a las condiciones drásticas de reacción (200 °C, 90 min), llevaron a buscar otras alternativas para su obtención.

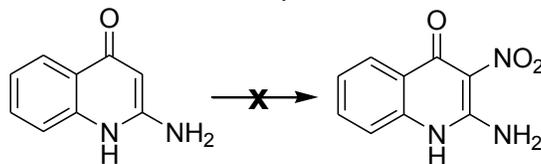
La pesquisa bibliográfica arrojó la síntesis de la 2-amino-3-ciano-4-hidroxiquinolina **11f** a partir de anhídrido isatoico **11g** y malononitrilo **11h**, la posterior hidrólisis y descarboxilación de este compuesto daría lugar al compuesto **11a** como se ilustra en la Figura 45.<sup>170</sup> Para el primer paso se observó que se requería mayor temperatura y tiempos de reacción más largos a los reportados en la literatura para obtener rendimientos satisfactorios, mientras que para la hidrólisis y descarboxilación se requirieron tiempos largos de reflujo. Sin embargo, esta estrategia fue exitosa ya que se obtuvo el compuesto **11a** con un rendimiento del 85% a partir del compuesto **11g** a escala de 50 g.



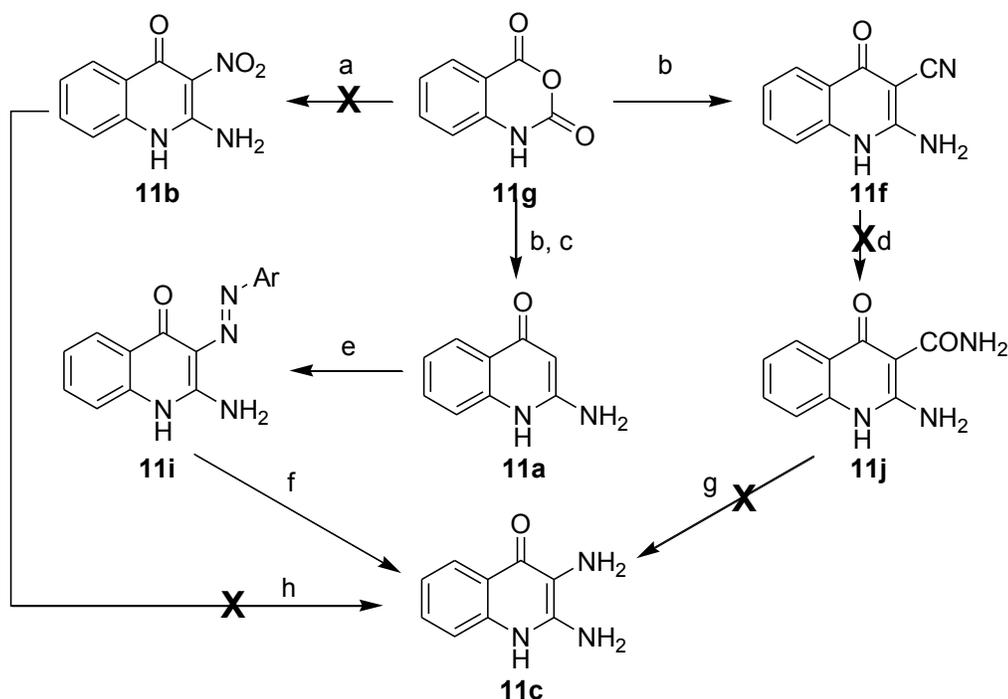
**Figura 45.** Ruta alternativa para la obtención del compuesto **11a**.

La obtención del compuesto **11b** presentó varias dificultades. La ruta propuesta inicialmente suponía incorporar un grupo nitro en la posición 3 del anillo de quinolina, empleando una mezcla de ácido nítrico y ácido acético de manera similar al paso inicial de la ruta A. Sin embargo, sólo se recuperó materia prima, por lo que se intentaron varias modificaciones algunas de las cuales se muestran en la Tabla 16, ninguna de ellas permitió obtener el compuesto 3-nitro sustituido por lo que fue necesario considerar otras opciones, las cuales se muestran en la Figura 46.

**Tabla 16.** Algunas condiciones de reacción ensayadas para la nitración del compuesto **11a**



Condiciones de reacción	Resultado
Ácido nítrico/ AcOH, 70° C	No hubo reacción
Mezcla de ácido nítrico/ anhídrido acético, 15° C	Se obtuvo la 2-acetamido-6-nitro-4-quinolona en un 70%
Ácido nítrico 70°C	Mezcla compleja de varios productos difícil de purificar.



- a)  $\text{NCCH}_2\text{NO}_2$ , TEA, DMF;<sup>171</sup> b)  $\text{NCCH}_2\text{CN}$ ;<sup>170</sup> c) KOH 6N, reflujo;<sup>170</sup> d) DMSO,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ;<sup>172</sup>  
 e)  $\text{ArN}_2^+\text{Cl}^-$ , piridina;<sup>173</sup> f)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ , DMF, buffer 7.4;<sup>174</sup> g) NaOBr; h)  $\text{H}_2$ , Pd/C

**Figura 46.** Rutas potenciales para la obtención del compuesto **11c**.

En el caso de la ruta con 2-nitroacetoniitrilo, se observó que este compuesto era de difícil manejo, se necesitaba manejar inmediatamente después de preparado y aún así las condiciones de reacción planteadas no permitieron obtener el producto deseado. Entonces se optó por obtener el compuesto **11c** a partir del compuesto **11f** mediante la reacción de conversión de nitrilos a amidas de Katritzky<sup>172</sup> para la obtención del compuesto **11j** y posterior conversión a la diamina por una degradación de Hoffmann. Sin embargo, no se pudo obtener la carboxamida **11j**, debido posiblemente a la pobre solubilidad del compuesto **11f** aún en DMSO, por lo que se abandonó esta ruta.

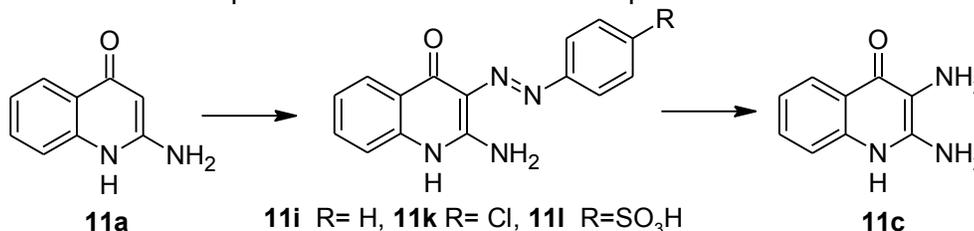
Como otra ruta alternativa se exploró el empleo de derivados de diazo compuestos como precursores de aminas aromáticas mediante la ruptura reductiva del enlace  $\text{-N=N-}$ . En la literatura se halló descrita la preparación de la 2-amino-3-(fenildiazo)-4-quinolona, **11i**<sup>173</sup> a partir de la 2-amino-4-quinolona, la cual mediante algunas modificaciones resultó adecuada en

términos de tiempos y condiciones de reacción. Se probó la reacción de acoplamiento con anilina y 4-cloroanilina resultando más eficiente con ésta última (70% con la primera y 90% con la segunda, con un tiempo de reacción de 3 h para ambas) por lo que se siguió la secuencia de síntesis con este intermediario.

Al buscar en la literatura<sup>174</sup> las condiciones de reacción para la ruptura del enlace diazo se encontró el uso de metales en condiciones ácidas y ditionito sódico en condiciones básicas, entre otras. Se probaron varias combinaciones de metales o sus sales (Zn, Sn y SnCl<sub>2</sub>) en HCl o AcOH, en todos los casos al seguir la reacción por cromatografía en capa fina (ccf) se observó la formación de la 4-cloroanilina, lo que indicó la ruptura del enlace diazo. Sin embargo, se observó una serie de compuestos más polares, que no se pudieron aislar para su caracterización, ya que la presencia de las sales de zinc o estaño dificultó la purificación.

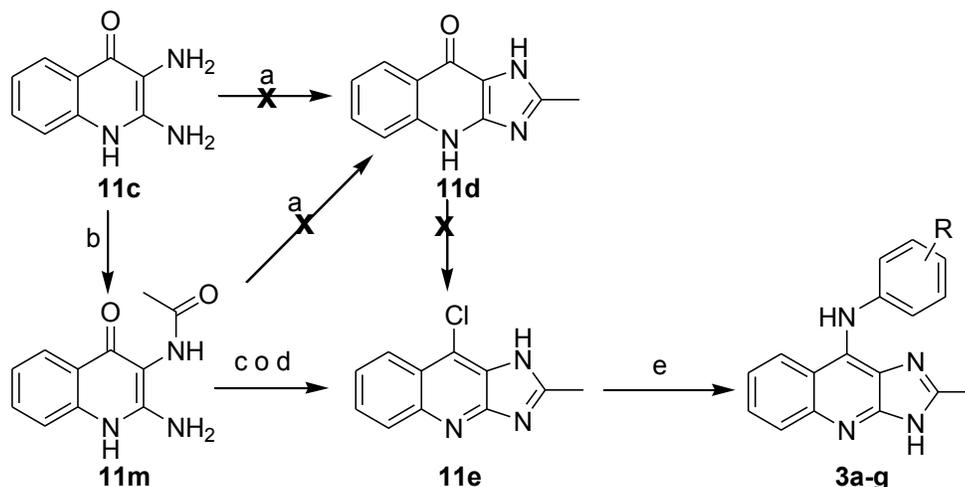
Se probó entonces con ditionita sódica, aunque la baja solubilidad del compuesto diazo no permitió hallar las condiciones de reacción fácilmente. Una mezcla de DMF-buffer de fosfatos<sup>174</sup> permitió disolver parcialmente el compuesto y que se efectuara la reacción, lográndose aislar el compuesto **11c** en un rendimiento del 50%. A pesar de ello, la reacción no fue reproducible (variaba el rendimiento entre el 40-60%), requería 48 h para completarse y 150 mL de la mezcla de DMF-buffer por gramo de compuesto diazo para obtener buenos resultados. Sin embargo, la experiencia adquirida permitió deducir que era necesario que el compuesto diazo se encontrara soluble en el medio de reacción, por lo que se sustituyó la 4-cloroanilina por ácido sulfanílico en la reacción de acoplamiento, esperando que este nuevo derivado azo fuera soluble en condiciones básicas. Efectivamente este compuesto fue soluble en NaOH al 15% a 70 °C (10 g/100 mL), el trabajo de reacción fue sencillo, pues al neutralizar el medio de reacción precipitó un compuesto blanco, que fue caracterizado posteriormente como el compuesto **11c**, en un 85% de rendimiento. La Tabla 17 resume los ensayos realizados para la obtención de este intermediario por acoplamiento de una sal de diazonio y posterior ruptura reductiva, así como los resultados obtenidos

**Tabla 17.** Resultados obtenidos durante la preparación del compuesto **11c** a través de la ruptura reductiva de los azo compuestos



<b>Obtención de los diazo derivados (11i,11k,11l)</b>	
<b>ANILINA ACOPLADA</b>	<b>RESULTADO</b>
Anilina ( <b>11i</b> ), <i>p</i> -cloroanilina ( <b>11k</b> ), ácido sulfanílico ( <b>11l</b> )	Se obtuvieron los azo derivados en rendimiento del 70% ( <b>11i</b> ) al 90% ( <b>11k,11l</b> ).
<b>Reducción del derivado 3-(4-clorofenilazo) 11k</b>	
Zn/NH <sub>4</sub> OAc/MeOH, t.a	Se recuperó únicamente materia prima.
Se probaron varias combinaciones de metales en presencia de ácido.	En todos los casos se observó formación de varios subproductos, las sales de los metales dificultaron el proceso de purificación.
Ditionita/NaOH 15%, 70 °C	El derivado azo no es soluble en NaOH 15%.
Ditionita/ DMF/ Buffer fosfatos pH= 7.4	Rendimiento entre 40-60%, requiere gran cantidad de la mezcla DMF/buffer de fosfatos
<b>Reducción del derivado azo del ácido sulfanílico 11l</b>	
Ditionita/NaOH 15%, 70 °C	Se obtuvo en rendimiento del 85%.

Una vez obtenido el derivado 2,3-diamino sustituido **11c**, se trató de obtener el núcleo de imidazo[4,5-*b*]quinolina mediante las rutas potenciales indicadas en la Figura 47.



R = -H, (**3a**) 3'-CN (**3b**), 3'-OMe (**3c**), 3'-Cl (**3d**), 4'-CN (**3e**), 4'-OMe (**3f**), 4'-Cl (**3g**)  
 a) AcOH, PPA /reflujo; b) Ac<sub>2</sub>O/Py, t.amb.; c) POCl<sub>3</sub>,<sup>145</sup> d) SOCl<sub>2</sub>,<sup>175</sup> e) NH<sub>2</sub>Ar/CHCl<sub>3</sub>, reflujo.

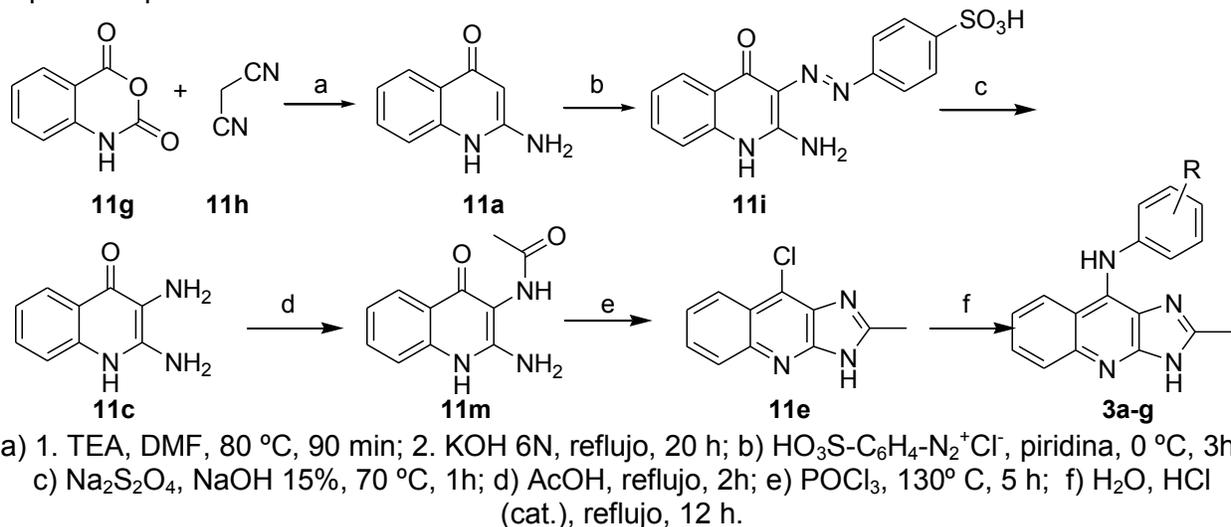
**Figura 47.** Rutas potenciales para la obtención de los compuestos finales **3a-g** a partir del compuesto **11c**.

El compuesto **11d** se trató de obtener haciéndolo reaccionar en AcOH a reflujo en presencia o ausencia de PPA sin embargo se obtuvo únicamente la amida **11m** como producto. El compuesto **11m** se colocó en ácido acético/PPA a reflujo para dar la imidazoquinolona **11d** en bajo rendimiento, recuperándose principalmente materia prima sin reaccionar, a pesar de la temperatura y tiempo de reacción (150° C por 15 h), por lo que se decidió optar por otra estrategia, en la cual se usaría un agente como el oxiclورو de fósforo<sup>145</sup> o el cloruro de tionilo<sup>175</sup> como agentes de ciclocondensación y de incorporación del átomo de cloro al núcleo tricíclico.

Se trató el compuesto **11m** con oxiclورو de fósforo, obteniéndose una masa resinosa, la cual después de tratarse con agua y ajustar a pH = 7 dio un producto café que se identificó como la 9-cloro-2-metilimidazo[4,5-*b*]quinolina **11e** en rendimiento moderado (72%). Este producto se hizo reaccionar con anilina en metanol con unas gotas de ácido clorhídrico,<sup>145</sup> sin embargo la reacción procedía lentamente, por lo que se optó por el uso de otros disolventes, encontrándose que la reacción procedía adecuadamente en agua con una cantidad catalítica de ácido clorhídrico concentrado como medio de reacción y después de ajustar a pH = 7-8 se pudo aislar el producto deseado fácilmente y eliminar la amina aromática excedente por lavados con acetato de etilo o éter isopropílico, en rendimientos moderados (alrededor del 70%). Siguiendo este procedimiento se sintetizaron los compuestos **3a-g** los cuales fueron identificados por sus datos espectroscópicos. En la Figura 48 se muestra la ruta de síntesis para los derivados de imidazo[4,5-*b*]quinolina obtenidos en este trabajo.

La ruta planteada y desarrollada es novedosa puesto que las síntesis previas sobre el núcleo de imidazo[4,5-*b*]quinolina se basaban en la construcción del anillo central, por lo que se tenía que tener como punto de partida derivados imidazólicos. En ninguno de los pasos se requiere emplear cromatografía en columna, los productos se obtienen con rendimientos de moderados a buenos (particularmente en los primeros pasos de la ruta sintética) y muchas de las reacciones no requieren el uso de disolventes orgánicos, lo cual ofrece una ventaja

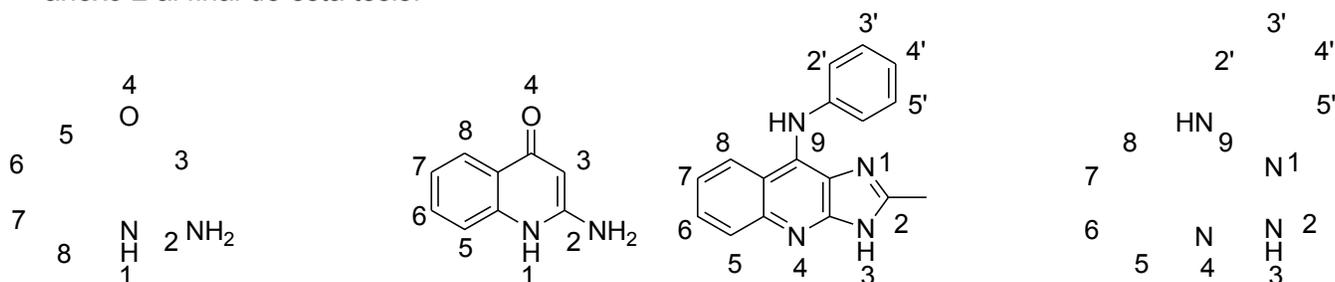
adicional. Además esta ruta ofrece la posibilidad de incorporar diferentes sustituyentes en las posiciones 2 y 9 del anillo tricíclico y permite, a partir del compuesto **11c**, la sustitución del sistema tricíclico en la posición 3. Como se comentó previamente, esta versatilidad es importante para estudios de relación estructura-actividad.



**Figura 48.** Ruta sintética para la preparación de los derivados de imidazo[4,5-*b*]quinolina anilino sustituidos.

### 5.1.2.2 Análisis espectroscópico

La elucidación estructural de todos los compuestos se realizó por el análisis de sus espectros de infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN <sup>1</sup>H) y de <sup>13</sup>C (RMN <sup>13</sup>C) en algunos casos y de espectrometría de masas (EM). En estos espectros se observó la presencia de patrones característicos que permitieron la identificación de los compuestos y asignación de las señales encontradas. Para un mejor análisis de los datos de este apartado, la numeración empleada es la descrita en la Figura 49 y al igual que para los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina, la asignación de las bandas y señales observadas se encuentra descrita para cada compuesto de estructura novedosa en la parte experimental por lo que aquí sólo se comentarán los aspectos más relevantes. Los espectros se encuentran en el anexo 2 al final de esta tesis.



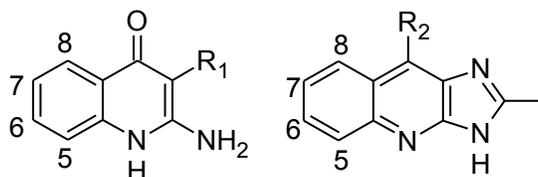
**Figura 49.** Numeración empleada en las asignaciones para los intermediarios y compuestos finales de la síntesis de derivados de imidazo[4,5-*b*]quinolina.

La técnica de IR resultó particularmente útil para la identificación preliminar y para verificar si las transformaciones se habían llevado a cabo. La ausencia de la banda que se asocia al grupo CN (alrededor de 2220 cm<sup>-1</sup>) sugirió que la hidrólisis y descarboxilación para dar el compuesto **11a** se había llevado a cabo. Un razonamiento similar con las bandas asociadas al grupo azo (1620 y 1510 cm<sup>-1</sup>), indicó que se había llevado a cabo la ruptura reductiva de este

grupo para obtener el compuesto **11c**. La formación del enlace amida en el compuesto **11m** es sugerida por la aparición de una banda en  $1718\text{ cm}^{-1}$ .

Las bandas entre  $1650$  y  $1690\text{ cm}^{-1}$  se asociaron al grupo carbonilo de la 4-quinolona en los espectros de los compuestos **11a**, **11c**, **11l** y **11m**, por lo que la ausencia de ésta sugirió la formación de los compuestos **11e** y **3a-g**. La incorporación de las aminas aromáticas en la posición 9 se sugiere por la aparición de bandas alrededor de  $3300\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$  que se pueden relacionar al enlace N-H, ya que esta banda también se ha observado en los derivados de 9-anilino-tiazolo[5,4-*b*]quinolina. En la Tabla 18 se muestra un resumen de estas observaciones.

**Tabla 18.** Bandas más relevantes en IR de los intermediarios en la síntesis de derivados de 9-anilinoimidazo[4,5-*b*]quinolina (frecuencia  $\nu$ , en  $\text{cm}^{-1}$ )



Compuesto	11a	11l	11c	11m	11e	3a
R <sub>1</sub>	H	N=N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -SO <sub>3</sub> H	NH <sub>2</sub>	NHAc	----	----
R <sub>2</sub>	---	-----	-----	-----	Cl	NHC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
ArN-H	3306	3278 3080	3342 3133	3208 3174	3414	3358 3090
C=O	1646	1682	1649	1672	-----	
Aromaticidad (-C=C-)	1596 1550 1509 1497	1620 1520 1497	1605 1565 1493	1629 1560 1497	1614 1584 1511	1617 1588 1513 1495
Otras bandas importantes		1475 (N=N) 1367 (-S=O)				

En cuanto a los espectros de RMN <sup>1</sup>H se encontraron diferencias en los patrones de señales de los intermediarios respecto a los patrones de señales de los compuestos tricíclicos finales. En particular se encontró que el patrón de señales de la zona aromática en los compuestos tipo quinolona (compuestos **11a**, **11c**, **11l** y **11m**) es distinto a los de los compuestos 9-cloro o 9-anilino sustituidos (compuestos **11e** y serie **3**).

Esto puede explicarse debido a que el anillo B en los compuestos tipo quinolona se encuentra preferentemente en forma ceto y no en su forma enol. En la literatura se han descritos ejemplos donde el patrón de las señales de derivados de quinolina o acridona se presentan en secuencia, de campo bajo a campo alto, los protones H-5, H-6, H-8 y H-7.<sup>178,179</sup> Este patrón se encontró en los espectros de los intermediarios **11a**, **11c**, **11l** y **11m** lo que sugiere que estos compuestos se hallan en su forma ceto en el disolvente donde se efectuó el experimento de RMN (DMSO). Por otra parte en los derivados de quinolina o acridina el orden de las señales (nuevamente de campo bajo a campo alto) es H-8, H-5, H-6 y H-7, como se observó también en los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina. Este patrón de señales se detectó en los espectros de los compuestos **11e** y **3a-g**, lo que confirmó que el átomo de cloro y el anillo de anilina se encuentran en la posición 9 del núcleo tricíclico. Para ejemplificar lo anterior, la Figura 50 muestra una ampliación de la zona aromática de los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los compuestos **11c** y **11e**.

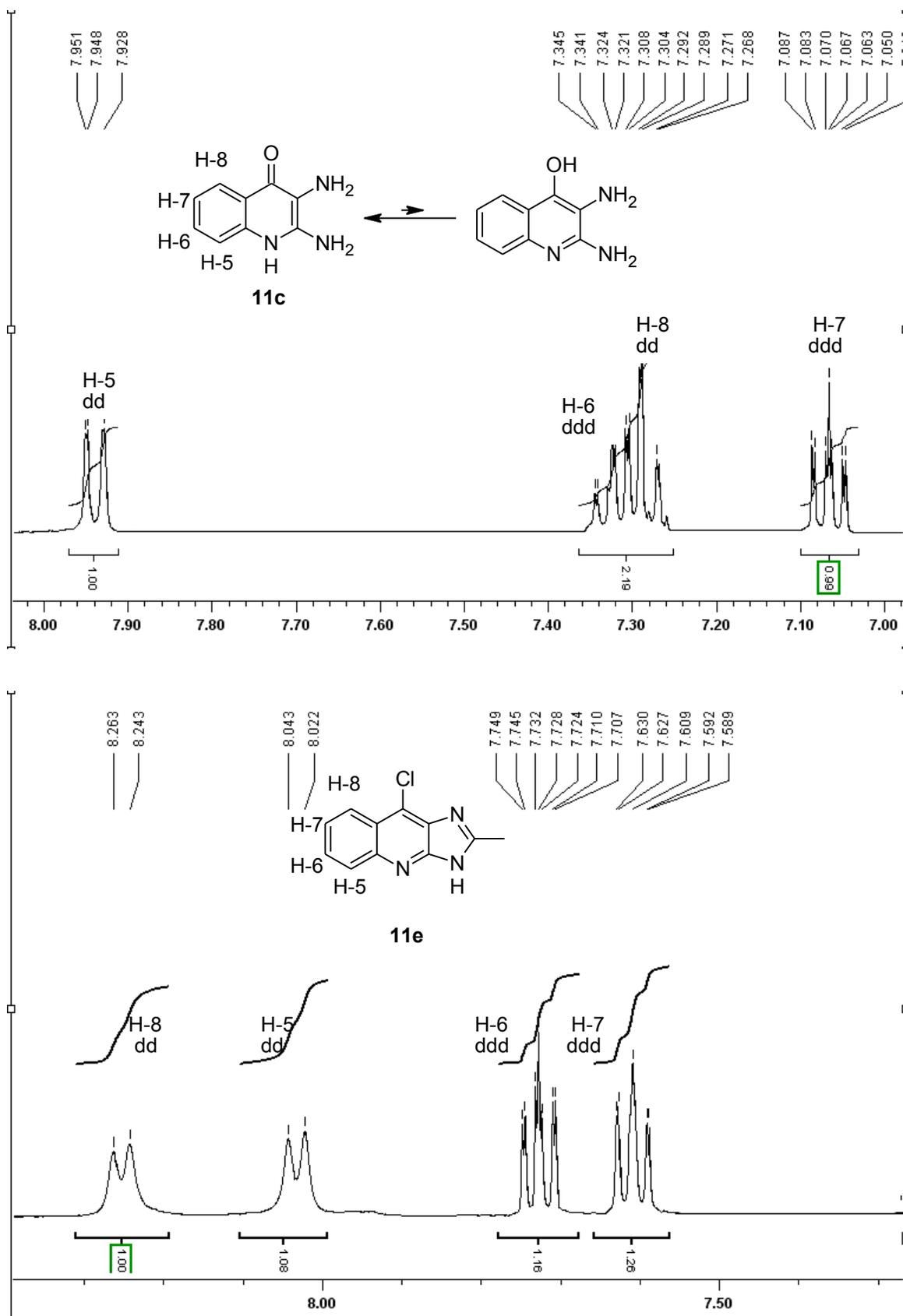
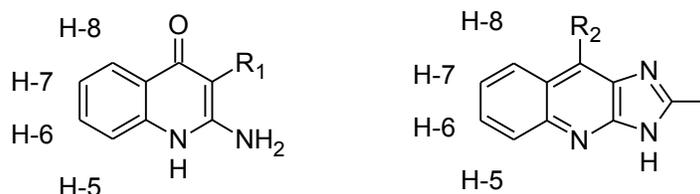


Figura 50. Ampliación de la zona aromática en los espectros de los compuestos 11c y 11e.

La Tabla 19 muestra un resumen de las señales de los intermediarios y el compuesto 11a como ejemplo representativo de los compuestos finales. De manera general puede señalarse que el desplazamiento químico de las señales del anillo bencenoide es entre 7.00 y 8.10 ppm, con el patrón de señales dependiendo si el compuesto puede adoptar la forma ceto o enol como se comentó anteriormente.

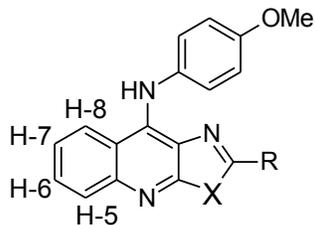
**Tabla 19.** Señales en RMN<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) de los intermediarios para la síntesis de los derivados de imidazo[4,5-*b*]quinolina y el compuesto **3a** (desplazamiento químico  $\delta$  en ppm, constantes de coplamamiento J, en Hz)



Compuesto	11a	11l	11c	11m	11e	3a
R <sub>1</sub>	H	N=N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -SO <sub>3</sub> H	NH <sub>2</sub>	NHAc	----	----
R <sub>2</sub>	---	----	----	----	Cl	NHAr
H-5	7.90 (dd, J=8.7, 1.5)	8.10 (d, J=8.4)	7.93 (dd J=8.4, 0.9)	7.93 (dd, J=8.7, 1.5)	8.03 (ddd J=8.4, 1.2)	7.90 (dd, J=8.4, 1.2)
H-6	7.42 (ddd, J=8.7, 6.9, 1.5)	7.58 (ddd, J=8.4, 6.9, 1.2)	7.32 (ddd, J=8.4, 6.8, 0.9)	7.51 (ddd, J=8.7, 6.9, 1.5)	7.72 (ddd, J=8.4, 6.8, 1.2)	7.59 (ddd, J=8.4, 6.9, 1.2)
H-7	7.09 (ddd, J=8.7, 6.9, 0.9)	7.23 (dd, J=8.4, 6.9, 1.2)	7.07 (ddd, J=8.4, 6.8, 0.9)	7.17 (ddd, J=8.7, 6.9, 1.2)	7.61 (ddd, J=8.4, 6.8, 1.2)	7.35 (ddd, J=8.4, 6.9, 1.2)
H-8	7.25 (d, J=8.7)	7.31 (d, J=8.4)	7.29 (dd J=8.1, 0.9)	7.34 (d, J=8.7)	8.25 (dd, J=8.4, 1.2)	8.17 (dd, J=8.4, 1.2)
Otras señales	5.25 (s, 1H) N=C $\underline{CH}$ 6.18 (s, intercambia D <sub>2</sub> O, 2H, NH <sub>2</sub> )	7.64 (sa, 4H) se asignaron al grupo fenilazo	5.99 (s, 2H intercambia D <sub>2</sub> O, NH <sub>2</sub> )	2.19 (s, 3H grupo acetilo)  6.48 (s, intercambia D <sub>2</sub> O, 2H) NH <sub>2</sub>  10.96 (sa, 1H) NHAc	2.62 (s, 3H, grupo metilo)	2.48 (s, 3H, grupo metilo) 6.83-7.18 (señales del anillo de anilina) 8.90 (s, 1H, intercambia D <sub>2</sub> O, NHAr) 12.56 (sa, 1H, intercambia D <sub>2</sub> O, NH del imidazol)

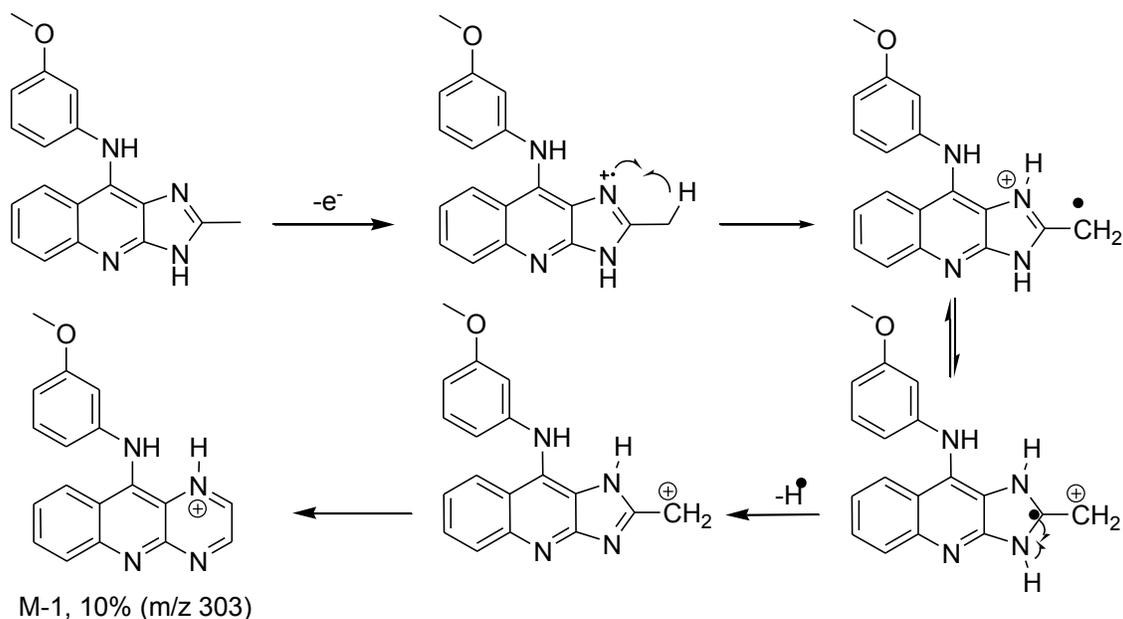
En la Tabla 20 se muestra una comparación entre los desplazamientos químicos de los compuestos tricíclicos 4'-metoxi sustituidos sintetizados en esta tesis. Los patrones encontrados son similares independientemente del sustituyente en el anillo de anilina. Con base en esto puede proponerse que la sustitución del átomo de azufre por un átomo de nitrógeno, ocasiona que el desplazamiento químico de las señales del sistema tricíclico sea inferior, lo que sugiere un efecto de protección, similar al que ocurre cuando se cambia el sustituyente de la posición 2 de un metilio a un grupo alquilamino en las tiazolo[5,4-*b*]quinolina. En los estudios de modelado molecular esto se verá reflejado en un incremento en el potencial molecular electrostático en los anillos bencenoide y central debido a un aumento en la densidad electrónica en estas zonas en las moléculas de imidazoquinolina.

**Tabla 20.** Comparativo entre el desplazamiento químico ( $\delta$ , ppm, en DMSO- $d_6$ ) de los protones del sistema tricíclico de los derivados 4'-OMe sustituidos



	8d	9d	1d	3d
<b>X</b>	S	S	S	N
<b>R</b>	SMe	SO <sub>2</sub> Me	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (NEt) <sub>2</sub>	Me
<b>-CH<sub>3</sub></b>	2.28	3.23	-----	2.44
<b>H-5</b>	7.95	7.97	7.79	7.83
<b>H-6</b>	7.90	7.94	7.52	7.55
<b>H-7</b>	7.64	7.65	7.36	7.28
<b>H-8</b>	8.66	8.65	8.06	8.18

En los espectros de masas, sólo se pudo verificar que el peso molecular corresponde al de las estructuras propuestas, ya que por la técnica en que se analizaron las muestras (FAB) no se aprecian claramente los patrones de fragmentación. Se logra apreciar solamente un fragmento M-1 con una abundancia relativa del 10%, el posible patrón de fragmentación se ilustra en la figura 51.

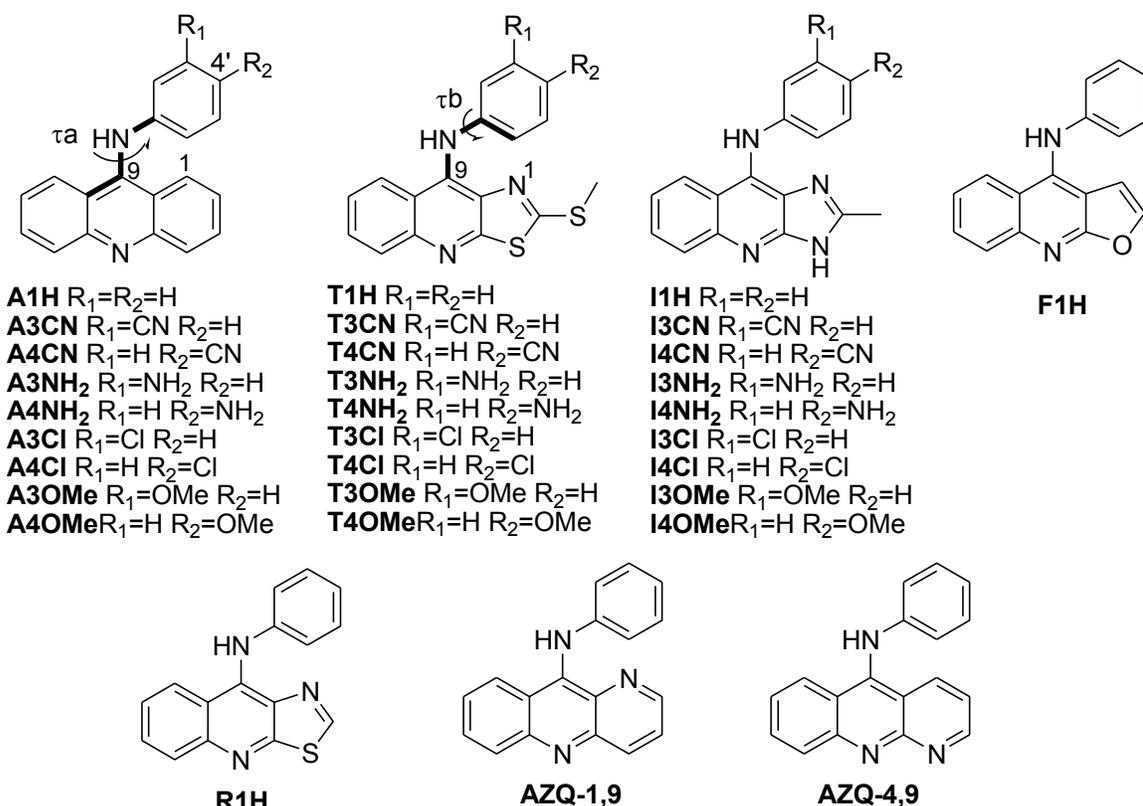


**Figura 51.** Posible patrón de fragmentación de los derivados de 9-anilinoimidazo[4,5-*b*]quinolina.

## 5.2 Modelado molecular de compuestos tricíclicos anilino sustituidos

Para explicar las diferencias en el cumplimiento de los requerimientos estructurales para la actividad citotóxica de las 9-anilinoacridinas y de el de sus isómeros, se decidió realizar estudios de modelado molecular de varios compuestos tricíclicos 9-anilino sustituidos tanto como moléculas aisladas por cálculos *ab initio* (HF 6-31 G\*) como en complejos de intercalación con el ADN usando el método y campo de fuerza AMBER, dado que las propiedades electrónicas y geométricas de los agentes intercalantes tienen un papel importante en su afinidad y selectividad por determinadas secuencias de ADN. Las moléculas analizadas, así como las claves con las que se designaron para facilitar el análisis de este apartado, se muestran en la Figura 52.

Adicionalmente se modelaron algunas moléculas que se han sintetizado en nuestro grupo de trabajo para el análisis de relación estructura-actividad citotóxica que se discute en el apartado 5.3. Estos datos se comentarán en el apartado 5.2.3.



**Figura 52.** Compuestos analizados por modelado molecular y descripción de los ángulos diedros  $\tau_a$  y  $\tau_b$ .

### 5.2.1 Modelado molecular de las moléculas aisladas

El protocolo empleado para el modelado molecular de los compuestos de la Figura 53, se describe con mayor detalle en la parte experimental. En resumen las moléculas se construyeron a partir de fragmentos convencionales implementados en el programa Spartan'08<sup>153</sup> y se minimizó su energía mediante el método de mecánica molecular MMFF94. A continuación se realizó el análisis conformacional de todos los compuestos variando los ángulos diedros  $\tau_a$  (formado por los átomos C8a-C9-N-C1') y  $\tau_b$  (formado por los átomos C9-N-C1'-C2') que se muestran en la Figura 53. El conformero de menor energía se seleccionó y se optimizó

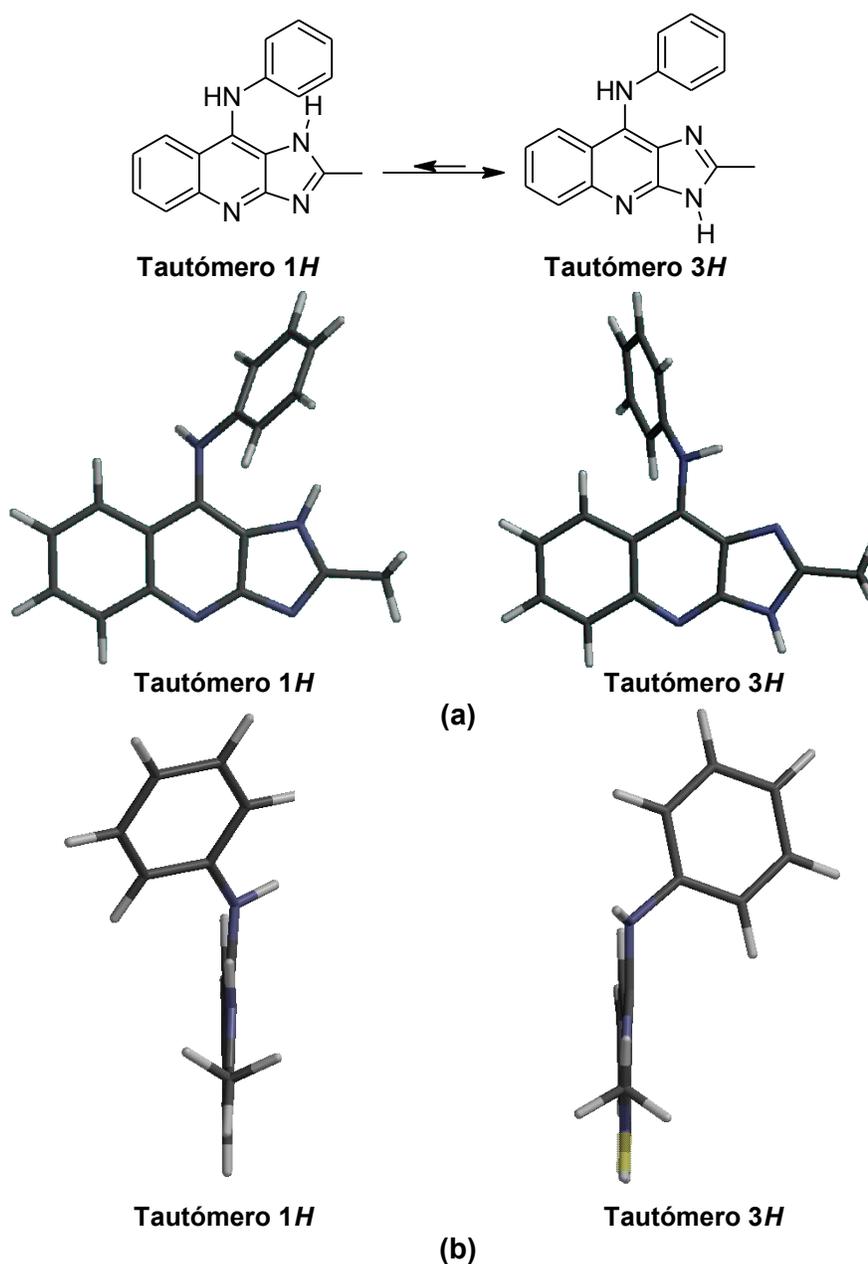
su geometría nuevamente con el método semiempírico PM3. Esta geometría inicial se optimizó nuevamente y se calcularon sus propiedades electrónicas con el método *ab initio* HF 6-31G\*. La Tabla 21 resume algunas de las propiedades calculadas.

**Tabla 21.** Algunos parámetros calculados para los compuestos de la Figura 52 mediante HF 6-31G\*

	$\tau_a$ (°)	$\tau_b$ (°)	E HOMO (eV)	E LUMO (eV)	Dipolo (Debye)	Log P (Ghose-Crippen)
A1H	-80.48	3.97	-7.4781	1.5047	2.2066	4.4912
A3CN	-84.39	7.19	-7.8013	1.2163	3.3251	4.5245
A4CN	-86.21	9.23	-7.8686	1.1610	5.2428	4.5245
A3NH2	-82.90	6.47	-7.4512	1.5460	3.1156	3.6884
A4NH2	-68.12	23.07	-7.1831	1.7102	3.3401	3.6884
A3CI	-83.29	6.52	-7.6629	1.3495	0.6773	5.0494
A4CI	-82.04	5.04	-7.6368	1.3554	2.2833	5.0494
A3OMe	-84.24	9.08	-7.5014	1.5136	2.7304	4.3648
A4OMe	-68.60	19.31	-7.2549	1.6637	3.9872	4.3648
T1H	-59.54	18.72	-7.7398	2.0506	3.7510	5.6132
T3CN	-63.38	12.67	-8.0843	1.7063	2.1396	5.6465
T4CN	-68.38	1.20	-8.1635	1.5951	4.0305	5.6465
T3NH2	-61.84	13.31	-7.7032	2.0693	4.5764	4.8104
T4NH2	-54.29	33.25	-7.5350	2.2152	4.8971	4.8104
T3CI	-62.65	13.37	-7.9358	1.8663	1.4274	6.1714
T4CI	-61.34	15.88	-7.9013	1.8833	2.2842	6.1714
T3OMe	-61.66	12.52	-7.7372	2.0456	4.5177	5.4868
T4OMe	-54.68	30.95	-7.6177	2.1751	5.2612	5.4868
I1H	-60.89	14.41	-7.4356	2.4239	2.4416	4.6940
I3CN	-63.95	9.95	-7.7912	2.0543	6.5274	4.7273
I4CN	-69.26	1.63	-7.8828	1.9570	7.4377	4.7273
I3NH2	-62.40	10.12	-7.3918	2.4582	3.5850	3.8912
I4NH2	-53.97	32.52	-7.2299	2.6145	1.2184	3.8912
I3CI	-63.46	10.13	-7.6390	2.2368	3.9599	5.2522
I4CI	-62.27	12.49	-7.6043	2.2530	4.0910	5.2522
I3OMe	-62.83	10.62	-7.4601	2.3999	3.0899	4.5676
I4OMe	-54.97	29.78	-7.3049	2.5707	2.2630	4.5676
F1H	-69.73	6.74	-7.7084	2.1345	3.8045	n.d.
R1H	-56.46	21.50	-7.7578	2.0155	2.3456	4.6628
AZQ-1,9	-52.64	23.10	-7.4121	1.4985	1.3549	3.5877
AZQ-4,9	-106.6	1.77	-7.7609	1.3178	4.7082	4.3616

Cabe mencionar que en el caso de la serie I en la cual pueden existir dos tautómeros (Figura 53), se eligió el tautómero 3H, al ser éste de menor energía que el tautómero 1H por 5 kcal/mol en los cálculos *ab initio*. Esto puede explicarse en parte por repulsión de tipo estérico entre el anillo de anilina y el protón de la posición 1, que ocasiona que este protón se encuentre fuera del plano del sistema tricíclico en el caso del tautómero 1H (una desviación de 8.1 ° en el

tautómero  $1H$  y una desviación de  $0.9^\circ$  en el caso del tautómero  $3H$ ) como puede apreciarse en la Figura 53.



**Figura 53.** Tautómeros en las 9-anilinoimidazo[4,5-*b*]quinolinas y geometría optimizada de los conformeros de mínima energía obtenida por cálculos *ab initio* (a) vistos desde la cara *Re* y (b) vistos desde la posición 2 del núcleo tricíclico.

A continuación se describen los aspectos analizados y las diferencias y similitudes encontradas entre los diferentes sistemas tricíclicos anilino sustituidos. En el anexo 4 aparecen las imágenes de todos los compuestos analizados, para fines explicativos en este apartado sólo se muestran algunos ejemplos representativos.

## a) Posición del anillo de anilina respecto al núcleo tricíclico

Es interesante notar las diferencias entre los valores para los ángulos diedros. En el caso de los derivados de acridina (serie A), el valor de  $\tau_a$  es alrededor de  $-80^\circ$ , mientras que en las series T e I los valores son alrededor de  $-65^\circ$ , excepto en los derivados 4' sustituidos con grupos electrodonadores donde el valor es alrededor de  $-54^\circ$  a  $-68^\circ$ , lo cual coincide con reportes en la literatura para los derivados de 9-anilinoacridina.<sup>180,181</sup> El valor de  $\tau_b$  en los compuestos sustituidos en las posiciones 3' es entre  $3-9^\circ$  para la serie A, lo que indica que el anillo de anilina está ortogonal al núcleo tricíclico, mientras que en las series T e I es entre  $10$  y  $18^\circ$ , lo cual coincide con los datos sugeridos en los experimentos NOESY, respecto a la relación oblicua que guarda el anillo de anilina respecto al núcleo tricíclico en estos derivados.<sup>145</sup>

Una propuesta inicial para explicar estas diferencias fue la existencia de una interacción de tipo electrónico entre el anillo de anilina con la densidad electrónica del átomo en la posición 1 del sistema tricíclico. Una primera aproximación fue tratar de hallar una correlación entre el parámetro electrónico de Hammet ( $\sigma$ ), como se muestra en la Figura 54. El haber encontrado una correlación relativamente buena (mejora al excluir los compuestos 4' sustituidos), sugiere que el valor del ángulo diedro  $\tau_a$  está influenciado por parámetros electrónicos.

Además se estudió el arreglo espacial de los compuestos de las series R, F y AZQ. Los valores de los ángulos  $\tau_a$  y  $\tau_b$  en los compuestos R1H y AZQ-1,9 fueron similares a los de los compuestos de las series T e I, estos compuestos tienen en común que presentan un átomo de nitrógeno en la posición 1 del núcleo tricíclico. Por otra parte, en los compuestos F1H y AZQ-4,9, los valores de  $\tau_a$  y  $\tau_b$  son más cercanos a los de la serie A, todos estos compuestos tienen un átomo de carbono en la posición 1, lo que sugiere que la densidad electrónica en esta posición juega un papel importante en el posicionamiento del anillo de anilina. Esto se verificó al encontrar una correlación entre el valor de la carga electrostática en el átomo de la posición 1 con el valor del ángulo  $\tau_a$  ( $r^2 = 0.9043$ , Tabla 20), lo cual soporta la idea de que la posición del anillo de anilina está influida por efectos electrónicos.

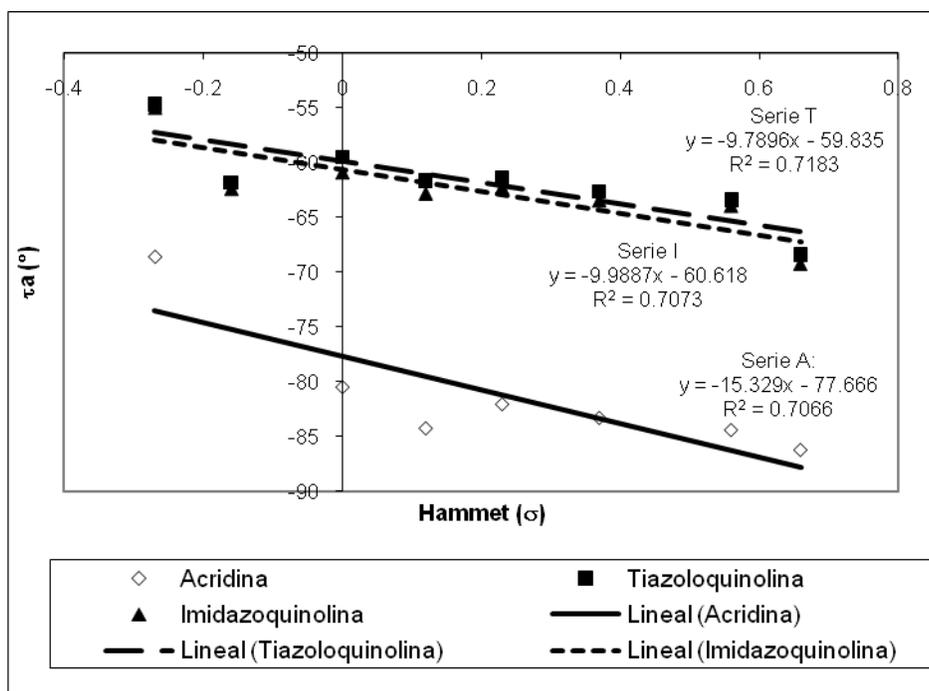
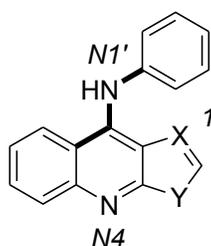


Figura 54. Correlación entre  $\tau_a$  y el parámetro electrónico de Hammet.

b) Cargas electrostáticas de los átomos de nitrógeno

Dado que los átomos de nitrógeno son reconocidos como importantes para la interacción de los ligantes con las biomoléculas, las cargas electrostáticas de estos átomos en el sistema tricíclico se calcularon y se muestran para los compuestos cabezas de serie en la Tabla 22. El valor de la carga electrostática en el átomo del anillo central (N4) es mayor en los compuestos R1H y T1H en comparación con el resto de los compuestos. Además, dado que se ha postulado que los grupos funcionales en el anillo de anilina podrían estar implicados en interacciones con la ADN topoisomerasa II, se decidió observar si había cambios en las cargas electrostáticas que fueran inducidos por el núcleo tricíclico; sin embargo, no se observaron diferencias significativas.

**Tabla 22.** Cargas electrostáticas en los átomos de nitrógeno de algunos de los compuestos analizados y su correlación con el ángulo diedro  $\tau_a$  (mostrado en negrita en la figura)



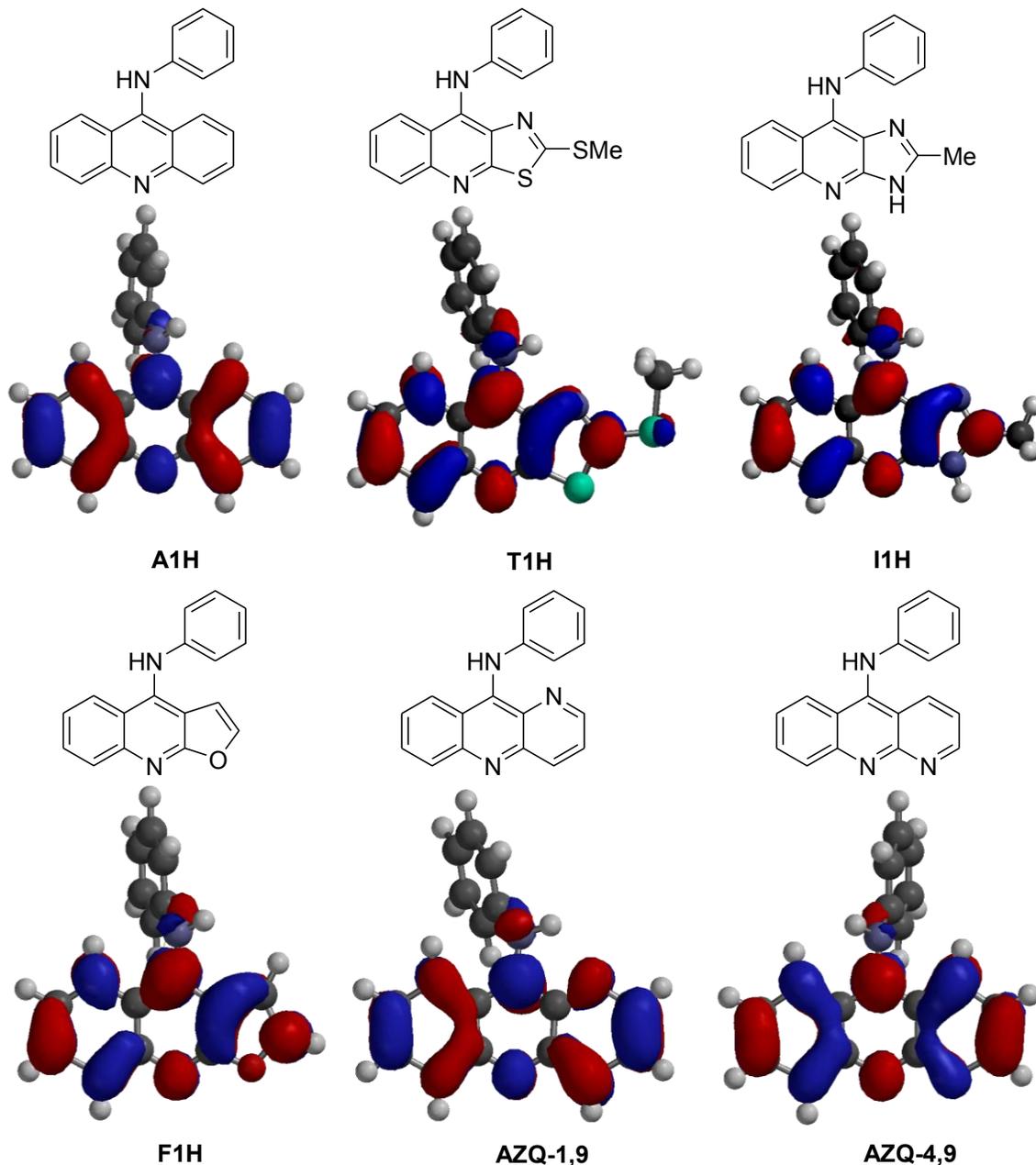
Compuesto	X	Y	Valor de carga electrostática			$\tau_a$ (°)
			1	N4	N1'	
A1H	CH=CH	CH	-0.133	-0.706	-0.756	-80.5
T1H	N	S	-0.363	-0.464	-0.641	-59.5
I1H	N	NH	-0.691	-0.653	-0.662	-60.9
F1H	CH	O	-0.372	-0.703	-0.757	-69.7
R1H	N	S	-0.562	-0.463	-0.6	-56.5
AZQ-1,9	N=CH	CH=CH	-0.598	-0.661	-0.559	-52.6
AZQ-4,9	CH=CH	CH=N	0.294	-0.757	-0.768	-107
$r^2$ con $\tau_a$			0.9043	0.4207	0.6672	

c) Diferencias en los valores energéticos del HOMO y el LUMO

Varias fuerzas se han postulado como estabilizantes del complejo de intercalación ligante-ADN; como fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, complejos de transferencia de carga e interacciones de orbitales frontera.<sup>37</sup> En particular se ha sugerido que esto se origina por la interacción del HOMO de los pares de bases con el LUMO del cromóforo. Por ello se decidió estudiar lo anterior a partir de los valores de energía y de la distribución de los orbitales HOMO y LUMO en los compuestos tricíclicos.

Como se esperaba, el valor de la energía del HOMO y el LUMO está relacionado con la naturaleza de los sustituyentes en el anillo de anilina, con valores menores en los compuestos con grupos electroattractores en las posiciones 3' o 4' como se aprecia en la Tabla 19. Los valores más bajos en la energía del LUMO se observan en las series A y AZQ, lo que sugiere que estos compuestos pueden unirse mejor al ADN por intercalación que el resto de los derivados analizados. Esto es al menos cierto para los derivados de la serie T, según se ha demostrado experimentalmente.<sup>145</sup>

La distribución de los orbitales LUMO se muestra en la Figura 55. En los compuestos de las series T, I, R y F se observa que esta distribución es asimétrica, mientras que en las series A y AZQ es simétrica. Si esta asimetría le confiere selectividades diferentes por ciertas secuencias de ADN es algo que no se sabe aún, pero es un factor que debiera considerarse en futuros estudios. La misma situación se observó en el caso de la distribución de los orbitales HOMO.

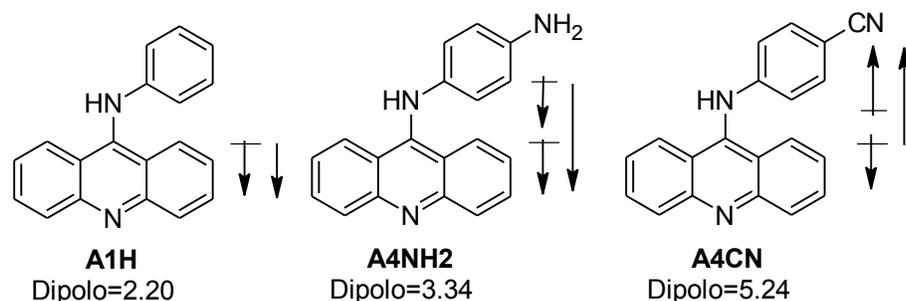


**Figura 55.** Distribución de los orbitales LUMO en algunos de los compuestos estudiados.

d) *Magnitud y dirección del momento dipolar*

Se ha reportado que el momento dipolar puede jugar un papel importante en la afinidad al ADN<sup>154</sup> o en la unión al ADN de algunos intercalantes,<sup>182</sup> por lo que la magnitud y orientación del momento dipolar también se consideraron en el presente estudio.

En los compuestos analizados cuando no había sustituyentes en el anillo de anilina o éstos eran electrodonadores, el momento dipolar se orientó hacia el núcleo tricíclico; mientras que cuando eran electroattractores el dipolo se orientó hacia el anillo de anilina. Esto puede racionalizarse con base a una “competencia” o “cooperatividad” entre los sustituyentes del anillo de anilina y el átomo de nitrógeno central del núcleo tricíclico como se ilustra en la Figura 56. Mientras que los grupos electrodonadores aumentan la densidad electrónica hacia el anillo de anilina, lo cual aumenta la densidad en la zona cercana al núcleo tricíclico, los grupos electroattractores la atraen hacia sí, lo cual disminuye la densidad electrónica en la zona cercana al núcleo tricíclico.



**Figura 56.** Posible explicación de las diferencias encontradas en la orientación del momento dipolar.

Por otra parte, la magnitud del momento dipolar es dependiente de la naturaleza de los sustituyentes y de su posición en el anillo de anilina. De manera general, la incorporación de un sustituyente electrodonador o electroattractor incrementó la magnitud del momento dipolar, especialmente si se incorporaban en la posición 4’.

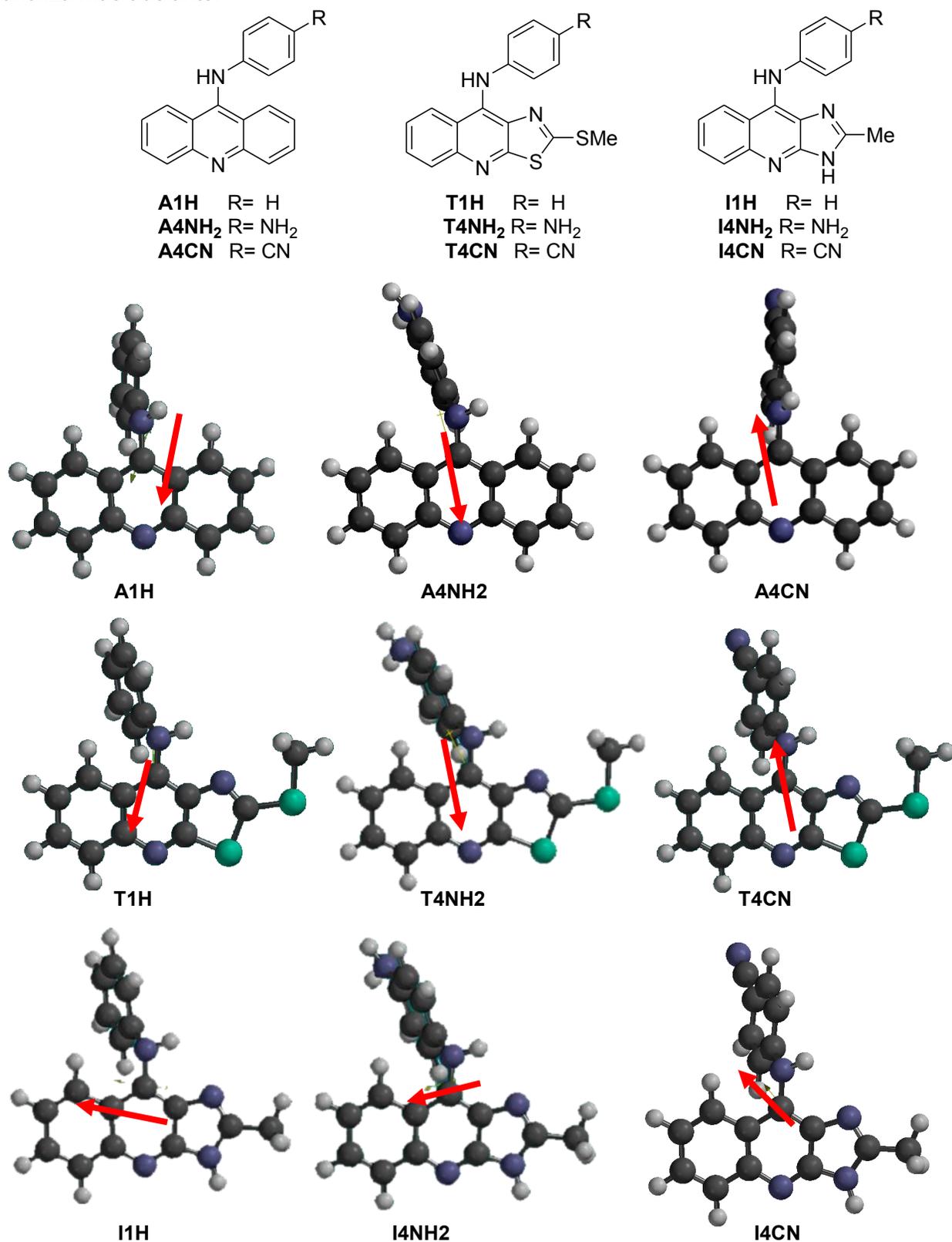
La estructura del núcleo tricíclico afecta también la magnitud y la dirección del momento dipolar. De manera general, en los derivados de imidazo[4,5-*b*]quinolina los valores del momento dipolar fueron mayores en comparación con el resto de los derivados tricíclicos. Además en los derivados de imidazoquinolina la orientación del momento dipolar fue distinta en comparación con los demás núcleos, mientras en el resto de los núcleos el momento dipolar se orientó hacia el anillo de anilina o el anillo central del núcleo tricíclico, en los derivados de imidazoquinolina se orientó hacia el anillo bencenoide del núcleo tricíclico como se observa en la Figura 57.

#### e) *Potencial molecular electrostático*

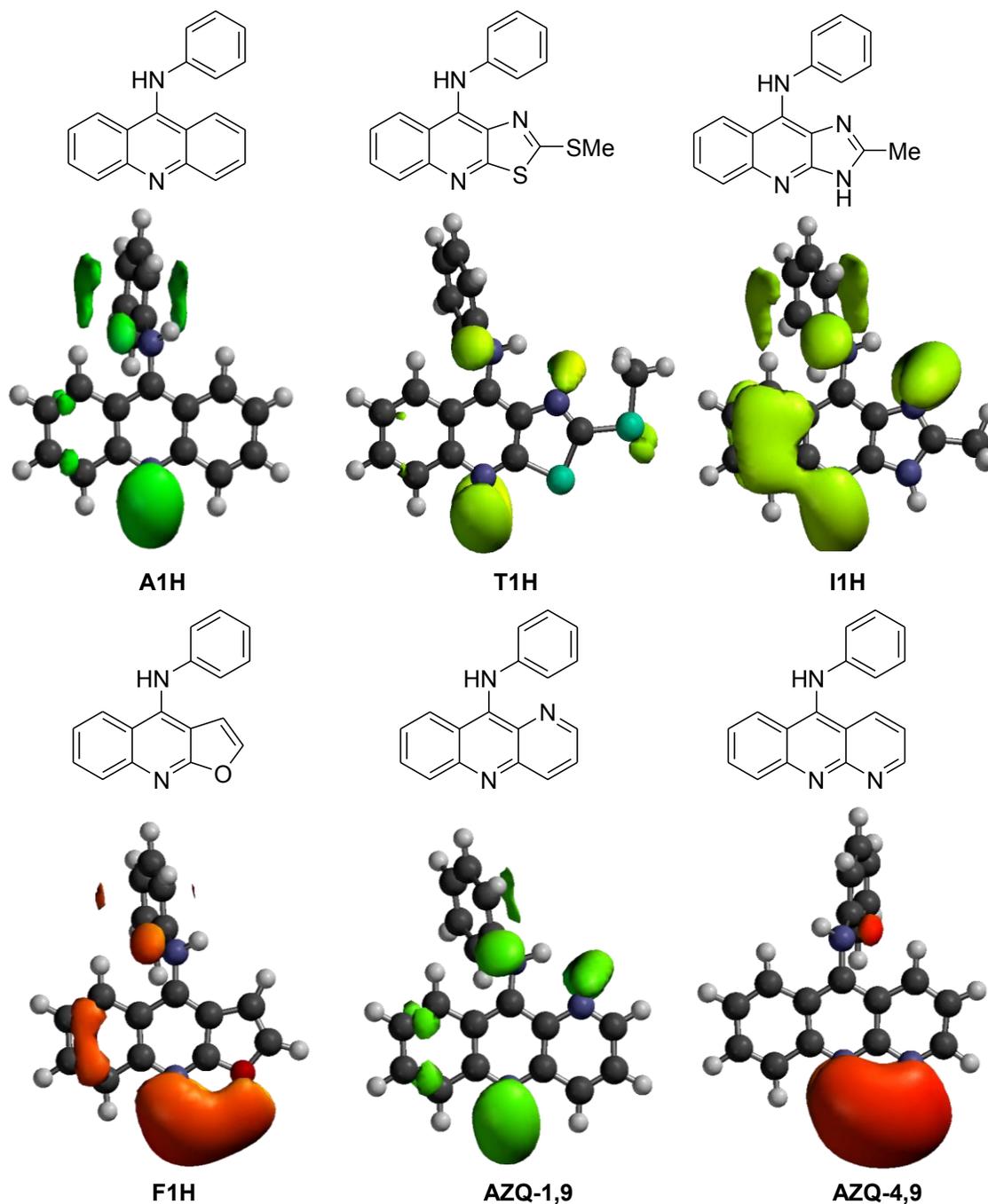
Estudios realizados por Medhi y colaboradores<sup>183</sup> sugieren que aunque la cadena lateral es importante para determinar la especificidad por cierto tipo de bases, variaciones en el potencial molecular electrostático (PME) pueden afectar la afinidad por ciertas secuencias y esto podría lograrse a través de modificaciones en la estructura del cromóforo. En particular, en este estudio, se señala que zonas de bajo PME podrían favorecer la intercalación. La Figura 58 muestra un mapa del PME para algunos compuestos a -20 Å/Bohr. Se observa que todos los compuestos muestran zonas con alto PME alrededor de los átomos de nitrógeno, los compuestos de las series A, I y F muestran zonas adicionales en el anillo bencenoide, siendo particularmente amplia en la serie I, lo cual podría repercutir en su capacidad intercalante de los compuestos de esta serie..

Estos resultados muestran que la sustitución isostérica del núcleo tricíclico en las 9-anilinoacridinas afecta las propiedades electrónicas y geométricas del compuesto resultante. Las diferencias más importantes son la posición del anillo de anilina respecto al núcleo tricíclico,

los valores energéticos del HOMO y LUMO y la dirección y magnitud del momento dipolar. Estas diferencias son relevantes para la actividad citotóxica de estos compuestos como se analiza más adelante.



**Figura 57.** Orientación del momento dipolar en algunos compuestos tricíclicos analizados.



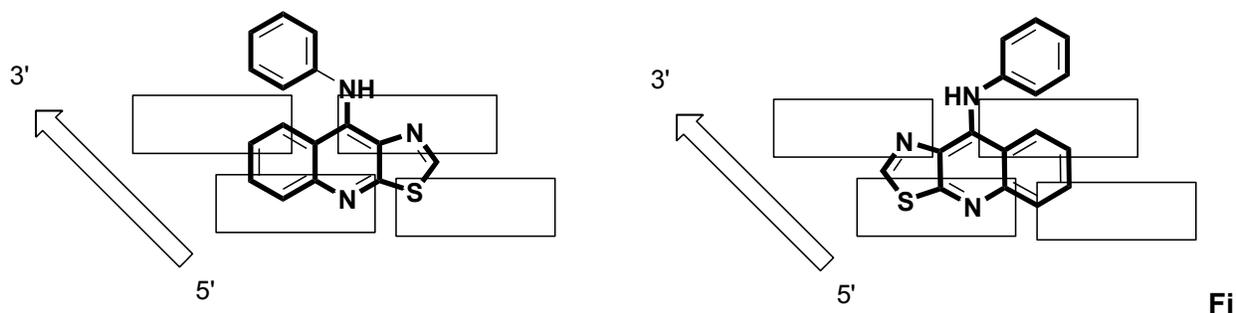
**Figura 58.** Mapas del PME a un isovalor de  $-20 \text{ \AA/Bohr}$  para algunos de los compuestos estudiados.

### 5.2.2 Modelado molecular de los complejos de intercalación con ADN

Para obtener mayor información sobre la influencia del tipo de sistema tricíclico en la geometría de los complejos de intercalación, se decidieron hacer estudios de *docking* sobre secuencias de ADN empleando el programa Hyperchem 7.0<sup>184</sup> usando el protocolo de AMBER.<sup>185</sup> Los detalles sobre la metodología empleada se exponen en el apartado de Parte experimental. Para este estudio solo se consideraron los compuestos de las series A, T, I, sustituidos con grupos ciano y amino, además de los compuestos R1H, F1H y AZQ-1,9.

Debido a que no existen, al momento de escribir este trabajo, estructuras cristalinas sobre complejos de intercalación de derivados tricíclicos anilino sustituidos, no se podía elegir una estructura inicial para hacer los estudios, por lo que ciertas consideraciones tuvieron que realizarse:

- La elección para la secuencia de estudio estuvo basada en reportes previos que sugieren que el uso de la secuencia 5'-CGCGCG CGCGCG-3', (dodecámero de Drew) al ser una secuencia bien estudiada.<sup>186</sup> El sitio GC fue donde se colocó el compuesto tricíclico. Los estudios preliminares se hicieron con los compuestos A1H, T1H e I1H
- Se realizaron estudios de docking manual, insertando el compuesto tricíclico entre el par de bases a estudiar. Posteriormente se minimizó la energía a 0.1 kcal/Åmol para crear el complejo de intercalación inicial.
- El anillo de anilina podía colocarse en el surco menor o en el surco mayor, pero estudios sobre la cinética de la formación del complejo de intercalación y estudios *in silico* previos realizados en derivados de la amsacrina sugieren que se coloca en el surco menor<sup>187</sup> por lo que inicialmente, se colocó el anillo de anilina en este surco. Posteriormente, se hicieron los estudios colocando el anillo de anilina en el surco mayor, pero los complejos resultantes eran mayores en energía a los complejos en los que el anillo de anilina se colocó en el surco menor.
- Debido a que los núcleos de las series T e I presentan caras heterotópicas, se modelaron tanto colocando la cara *Re* como con la cara *Si* del núcleo tricíclico en dirección 5'→3' (ver Figura 59). Con el campo de fuerza AMBER no se encontró diferencia entre una u otra orientación del núcleo tricíclico en el sitio de intercalación.



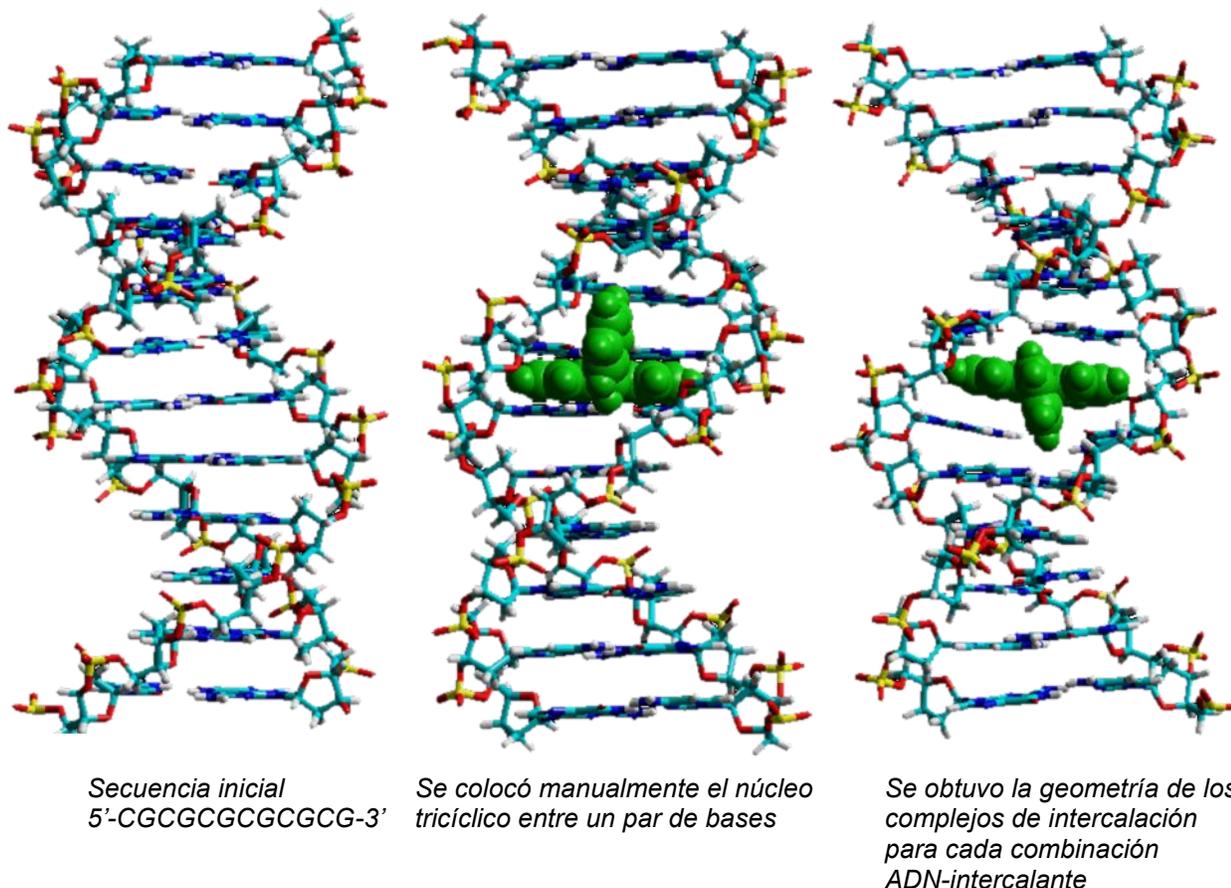
**gura 59.** Orientación de los núcleos tricíclicos con caras heterotópicas en el sitio de intercalación. Los cuadrados transparentes representan bases nitrogenadas y el anillo de anilina está colocado en el surco menor.

La Figura 60 resume estas consideraciones iniciales

Los estudios preelminares en la secuencia 5'-CGCGCG CGCGCG-3' mostraron que la inserción del compuesto tricíclico únicamente afecta a los tres pares de bases adyacentes en dirección 3' y a los tres pares de bases adyacentes en dirección 5', por lo que para fines de simplificación, solamente se ocuparon 6 pares de bases, quedando la secuencia empleada para todos los estudios 5'-CGX YCG -3', donde X Y es cualquier par razonable de bases (AA, AC, AG, AT, CC, CG, GC, TA, TC TG). En este caso se volvieron a hacer las consideraciones señaladas en los puntos anteriores obteniendo las mismas conclusiones que en los estudios preelminares.

Además, dado que no se conoce la posición del anillo de anilina dentro del sitio de intercalación, se realizó un análisis conformacional sobre los ángulos diedros  $\tau_a$  y  $\tau_b$  (ver la Figura 56 para la definición de estos ángulos) a fin de observar si existe alguna posición preferente donde se ubique el anillo de anilina dentro del surco menor. Se observó que el anillo de anilina puede moverse con cierta libertad dentro del sitio de intercalación, variando el ángulo  $\tau_a$  entre 70 y 120 °, tendiendo a estar más cerca de 90 ° en el caso de los derivados de acridina y más cercano a 70-80 ° en el caso de los demás derivados, lo que coincide con los resultados de los cálculos *ab initio*.

El complejo de menor energía resultado de este análisis conformacional fue el que se eligió para hacer el resto de los análisis.



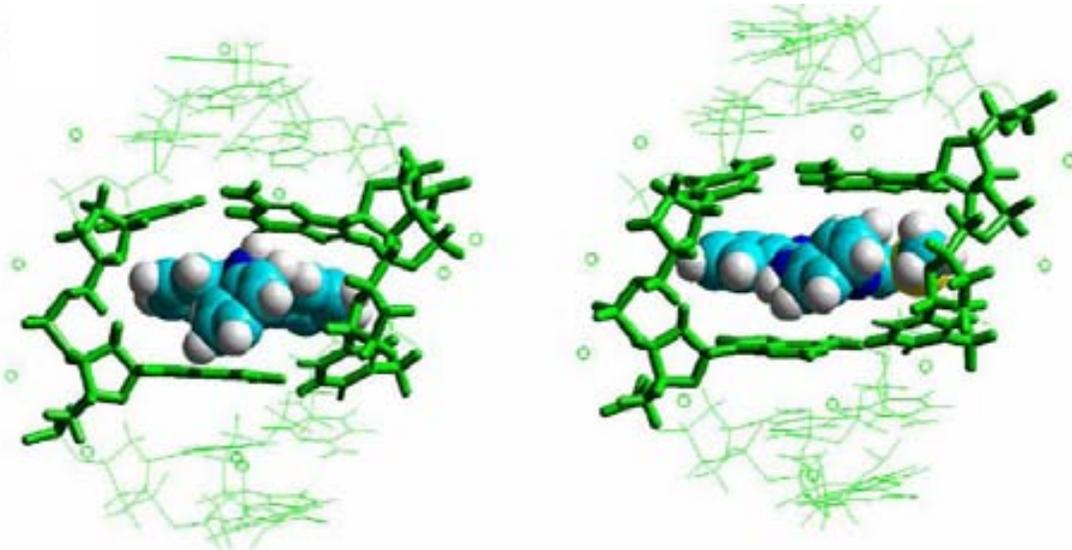
**Figura 60.** Estudios preliminares para obtener los modelos iniciales para hacer los modelos de intercalación

Los análisis que se realizaron a estos complejos incluyeron:

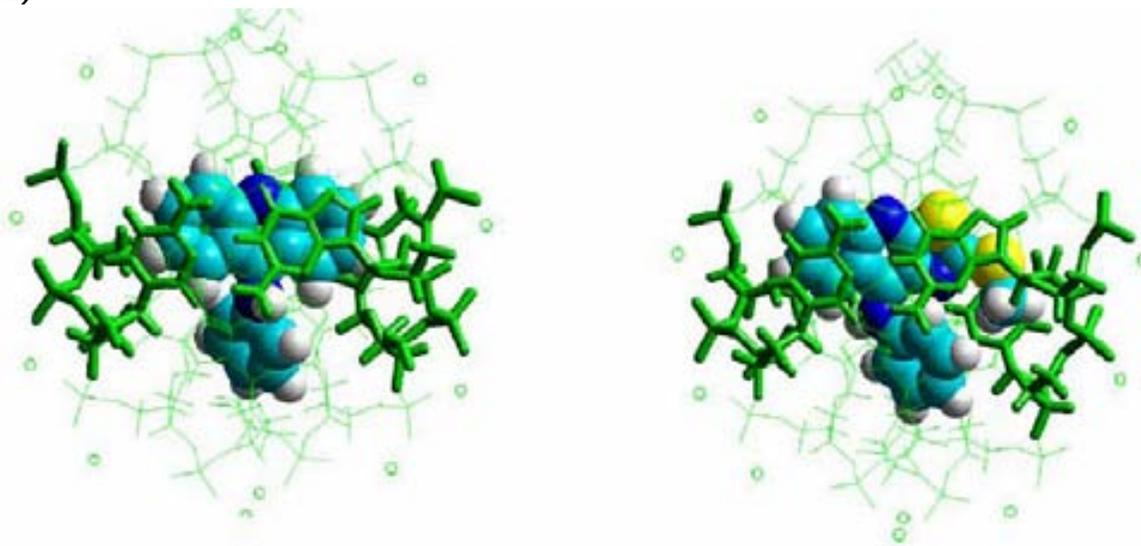
- *Posición del núcleo tricíclico dentro del sitio de intercalación.* En general se observó que la sustitución de núcleo tricíclico no afecta la posición que aguarda el sistema planar dentro del sitio de intercalación. Como ejemplo se muestra en la Figura 61 los complejos de intercalación de los compuestos A1H y T1H con la secuencia 5'-CGCGCG-3' en los que puede apreciarse que la disposición espacial de ambos núcleos tricíclicos en el sitio de intercalación es prácticamente la misma.
- *Obtención de la energía de formación aparente ( $E_a$ ).* Ésta se calculó mediante la fórmula  $E_a = E_{\text{complejo}} - (E_{\text{intercalante}} + E_{\text{secuencia ADN}})$ .<sup>188</sup> Estos cálculos se hicieron tanto con los

valores de energía obtenidos con el campo de fuerza AMBER ( $E_{\text{AMBER}}$ ) y con el campo de fuerza AM1 ( $E_{\text{AM1}}$ ), este campo de fuerza se eligió en base a estudios previos sobre purinas y pirimidinas que indican que existe buena correlación entre los resultados experimentales y los cálculos realizados con este campo de fuerza.<sup>189</sup> Para el caso de  $E_{\text{AM1}}$  sólo se consideraron los pares de bases adyacentes al compuesto tricíclico (como los pares de bases indicados en color verde en la Figura 61).

(A)



(B)



**Figura 61.** Complejos de intercalación de los compuestos A1H y T1H con la secuencia 5'-CGCGCG-3' vistos desde (A) el surco menor y (B) la posición 3'.

Las Tablas 23 y 24 muestran los valores de  $E_{\text{AMBER}}$  y de  $E_{\text{AM1}}$  obtenidos para cada combinación intercalante-ADN. Mientras que para los cálculos con AMBER la secuencia preferida por todos los compuestos fue la 5'-CGC GCG-3', en los cálculos con AM1 la secuencia preferida en general fue la secuencia 5'-CGA TCG-3' lo cual coincide con datos reportados previamente para derivados de acridina, particularmente de amsacrina.<sup>190</sup> Esto importante destacarlo ya que datos experimentales que sugieren que el sitio de ruptura inducido por derivados de acridina tiene preferentemente una adenina en posición 5'.<sup>61</sup>

**Tabla 23.** Energías de formación aparentes calculadas con el campo de fuerza AMBER ( $E_{\text{AMBER}}$ )

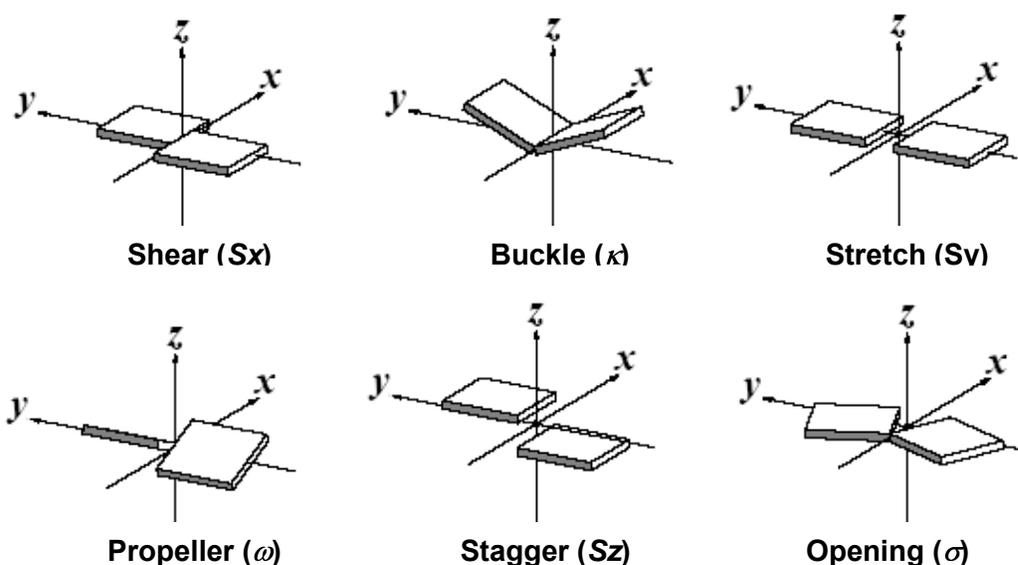
	AA	AC	AG	AT	CC	CG	GC	TA	TC	TG
<b>A1H</b>	-58.64	-58.73	-53.75	-62.79	-58.28	-65.80	-57.91	-58.36	-56.71	-56.05
<b>A3CN</b>	-60.22	-58.76	-66.33	-58.70	-54.07	-64.46	-54.35	-57.29	-56.50	-54.21
<b>A4CN</b>	-62.68	-53.34	-62.06	-58.41	-52.84	-65.68	-58.35	-55.94	-63.33	-52.67
<b>A3NH2</b>	-61.53	-54.69	-56.00	-59.22	-59.59	-64.58	-60.02	-60.02	-56.15	-55.15
<b>A4NH2</b>	-60.92	-52.57	-60.46	-58.52	-55.21	-65.26	-54.98	-64.74	-61.28	-54.42
<b>T1H</b>	-44.69	-55.36	-49.76	-57.01	-58.28	-66.52	-63.68	-59.18	-64.12	-58.02
<b>T3CN</b>	-46.19	-52.18	-46.11	-52.46	-60.11	-67.89	-61.73	-46.82	-58.38	-47.45
<b>T4CN</b>	-46.25	-54.41	-51.63	-58.58	-60.59	-67.72	-45.77	-56.16	-55.93	-47.72
<b>T3NH2</b>	-45.47	-54.19	-47.19	-54.32	-60.16	-67.07	-51.43	-42.88	-66.16	-52.87
<b>T4NH2</b>	-49.75	-56.93	-58.19	-49.95	-59.27	-68.01	-48.53	-54.08	-60.96	-60.67
<b>I1H</b>	-42.85	-64.56	-59.42	-65.23	-59.77	-69.52	-63.88	-65.34	-61.72	-57.63
<b>I3CN</b>	-45.10	-62.47	-53.51	-62.12	-62.31	-71.90	-62.14	-61.13	-59.98	-58.77
<b>I4CN</b>	-45.00	-60.39	-56.90	-61.72	-61.82	-71.30	-60.03	-61.34	-63.18	-57.07
<b>I3NH2</b>	-44.69	-61.44	-54.45	-60.80	-60.95	-71.25	-62.00	-65.07	-59.08	-58.78
<b>I4NH2</b>	-44.44	-55.97	-58.41	-63.09	-62.93	-71.25	-66.28	-63.74	-63.38	-56.39
<b>F1H</b>	-59.84	-61.46	-58.10	-63.34	-55.56	-63.76	-66.29	-58.68	-61.33	-57.58
<b>R1H</b>	-49.35	-60.13	-55.04	-60.95	-56.13	-66.98	-62.45	-59.90	-57.74	-55.64
<b>AZQ-4,9</b>	-63.00	-56.69	-53.08	-60.87	-62.12	-62.84	-55.76	-58.25	-56.54	-56.96

En los cálculos con AM1 se encontró que el cambio de núcleo tricíclico no cambió de manera sensible la selectividad por alguna u otra secuencia, en cambio si se observó que las cadenas laterales pueden afectar en gran medida la afinidad por el ADN, como está ejemplificado al comparar el compuesto T1H con el compuesto R1H, el primero con un grupo metilto en la posición 2, tiene una mayor energía de formación en comparación con el segundo que no tiene sustituyentes en esta posición. Por otra parte, los derivados de acridina y benzo[b]naftiridinas tendrían mayor afinidad que el resto de los compuestos tricíclicos, como fue sugerido en los cálculos *ab initio* del apartado anterior. Esto es cierto al menos para los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina que mostraron menor afinidad por el ADN que las acridinas en experimentos de desplazamiento de bromuro de etidio.<sup>144,145</sup>

Tabla 24. Energías de formación aparentes calculadas con el campo de fuerza AM1 ( $E_{AM1}$ )

	AA	AC	AG	AT	CC	CG	GC	TA	TC	TG
<b>A1H</b>	9.02	18.17	8.59	-5.25	6.16	18.63	3.27	0.97	2.88	11.97
<b>A3CN</b>	4.65	14.63	6.65	-4.39	4.76	23.87	-5.69	5.60	-2.46	14.06
<b>A4CN</b>	1.49	5.12	6.09	2.26	7.68	29.74	-0.56	6.78	5.35	11.03
<b>A3NH2</b>	3.14	0.50	8.71	-0.08	16.16	18.36	13.62	9.09	1.93	18.88
<b>A4NH2</b>	0.84	0.41	12.49	1.19	-3.75	16.73	1.37	1.79	2.76	12.86
<b>T1H</b>	11.26	15.93	29.63	2.23	8.21	18.35	15.81	15.24	-0.87	19.59
<b>T3CN</b>	5.36	4.39	39.39	-0.11	8.19	21.03	8.39	8.58	13.43	27.44
<b>T4CN</b>	11.33	8.63	26.05	-5.64	11.46	15.34	4.37	10.80	0.44	28.84
<b>T3NH2</b>	12.68	27.11	32.05	7.01	1.63	15.69	10.96	13.98	1.21	19.91
<b>T4NH2</b>	12.59	15.55	8.45	12.73	13.17	15.35	7.34	11.86	15.41	26.64
<b>I1H</b>	0.61	11.00	12.45	-0.98	5.58	11.07	15.81	2.85	4.96	12.70
<b>I3CN</b>	7.45	5.74	20.88	7.52	9.78	19.01	7.42	9.00	9.86	16.05
<b>I4CN</b>	9.29	17.53	14.63	5.37	6.82	25.45	20.57	15.56	0.32	10.43
<b>I3NH2</b>	5.89	5.40	10.89	0.05	4.05	14.21	8.80	1.70	12.12	13.82
<b>I4NH2</b>	17.47	6.51	26.87	-1.28	3.63	18.79	18.86	3.33	7.83	14.41
<b>F1H</b>	-0.39	7.91	8.14	-5.40	8.12	10.01	6.75	10.60	0.52	12.37
<b>R1H</b>	1.98	7.54	5.00	3.23	8.71	14.61	5.77	6.18	-2.20	6.69
<b>AZQ-4,9</b>	12.48	-0.49	1.02	-3.63	-7.29	12.11	1.27	7.45	-4.27	5.57

- *Propiedades geométricas del ADN.* Para la evaluación de estas propiedades se eligió el programa 3DNA<sup>191</sup>, el cual calcula algunos parámetros geométricos según la convención de Cambridge para la medición de parámetros helicoidales del ADN.<sup>192</sup> Estos parámetros se muestran en la Figura 62.

Figura 62. Parámetros helicoidales del ADN evaluados con el programa 3DNA.<sup>191</sup>

Se observó que dos factores afectaron principalmente estos parámetros, la naturaleza del núcleo tricíclico y la posición del sustituyente. La Tabla 25 muestra la variación promedio

respecto a la secuencia de ADN sin intercalante de los parámetros helicoidales, agrupados por el tipo de núcleo tricíclico y dependiendo si tenían sustituyentes en las posiciones 3' y 4'.

**Tabla 25.** Variación de los valores helicoidales en secuencias de ADN con compuesto tricíclico intercalado y sin intercalante. Valores promedio agrupados por tipo de intercalantes y por patrón de sustitución<sup>1</sup>

Agrupado por núcleo tricíclico				Agrupado por patrón de sustitución			
	Serie A	Serie T	Serie I		Sin sust.	Sust en 3'	Sust en 4'
$Sx_1$	-0.45	-0.13	-0.42	$Sx_1$	-0.29	-0.34	-0.28
$Sy_1$	0.23	0.27	0.17	$Sy_1$	0.16	0.23	0.21
$Sz_1$	0.94	0.46	0.71	$Sz_1$	0.82	0.72	0.66
$\kappa_1$	24.51	16.48	16.10	$\kappa_1$	21.28	18.49	18.91
$\omega_1$	15.98	21.39	20.85	$\omega_1$	18.31	19.31	19.02
$\sigma_1$	4.69	2.09	2.63	$\sigma_1$	2.44	1.61	1.22
$Sx_2$	0.42	0.87	0.50	$Sx_2$	0.58	0.50	0.60
$Sy_2$	0.33	0.50	0.37	$Sy_2$	0.27	0.41	0.38
$Sz_2$	0.77	0.80	0.70	$Sz_2$	0.82	0.74	0.74
$\kappa_2$	23.07	15.48	18.49	$\kappa_2$	21.23	19.10	18.65
$\omega_2$	17.82	23.09	21.57	$\omega_2$	18.38	20.64	21.02
$\sigma_2$	5.61	3.24	4.37	$\sigma_2$	3.34	5.38	3.95

<sup>1</sup>El subíndice 1 indica el par de bases en posición 5', el subíndice 2, el par en posición 3'. La variación de  $Sx$ ,  $Sy$  y  $Sz$  está en Å,  $\kappa$ ,  $\omega$  y  $\sigma$  en °

Al analizar por tipo de núcleo tricíclico se aprecia que para el núcleo de acridina, los valores de  $\kappa$  son ligeramente mayores, pero los valores de  $\omega$  son menores. Esto indica que en los derivados de acridina la apertura del sitio de intercalación es ligeramente mayor (por un mayor valor de  $\kappa$ ), pero ocasiona una menor distorsión entre los pares de bases (por un menor valor del valor de  $\omega$ ). Ambas observaciones sugieren que el acomodo de los derivados de acridina pudiera favorecer una mejor interacción de los pares de bases con el núcleo tricíclico y esto puede explicar, en parte, la mejor afinidad de los derivados de acridina respecto a los demás núcleos tricíclicos.

Por otra parte, al analizar el patrón de sustitución se observa de modo similar al análisis del párrafo anterior, que cuando no hay sustituyente en el anillo de anilina hay un mejor acomodo del compuesto tricíclico en el sitio de intercalación. Esto permitiría explicar porque en algunas ecuaciones de modelos QSAR sobre la actividad citotóxica o la capacidad intercalante de derivados de acridina, suele aparecer un componente estérico negativo.<sup>115</sup> Cabe señalar que la presencia de grupos electrodonadores o electroattractores es importante para la intercalación o para la actividad citotóxica ya que también hay factores electrónicos, no solamente estéricos o geométricos, que están relacionados.

De esta serie de estudios *in silico* sobre los complejos de intercalación de compuestos tricíclicos anilino sustituidos, puede concluirse que la sustitución isostérica del núcleo tricíclico en los derivados de 9-anilinoacridina, ocasiona una serie de cambios electrónicos y geométricos que inciden en su capacidad intercalante. Particularmente, se observa que aunque la posición del núcleo tricíclico dentro del sitio de intercalación no se afecta por el cambio del sistema policíclico, si se afecta la posición de las bases adyacentes al compuesto intercalado, lo cual puede afectar la interacción ADN-intercalante. La disposición espacial que tiene el compuesto policíclico dentro del sitio de intercalación es importante de considerar. Estudios recientes

señalan que no sólo la capacidad intercalante, sino la geometría del complejo son importantes para la actividad citotóxica en derivados de naftopirrol,<sup>193</sup> por lo que los complejos de intercalación de compuestos tricíclicos con diferentes secuencias de ADN, deberían de estudiarse para un mejor diseño de agentes intercalantes.

### 5.3 Modelado molecular de derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina empleados para el análisis de relación estructura-actividad

En los estudios de relación estructura-actividad es crucial contar con descriptores adecuados que, en principio, expresen propiedades electrónicas y geométricas de la molécula. Reportes en la literatura<sup>144,145</sup> señalaron que algunos parámetros como el momento dipolar y la energía del LUMO tenían influencia en la actividad citotóxica de algunos agentes intercalantes. Teniendo esto en cuenta, se decidieron calcular los ángulos diedros  $\tau_a$  y  $\tau_b$ , los parámetros de la energía del HOMO y LUMO, el momento dipolar y el logP, de algunos compuestos que se han sintetizado en nuestro grupo de trabajo. Estos compuestos incluyen derivados 2-metiltio sustituidos (**2a-c** y **8a-m**), 7-fluor-2-metiltio sustituidos (**12a-e**), 2-azaciclo saturado sustituidos (**13a-f**) y 2-alkilamino sustituidos (**1a-g** compuestos etilendiaminosustituidos y **14a-e** propilendiamino sustituidos). Los cálculos se realizaron del mismo modo que para los compuestos del apartado 5.2.1. Los datos calculados aparecen en la Tabla 26.

Al analizar estos datos se encontró que la incorporación de un átomo de flúor en la posición 7 (compuestos **12a-e**) ocasiona pocos cambios en los ángulos diedros  $\tau_a$  y  $\tau_b$ , pero si afecta parámetros electrónicos, hay una disminución de los valores de energía del HOMO y el LUMO, lo que hizo pensar que podrían tener mejores propiedades intercalantes que los compuestos sin flúor en la posición 7 (compuestos **2a-c** y **8a-m**). Después se demostró experimentalmente que no eran mejores intercalantes,<sup>152</sup> una posible explicación se discute más adelante.

Otro parámetro que se modificó fue la magnitud del momento dipolar, pues se disminuyó ligeramente y la orientación del momento dipolar que cambio de orientarse al anillo central, a orientarse hacia el anillo bencenoide (ver Figura 63). Estos cambios, se atribuyen a la naturaleza electronegativa del átomo de flúor. Más aún, al analizar los mapas del potencial molecular electrostático (Figura 64), puede notarse una zona de alto potencial alrededor de este átomo.

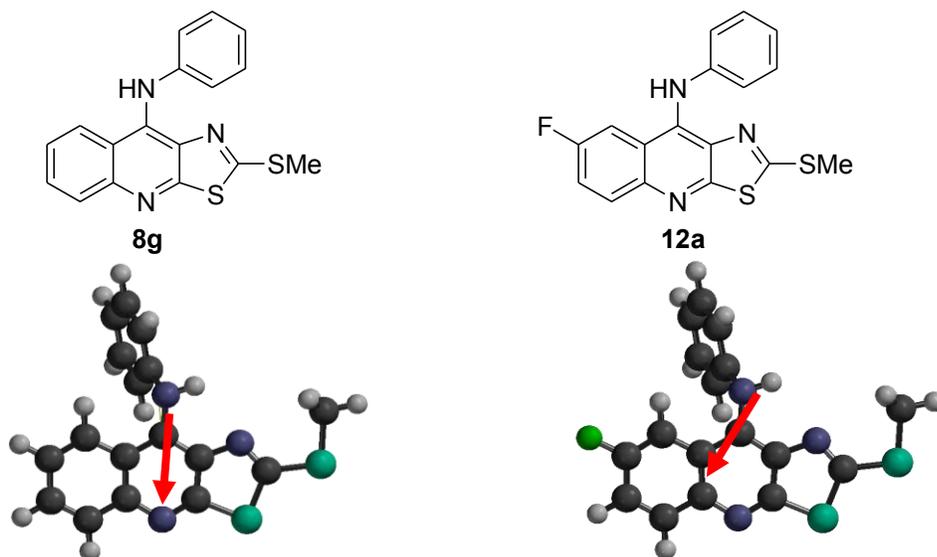
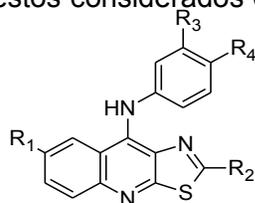
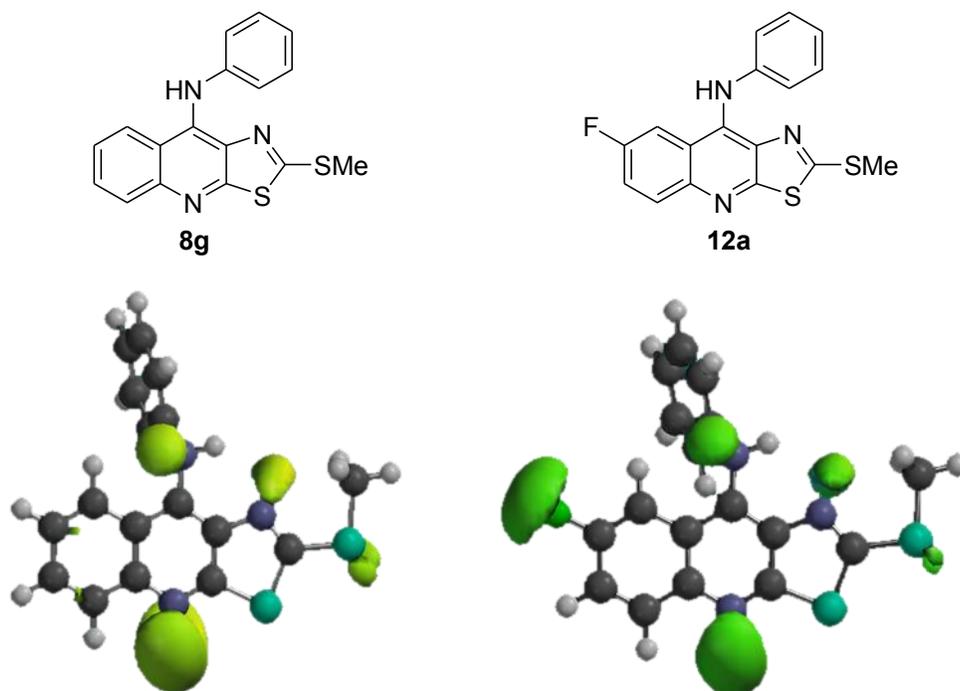


Figura 63. Orientación del momento dipolar en derivados 2-metiltio sustituidos

**Tabla 26.** Datos de los compuestos considerados dentro del análisis de relación estructura-actividad.

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	$\tau_a$ (°)	$\tau_b$ (°)	E HOMO (eV)	E LUMO (eV)	Dipolo (Debye)	Log P
1a	H	E	CN	H	-70.65	1.50	-7.7104	2.1397	5.6062	5.38
1b	H	E	Cl	H	-69.57	3.66	-7.5732	2.3277	4.5150	5.90
1c	H	E	OMe	H	-68.95	1.63	-7.3893	2.4934	4.9274	4.93
1d	H	E	H	CN	-74.70	6.67	-7.7847	2.0948	7.1802	5.38
1e	H	E	H	Cl	-68.27	6.09	-7.5426	2.3389	5.1324	5.90
1f	H	E	H	OMe	-59.79	26.88	-7.2592	2.6343	5.2814	5.38
1h	H	E	H	H	-65.72	10.17	-7.3788	2.5031	4.8010	5.35
2a	H	SMe	COMe	H	-61.35	13.93	-7.8532	1.8955	3.7300	4.92
2b	H	SMe	CO <sub>2</sub> Et	H	-60.47	16.2	-7.8177	1.9474	4.0548	5.77
2c	H	SMe	OXM <sup>1</sup>	H	-60.03	16.93	-7.7573	2.0148	3.4994	5.31
8a	H	SMe	CN	H	-63.38	12.67	-8.0843	1.7063	2.1396	5.64
8b	H	SMe	OMe	H	-61.66	12.52	-7.7372	2.0456	4.5177	5.48
8c	H	SMe	Cl	H	-62.65	13.37	-7.9358	1.8663	1.4274	6.17
8d	H	SMe	H	CN	-68.38	1.20	-8.1635	1.5951	4.0305	5.64
8e	H	SMe	H	OMe	-54.68	30.95	-7.6177	2.1751	5.2612	5.48
8f	H	SMe	H	Cl	-61.34	15.88	-7.9013	1.8833	2.2842	6.17
8g	H	SMe	H	H	-59.5	18.7	-7.7398	2.0506	3.7510	5.61
8h	H	SMe	NMe	H	-61.63	14.01	-7.6415	2.0985	5.0154	5.11
8i	H	SMe	(CO)E	H	-63.04	12.64	-7.9398	1.8616	2.8463	5.43
8j	H	SMe	CF <sub>3</sub>	H	-65.51	16.53	-8.0620	1.7566	2.3354	6.53
8k	H	SMe	OH	H	-61.78	12.66	-7.8583	1.9304	2.8150	5.22
8l	H	SMe	NH <sub>2</sub>	H	-61.84	13.31	-7.7032	2.0693	4.5764	4.81
8m	H	SMe	NHAc	H	-63.07	13.96	-7.9496	1.8511	2.4226	4.52
12a	F	SMe	H	H	-60.2	19.8	-7.8977	1.8505	3.2976	5.77
12b	F	SMe	CN	H	-65.2	-153.4	-8.1300	1.6774	5.4350	5.80
12c	F	SMe	OMe	H	-61.4	-158.8	-7.9335	1.7937	2.8705	5.64
12d	F	SMe	H	CN	-66.6	-331.1	-8.1885	1.5933	4.9083	5.80
12e	F	SMe	H	OMe	-57.7	14.3	-7.7898	1.8852	3.0288	5.64
13a	H	PIP	*	*	n.a	n.a	-7.7949	2.3090	3.2054	6.19
13b	H	MPZ	*	*	n.a	n.a	-7.8246	2.2828	2.9568	5.21
13c	H	MOR	*	*	n.a	n.a	-7.9184	2.1998	1.4715	5.05
13d	H	PIP	H	H	-65.2	13.0	-7.4039	2.4272	3.9138	5.79
13e	H	MPZ	H	H	-64.4	12.0	-7.4179	2.4077	3.4982	4.81
13f	H	MOR	H	H	-63.4	11.0	-7.4832	2.3347	2.2020	4.66
14a	H	P	H	H	-66.1	9.77	-7.3152	2.5554	5.1565	5.63
14b	H	P	CN	H	-72.5	14.0	-7.6336	2.3136	5.9075	5.66
14c	H	P	Cl	H	-70.22	1.87	-7.5078	2.3736	5.2654	6.18
14d	H	P	H	CN	-70.4	8.68	-7.6297	2.2794	8.1447	5.66
14e	H	P	H	Cl	-69.6	10.2	-7.4784	2.3997	5.6151	6.18

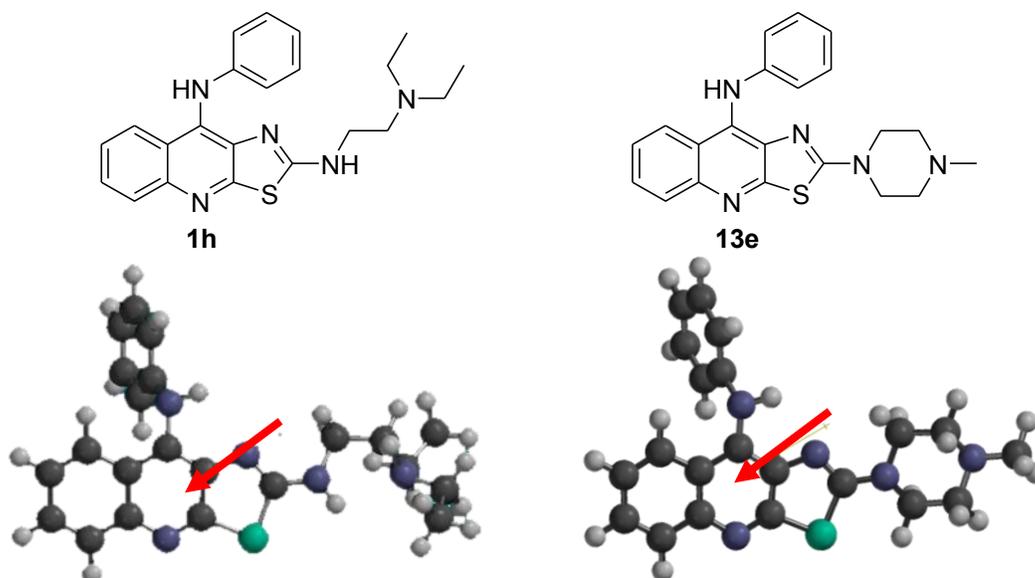
<sup>1</sup> OXM= C(NO<sub>2</sub>)Me (\*)- Cl en la posición 9.



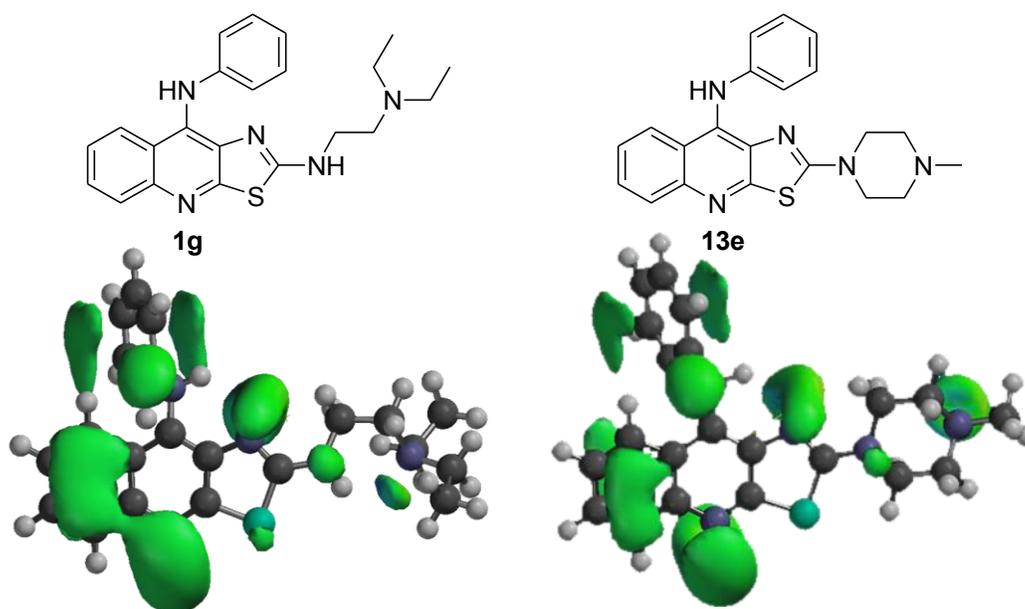
**Figura 64.** Mapas del PME a un isovalor de  $-20 \text{ \AA/Bohr}$  en derivados 2-metilto sustituidos.

La incorporación de aminas alifáticas cíclicas o abiertas en la posición 2 por otra parte ocasionó ligeros cambios en la geometría y en las propiedades electrónicas del núcleo tricíclico, debidos a la naturaleza electrodonadora del grupo amino. El valor del ángulo diedro  $\tau_a$  se ubicó alrededor de  $-70^\circ$ , indicando que se encuentra también en posición oblicua respecto al núcleo tricíclico, aunque se esperaban valores más cercanos a  $-60^\circ$ . Esto puede explicarse por una mayor densidad electrónica en el anillo bencenoide, lo que ocasiona repulsión en el anillo de anilina, ubicándolo más cercano a  $-90^\circ$  en comparación con los derivados que no tienen cadenas alquilamínicas. Esto se comprueba de manera experimental en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  puesto que el desplazamiento químico de los protones del anillo bencenoide aparece a campo más alto en los compuestos 2-alquilamino sustituidos en comparación con los 2-metilto sustituidos, como se mencionó en el análisis espectroscópico de los derivados **1a-f**.

En cuanto a las propiedades electrónicas se aprecia un incremento en los valores energéticos del LUMO y el HOMO, ocasionado por el aumento de la densidad electrónica en el sistema tricíclico, lo cual también ocasiona que la orientación en el momento dipolar cambie hacia el anillo bencenoide (Figura 65). Además se observa un aumento en el potencial molecular electrostático en este anillo (Figura 66). Este patrón es similar a los derivados de imidazo[4,5-*b*]quinolina, lo que sugería que estos compuestos podrían tener actividades citotóxicas similares. Sin embargo, esto no ocurrió como se discute en el siguiente apartado.



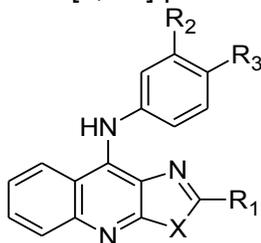
**Figura 65.** Orientación del momento dipolar en derivados 2.alquilaminos y 2-azaciclo sustituidos.



**Figura 66.** Mapas del PME a un isovalor de  $-20 \text{ \AA/Bohr}$  en derivados en derivados 2.alquilaminos y 2-azaciclo sustituidos.

## 5.4 Análisis estructura-actividad citotóxica

La Tabla 27 muestra los resultados de actividad citotóxica en algunas líneas celulares por el método  $\text{MTT}^{193}$  de los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina e imidazo[4,5-*b*]quinolina sintetizados como parte de esta tesis. Estas determinaciones fueron realizadas por el M. en C. José Solano Becerra (Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM). Las líneas celulares fueron de cérvix (HeLa), colon (SW480 y SW620) y leucemia mielógena (K-562).

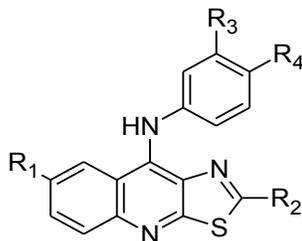
**Tabla 27.** Resultados de actividad citotóxica ( $IC_{50}$ ,  $\mu M$ ) de los derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina e imidazo[4,5-*b*]quinolina sintetizados en esta tesis

	X	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	HeLa	SW480	SW620	K-562
<b>1a</b>	S	E	CN	H	13.33	13.10	14.62	12.48
<b>1b</b>	S	E	Cl	H	9.12	14.33	17.78	12.19
<b>1c</b>	S	E	OMe	H	19.2	11.5	20.0	23.5
<b>1d</b>	S	E	H	CN	15.18	14.18	16.49	8.36
<b>1e</b>	S	E	H	Cl	10.16	12.56	12.20	7.26
<b>1f</b>	S	E	H	OMe	13.60	12.04	16.38	10.87
<b>2a</b>	S	SMe	COMe	H	>80	>80	>80	>80
<b>2b</b>	S	SMe	CO <sub>2</sub> Et	H	>80	>80	>80	>80
<b>2c</b>	S	SMe	C(NO <sub>2</sub> )Me	H	34.2	37.3	39.4	32.8
<b>3a</b>	NH	Me	H	H	>80	>80	>80	>80
<b>3b</b>	NH	Me	CN	H	>80	>80	>80	>80
<b>3c</b>	NH	Me	Cl	H	>80	>80	>80	>80
<b>3d</b>	NH	Me	OMe	H	>80	>80	>80	>80
<b>3e</b>	NH	Me	H	CN	>80	>80	>80	>80
<b>3f</b>	NH	Me	H	Cl	>80	>80	>80	>80
<b>3g</b>	NH	Me	H	OMe	>80	>80	>80	>80

E = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NEt<sub>2</sub>

En esta tabla se observa que solamente los derivados sustituidos con una cadena alquildiamínica (compuestos **1a-f**) tienen buena actividad citotóxica y el derivado **2c** tiene actividad moderada. Los derivados de imidazo[4,5-*b*]quinolina no mostraron actividad citotóxica.

Para el análisis de relación estructura-actividad, se incluyeron los datos de actividad citotóxica de algunos derivados que han sido sintetizados en el grupo de trabajo y que han sido reportados en la literatura y se muestran en la Tabla 28. Los descriptores empleados son los que se calcularon en el apartado 5.3 y se encuentran en la Tabla 26.

**Tabla 28.** Datos de actividad citotóxica (IC<sub>50</sub>, μM) de derivados de tiazolo[5,4-*b*]quinolina sintetizados dentro del grupo de trabajo

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	HeLa	SW480	SW620	K-562
8a <sup>1</sup>	H	SMe	H	H	>80	>80	>80	>80
8b <sup>1</sup>	H	SMe	CN	H	7.75	28.68	43.75	8.01
8c <sup>1</sup>	H	SMe	OMe	H	25.34	66.65	26.58	22.17
8d <sup>1</sup>	H	SMe	Cl	H	69.37	>80	>80	80.26
8e <sup>1</sup>	H	SMe	H	CN	>80	>80	>80	>80
8f <sup>1</sup>	H	SMe	H	OMe	>80	>80	>80	77.2
8g <sup>1</sup>	H	SMe	H	Cl	>80	>80	>80	79.45
8h <sup>1</sup>	H	SMe	NMe	H	46.22	>80	>80	46.85
8i <sup>1</sup>	H	SMe	(CO)E	H	21.69	13.6	19.72	12.54
8j <sup>1</sup>	H	SMe	CF <sub>3</sub>	H	43.34	65.13	62.28	67.06
8k <sup>1</sup>	H	SMe	OH	H	>80	>80	>80	>80
8l <sup>1</sup>	H	SMe	NH <sub>2</sub>	H	>80	>80	>80	>80
8m <sup>1</sup>	H	SMe	NHAc	H	>80	>80	>80	>80
12a <sup>2</sup>	F	SMe	H	H	>80	>80	>80	>80
12b <sup>2</sup>	F	SMe	CN	H	>80	>80	>80	55.36
12c <sup>2</sup>	F	SMe	OMe	H	15.8	13.7	12.2	NA
12d <sup>2</sup>	F	SMe	H	CN	>80	>80	>80	NA
12e <sup>2</sup>	F	SMe	H	OMe	>80	>80	>80	54.91
13a <sup>3</sup>	H	PIP	*	*	>80	>80	>80	>80
13b <sup>3</sup>	H	MPZ	*	*	>80	>80	>80	>80
13c <sup>3</sup>	H	MOR	*	*	>80	>80	>80	>80
13d <sup>3</sup>	H	PIP	H	H	>80	>80	>80	>80
13e <sup>3</sup>	H	MPZ	H	H	60.7	41.8	>80	73.01
13f <sup>3</sup>	H	MOR	H	H	>80	>80	>80	>80
14a <sup>4</sup>	H	P	H	H	6.27	6.90	16.56	7.52
14b <sup>4</sup>	H	P	CN	H	19.21	11.53	19.65	12.88
14c <sup>4</sup>	H	P	Cl	H	7.46	7.91	10.17	9.84
14d <sup>4</sup>	H	P	H	CN	24.18	22.70	29.15	12.88
14e <sup>4</sup>	H	P	H	Cl	8.82	4.92	7.48	3.36
			<b>Amsacrina</b> <sup>1</sup>		9.5	27.7	16.7	19.9

E= NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NEt<sub>2</sub>; PIP=1-piperidinilo; MPZ=1-(4-metilpiperazinilo); MOR=1-morfolinilo; P= NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NEt<sub>2</sub>; \* sustituido con un átomo de cloro en la posición 9, NA= no se analizó

<sup>1</sup> Tomado de la referencia 145

<sup>2</sup> Tomado de la referencia 152

<sup>3</sup> Tomado de la referencia 151

<sup>4</sup> Tomado de la referencia 150

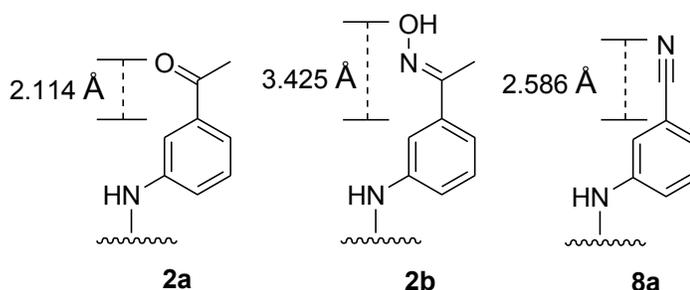
De estos datos se observaron algunos factores que afectan de manera positiva o negativa la actividad citotóxica de los derivados de tiazolo e imidazoquinolina:

*I. Factores que disminuyen la actividad citotóxica:*

- El cambio isostérico de un anillo de benceno por uno de tiazol y aún más por uno de imidazol, cuando carecen de cadenas alquilamínicas. Esto tendría relación con alguno de los parámetros electrónicos o geométricos calculados en los apartados 5.2.1 y 5.3 y se discute más adelante
- Un átomo de flúor en la posición 7 del sistema tricíclico. Al contrario que los derivados de 9-alquildiamino-7-fluorotiazolo[5,4-*b*]quinolina sintetizados por el grupo de Álvarez-Ibarra,<sup>149</sup> los compuestos sustituidos con flúor en la posición 7 en derivados 9-anilino sustituidos no fueron activos.
- Núcleos heterocíclicos saturados, con restricción conformacional, en la posición 2 del sistema tricíclico. Esto concuerda con las observaciones realizadas por Álvarez-Ibarra respecto a la importancia de la libertad conformacional que tiene que tener la cadena alquildiamínica para la actividad citotóxica.<sup>149</sup>

*II. Factores que favorecen la actividad citotóxica*

- La presencia de grupos aceptores de puentes de hidrógeno en la posición 3' en los derivados de 2-metilthiotiazolo[5,4-*b*]quinolina. En un estudio previo se encontró que la distancia del átomo C-3' al átomo formador del puente de hidrógeno tiene relación con la actividad citotóxica.<sup>145</sup> Esto podría explicar en parte porque los compuestos sustituidos en la posición 3' con grupo ciano y oxima presentan mayor actividad que los compuestos ceto y éster sustituidos, puesto que están más alejados del átomo C-3 (Figura 67). Esto sugiere que es importante tener grupos funcionales en el anillo de anilina que formen interacciones tipo puente de hidrógeno con un sitio receptor hipotético en la ADN topoisomerasa II.



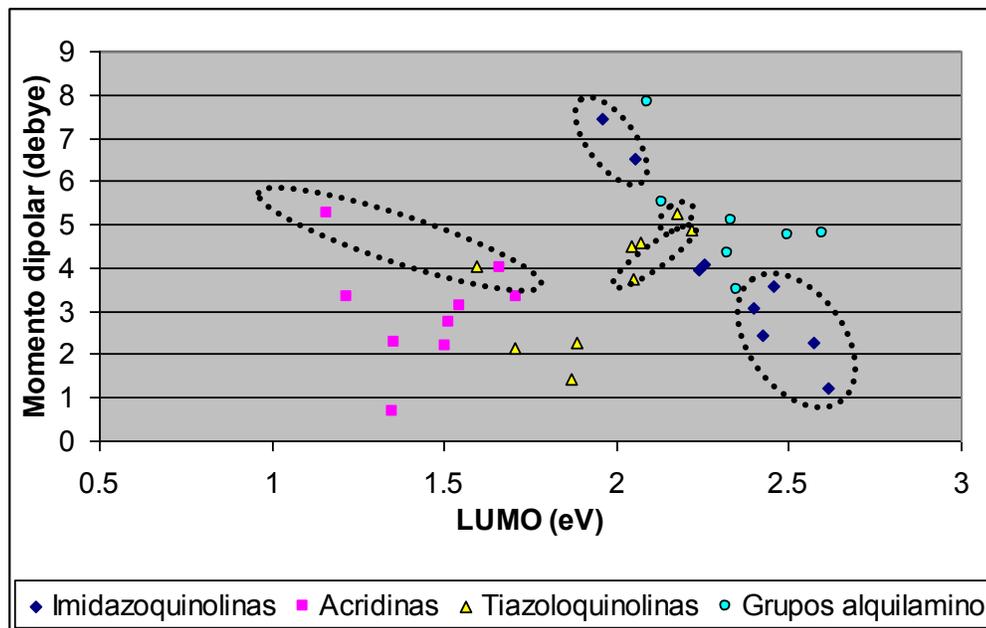
**Figura 67.** Distancia del C-3' al átomo formador de puentes de hidrógeno en derivados 3'-sustituidos.

- La presencia de átomos de cloro en el anillo de anilina en los derivados de 2-alquilaminotiazolo[5,4-*b*]quinolina. Esto sugiere que la lipofilia es un parámetro importante para la actividad citotóxica, ya los compuestos sustituidos con grupos funcionales polares (ciano y metoxi) fueron menos activos que los compuestos cloro sustituidos o inclusive sin sustituyentes en el anillo de anilina.
- El alargamiento de la cadena de alquilamino de dos a tres átomos de carbono, también mejoró la actividad citotóxica de los derivados 2-alquildiamino sustituidos. Esto podría

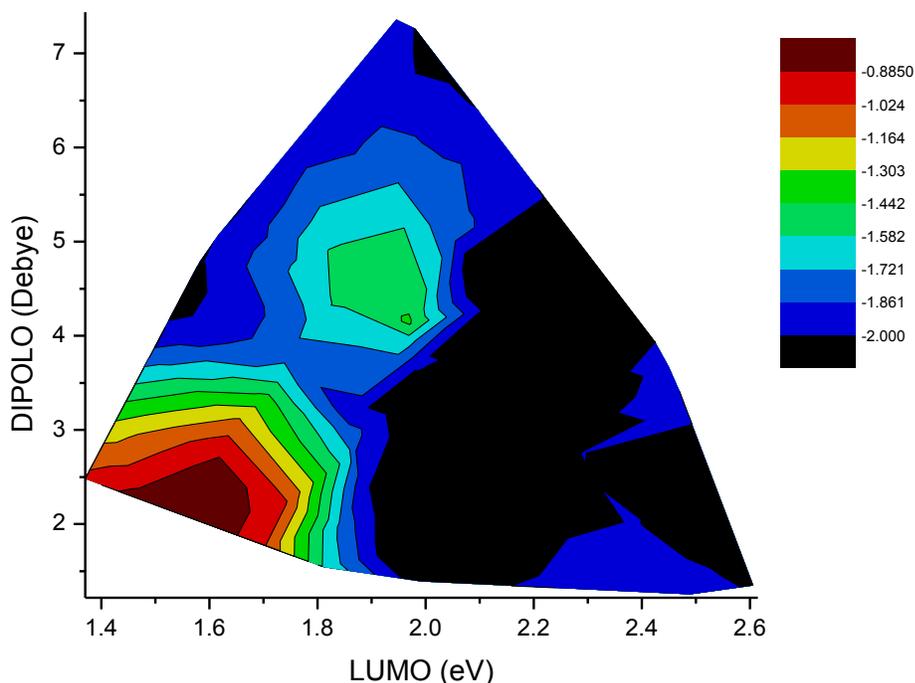
tener relación con una mejor interacción con el sitio receptor hipotético o con un ligero aumento en la lipofilia en los compuestos propildiamino sustituidos respecto a los etildiamino sustituidos.

Se decidieron obtener modelos QSAR correlacionando los datos de actividad citotóxica con los parámetros obtenidos por los cálculos *ab initio* de los apartados 5.2.1 y 5.3 empleando el programa BuildQSAR,<sup>194</sup> obteniéndose modelos que incluían al momento dipolar y al valor energético del LUMO como parámetros más relevantes; en la línea celular K-562 se encontró la siguiente ecuación  $\text{Log}(1/IC_{50}) = 1.14576 \cdot \text{LUMO} + 0.13084 \cdot \text{momento dipolar} - 0.59538$  ( $n=019$ ;  $r^2=0.850$ ;  $F=45.583$ ).

Por lo tanto se decidió estudiar con mayor detalle estos dos parámetros y se gráfico el valor de la energía del LUMO contra el momento dipolar, incluyendo a los derivados de 9-anilinoacridina, 9-anilino-tiazolo[5,4-*b*]quinolina e imidazo[4,5-*b*]quinolina, la gráfica se observa en la Figura 68. Seleccionando los compuestos más activos se observó que los compuestos más activos, eran aquellos con valores de momento dipolar y de valor de LUMO bajos, excluyendo a los compuestos sustituidos con grupos alquildiamina (Figura 69). Esta observación es importante puesto que explica la falta de actividad citotóxica de los derivados de imidazoquinolina y sugiere que los compuestos con grupos alquildiamínicos tienen requerimientos estructurales distintos a los que carecen de estos grupos, y por lo tanto modos de acción o sitios de unión diferentes. Por lo tanto el análisis de la relación estructura-actividad se hará de ambas clases de compuestos por separado.



**Figura 68.** Gráfica del valor energético del LUMO contra momento dipolar. En las áreas punteadas se muestran los compuestos con poca o nula actividad.



**Figura 69.** Gráfico de contorno del momento dipolar X energía del LUMO X  $\log(1/IC_{50})$  de compuestos tricíclicos 9-anilino sustituidos sin grupos alquildiamino (incluyendo amsacrina)

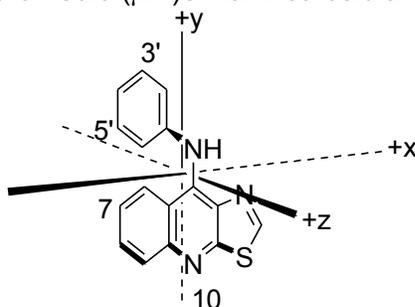
a) *Derivados sin cadenas alquildiamínicas*

Con base a las gráficas de las Figuras 68 y 69 se puede concluir que, para que estos compuestos presenten actividad citotóxica. Se requiere un momento dipolar menor a 3 y un valor de la energía del LUMO menor a 2 eV (calculados por *ab initio* HF 6-31G\*). Esto puede relacionarse con la capacidad de intercalarse con el ADN<sup>182</sup> y es una observación que se ha descrito para derivados de elipticina,<sup>152</sup> pero no para derivados tricíclicos anilino sustituidos.

Al tratar de encontrar un modelo QSAR no se pudo encontrar un modelo que incluyera a todos los compuestos 9-anilino sustituidos, notándose que los compuestos **8a** (3'-CN), **8i** (3'-COE) y **8j** (3'-CF<sub>3</sub>) no ajustaban dentro de los modelos propuestos, por lo que se decidió analizar la causa de esto, encontrándose que la diferencia era la orientación del momento dipolar. Esto llevó a agrupar a los compuestos en 4 categorías dependiendo de la orientación del momento dipolar que ilustran, junto con los valores promedios de IC<sub>50</sub> para cada grupo, en la Tabla 29. Los 4 conjuntos son:

- Grupo A: El momento dipolar orientado hacia la posición 10 (sobre el eje -y, en la figura de la Tabla 29)
- Grupo B: El momento dipolar orientado hacia la posición 7 (sobre el eje -x)
- Grupo C: El momento dipolar orientado hacia la posición 3' (sobre el eje +y)
- Grupo D: El momento dipolar orientado hacia la posición 4' (sobre el eje -z)

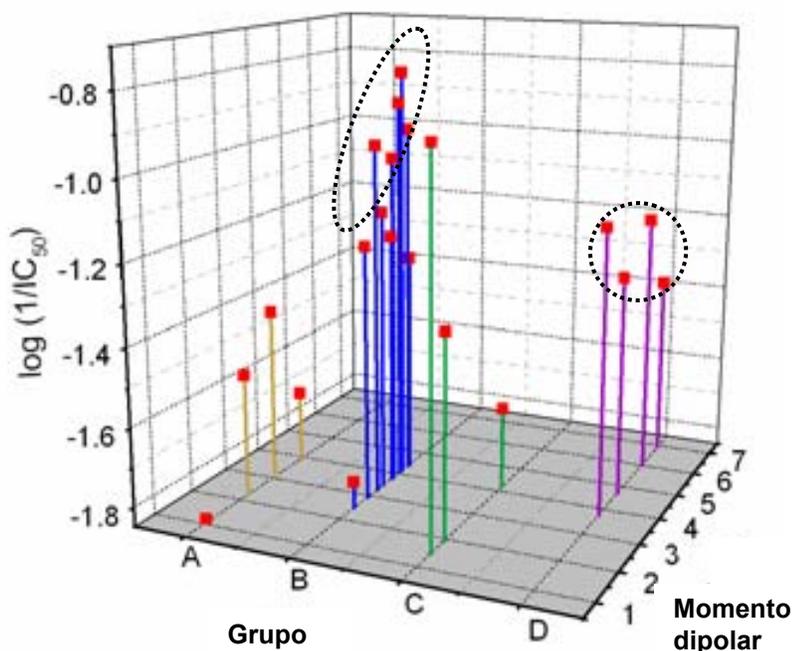
**Tabla 29.** Agrupación de los compuestos según la orientación del momento dipolar.  
IC<sub>50</sub> promedio (μM) en la línea celular HeLa



Grupo	Compuestos	IC <sub>50</sub> prom. (μM)
Grupo A (posición 10)	○ Tiazolo[5,4- <i>b</i> ]quinolinas con grupos electrodonadores en la posición 3'	>80 <sup>1</sup>
Grupo B (posición 7)	○ Tiazolo[5,4- <i>b</i> ]quinolinas 7-flúor sustituidas ○ Tiazolo[5,4- <i>b</i> ]quinolinas con anillos heterocíclicos saturados en la posición 2 ○ Imidazo[4,5- <i>b</i> ]quinolinas con grupos electrodonadores en la posición 3'	>80
Grupo C (posición 3')	○ Tiazolo[5,4- <i>b</i> ]quinolinas con grupos electroattractores en la posición 3', excepto ceto y ester sustituidos	24.2
Grupo D (posición 4')	○ Tiazolo[5,4- <i>b</i> ]quinolinas con grupos ceto o éster en la posición 3' ○ Imidazo[4,5- <i>b</i> ]quinolina con grupos electroattractores en las posiciones 3' y 4'	>80

<sup>1</sup> Excepto **2c** IC<sub>50</sub>= 34.2 μM y **8c** IC<sub>50</sub>=25.3 μM

De la información de la Tabla 29 se desprende que la orientación del momento dipolar es importante para la actividad citotóxica, pues sólo los compuestos del grupo C y algunos del grupo A, presentan actividad citotóxica. Un estudio previo sugiere que la orientación del momento dipolar es importante para la interacción de las bases nitrogenadas del ADN con el núcleo tricíclico,<sup>182</sup> por lo que esto podría explicar esta observación. Para explicar porque algunos derivados del grupo A presentan actividad, se graficó la actividad citotóxica contra la magnitud del momento dipolar (Figura 70), encontrándose que los compuestos con momento dipolar menor a 3 en el grupo A son los que presentan actividad citotóxica. Más aún se encontró que en el caso del grupo A los compuestos con valores del momento dipolar cercanos a 3, eran los más activos, mientras que los compuestos del grupo C, por el contrario, los compuestos con un menor momento dipolar eran los que tenían mayor actividad citotóxica.



**Figura 70.** Gráfico de la actividad citotóxica contra el momento dipolar. Los grupos A-D son los que se encuentran descritos en la Tabla 27. En los círculos punteados se encuentran los compuestos alquildiamino sustituidos

En conclusión, los requisitos estructurales para la actividad citotóxica de compuestos tricíclicos anilino sustituidos, sin cadenas alquildiamínicas son:

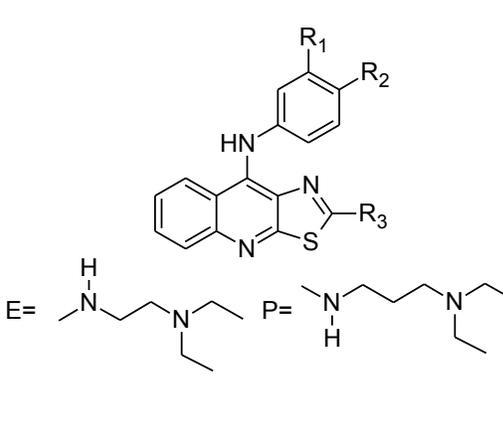
- Grupos formadores de puentes de hidrógeno en el anillo de anilina, particularmente en la posición 3'. La ausencia de grupos de este tipo disminuye la actividad citotóxica de estos compuestos, independientemente de si cumplen con el resto de los requisitos
- Valores de la energía de LUMO menores a 2 eV. Esto podría tener relación con la afinidad al ADN, dado que una de las fuerzas que participan en la estabilización del complejo intercalante es la interacción de orbitales frontera entre las bases del ADN y el compuesto planar.<sup>34, 195</sup>
- Valores de momento dipolar menores a 3 debye y orientación hacia la posición 10 o 3' (sobre el eje y, según la figura de la Tabla 27). Aunque no es una de las fuerzas más determinantes para que se inicie el proceso de intercalación, si se reconoce que las interacciones dipolo-dipolo juegan un papel importante en la estabilización del complejo y posiblemente en el reconocimiento y selectividad de algunos agentes intercalantes.<sup>182,196,197</sup> Esto explicaría porque los derivados 7-fluoro sustituidos mostraron baja afinidad por el ADN, posiblemente, debido a que la orientación de su momento dipolar no es adecuada.

#### *b) Derivados con cadenas alquildiamínicas*

Como puede concluirse de las Figuras 68, 69 y 70, los compuestos con cadenas de alquildiamino, no tienen los mismos requisitos estructurales que los compuestos que carecen de estas cadenas, puesto que presentan actividad citotóxica a pesar de tener valores de momento dipolar y valores de la energía de LUMO más altos.

Al tratar de encontrar un modelo que relacione la actividad citotóxica con alguno de los parámetros calculados para estos compuestos, se obtuvieron modelos que correlacionan el logP y el área polar superficial (PSA, por sus siglas en inglés) con la actividad biológica (los valores de PSA de los derivados de 2-alkilaminotiazolo[5,4-*b*]quinolina se encuentran en la Tabla 30). De estos dos parámetros el que mejor correlacionó fue el PSA:  $\text{Log}(1/IC_{50}) = -0.01964 \text{ PSA} - 0.19409$ ; ( $n=10$ ;  $r^2=0.740$ ;  $F=24.541$ ). El parámetro de PSA correlaciona con la permeabilidad en membranas biológicas,<sup>197</sup> esto sugiere que es la capacidad de atravesar las membranas biológicas lo que favorece la citotoxicidad de estos compuestos, lo que explicaría porque los compuestos cloro 3'- o 4'-sustituídos y con cadena de propildiamino en la posición 2 son los que presentan mayor actividad citotóxica en comparación con los sustituidos con grupos polares y con cadenas etildiamino, puesto que presentan valores menores de PSA y mayores de logP. La longitud de la cadena alquildimínica favorece la actividad citotóxica, no necesariamente por una mejor interacción con el ADN o la topoisomerasa II, sino por un aumento en la permeabilidad hacia membranas biológicas.

**Tabla 30.** Valores del área polar superficial de los derivados de 2-alkilaminotiazolo[5,4-*b*]quinolina



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	PSA (Å <sup>2</sup> )	LogP
<b>1a</b>	CN	H	E	54.4904	5.38
<b>1b</b>	Cl	H	E	39.0601	5.90
<b>1c</b>	OMe	H	E	46.2024	5.22
<b>1d</b>	H	CN	E	54.4736	5.38
<b>1e</b>	H	Cl	E	39.0872	5.90
<b>1f</b>	H	OMe	E	46.2707	5.22
<b>14a</b>	H	H	P	36.7885	5.63
<b>14b</b>	CN	H	P	52.1346	5.66
<b>14c</b>	Cl	H	P	34.2395	6.18
<b>14d</b>	H	CN	P	52.1784	5.66
<b>14e</b>	H	Cl	P	36.7761	6.18

*c) Inhibición de la enzima ADN topoisomerasa II*

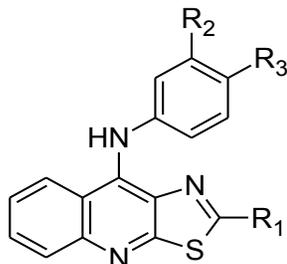
Por otra parte, el grupo de trabajo del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres (Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM) determinó la capacidad inhibitoria *in vitro* de la actividad de la enzima ADN topoisomerasa II de algunos de los compuestos que ha sintetizado nuestro grupo de trabajo. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 31.

De estos datos se pudo obtener una ecuación que correlacionó el LUMO con la actividad inhibitoria de la enzima:  $\log(1/IC_{50}) = -0.99025 \cdot \text{LUMO} - 2.46625$ ; ( $n=07$ ;  $r^2=0.810$ ;  $F=21.233$ ). Ninguno de los compuestos evaluados tuvo mayor actividad inhibitoria que la amsacrina, aunque algunos de ellos tienen mayor actividad citotóxica, lo cual es un ejemplo de que la inhibición de la actividad enzimática es sólo una parte de los factores que afectan la actividad citotóxica. El hecho de que el LUMO aparezca como el parámetro que más influye, sugiere que la unión al ADN mediante intercalación, es un proceso necesario para inhibir la actividad enzimática.<sup>182</sup>

Por otra parte, es de destacar la baja actividad inhibitoria que mostró el compuesto **1h** y la moderada actividad del compuesto **14c**, a pesar de que se encuentran entre los compuestos más citotóxicos. Esto podría ser indicativo de que el mecanismo de acción de estos compuestos es distinto a la inhibición de la ADN topoisomerasa II. En el caso de los derivados de 4-carboxamidoacridinas, se ha señalado que compuestos con cadenas alquildiamínicas (como la

que poseen **1h** y **14c** en su estructura), inhiben de manera más selectiva la actividad de la ADN topoisomerasa I.<sup>95,96</sup> Esto podría explicar la alta citotoxicidad de los compuestos **1h** y **14c**, a pesar de su baja actividad inhibitoria de la ADN topoisomerasa II, pues posiblemente interfieran de manera más eficiente con la actividad de la enzima tipo I que con la actividad de la enzima tipo II. Por lo tanto, los compuestos sin grupos alquilamino parecen tener mecanismos diferentes de citotoxicidad a los compuestos que poseen estos grupos en su estructura, esto se reflejó en los resultados de los ensayos de inhibición de la ADN topoisomerasa II y en los requerimientos estructurales para presentar actividad citotóxica.

**Tabla 31.** Inhibición de la actividad enzimática de la ADN topoisomerasa II ( $IC_{50}$ ,  $\mu M$ )



	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$IC_{50}(\mu M)$
<b>1h</b>	E	H	H	168.90
<b>8d</b>	SMe	Cl	H	21.20
<b>8g</b>	SMe	H	Cl	20.49
<b>8h</b>	SMe	NHMe	H	12.27
<b>8l</b>	SMe	NH <sub>2</sub>	H	18.04
<b>8m</b>	SMe	NHAc	H	29.56
<b>14c</b>	P	Cl	H	40.95
		<b>Amsacrina</b>		9.94

## 6. CONCLUSIONES

- Se lograron preparar 6 nuevos derivados de 2-[2-(*N,N*-dietilamino)etil]amino]-9-anilino[5,4-*b*]quinolina con distintos sustituyentes en las posiciones 3' y 4' del anillo de anilina, aumentando los rendimientos y/o disminuyendo los tiempos de reacción en algunos pasos.
- Se lograron preparar 7 derivados de 9-anilino-2-metilimidazo[4,5-*b*]quinolina con distintos sustituyentes en las posiciones 3' y 4' del anillo de anilina, a través de una ruta sintética novedosa que permite la incorporación de otros grupos funcionales en las posiciones 2, 3 y 9 del núcleo tricíclico. Esta versatilidad permitiría profundizar los estudios de relación estructura-actividad de este tipo de estructuras.
- Los estudios de modelado molecular revelaron que el reemplazo isostérico en el núcleo tricíclico de los derivados de 9-anilinoacridina y la naturaleza de los sustituyentes en el anillo de anilina, causan cambios a nivel electrónico y de la geometría de los complejos de intercalación que impactan en sus propiedades citotóxicas y de afinidad al ADN.
- La presencia de grupos formadores de puentes de hidrógeno, los valores de la energía del LUMO y la magnitud y la orientación del momento dipolar, son parámetros necesarios para que los derivados tricíclicos 9-anilino sustituidos, sin cadenas alquilamínicas en su estructura, presenten actividad citotóxica.
- Otros parámetros como el logP o el PSA influyen, principalmente en los derivados 2-aminoalquilamino sustituidos, por lo que aunque el aumento de la longitud de la cadena alquildimínica favorece la actividad citotóxica, no necesariamente es a través de una mejor interacción con el ADN o la ADN topoisomerasa II, sino por un aumento en la permeabilidad hacia membranas biológicas.
- El hecho de que el LUMO apareciera como el parámetro que más influye en el modelo de relación estructura-inhibición de la actividad de la ADN topoisomerasa II, sugiere que la unión al ADN mediante intercalación, es un proceso necesario, aunque no el único involucrado, para inhibir la actividad enzimática.
- Los compuestos sin grupos alquilamino parecen tener mecanismos diferentes de citotoxicidad a los compuestos que poseen estos grupos en su estructura, esto se reflejó en los ensayos de inhibición de la ADN topoisomerasa II y en los requerimientos estructurales para presentar actividad citotóxica.
- Es importante considerar la naturaleza de grupos funcionales en el anillo de anilina y en el núcleo tricíclico puesto que permiten modular parámetros conformacionales (modificando la geometría del complejo de intercalación), electrónicos (variando los valores del momento dipolar y los valores energéticos de los orbitales frontera) y lipofílicos (afectando la entrada de los compuestos al interior de las células) que inciden directamente en la actividad citotóxica de estos compuestos. Estos aspectos deben de ser considerados en el diseño de nuevos compuestos tricíclicos anilino sustituidos como potenciales antiutumorales.

## 7. PARTE EXPERIMENTAL

### 7.1. Síntesis

#### 7.1.1. Materiales

Todas las materias primas utilizadas en la síntesis se adquirieron comercialmente en grado reactivo. La caracterización de los intermediarios reportados se realizó por comparación de sus puntos de fusión y por cromatografía comparativa en capa fina coincidiendo con los señalado en la literatura, obteniéndose además su espectro IR.

Para la evaporación de los disolventes se empleó un evaporador rotatorio marca Büchi modelo RE 111. Para la destilación a presión reducida se ocupó una bomba para vacío marca FELISA modelo FE-1405 con capacidad máxima de 0.1 mmHg. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo se determinaron en un aparato Nicolet FT5SX en pastilla de KBr a menos que se indique otra cosa. Las unidades se reportan en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizaron en un aparato Varian VxR-300S (300 MHz) y Varian 300S (75 MHz), respectivamente. Los desplazamientos químicos están dados en ppm ( $\delta$ ) y las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz). La multiplicidad de señales se expresa como s= señal simple, d= señal doble, t= señal triple, c= señal cuádruple, sa= señal simple ancha, ta= señal triple ancha, dd= señal doble de doble, ddd= señal doble de doble de doble, dt= señal doble de triple, m= señal múltiple. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolventes dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) y cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

Los espectros de masas se determinaron por IE en un espectrómetro JEOL JEM-AX505HA, y por IQ y FAB en un espectrómetro de masas JEOL Sx102, empleando en FAB alcohol 3-nitrobencílico como matriz. El ion molecular se indica como  $M^+$ . La nomenclatura se indica como  $m/z$ = masa/carga con su respectiva abundancia relativa. En el caso de los espectros obtenidos a través de la técnica de FAB, no se consideraron los picos correspondientes a la matriz para designar al pico base.

#### 7.1.2. Cromatografía

Para las cromatografías en columna se empleó gel de sílice Merck 60 malla 70-230. Los análisis cromatográficos se efectuaron en capa fina analítica siguiendo técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice de la casa Aldrich con un espesor de 0.2mm. Para la visualización de las placas se empleó una lámpara de luz UV y exposición a vapores de yodo.

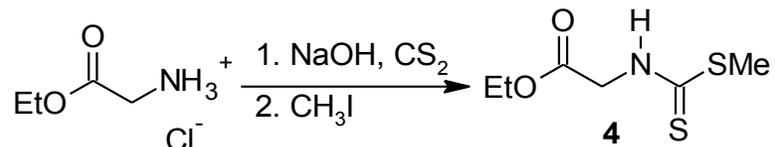
**Tabla 32.** Sistemas de elución empleados.

Sistema	Mezcla de disolventes	Proporción
I	Hexano/acetato de etilo	8:2
II	Hexano/acetato de etilo	7:3
III	Diclorometano/metanol	9:1
IV	Diclorometano/metanol/ $\text{NH}_4\text{OH}$	9:1:0.1
V	Diclorometano/metanol	8:2
VI	Hexano/acetato de etilo	1:1

### 7.1.3. Descripción de las síntesis.

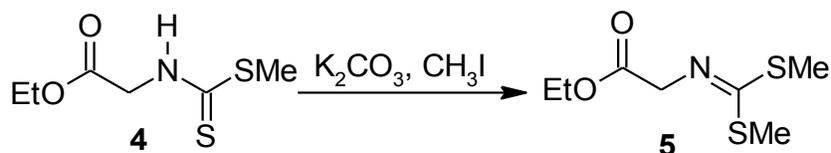
#### 7.1.3.1. Derivados de 9-anilino[5,4-*b*]quinolina

##### 7.1.3.1.1. *N*-((Etoxicarbonil)metil)ditiocarbamato de metilo (**4**)<sup>155</sup>



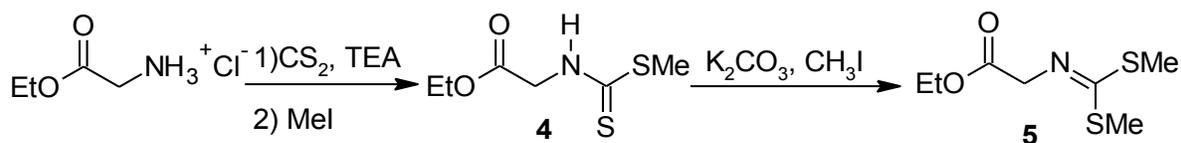
En un matraz de fondo redondo de tres bocas acondicionado con termómetro, agitación mecánica y embudo de adición, se mezclaron 300 mL de DMSO y 83.76 g (0.6 moles) de diclorhidrato de glicinato de etilo. La suspensión se agitó vigorosamente a temperatura ambiente hasta disolución total. A esta solución se le adicionaron lentamente 36 mL de una disolución 20 M de hidróxido de sodio, manteniendo la temperatura a 20 °C. Terminada la adición se agregaron lentamente 48 mL (0.78 moles), de disulfuro de carbono manteniendo la temperatura entre 15 y 20 °C. Se mantuvo en agitación durante 40 minutos a temperatura ambiente. La disolución naranja se enfrió a 0 °C y se adicionaron lentamente 48 mL (0.78 moles) de yoduro de metilo, manteniendo la temperatura de reacción a 0 °C. Terminada la adición se retiró el sistema de enfriamiento y se dejó agitando por 3 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre 3000 mL de una mezcla de hielo-agua con agitación constante. El precipitado formado se aisló por filtración y se dejó secar al aire. Se obtuvieron 50.25 g (43.38%) de un precipitado ligeramente amarillo (Lit. 51%<sup>155</sup>) que mostró dos manchas con un Rf de 0.30 y 0.10 (sistema I). Este crudo se empleó como tal en el siguiente paso de reacción.

##### 7.1.3.1.2. *N*-((Etoxicarbonil)metil)iminoditiocarbamato de dimetilo (**5**)<sup>155</sup>

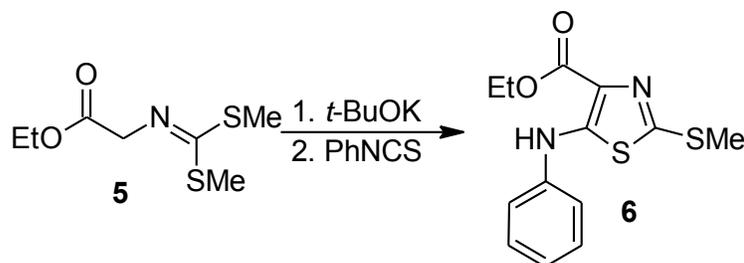


En un matraz de fondo redondo de tres bocas acondicionado con termómetro, agitación mecánica y embudo de adición se mezclaron 43 g (aproximadamente 0.224 moles) del crudo del compuesto **4** en 120 mL de DMSO, a la solución amarilla resultante se le agregó lentamente, una disolución de 48 g de carbonato de potasio en 38 mL de agua, manteniendo la temperatura en 20 °C, formándose una suspensión color rojo pardo. Terminada la adición la suspensión se enfrió a 0 °C y se adicionaron lentamente 20 mL de yoduro de metilo (0.32 moles), manteniendo la temperatura en 0 °C y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 18 horas. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se vertió lentamente sobre 1000 mL de agua con agitación. La solución acuosa se extrajo con acetato de etilo (4 x 400 mL). Los extractos orgánicos se trataron con sulfato de sodio anhidro y se eliminó por evaporación el acetato de etilo obteniéndose un aceite oscuro. Este aceite se purificó por destilación a presión reducida, colectando la fracción que destiló entre 145-160 °C. Se obtuvieron 41.93 g (90.43%) de un aceite incoloro que se torna amarillo con la exposición a la luz (Lit. 98%<sup>155</sup>) con un Rf de 0.4 (sistema II).

IR (espectro 1, película, cm<sup>-1</sup>): 2981, 2925 (C-H), 1748 (C=O), 1580 (C=N), 1182 (C-S)

7.1.3.1.2.1. Técnica modificada para la obtención del compuesto 5<sup>156</sup>

En un matraz de tres bocas, acondicionado con termómetro, refrigerante y embudo de adición, se colocaron 50 g (0.36 mol) de de clorhidrato de glicinato de etilo, 83.5 mL (0.7 mol) de trietilamina y 250 mL de cloroformo, la suspensión se agitó vigorosamente hasta disolución total. Posteriormente se adicionaron 21.6 mL (0.36 mol) de disulfuro de carbono, la mezcla de reacción se calentó a 40 °C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron por goteo, a través del embudo de adición, 22 mL (0.36 mol) de yoduro de metilo. Terminada la adición, la mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución resultante se lavó con agua destilada (3 x 50 mL), y se eliminó el cloroformo por destilación a presión reducida, obteniéndose un aceite amarillo el cual se disolvió en 300 mL de acetona. La solución amarilla resultante se colocó nuevamente en un matraz de tres bocas acondicionado con termómetro, refrigerante y embudo de adición. A continuación se le agregó lentamente una disolución de 48 g (0.3 mol) de carbonato de potasio en 38 mL de agua, seguida de la adición de 22 mL (0.36 mol) de yoduro de metilo. La reacción se calentó a 40 °C durante 3 horas, al final de las cuales se retiró el calentamiento dejando enfriar la reacción a temperatura ambiente y continuando la agitación durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se eliminaron las sales inorgánicas por filtración, obteniéndose un filtrado de color ámbar, del cual se eliminó la acetona a presión reducida, obteniéndose un aceite ámbar. Dicho aceite se purificó como se describe en el punto 6.1.3.1.2. Se obtuvieron 50 g (0.328 mol, 72 %) de un aceite incoloro que coincidió en R<sub>f</sub> y en su espectro IR con el reportado para el compuesto 5.

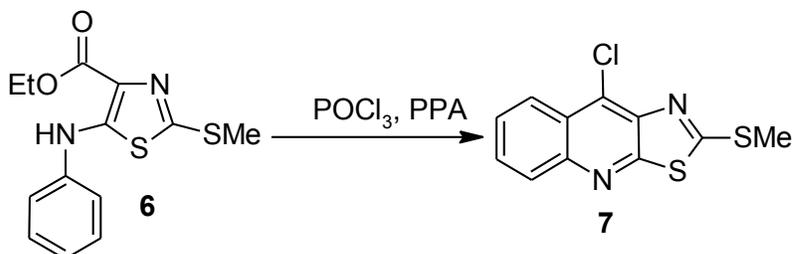
7.1.3.2. 4-(Etoxicarbonil)-5-(fenilamino)-2-(metiltio)tiazol (6)<sup>157</sup>

En un matraz Taper de la casa Kontes, acondicionado con termómetro para bajas temperaturas, embudo de adición, condiciones anhidras y atmósfera de argón, se mezclaron 9.51 g (84.90 mmoles) de *tert*-butóxido de potasio en 200 mL de tetrahidrofurano anhidro. La suspensión formada se enfrió a -75° C mediante un baño de hielo seco-acetona. Al embudo de adición se transfirió mediante una cánula una disolución de 12 g (57.96 mmoles) del compuesto 5 en 15 mL de tetrahidrofurano anhidro, la cual se adicionó por goteo a la suspensión de *tert*-butóxido de potasio, manteniendo la temperatura en -75 °C. Terminada la adición, la solución amarillo-naranja resultante se dejó agitar durante 90 minutos a la misma temperatura. A continuación se transfirió al embudo de adición una disolución de 7.2 mL (57.96 mmoles) de isotiocianato de fenilo en 15 mL de tetrahidrofurano anhidro y se adicionó por goteo, cuidando que la temperatura se mantuviera en -75 °C. Se dejó agitar durante 45 minutos más y se retiró el sistema de enfriamiento. Cuando la temperatura se acercó a -10 °C se formó un precipitado

amarillo. La suspensión formada se dejó en agitación durante 16 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la suspensión amarilla se vertió lentamente en 1600 mL de agua con agitación constante, formándose un precipitado blanco el cual se separó y secó por filtración al vacío. Se obtuvieron 15.6 g (91.5 %) del compuesto **6** (Lit. 90%<sup>145,157</sup>) con un punto de fusión de 80 °C (Lit. 79-80 °C<sup>157</sup>) y un Rf de 0.57 (sistema I)

IR (espectro 2, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3275 (N-H), 2987, 2927 (C-H), 1658 (C=O), 1542, (C=N), 1200 (C-S), 1043 (C-O)

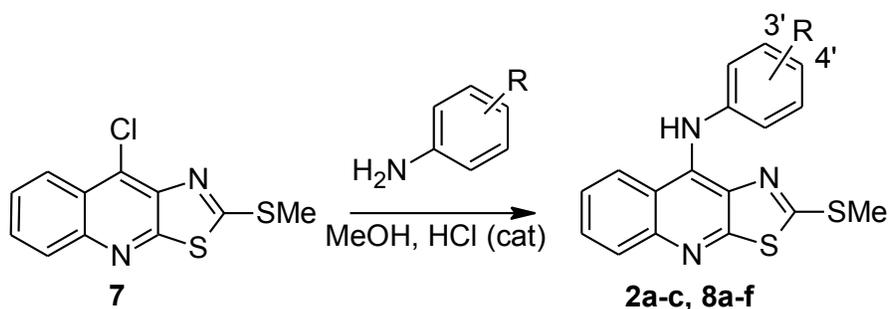
### 7.1.3.3. 9-Cloro-2-(metiltio)tiazolo[5,4-*b*]quinolina (**7**)<sup>144</sup>



En un matraz de fondo redondo de 1 boca se colocaron 5.88 g (20 mmol) del compuesto **6**, se adicionaron 710 mg de ácido polifosfórico y 5 mL (32.5 mmol) de oxiclورو de fósforo. La mezcla de reacción se calentó, con agitación constante a 130-135 °C por 4 horas. Terminado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente, se colocó el matraz en un baño de hielo y se agregaron lentamente 5 mL de etanol frío, formándose un aceite color café. Al disolverse el aceite precipitó un sólido color naranja. La suspensión se vertió sobre 20 mL de agua y se neutralizó con disolución saturada de bicarbonato de sodio. El precipitado amarillo-café se separó por filtración al vacío y secó al aire. El crudo se suspendió en metanol, se calentó ligeramente con agitación durante 5 minutos y se filtró para obtener 3.32 g (62.4%) del compuesto **7** (Lit 60.3%<sup>144</sup>) con un punto de fusión de 160 °C (Lit. 160 °C<sup>144</sup>) y un Rf de 0.65 (sistema I)

IR (espectro 3, KBr, cm<sup>-1</sup>): 1583, 1543, 1461, 1450 (aromáticos), 1293 (C-S), 1014 (Ar-Cl)

### 7.1.3.4. Método general para la obtención de derivados de 9-(fenilamino)-2-metiltiotiazolo [5,4-*b*]quinolina (**2a-c**, **8a-f**)<sup>144,145</sup>



En un matraz de fondo redondo de una boca acondicionado con refrigerante se suspendieron 133 mg (0.5 mmol) del compuesto **7** en 5 mL de metanol y se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y se dejó agitar por 10 minutos. Terminado este tiempo se agregaron 0.7 mmol de la anilina con el patrón de sustitución deseado, se calentó la mezcla a reflujo durante 6-8 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. Se eliminó el metanol a presión reducida. El residuo se suspendió en 10 mL de agua y se ajustó a pH = 8

con carbonato de sodio al 10% precipitando un sólido que se filtró al vacío, se lavó con agua destilada y posteriormente con acetona fría y se dejó secar al aire.

**8a** R= 3'CN, p.f. 210-212 °C (con descomposición) (Lit 210-212 °C<sup>145</sup>); Rf: 0.37 (sistema II); rendimiento 72%

IR (espectro 4, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3245 (NH), 2231 (CN), 1624, 1573, 1550, 1498, 1473, 1433 (aromático), 1286 (C-S)

**8b** R= 3'OMe, p.f. 175-177 °C (Lit 175-177 °C<sup>145</sup>); Rf: 0.51 (sistema II); rendimiento 75%

IR (espectro 5, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3120 (NH), 3053, 2966 (CH), 2850 (C-H unido a O), 1595, 1571, 1543, 1503, 1476, (aromático), 1300 (C-S), 1266 (ArO)

**8c** R= 3'Cl, p.f. 185-187 °C (Lit 185-187 °C<sup>145</sup>); Rf: 0.64 (sistema II); rendimiento 74.5%

IR (espectro 6, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3108 (NH), 3050 (C-H), 1572, 1548, 1516, 1477, 1430, (aromático), 1266 (C-S)

**8d** R= 4'CN, p.f. 178-180 °C (con descomposición) (Lit 178-180 °C<sup>145</sup>); Rf: 0.37 (sistema II); rendimiento 68%

IR (espectro 7, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3423 (NH), 2222 (CN), 1622 (C=N), 1573, 1532, 1497, 1424 (aromáticos), 1274 (C-S)

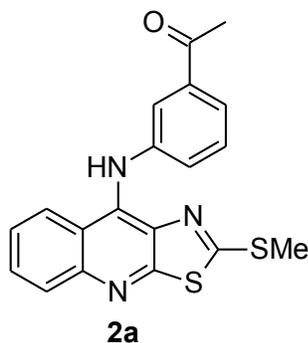
**8e** R= 4'OMe, p.f. 205-207 °C (Lit 205-207 °C<sup>145</sup>); Rf: 0.55 (sistema II); rendimiento 68%

IR (espectro 8, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3200 (NH), 3062, 3028 (C-H), 2835 (C-H unido a O), 1608, 1573, 1546, 1510, 1475 (aromáticos), 1295 (C-S)

**8f** R= 4'Cl, p.f. 186-187 °C (Lit 186-187 °C<sup>145</sup>); Rf: 0.34 (sistema II); rendimiento 70%

IR (espectro 9, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3196 (NH), 3104, 2989 (C-H), 1627, 1573, 1540, 1486, 1467 (aromáticos) 1295 (C-S)

### 7.3.1.5.7 9-[[[3-Acetil)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-b]quinolina (2a)



Aspecto: Sólido color amarillo claro.

Rendimiento: 128 mg (70%)

Rf: 0.37 (sistema II)

Punto de fusión: 185-7 °C

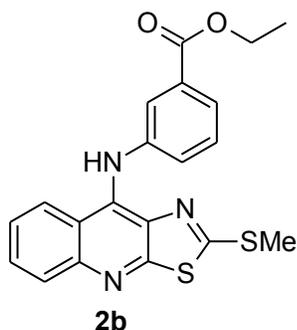
IR (espectro 10, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3411 (NH), 3129, 3122, 3059 (CH), 1681 (C=O), 1621, 1570, 1550, 1504 (aromáticos);

<sup>1</sup>H RMN (espectro 11, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 2.24 (s, 3H) COCH<sub>3</sub>; 2.55 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.52 (t J= 6.9 Hz, 1H) H-5'; 7.55 (dt, J= 6.9, 1.5 Hz, 1H) H-6'; 7.67 (ddd, J= 8.7, 6.3, 1.2, 1H) H-7; 7.78 (dt J= 6.9, 1.5 Hz, 1H) H-4'; 7.86 (t, J= 1.5 Hz, 1H) H-2'; 7.91 (ddd, J= 8.7, 6.3, 1.2 Hz, 1H) H-6;

7.99 (dd, J= 8.7, 1.2, 1H) H-5; 8.58 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-8; 10.66 (br, 1H) NH;

RMN <sup>13</sup>C (espectro 12, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 14.6, 26.8, 117.7, 122.7, 123.0, 124.4, 125.3, 128.3, 128.5, 130.8, 131.8, 136.9, 140.6, 141.1, 141.7, 150.1, 156.2, 162.2, 197.7

EM (espectro 13, FAB, m/z): 366 (M<sup>+</sup>+1, 100%)

7.3.1.5.8 9-[[3-(Carbetoxi)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-*b*]quinolina (2b)

Aspecto: Sólido color amarillo claro

Rendimiento: 138 mg (70%)

Rf: 0.50 (sistema II)

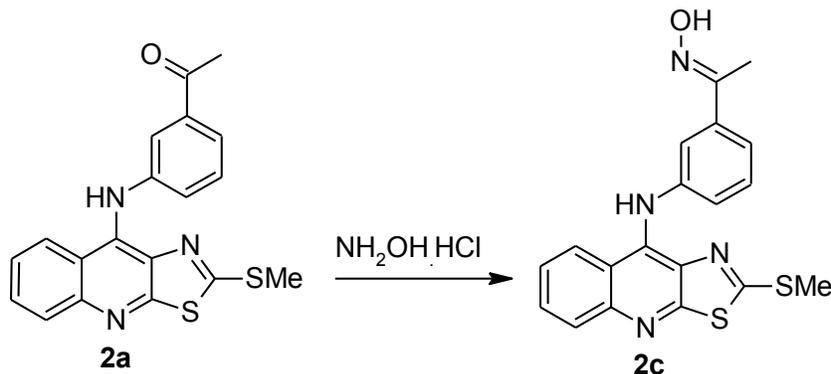
Punto de fusión: 173-5 °C

IR (espectro 14, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3411 (NH), 3129, 3056, 2971 (CH), 1713 (C=O), 1621, 1570, 1545, 1507 (aromáticos);

$^1\text{H}$  RMN (espectro 15, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 1.30 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H)  $\text{CH}_3$ ; 2.21 (s, 3H)  $\text{SCH}_3$ ; 4.30 (c,  $J = 6.9$  Hz, 2H)  $\text{OCH}_2$ ; 7.52 (t  $J = 6.9$  Hz, 1H) H-5'; 7.55 (dt,  $J = 6.9, 1.5$  Hz, 1H) H-6'; 7.68 (ddd,  $J = 8.7, 6.3, 1.2$ , 1H) H-7; 7.70 (dt  $J = 6.9, 1.5$  Hz, 1H) H-4'; 7.89 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H) H-2'; 7.92 (ddd,  $J = 8.7, 6.3, 1.2$  Hz, 1H) H-6; 7.99 (dd,  $J = 8.7, 1.2$ , 1H) H-5; 8.70

(d,  $J = 8.4$  Hz, 1H) H-8; 10.7 (br, 1H) NH;

EM (espectro 16, FAB,  $m/z$ ): 396 ( $\text{M}^+ + 1$ , 100%)

7.3.1.5.9 (1*E*)-oxima de 9-[[3-(acetil)fenil]amino]-2-(metiltio)tiazolo[5,4-*b*]quinolina (2c)

A una suspensión de 110 mg (0.3 mmol) del compuesto **2a** en 10 mL de metanol, se añadió una disolución de 50 mg (0.72 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina en 5 mL de metanol y la mezcla se calentó a reflujo por una hora. Transcurrido el tiempo de reacción, el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se suspendió en 10 mL de agua y se ajustó a  $\text{pH} = 8$  con carbonato de sodio al 10% precipitando un sólido que aisló por filtración al vacío, se lavó con agua destilada, posteriormente con acetona fría y se secó al aire para dar 100 mg (87%) de un sólido ligeramente amarillo con un Rf de 0.25 (sistema II) y punto de fusión de 201-3 °C.

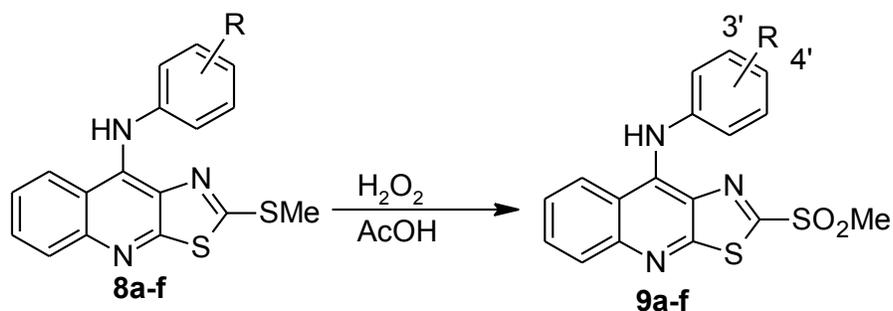
IR (espectro 17, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3411 (NH), 3227, 3053 (CH), 1617 (C=N), 1585, 1551, 1496, (aromáticos);

RMN  $^1\text{H}$  (espectro 18, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 2.10 (s, 3H)  $\text{C}(\text{NOH})\text{CH}_3$ ; 2.41 (s, 3H)  $\text{SCH}_3$ ; 7.08 (m, 1H) H-5'; 7.28 (m, 2H) H-4', H-6'; 7.39 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H) H-2'; 7.51 (ddd,  $J = 8.7, 6.3, 1.2$ , 1H) H-7; 7.71 (ddd,  $J = 8.7, 6.3, 1.2$  Hz, 1H) H-6; 7.92 (dd,  $J = 8.7, 1.2$ , 1H) H-5; 8.37 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H) H-8; 9.36 (br, 1H)  $\text{NHAr}$ ; 11.12 (s, 1H) OH. Se realizó un experimento NOESY (espectro 19)

RMN  $^{13}\text{C}$  (espectro 20, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 11.5, 14.3, 118.0, 119.4, 119.5, 121.2, 123.8, 124.2, 128.0, 128.1, 129.2, 131.6, 136.8, 137.4, 142.6, 146.4, 152.7, 161.7, 162.2

EM (espectro 21, FAB,  $m/z$ ): 380 ( $\text{M}^+ + 1$ , 100%)

### 7.1.3.4 Método general para la obtención de derivados de 2-(metilsulfonil)-9-(fenilamino)tiazolo[5,4-*b*]quinolina (9a-f)



En un matraz de bola de fondo redondo se colocaron 0.5 mmol del derivado de 9-fenilamino-2-metiltiotiazolo[5,4-*b*]quinolina con el patrón de sustitución deseado en el anillo de anilina, y se añadieron 2.5 mL de ácido acético, a la suspensión amarilla formada se añadieron 5 mL de peróxido de hidrógeno al 30% y la mezcla se dejó a temperatura ambiente, con agitación vigorosa toda la noche. Terminado el tiempo de reacción, se añadieron 20 mL de agua fría y se dejó en agitación por 10 minutos. La mezcla, conteniendo un precipitado naranja, se filtró al vacío, el residuo se lavó con agua fría repetidamente hasta pH neutro y se dejó secar al aire. Posteriormente este precipitado naranja se suspendió en tetrahidrofurano caliente y se filtró nuevamente al vacío, quedando un sólido amorfo de color amarillo claro.

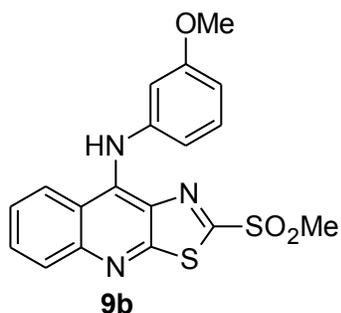
**9a** R= 3'CN, p.f. 255-257 °C (Lit 255-257 °C<sup>150</sup>); Rf: 0.40 (sistema VI); rendimiento 82%  
IR (espectro 22, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3545 (NH), 2229 (CN), 1617, 1574, 1555, 1532, 1473 (aromáticos), 1326, 1148 (S=O)

**9c** R= 3'Cl, p.f. 221-224 °C (Lit 221-224 °C<sup>150</sup>); Rf: 0.56 (sistema VI); rendimiento 83%  
IR (espectro 23, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3330 (NH), 2990 (CH), 1621, 1594, 1571, 1552, 1500 (aromáticos), 1325, 1149 (S=O)

**9d** R= 4'CN, p.f. 274-276 °C (Lit 274-276 °C<sup>150</sup>); Rf: 0.40 (sistema VI); rendimiento 83%  
IR (espectro 24, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3423 (NH), 2223 (CN), 1622, 1573, 1543, 1469 (aromáticos), 1333, 1149 (S=O)

**9f** R= 4'Cl, p.f. 260-262 °C (Lit 260-262 °C<sup>150</sup>); Rf: 0.40 (sistema VI); rendimiento 73%  
IR (espectro 25, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3370 (NH), 1617, 1577, 1556, 1524, 1491 (aromáticos), 1312, 1139 (S=O)

#### 7.1.3.5.1 9-[[[3-metoxi]fenil]amino]-2-(metilsulfonil)tiazolo[5,4-*b*]quinolina (9b)



Aspecto: Sólido color amarillo brillante

Rendimiento: 127 mg (66%)

Rf: 0.43 (sistema VI)

Punto de fusión: 215-217° C

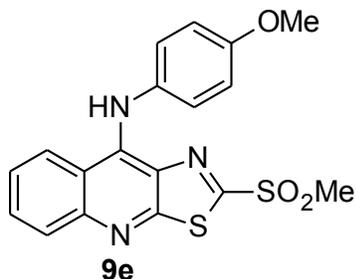
IR (espectro 26, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3417 (NH), 1622, 1594, 1573, 1557 (aromáticos), 1323, (SO) 1287 (O-CH<sub>3</sub>), 1146 (S=O)

RMN <sup>1</sup>H (espectro 27, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 3.26 (s, 3H) SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; 3.73 (s, 3H) OCH<sub>3</sub>; 6.87 (sa 1H) H-2'; 6.89 (dd J= 7.2, 1.5 Hz, 2H) H-4', H-6'; 7.30 (t J= 6.9 Hz, 1H) H-5'; 7.66 (ddd, J= 8.7, 6.3, 1.2, 1H) H-7; 7.70 (ddd, J= 8.7, 6.3, 1.2 Hz, 1H) H-6; 8.03 (dd, J= 8.7, 1.2, 1H)

H-5; 8.68 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-8; 10.7 (br, 1H) NH;

EM (espectro 28, FAB, m/z): 387, (M<sup>+</sup>+1, 100%)

## 7.1.3.5.2 9-[[[(4-metoxi)fenil]amino]-2-(metilsulfonyl)tiazolo[5,4-b]quinolina (9e)



9e

Aspecto: Sólido color amarillo brillante

Rendimiento: 154 mg (80%)

Rf: 0.46 (sistema VI)

Punto de fusión de 225-227° C

IR (espectro 29, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3430 (NH) 1620, 1572, 1556, 1512 (aromáticos), 1323 (SO), 1248 (O-CH<sub>3</sub>), 1146 (SO)

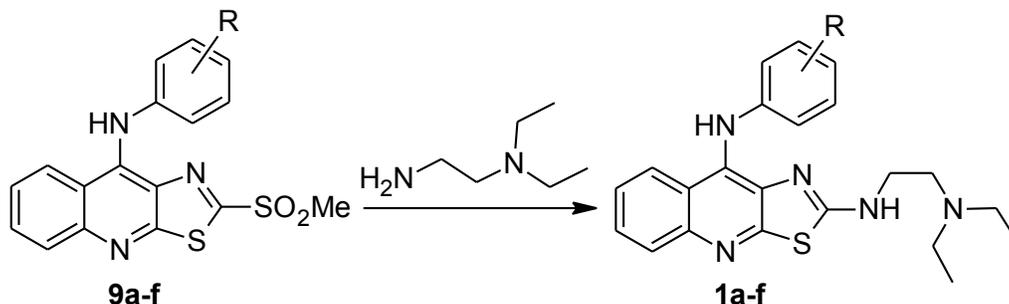
RMN <sup>1</sup>H (espectro 30, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 3.23 (s, 3H) SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; 3.80 (s, 3H) OCH<sub>3</sub>; 7.00 (dd J= 7.2, 1.5 Hz, 2H) H-2',H-6'; 7.31 (dd J= 7.2, 1.5 Hz, 2H) H-3',H-5'; 7.65 (ddd, J= 8.7, 6.3, 1.2, 1H) H-7;

7.90 (ddd, J= 8.7, 6.3, 1.2 Hz, 1H) H-6; 7.99 (dd, J= 8.7, 1.2, 1H) H-5; 8.66 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-8; 10.7 (br, 1H) NH;

RMN <sup>13</sup>C (espectro 31, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 40.7, 55.4, 113.9, 116.7, 124.4, 124.9, 126.7, 128.3, 128.6, 132.61, 132.69, 133.0, 139.9, 147.3, 157.7, 158.6, 173.8

EM (espectro 32, FAB, m/z): 387, (M<sup>+</sup>+1, 100%)

## 7.1.3.6 Método general para la obtención de derivados de 2-[2-(N,N-dietilamino)etilamino-9-anilino]tiazolo[5,4-b]quinolina (1a-f)



9a-f

1a-f

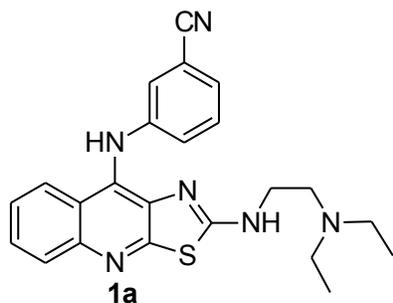
*Método A)*

En un matraz de fondo redondo se colocaron 0.5 mmol del derivado 2-metilsulfonyl sustituido y 0.5 mL de 2-(N,N-dietilamino)etilamina, la solución rojiza se calentó a 130 °C por 30 minutos. La solución café resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó con 30 mL de diclorometano, la solución amarilla formada se lavó sucesivamente con NaOH 2N (3 x 5 mL), disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (3 x 5 mL) y agua (3 x 5 mL), la fase orgánica se trató con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo ámbar se purificó por cromatografía en columna empleando una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 98:2:0.1 como eluyente.

*Método B)*

En un matraz de fondo redondo se colocaron 0.5 mmol del derivado 2-metilsulfonyl sustituido y se disolvieron en la mínima cantidad de DMF (1-2 mL) y se enfrió a 0 °C. A la solución rojiza se añadieron 0.1 mL (0.7 mmol) de 2-(N,N-dietilamino)etilamina y dejó en agitación durante 3 horas. Durante el transcurso de la reacción, la solución rojiza se tornó ámbar. Transcurrido el tiempo de reacción la solución naranja se vertió lentamente en 10 mL de solución saturada de NaCl con agitación vigorosa y se dejó así toda la noche protegida de la luz. El precipitado amarillo formado se separó por filtración al vacío y se lavó dos veces con 5 mL de agua destilada y se dejó secar al aire. El sólido color ligeramente amarillo se trató con éter diisopropílico caliente y se dejó secar nuevamente al aire.

**7.1.3.6.1 9-[[3-Ciano]fenil]amino}-2-[2-(*N,N*-dietilamino)]etilaminotiazolo[5,4-*b*]quinolina (1a)**



Aspecto: Sólido amarillo pálido

Rendimiento: 143 mg (69%)

Punto de fusión 110-111 °C

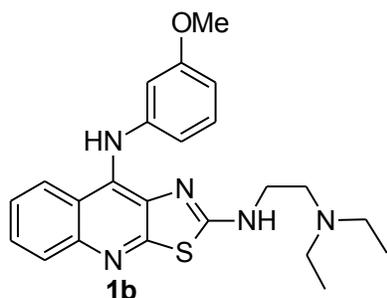
IR (espectro 33, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3311 (NH), 2966, 2810 (CH); 2227 (CN); 1600, 1560, 1476 (aromáticos);

RMN  $^1\text{H}$  (espectro 34,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 1.02 (t,  $J=7.2$  Hz, 6H) 2- $\text{CH}_3$ ; 2.55 (c,  $J=7.2$  Hz, 4H)  $\text{CH}_2$ ; 2.68 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H)  $\text{CH}_2$ ; 3.48 (c,  $J=6.9$  Hz, 2H)  $\text{NHCH}_2$ ; 6.44 (sa, 1H) -NH-; 7.00 (s, 1H) -NHAr-; 7.04 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H) H-6'; 7.08 (s, 1H) H-2'; 7.18 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H) H-4'; 7.26 (t,  $J=8.1$ , 1H) H-5'; 7.37 (ddd;  $J=8.7$ , 6.9,

1.2Hz; 1H) H-7; 7.60 (ddd;  $J=8.7$ , 6.9, 1.5 Hz; 1H) H-6; 7.67 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H) H-5; 8.03 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H) H-8;

EM (espectro 35, FAB,  $m/z$ ): 417 ( $\text{M}^+ + 1$ , 100%)

**7.1.3.6.2 9-[[3-Metoxi]fenil]amino}-2-[2-(*N,N*-dietilamino)]etilaminotiazolo[5,4-*b*]quinolina (1b)**



Aspecto: Sólido café claro

Rendimiento: 105 mg (50%)

Punto de fusión 118-120 °C

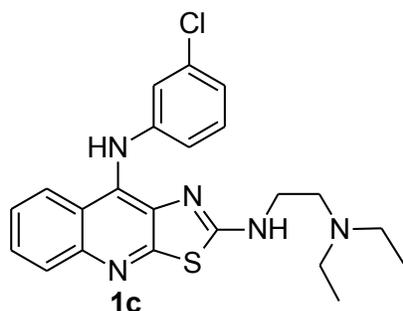
IR (espectro 36, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3120 (NH), 3053, 2966 2850 (CH), 1595, 1571, 1543, 1503, 1476, (aromáticos),

RMN  $^1\text{H}$  (espectro 37,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ): 0.88 (t,  $J=7.2$  Hz, 6H) 2- $\text{CH}_3$ ; 2.41 (c,  $J=7.2$  Hz, 4H)  $\text{CH}_2$ ; 2.45 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H)  $\text{CH}_2$ ; 3.23 (c,  $J=6.9$  Hz, 2H)  $\text{NHCH}_2$ ; 6.74 (m, 3H) H-2', H-4', H-6'; 7.25 (t,  $J=8.7$  Hz) H-5'; 7.60 (ddd,  $J=8.4$ , 6.6, 1.2 Hz) H-7; 7.84 (ddd,  $J=8.7$ , 6.6, 1.2 Hz) H-6; 7.97 (dd,  $J=8.7$ , 0.9 Hz) H-5; 8.53

(d,  $J=8.4$  Hz) H-8; 8.13 (sa, t,  $J=6.9$ , 1H) -NH-; 8.29 (s, 1H) -NHAr-;

EM (espectro 38, EI,  $m/z$ ): 421 ( $\text{M}^+$ , 18%), 322 (M-99, 80%), 86 (M-335, 100%)

**7.1.3.6.3 9-[[3-Cloro]fenil]amino}-2-[2-(*N,N*-dietilamino)]etilaminotiazolo[5,4-*b*]quinolina (1c)**



Aspecto: Sólido color crema

Rendimiento: 148 mg (70%)

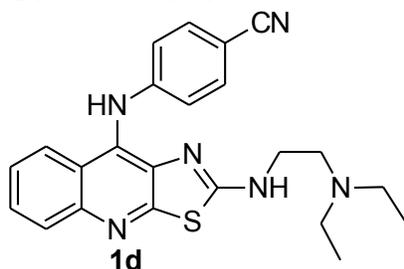
Punto de fusión 109-110 °C.

IR (espectro 39, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3411 (NH), 2966, 2919, 2849 (CH); 1549, 1561, 1475 (aromáticos);

RMN  $^1\text{H}$  (espectro 40,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ ): 1.10 (t,  $J=7.2$  Hz, 6H) 2- $\text{CH}_3$ ; 2.97 (c,  $J=7.2$  Hz, 4H)  $\text{CH}_2$ ; 3.10 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H)  $\text{CH}_2$ ; 3.59 (c,  $J=6.9$  Hz, 2H)  $\text{NHCH}_2$ ; 6.78 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H) H-6'; 6.90 (d,  $J=8.1$  Hz, 1H) H-4'; 7.20 (t,  $J=8.1$ , 1H) H-5'; 7.30 (s, 1H) H-2'; 7.51 (ddd;  $J=8.7$ , 6.9, 1.2Hz; 1H) H-7; 7.64 (ddd;  $J=8.7$ , 6.9, 1.5 Hz; 1H) H-6; 7.90 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H) H-5; 8.22 (d,  $J=$

8.7 Hz, 1H) H-8; 8.97 (br, t,  $J=6.9$ , 1H) -NH-; 9.22 (s, 1H) -NHAr-;

EM (espectro 41, FAB,  $m/z$ ): 426 ( $\text{M}^+ + 1$ , 40%), 86 (M-339, 100%)

**7.1.3.6.4 9-[[4-(Ciano)fenil]amino]-2-[2-(*N,N*-dietilamino)]etilaminotiazolo[5,4-*b*]quinolina (1d)**


Aspecto: Sólido color amarillo claro

Rendimiento: 127 mg (61%)

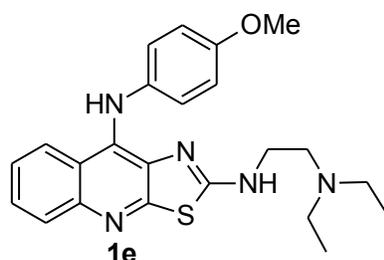
Punto de fusión: 114-115 °C.

IR (espectro 42, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3320 (NH); 2967, (CH) 2216 (CN), 1602, 1580, 1560, 1511 (aromáticos);

RMN  $^1\text{H}$  (espectro 43, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 1.10 (t,  $J=7.2$  Hz, 6H) 2- $\text{CH}_3$ ; 2.97 (c,  $J=7.2$  Hz, 4H)  $\text{CH}_2$ ; 3.10 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H)  $\text{CH}_2$ ; 3.59 (c,  $J=6.9$  Hz, 2H)  $\text{NHCH}_2$ ; 6.84 (d,  $J=8.4$  Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.55 (m, 3H) H-3', H-5', H-7; 7.64 (ddd;  $J=7.2, 6.9, 1.2$  Hz;

1H) H-6; 7.91 (d,  $J=7.8$  Hz, 1H) H-5; 8.04 (d,  $J=8.4$  Hz, 1H) H-8; 8.50 (br, 1H) -NH- 9.3 (s, 1H) -NH-

EM (espectro 44, FAB,  $m/z$ ): 430 ( $M^+ + 1$ , 50%) 86 ( $M - 344$ , 100%)


**7.1.3.6.5 9-[[4-(Metoxi)fenil]amino]-2-[2-(*N,N*-dietilamino)]etilaminotiazolo[5,4-*b*]quinolina (1e)**

Aspecto: Sólido amarillo claro

Rendimiento: 136 mg (65%)

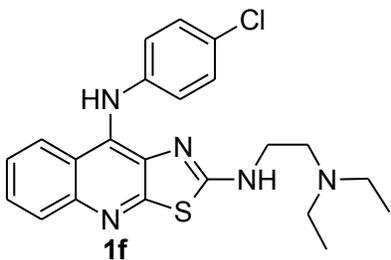
Punto de fusión 110-112 °C

IR (espectro 45, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3179 (NH) 2966, 2827, (CH); 1599, 1563, 1508, 1495, 1469 (aromáticos). 1236 ( $\text{OCH}_3$ );

RMN  $^1\text{H}$  (espectro 46, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 0.88 (t,  $J=7.2$  Hz, 6H) 2- $\text{CH}_3$ ; 2.41 (c,  $J=7.2$  Hz, 4H)  $\text{CH}_2$ ; 2.45 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H)  $\text{CH}_2$ ;

3.23 (c,  $J=6.9$  Hz, 2H)  $\text{NHCH}_2$ ; 3.68 (s, 3H)  $\text{OCH}_3$ ; 6.80 (m, 4H) H-2', H-6', H-3', H-5'; 7.36 (ddd;  $J=8.7, 6.9, 0.9$  Hz; 1H) H-7; 7.52 (ddd;  $J=8.7, 6.9, 0.9$  Hz; 1H) H-6; 7.79 (dd,  $J=8.7, 0.9$  Hz, 1H) H-5; 8.06 (dd,  $J=8.7, 0.9$  Hz, 1H) H-8; 8.13 (br, t,  $J=6.9$ , 1H) -NH-; 8.29 (s, 1H) NHAr;

EM (espectro 47, EI,  $m/z$ ): 421 ( $M^+$ , 15%), 322 ( $M - 99$ , 80%), 86 ( $M - 335$ , 100%)

**7.1.3.6.6 9-[[4-(Cloro)fenil]amino]-2-[2-(*N,N*-dietilamino)]etilaminotiazolo[5,4-*b*]quinolina (1f)**


Aspecto: Sólido amarillo claro

Rendimiento: 133 mg (63%)

Punto de fusión 113-114 °C

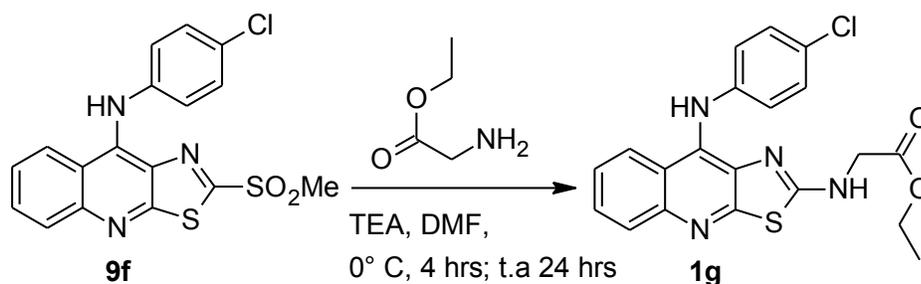
IR (espectro 48, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3410 (NH), 2965, 2809, (CH); 1600, 1586, 1566 (aromáticos);

RMN  $^1\text{H}$  (espectro 49, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 1.08 (t,  $J=7.2$  Hz, 6H) 2- $\text{CH}_3$ ; 2.94 (c,  $J=7.2$  Hz, 4H)  $\text{CH}_2$ ; 3.08 (t,  $J=6.9$  Hz, 2H)  $\text{CH}_2$ ; 3.58 (c,  $J=6.9$  Hz, 2H)  $\text{NHCH}_2$ ; 6.82 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.21 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H) H-3', H-5'; 7.48 (ddd;  $J=8.7, 6.9,$

1.2 Hz; 1H) H-7; 7.60 (ddd;  $J=8.7, 6.9, 1.5$  Hz; 1H) H-6; 7.88 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H) H-5; 8.16 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H) H-8; 8.4 (br, t,  $J=6.9$ , 1H) -NH-; 8.91 (s, 1H) -NHAr-;

EM (espectro 50, FAB,  $m/z$ ): 426 ( $M^+ + 1$ , 40%), 86 ( $M - 339$ , 100%)

### 7.1.3.7 Incorporación de aminoácidos en la posición 2. Obtención de 2-[(carboximetil)amino]-9-[[4-cloro]fenil]amino}tiazolo[5,4-*b*]quinolina (**1g**)



Se siguió una metodología similar a la descrita bajo método B en la sección anterior. En un matraz de fondo redondo se colocaron 0.5 mmol del derivado 2-metilsulfonyl sustituido y se disolvieron en la mínima cantidad de DMF (1-2 mL) y se enfrió a 0° C, a la solución rojiza se añadieron 137 mg (1.0 mmol) de clorhidrato de glicinato de etilo y 0.1 mL de trietilamina y la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 4 horas. Durante el transcurso de la reacción, la solución rojiza se tornó amarilla. Se retiró el sistema de enfriamiento y se dejó en agitación durante 24 horas más. Transcurrido el tiempo de reacción la solución naranja se vertió lentamente en 10 mL de disolución saturada de NaCl con agitación vigorosa. El precipitado amarillo formado se separó por filtración al vacío y se lavó con dos veces con 5 mL de agua destilada y se dejó secar al aire. Una vez seco, el crudo se disolvió en 10 mL de metanol y se filtró cualquier material insoluble, se concentró a presión reducida, hasta dejar un volumen de aproximadamente 2 mL y se recrystalizó de metanol-agua, para obtener 145 mg (70 %) del compuesto **1g** como agujas color crema, con un punto de fusión de 75-76 °C.

IR (espectro 51, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3357 (NH) 2981, (CH); 1738 (C=O); 1603, 1561, 1490, (aromáticos); 1203 (OCH);

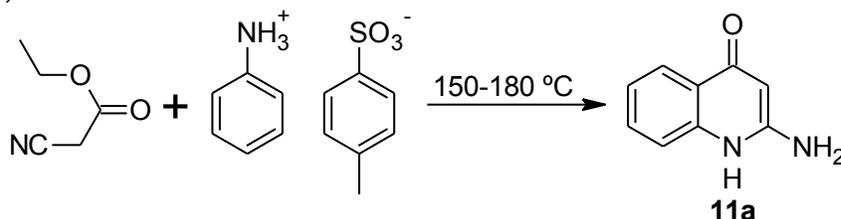
RMN  $^1\text{H}$  (espectro 52, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 1.16 (t,  $J=7.2$  Hz, 6H)  $\text{CH}_3$ ; 4.02 (d,  $J=6.3$  Hz, s con  $\text{D}_2\text{O}$  2H)  $\text{NHCH}_2$ ; 4.05 (c,  $J=7.2$  Hz, 4H)  $\text{OCH}_2$ ; 6.82 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.21 (d,  $J=8.7$  Hz, 2H) H-3', H-5'; 7.46 (ddd;  $J=8.7, 6.9, 0.9$  Hz; 1H) H-7; 7.59 (ddd;  $J=8.7, 6.9, 0.9$  Hz; 1H) H-6; 7.87 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H) H-5; 8.12 (d,  $J=8.7$  Hz, 1H) H-8; 8.71 (br, t,  $J=6.3$ , 1H) -NH-; 8.78 (s, 1H) NHAr;

EM (espectro 53,  $m/z$ ): 413 ( $M^++1$ , 100%)

### 7.1.4 Derivados de 9-anilino-2-metil-(3*H*)-imidazo[4,5-*b*]quinolina

#### 7.1.4.1 2-amino-4-quinolona (**11a**)

Método A)<sup>166</sup>

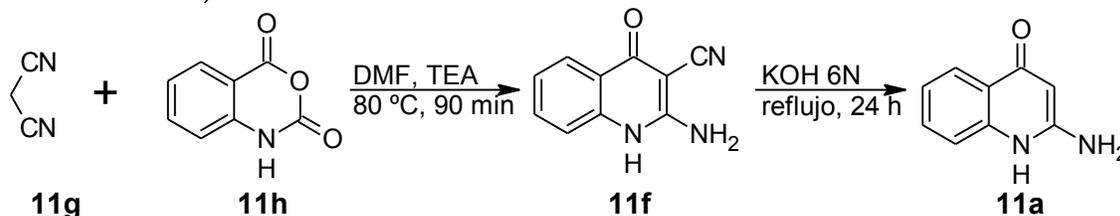


En un matraz de fondo redondo, con agitación magnética en condiciones anhidras y bajo atmósfera de nitrógeno, se colocaron 11.3 g (0.1 mol) de cianoacetato de etilo y 26.3 g (0.1 mol) de *p*-toluensulfonato de anilino, la mezcla se calentó a 150 °C por 20 minutos y luego a 180 °C por 90 minutos. Transcurrido el tiempo la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregó lentamente una disolución saturada de bicarbonato de sodio hasta alcanzar pH= 7-8, formándose un residuo resinoso color rojizo. La fase acuosa se decantó y al residuo se le

agregaron 50 mL de cloroformo, la suspensión formada se calentó a reflujo por 10 minutos y se filtró en caliente quedando un sólido de color blanco, el cual se recrystalizó de metanol-agua para dar 4.2 g (26%) de hojuelas blancas de 2-amino-4-quinolona con un Rf de 0.35 (sistema V) y un punto de fusión mayor a 300 °C (Lit. >300 °C<sup>166</sup>).

IR (espectro 54, KBr, cm<sup>-1</sup>) 3306, 3168 (NH); 1646 (C=O); 1596, 1550, 1509, 1497(aromáticos); RMN <sup>1</sup>H (espectro 55, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 5.25 (s, 1H) =CH; 6.18 (s, intercambia D<sub>2</sub>O 2H) NH<sub>2</sub>; 7.09 (ddd; J= 8.7, 6.9, 0.9 Hz; 1H) H-7; 7.25 (d, J= 8.7 Hz, 1H) H-8; 7.42 (ddd; J= 8.7, 6.9, 1.5 Hz, 1H) H-6; 7.90 (dd, J= 8.7, 1.5 Hz, 1H) H-5; EM (espectro 56, EI, m/z): 160 (M<sup>+</sup>, 100%)

Método B) (adaptada de la ref. 170)



### 1. Obtención de 2-amino-3-ciano-4-quinolona 11f

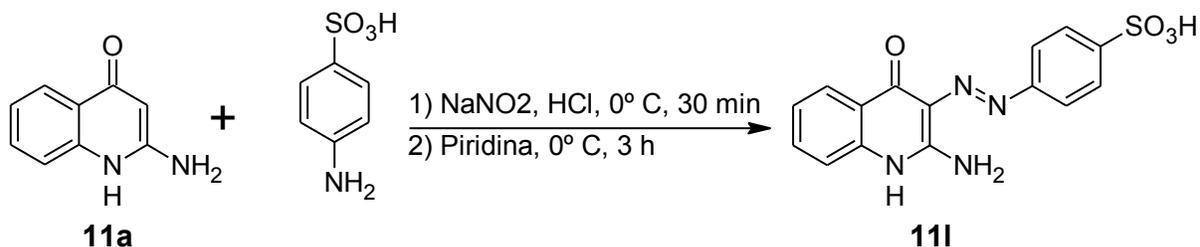
En un matraz de fondo redondo de tres bocas acondicionado con trampa de humedad, termómetro y embudo de adición de sólidos, se colocaron 150 mL de DMF, 21.8 g (20.8 mL, 0.33 mol) de malononitrilo **11g** y 33.4 g (46 mL, 0.33 mol) de trietilamina y se calentó la mezcla a 50 °C durante 15 minutos formándose una solución naranja. Posteriormente se agregaron lentamente 49.8 g (0.305 mol) de anhídrido isatoico **11h** a través del embudo de adición de sólidos, la solución se puso inmediatamente de color negro y se observó el desprendimiento de un gas. Terminada la adición se elevó la temperatura a 80° C y se calentó por 90 minutos, transcurrido dicho tiempo se dejó enfriar en un baño de hielo-agua y se agregó una disolución fría de HCl al 5% hasta alcanzar un pH= 6-8, formándose un precipitado de color amarillo claro que se aisló por filtración al vacío y se dejó secar por al aire, obteniéndose 51.9 g del compuesto **11f**. Este crudo es de calidad suficiente para la obtención de la 2-amino-4-quinolona **11a**, una muestra analítica se obtuvo por recrystalización de DMF obteniéndose un sólido cristalino en forma de hojuelas de color blanco con un punto de fusión mayor a 300° C (Lit >300 °C<sup>166,170</sup>) y un Rf de 0.64 (sistema V).

IR (espectro 57 KBr, cm<sup>-1</sup>) 3417, 3330, 3221 (NH); 2219 (-CN); 1655 (C=O); 1596, 1561, 1525 (aromáticos)

### 2. Obtención de 2-amino-4-quinolona 11a

En un matraz de fondo redondo de 1 litro acondicionado con un refrigerante se colocó el crudo de la reacción anterior y se agregaron 500 mL de una disolución de KOH 6N, la solución de color rojizo se calentó a reflujo por 24 horas, al término de las cuales se tornó de color ámbar. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y luego se colocó en un baño de hielo-agua, posteriormente a ésta solución se agregó ácido acético hasta alcanzar un pH entre 6-8, punto en el cual se observó la precipitación de un sólido amorfo blanco el cual se separó por filtración al vacío, se dejó secar parcialmente al aire y luego en estufa a 100° C durante 24 horas, quedando 42.0 g (86% a partir del anhídrido isatoico) de 2-amino-4-quinolona **11a**. Este producto coincidió en Rf, punto de fusión y en sus propiedades espectroscópicas y espectrométricas con el obtenido por el método A.

#### 7.1.4.2 Ácido 4-[2-(amino-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-il)diazenil]bencensulfónico (11l)



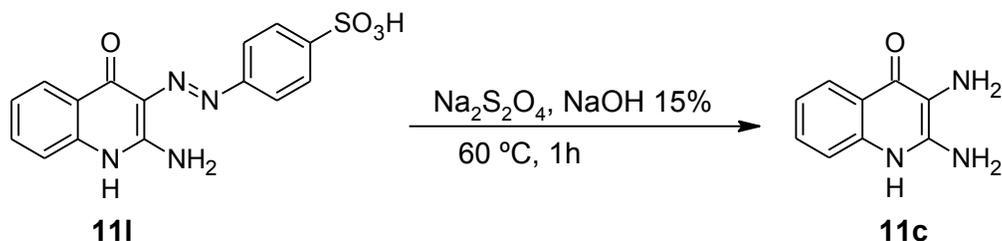
En un vaso de precipitados con agitación magnética se suspendieron 10.0 g (62.5 mmol) de 2-amino-4-quinolona **11a** en 30 mL de piridina y la mezcla se enfrió a  $-5^\circ \text{C}$ . Por otra parte, en un matraz Erlenmeyer también con agitación magnética, se colocaron 11.5 g (66.4 mmol) de ácido sulfanílico y 15 mL de una disolución de HCl al 50%, la mezcla se enfrió a  $-5^\circ \text{C}$  mediante un baño de hielo-sal y se le agregaron lentamente y por goteo con pipeta, 4.7 g (68.1 mmol) de nitrito de sodio disueltos en 4 mL de agua fría, sin permitir que la temperatura superara los  $10^\circ \text{C}$ , esta suspensión blanca se dejó en agitación por 30 minutos cuidando que la temperatura permaneciera inferior a  $10^\circ \text{C}$ , transcurrido dicho tiempo, la suspensión de la sal de diazonio se agregó mediante una pipeta a la suspensión de **11a** en piridina sin permitir que la temperatura superara los  $10^\circ \text{C}$ . Terminada la adición la suspensión naranja brillante formada se dejó en agitación a temperatura ambiente por 3 horas, transcurridas las cuales se agregaron 50 mL de agua-hielo. En la mezcla de reacción se formó un precipitado naranja se separó por filtración al vacío y se lavó sucesivamente con 25 mL de agua destilada, con 50 mL de HCl al 5% y con agua destilada hasta que los lavados fueron neutros y se dejó secar al aire, obteniéndose 19.5 g (91%) del compuesto **11I** con un punto de fusión mayor a  $300^\circ \text{C}$

IR (espectro 58, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3278, 3080 (NH); 1682 (C=O); 1620, 1510, 1497(aromáticos); 1475 (-N=N-);

RMN  $^1\text{H}$  (espectro 59, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 7.23 (ddd;  $J = 8.4, 6.9, 1.2 \text{ Hz}$ ; 1H) H-7; 7.31 (d,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , 1H) H-8; 7.58 (ddd;  $J = 8.4, 6.9, 0.9 \text{ Hz}$ , 1H) H-6; 7.68 (sa, 4H) H-2', H-3', H-5, H-6', 8.10 (d,  $J = 8.4 \text{ Hz}$ , 1H) H-5;

EM (espectro 60, FAB,  $m/z$ ): 345 ( $M^+ + 1$ , 100%)

#### 7.1.4.3 2,3-diamino-4-quinolona (**11c**)

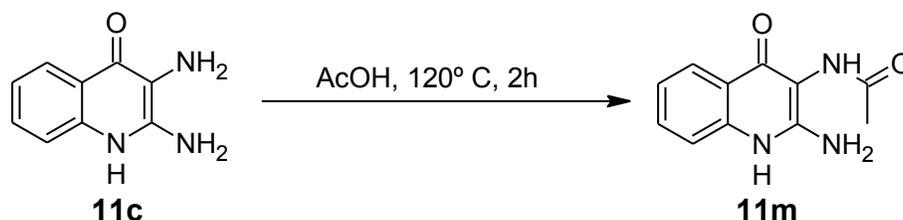


En un vaso de precipitados se colocaron 75 mL de una disolución de NaOH al 15% y se calentó a  $60^\circ \text{C}$ , punto en el que se añadieron lentamente 10 g (29 mmol) del compuesto **11I** para obtener una solución rojo carmín a la cual se agregaron 20 g (92 mmol) de ditionito sódico técnico (pureza del 85%) y se dejó agitar a dicha temperatura por una hora, durante el transcurso de la reacción se observó decoloración de la solución a amarillo claro y la formación de un precipitado blanco, verificándose que el pH estuviera entre 8 y 9. [Cuando no ocurrió así, la mezcla de reacción se llevó a este rango de pH con la adición de HCl diluido (precaución: formación de vapores de olor desagradable)]. La suspensión aún caliente se filtró al vacío

aislándose el precipitado blanco formado, éste se lavó con acetona fría y se dejó secar al aire para obtener 4.36 g (86 %) de 2,3-diamino-4-quinolona **11c**, como un sólido blanco con un Rf de 0.30 (sistema V) y un punto de fusión mayor a 300 °C

IR (espectro 61, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3342, 3133 (NH); 1649 (C=O); 1605, 1565, 1493 (aromáticos);  
 RMN  $^1\text{H}$  (espectro 62, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 5.99 (s, intercambia  $\text{D}_2\text{O}$ , 2H)  $\text{NH}_2$ ; 7.09 (ddd; J= 8.7, 6.9, 1.2 Hz; 1H) H-7; 7.25 (d, J= 8.7 Hz, 1H) H-8; 7.42 (ddd; J= 8.7, 6.9, 1.5 Hz, 1H) H-6; 7.90 (dd, J= 8.7, 1.5 Hz, 1H) H-5;  
 EM (espectro 63, FAB, m/z): 176 ( $\text{M}^+ + 1$ , 100%)

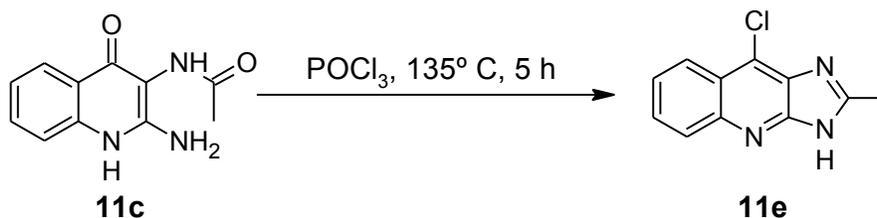
#### 7.1.4.4 3-acetamido-2-amino-4-quinolona (**11m**)



En un vaso de precipitados se colocaron 2 g (11.4 mmol) del compuesto **11c** y 10 mL de ácido acético, la mezcla de reacción se calentó a reflujo por 2 horas, al término de las cuales se agregaron 20 mL de agua fría a la mezcla de reacción, formándose un precipitado color crema que se aisló por filtración al vacío y se lavó sucesivamente con agua y acetona para dar 2.01 g (81 %) de 3-acetamido-2-amino-4-quinolona **11m** como hojuelas blancas con un Rf de 0.59 (sistema V) y un punto de fusión mayor a 300 °C

IR (espectro 64, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3208, 3174 (NH); 1672 (C=O); 1629, 1560 1497(aromáticos);  
 RMN  $^1\text{H}$  (espectro 65, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 2.19 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ); 6.48 (s, intercambia  $\text{D}_2\text{O}$ , 2H)  $\text{NH}_2$ ; 7.17 (ddd; J= 8.7, 6.9, 1.2 Hz; 1H) H-7; 7.34 (d, J= 8.7 Hz, 1H) H-8; 7.51 (ddd; J= 8.7, 6.9, 1.5 Hz, 1H) H-6; 7.93 (dd, J= 8.7, 1.5 Hz, 1H) H-5; 10.96 (sa, 1H)  $\text{NHAc}$   
 EM (espectro 66, FAB, m/z): 217 ( $\text{M}^+ + 1$ , 100%)

#### 7.1.4.5 9-Cloro-2-metilimidazo[4,5-b]quinolina (**11e**)

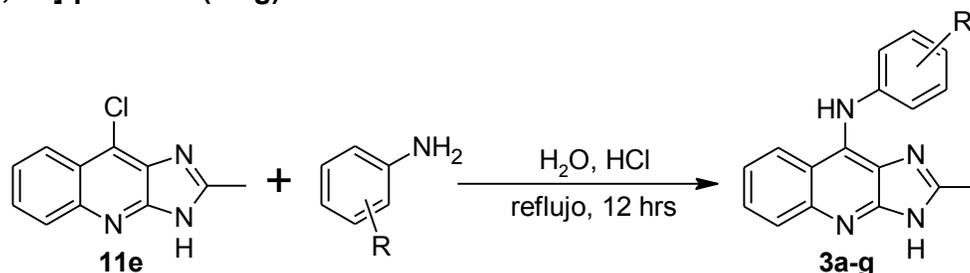


En un matraz de fondo redondo con agitación magnética, adaptado con refrigerante y trampa de humedad, se colocaron 2.5 g (11.5 mmol) del compuesto **11c** y 5 mL de  $\text{POCl}_3$ . La mezcla de reacción se calentó a 130-135 °C durante 5 horas. Durante el transcurso de la reacción, se observó disolución del compuesto **11c** y formación de una solución espesa de color café. Al término del tiempo de reacción se eliminó el  $\text{POCl}_3$  residual por destilación a presión reducida. Al residuo color café se le añadieron lentamente y con precaución 10 mL de agua fría y se dejó en agitación hasta que la solución café alcanzara temperatura ambiente. En este punto se filtró cualquier material insoluble y el filtrado se llevó a pH= 7-8 con una disolución saturada de carbonato de sodio, precipitando un sólido café claro que se aisló por filtración al

vacío dando 2.5 g (72 %) de un sólido ligeramente café con un Rf de 0.3 (sistema V) y un p.f. de 230 °C

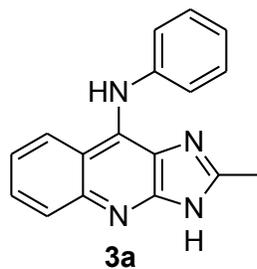
IR (espectro 67, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3414, 3031 (NH); 1647, 1584, 1537, 1511 (aromáticos);  
 RMN  $^1\text{H}$  (espectro 68, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 2.62 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ); 7.61 (ddd;  $J= 8.7, 6.9, 1.2$  Hz; 1H) H-7;  
 7.72 (ddd;  $J= 8.7, 6.9, 1.5$  Hz, 1H) H-6; 8.03 (dd,  $J= 8.7, 1.5$  Hz, 1H) H-5; 8.25 (d,  $J= 8.7$  Hz, 1H)  
 H-12.5 (sa, 1H) Imidazol-NH  
 EM (espectro 69, FAB,  $m/z$ ): 218 ( $M^+ + 1$ , 100%), 219 ( $M^+ + 1 + 2$ , 30%)

#### 7.1.4.6 Método general para la preparación de los derivados de 9-fenilamino-2-metil-3H-imidazo[4,5-b]quinolina (3a-g)



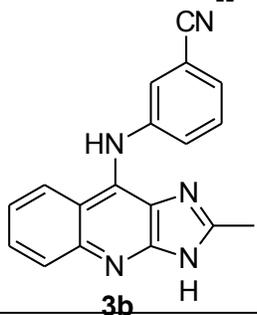
En un matraz de fondo redondo con agitación magnética y adaptado con refrigerante se colocaron 50 mg (0.23 mmol) del compuesto **11e**, 5 mL de agua destilada y 5 gotas de HCl concentrado y se puso en agitación durante 5 minutos, a la solución ligeramente roja se le agregaron 0.3 mmol de la anilina con el patrón de sustitución deseado y se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 12 horas. Al terminar el tiempo de reacción, la solución ligeramente roja se llevó a  $\text{pH} = 8$  con una disolución de hidróxido de amonio, punto en el que precipitó un sólido que se aisló por filtración al vacío y se lavó con agua destilada y éter dietílico.

##### 7.1.4.6.1 9-(Fenilamino)-2-metil-3H-imidazo[4,5-b]quinolina (3a)



Aspecto: Sólido blanco  
 Rendimiento: 50 mg (79%)  
 Punto de fusión:  $>250$  °C  
 Rf: 0.32 (sistema III)  
 IR (espectro 70, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3358, 3039 (NH), 1645, 1588, 1542, 1495 (aromáticos)  
 RMN  $^1\text{H}$  (espectro 71, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 2.48 (s, 3H)  $\text{CH}_3$ , 6.85 (t,  $J= 7.2$  Hz, 1H) H-4', 7.00 (dd,  $J= 7.2, 2.1$  Hz, 2H) H-2', H-6', 7.18 (td,  $J= 7.2, 2.1$  Hz, 2H) H-3', H-5', 7.34 (dd,  $J= 8.1, 6.9$  Hz, 1H) H-7, 7.58 (dd,  $J= 8.1, 6.9$  Hz, 1H) H-6, 7.89 (d,  $J= 8.1$  Hz, 1H) H-5, 8.18 (d,  $J= 8.4$  Hz, 1H) H-8, 8.92 (sa, intercambia  $\text{D}_2\text{O}$ , 1H) -NHAr, 12.5 (sa, intercambia  $\text{D}_2\text{O}$ , 1H) NH  
 EM (espectro 72, FAB,  $m/z$ ): 275 ( $M^+ + 1$ , 100%)

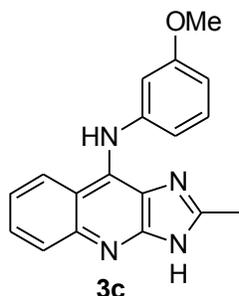
##### 7.1.4.6.2 9-[[3-(Ciano)fenil]amino]-2-metil-3H-imidazo[4,5-b]quinolina (3b)



Aspecto: Sólido blanco  
 Rendimiento: 49 mg (71%)  
 Punto de fusión:  $>250$  °C  
 Rf: 0.34 (sistema III)  
 IR (espectro 73, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3335 (NHAr), 3065 (NH), 2230 (CN), 1640, 1581, 1538 (aromáticos);

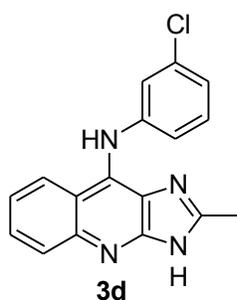
RMN <sup>1</sup>H (espectro 74, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 2.49 (s, 3H) CH<sub>3</sub>, 7.24 (d, J= 8.1 Hz, 1H) H-4', 7.26 (t, J= 7.5 Hz, 1H) H-5', 7.29 (s, 1H) H-2', 7.37 (d, J=8.1 Hz, 1H) H-6', 7.40 (dd, J= 8.1, 6.9 Hz, 1H) H-7, 7.63 (dd, J= 8.1, 6.9 Hz, 1H) H-6, 7.92 (d, J= 8.1 Hz, 1H) H-5, 8.22 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-8, 9.29 (sa, intercambia D<sub>2</sub>O, 1H) –NHAr, 12.6 (sa, intercambia D<sub>2</sub>O, 1H) NH;  
EM (espectro 75, FAB, m/z): 300 (M<sup>+</sup>+1, 100%)

**7.1.4.6.3 9-[[3-(Metoxi)fenil]amino]-2-metil-3H-imidazo[4,5-b]quinolina (3c)**



Aspecto: Sólido blanco  
Rendimiento: 49 mg (70%)  
Punto de fusión: >250° C  
Rf: 0.35 (sistema III)  
IR (espectro 76, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3381, 3001 (NH), 1649, 1591, 1542, 1514, 1489 (aromáticos)  
RMN <sup>1</sup>H (espectro 77, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 2.50 (s, 3H) CH<sub>3</sub>, 3.63 (s, 3H) O-CH<sub>3</sub>, 6.41 (dd, J= 7.8, 2.1 Hz, 1H) H-4', 6.50 (d, J= 7.8 Hz, 1H) H-6', 6.51 (sa, 1H) H-2', 7.05 (t, J=7.8 Hz, 1H) H-5', 7.33 (dd, J= 8.1, 6.9 Hz, 1H) H-7, 7.57 (dd, J= 8.1, 6.9 Hz, 1H) H-6, 7.90 (d, J= 8.1 Hz, 1H) H-5, 8.12 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-8, 8.88 (sa, intercambia D<sub>2</sub>O, 1H) –NHAr,  
EM (espectro 78, FAB, m/z): 305 (M<sup>+</sup>+1, 100%)

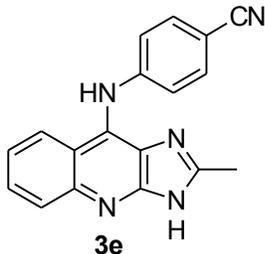
**7.1.4.6.4 9-[[3-(Cloro)fenil]amino]-2-metil-3H-imidazo[4,5-b]quinolina (3d)**



Aspecto: Sólido blanco  
Rendimiento: 55 mg (77%)  
Punto de fusión: >250° C  
Rf: 0.33 (sistema III)  
IR (espectro 79, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3417 (NH), 1641, 1590, 1542, 1512, 1481 (aromáticos)  
RMN <sup>1</sup>H (espectro 80, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 2.50 (s, 3H) CH<sub>3</sub>, 6.86 (d, J= 8.0 Hz, 2H) H-4', H-6'; 6.97 (d, J= 2.0 Hz, 1H) H-2', 7.17 (t, J=8.0 Hz, 1H) H-5', 7.39 (dd, J= 8.1, 6.9 Hz, 1H) H-7, 7.62 (dd, J= 8.1, 6.9 Hz, 1H) H-6, 7.92 (d, J= 8.1 Hz, 1H) H-5, 8.17 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-8, 9.16 (sa, intercambia

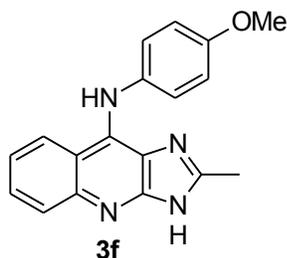
D<sub>2</sub>O, 1H) –NHAr,  
EM (espectro 81, FAB, m/z): 309 (M<sup>+</sup>+1, 100%)

**7.1.4.6.5 9-[[4-(Ciano)fenil]amino]-2-metil-3H-imidazo[4,5-b]quinolina (3e)**

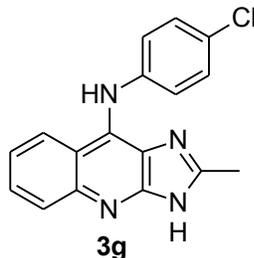


Aspecto: Sólido blanco  
Rendimiento: 47 mg (68.5%)  
Punto de fusión: >250° C  
Rf: 0.33 (sistema III)  
IR (espectro 82, KBr, cm<sup>-1</sup>): 3330, 3035 (NH), 2220 (CN), 1643, 1608, 1591, 1514 (aromáticos)  
RMN <sup>1</sup>H (espectro 83, DMSO-d<sub>6</sub>, δ): 2.52 (s, 3H) CH<sub>3</sub>, 6.96 (d, J= 8.4 Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.43 (dd, J= 8.4, 6.9 Hz, 1H) H-6; 7.57 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-3', H-5'; 7.64 (dd, J= 8.4, 6.9 Hz, 1H) H-7, 7.96 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-5, 8.14 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-8, 9.57 (sa, intercambia D<sub>2</sub>O, 1H) –NHAr,

EM (espectro 84, FAB, m/z): 300 (M<sup>+</sup>+1, 100%)

**7.1.4.6.6 9-[[4-(Metoxi)fenil]amino]-2-metil-3H-imidazo[4,5-b]quinolina (3f)**

Aspecto: Sólido blanco  
 Rendimiento: 45 mg (64%)  
 Punto de fusión: >250° C  
 Rf: 0.30 (sistema III)  
 IR (espectro 85, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3330, 3000 (NH), 1643, 1619, 1593, 1509, 1461 (aromáticos) 1239 (O-CH<sub>3</sub>)  
 RMN <sup>1</sup>H (espectro 86, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 2.43 (s, 3H) CH<sub>3</sub>, 3.71 (s, 3H) OCH<sub>3</sub>; 6.80 (d, J= 8.7 Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.00 (d, J= 8.7 Hz, 1H) H-3', H-5'; 7.26 (dd, J= 8.4, 6.9 Hz, 1H) H-6; 7.54 (dd, J= 8.4, 6.9 Hz, 1H) H-7, 7.83 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-5, 8.17 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-8, 8.69 (sa, intercambia D<sub>2</sub>O, 1H) -NHAr, 12.53 (sa, 1H) Imidazol-NH  
 EM (espectro 87, FAB, m/z): 305 (M<sup>+</sup>+1, 100%)

**7.1.4.6.7 9-[[4-(Cloro)fenil]amino]-2-metil-3H-imidazo[4,5-b]quinolina (3g)**

Aspecto: Sólido blanco  
 Rendimiento: 50 mg (70.5%)  
 Punto de fusión: >250° C  
 Rf: 0.33 (sistema III)  
 IR (espectro 88, KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3375, 3069 (NH), 1636, 1620, 1588, 1541, 1492 (aromáticos)  
 RMN <sup>1</sup>H (espectro 89, DMSO-d<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 2.48 (s, 3H) CH<sub>3</sub>, 6.93 (d, J= 8.7 Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.20 (d, J= 8.7 Hz, 1H) H-3', H-5'; 7.37 (dd, J= 8.4, 6.9 Hz, 1H) H-6; 7.58 (dd, J= 8.4, 6.9 Hz, 1H) H-7, 7.90 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-5, 8.15 (d, J= 8.4 Hz, 1H) H-8, 9.05 (sa, intercambia D<sub>2</sub>O, 1H) -NHAr,  
 EM (espectro 90, FAB, m/z): 309 (M<sup>+</sup>+1, 100%)

**7.2. Parte de modelado molecular****7.2.1. Análisis conformacional y cálculo de propiedades electrónicas de las moléculas aisladas**

Los estudios de modelaje molecular se realizaron en una computadora PC de 2 GB en RAM utilizando el programa Spartan'08.<sup>153</sup> Las moléculas se construyeron a partir de fragmentos convencionales y se preoptimizó su geometría. Las moléculas se consideraron en su forma neutra. El análisis conformacional se realizó utilizando MMFF 94 como campo de fuerza y el protocolo de Búsqueda Sistemática. La geometría del confórmero de menor energía se optimizó usando el método *ab initio* HF 6-31G\* y se calcularon sus propiedades electrónicas. La distribución electrónica calculada se usó para generar las correspondientes superficies de energía potencial electrostática.

**7.2.2. Modelado molecular de los complejos de intercalación con distintas secuencias de ADN.**

Los estudios de modelado molecular de los complejos de intercalación se realizaron en una computadora PC de 2 GB en RAM utilizando el programa Hyperchem 7.0.<sup>184</sup> De manera inicial los hexanucleótidos con secuencia 5'-CGXYCG-3' (donde XY es cualquier par de base razonable: AA AC, AG, AT, CC, CG, GC TA, TC y TG) se construyeron usando la base de datos de Hyperchem, se añadieron contraiones de sodio y la geometría se optimizó a 0.1 kcal/Å mol mediante el método de *steepest descent*, con el campo de fuerza AMBER 99, una constante

dieléctrica relativa de 4r para simular el efecto del disolvente y un umbral de 15 Å para disminuir las interacciones de repulsión entre los grupos fosfato.<sup>51</sup>

Por otra parte, las moléculas de los compuestos tricíclicos se construyeron a partir de fragmentos convencionales y se preoptimizó su geometría con el campo de fuerza AMBER 99, considerándose las moléculas tanto en su forma neutra como en su forma monocatiónica, su geometría se optimizó usando el método semiempírico AM1 y sus cargas electrostáticas se calcularon con éste.

A continuación se colocó de manera manual el compuesto tricíclico entre los pares de base XY con el anillo de anilina orientado hacia el surco menor y la geometría del complejo de intercalación se optimizó a 0.1 kcal/Å mol. Con esta geometría inicial se realizó un análisis conformacional alrededor de los enlaces que unen al anillo de anilina con el núcleo tricíclico, permitiendo que la geometría del complejo de intercalación se minimizara de nuevo a 0.1 kcal/Å mol. Con la geometría más estable se calculó la energía de formación del complejo mediante las fórmulas  $E_{\text{formación}} = E_{\text{complejo}} - (E_{\text{compuesto}} + E_{\text{ADN}})$ , donde  $E_n$  denota el valor de la energía calculada usando el campo de fuerza AMBER99.

Una vez obtenida la geometría del complejo de menor energía se seleccionaron el compuesto tricíclico y los pares de bases adyacentes a éste y se calculó la energía de ambos pares de bases por separado, del compuesto intercalante y del complejo en su conjunto con el campo de fuerza AM1. Con esta información se calculó la energía de formación del complejo usando la fórmula  $E_{\text{AM1formación}} = E_{\text{AM1complejo}} - (E_{\text{AM1compuesto}} + E_{\text{AM1ADN}})$

Los parámetros helicoidales se calcularon usando el programa X3DNA<sup>192</sup> basándose en la convención de Cambridge.

Los modelos de relación estructura-actividad se generaron mediante el uso del programa BuildQSAR<sup>194</sup> usando el protocolo de Búsqueda Sistemática para 2, 3 y 4 variables, con un índice de correlación cruzada entre las variables consideradas menor a 0.3

### 7.3. Evaluación de la actividad citotóxica

La evaluación de la actividad citotóxica de estos compuestos fue realizada por el M. en C. José D. Solano. Los ensayos fueron realizados de acuerdo al protocolo de microcultivo MTT con algunas modificaciones.<sup>193</sup> Las células se pasaron a placas de 24 micropozos (4.5-5.0 x 10<sup>4</sup> células/mL/pozo) y se inocularon con los compuestos, los cuales se disolvieron en DMSO y se añadieron en un volumen máximo de 2 µl/mL/pozo. Después de 72 horas de incubación, se añadieron 100 µg/mL de MTT disueltos en PBS (pH 7.2). Añadiendo 1 mL de DMSO a cada pozo se solubilizó el azul de formazán. Después de centrifugar, el coeficiente de extinción se midió a 540 nm usando un fotómetro Beckman modelo DU<sup>R</sup>-64. Las determinaciones se realizaron en 3 experimentos independientes y por cuadruplicado. El porcentaje de inhibición celular se determinó por la fórmula %IC= 100 x [1-(absorbancia de células tratadas/absorbancia de células control)].

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Datos de la Organización Mundial de Salud. Recurso en línea. <http://www.who.int/cancer/en/> Accesado el 1 de agosto de 2009.
2. Cancer medicine. Bast, R., Kufe, D., Pollock, R., Weichselbaum, R., Holland, J., Frei, E., Gansler, T. (Eds.) 5a. Edición. B.C. Decker. Canada. 2000.
3. Anticancer Drug Development. Baguley, B., Kerr, D. (Eds.) Academic Press. 1a. Edición. Estados Unidos de América. 2002.
4. Wermuth, C.G. *Drug Discovery Today*, **2006**, 11, 348.
5. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery. Chemotherapeutic Agents. Vol. 5 6a. Edición.
6. Stehelin, D., Varmus, H., Bishop, J., Vogt, P.K., *Nature*, **1976**, 260, 170.
7. Land, H., Parada, L.F., Weinberg, R.A., *Nature*, **1983**, 304, 596.
8. Hennings, H., Glick, A., Greenhalgh, D., Yuspa, S., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1993**, 202, 1-8.
9. Ruddon R.W. Cancer biology, Oxford University Press 3ª. Edición. Nueva York, Estados Unidos de América. 1995.
10. Cunningham, D., Zalcborg, J., Maroun, J., James, R.; Clarke, S., Maughan, T. S., Vincent, M., Schulz, J., Baron, M. G., Facchini, T., *Eur. J. Cancer*, **2002**, 38, 478.
11. Wagstaff, A. J., Ibbotson, T., Goa, K. L., *Drugs*, **2003**, 63, 217.
12. De Cian, A., Lacroix, L., Douarre, C., Temime-Smaali, N., Trentesaux, C., Riou, J., Mergny, J., *Biochimie*, **2008**, 90, 131.
13. Martins, C., Gunaratnam, M., Stuart, J., Makwana, V., Greciano, O., Reszka, A.P., Kelland, L.R., Neidle, S., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 2293.
14. Konstantinopoulos, P. A., Karamouzis, M.V., Papatsoris, A.G., Papavassiliou, A.G., *Int J Biochem Cell Biol*, **2008**, 40, 1156-68.
15. Moroy, G., Denhez, C., El Mourabit, H., Toribio, A., Dassonville, A., Decarme, M., Renault, J.H., Mirand, C., Bellon, G., Sapi, J., Alix, A.J.P., Hornebeck, W., Bourguet, E., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15, 4753.
16. Huwe, A., Mazitschek, R., Giannis, A., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2003**, 42, 2122.
17. Lin, R., Chiu, G., Yu, Y., Connolly, P.J., Li, S., Lu, Y., Adams, M., Fuentes-Pesquera, A.R., Emanuel, S., Greenberger, L.M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 4557.
18. Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., Pavletich, N. P., *Nature*, **1999**, 401, 188.
19. Rodriguez, M., Aquino, M., Bruno, I., De Martino, G., Taddei, M., Gomez-Paloma, L., *Curr. Med. Chem.*, **2006**, 13, 1119.
20. Leonard, D. M. *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 2971.
21. Troutman, J.M., Andres, D.A., Spielmann, H.P. *Biochemistry*, **2007**, 46, 11299.
22. Osheroff, N., *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, 1400, 1.
23. Leu, Y. L., Roffler, S. R., Chern, J. W., *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 3623.
24. Baldwin, E. L., Osheroff, N., *Curr. Med. Chem: Anti-Cancer Agents*, **2005**, 5, 363.
25. Jordan, M. A., Wilson, L., *Nat. Rev. Cancer* **2004**, 4, 253.
26. Wilson, L., Jordan, M. A., *J. Chemother.*, **2004**, 4, 83.
27. Singh, S. M., Gauthier, S.; Labrie, F. *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 211.
28. Grese, T. A., Dodge, J. A. *Curr. Pharm. Des.*, **1998**, 4, 71.
29. Arora, A., Scholar, E. M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, 315, 971.
30. Miller, B. S., Yee, D. *Cancer Res.* **2005**, 65, 10123.
31. Fan, J., Valu, K., Woodgate, P. Baguley, B. C., Denny, W. A. *Anti-Cancer Drug Des.* **1997**, 12, 181.

32. Cozzi, P., Beria, I., Caldarelli, M., Capolongo, L., Geroni, C., Mazzini, S., Ragg, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1653.
33. Palchauthuri, R., Hergenrother, P.J. *Curr. Opinion Biotech.* **2007**, *18*, 497.
34. Kahane, A. L., Bruice, T.C., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* , **2006**, *16*, 6255.
35. Dervan, P. B., Edelson, B. S. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2003**, *13*, 284.
36. Ferguson, L. R., Denny, W.A., *Mutation Res.* **2007**, *623*, 14.
37. Martínez, R., Chacon-García, L., *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 127.
38. Fernández, M. J., Wilson, B., Palacios, M., Rodrigo, M. M., Grant, K. B., Lorente, A., *Bioconjugate Chemistry*, **2007**, *18*, 121
39. Watson J., Crick F., *Nature* **1953**, *171*, 737
40. Braña, M. F., Cacho, M., Gradillas, A., de Pascual-Teresa, B., Ramos, A., *Curr. Pharm.Des.*, **2001**, *7*, 1745
41. Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.*, **1961**, *3*, 18
42. Graves, D. E., Velea, L. M. *Curr. Org. Chem.*, **2000**, *4*, 915.
43. Hunter, C. A. *J. Mol. Biol.*, **1993**, *230*, 1025.
44. Martínez, R., Chacón-García, L. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, *12*, 127
45. Pommier, Y., Mattern, M. R., Schwartz, R. E., Zwelling, L. A., Kohn, K. W. *Biochemistry*, **1984**, *23*, 2927
46. Waring, M. J., Bailly, C. *Gene*, **1994**, *149*, 69.
47. Rehn, C., Pindur, U., *Monatsh. Chem.*, **1996**, *127*, 631.
48. Baginski, M., Fogolari, F., Briggs, J. M. *J. Mol. Biol.*, **1997**, *274*, 253.
49. Shui, X., Peek, M. E., Lipscomb, L. A., Gao, Q., Ogata, C., Roques, B. P., Garbay-Jaureguiberry, C., Wilkinson, A. P., Williams, L. D., *Curr. Med. Chem.*, **2000**, *7*, 59.
50. Suh, D., Chaires, J.B., *Bioorg Med Chem* **1995**, *3*, 723
51. MacKerell, A.D., Nilsson, L. "Nucleic Acid Simulation" en Computational Biochemistry and Biophysics. Becker, O.M., MacKerell, A.D., Roux, B., Watanabe M. (Eds.) Marcel Dekker. Estados Unidos de América. 2001
52. Minford, J., Pommier, Y., Filipinski, J., Kohn, K. W., Kerrigan, D., Mattern, M. R., Michaels, S., Schwartz, R. E., Zwelling, L. A., *Biochemistry* **1986**, *25*, 9
53. Osheroff, N. Burden, B.A., *Biochim. Biophys Acta*, **1998**, *1400*, 139
54. Wang, J.C., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2002**, *3*, 430
55. McClendon, A.K., Osheroff, N., *Mutation Res.* **2007**, *623*, 83
56. Berger, J.M., *Biochim. Biophys Acta*, **1997**, *1400*, 3
57. Roca, J., *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 156
58. Dickey, J.S., Osheroff, N. *Biochemistry*, **2005**, *44*, 11546
59. McClendon, A.K., Osheroff, N., *Biochemistry* **2006**, *45*, 3040
60. Holden, J.A., *Curr. Med. Chem.-Anti Cancer Agents.*, **2001**, *1*, 1
61. Capranico, G., Binaschi, M., *Biochim. Biophys Acta*, **1998**, *1400*, 185
62. Andch, T., Ishida, R., *Biochim. Biophys Acta*, **1997**, *1400*, 155
63. Champoux, J.J., *Annu. Rev. Biochem.*, **2001**, *70*, 369
64. Wilstermann, A., Osheroff, N. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2003**, *3*, 1349
65. Kaufmann, S.H. *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1400*, 195
66. Hande, K.R., *Biochim. Biophys Acta*, **1998**, *1400*, 173
67. Roca, J. Ishida, R. Berger, J.M., Wang, J.C., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1994**, *91*, 1781
68. Kingma, P.S., Osheroff, N. *Biochim. Biophys Acta*, **1998**, *1400*, 223
69. Baldwin, E.L., Osheroff, N. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, **2005**, *5*, 363.
70. Capranico, G., Palumbo, M., Tinelli, S., Mabilia, M., Pozzan, A. Zunno, F. *J. Mol. Biol.*, **1994**, *235*, 1218
71. Capranico, G., Guano, F., Moro, S., Zagotto, G., Sissi, C., Gatto, B., Zunno, F. Palumbo, M. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 12732
72. Christmann-Franck, S., Bertrand, H., Goupil-Lamy, A., der Garabedian, P., Mauffret, O., Hoffmann, R., Femandjian, S., *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6840

73. Moro, S., Beretta, G.L., Dal Ben, D., Nitiss, J., Palumbo, M., Capranico, G., *Biochemistry* **2004**, *43*, 7503
74. Rhee, H., Park, H., Lee, S., Lee, C. Park Choo, H., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 1651
75. Basnet, A., Thapa, P., Karki, R., Na, Y., Jahng, Y., Jeong, B., Jeong, T., Lee, C., Lee, E., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 4351
76. Kim, J., Rhee, H., Park, H., Lee, I., Lee, S., Suh, M., Lee, H., Ryu, C., Park Choo, H., *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 451
77. Demeunynck, M., Charmantray, F., Martelli, A, *Curr. Pharm. Des.*, **2001**, *7*, 1703
78. Ishida, K., Asao, T. *Biochim. Biophys. Acta - Molecular Basis of Disease*, **2002**, *18*, 155
79. Atwell, G. J., Cain, B. F., Baguley, B. C., Finlay, G. J., Denny, W. A. *J. Med. Chem.*, **1984**, *27*, 1481.
80. Rewcastle, G. W., Atwell, G. J., Chambers, D., Baguley, B. C., Denny, W. A. *J. Med. Chem.*, **1986**, *29*, 472.
81. Denny, W. A., Atwell, G. J., Rewcastle, G. W., Baguley, B. C. *J. Med. Chem.*, **1987**, *30*, 658.
82. Todd, A. K., Adams, A., Thorpe, J. H., Denny, W. A., Wakelin, L. P. G., Cardin, C. J. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 536.
83. Spicer, J. A., Gamage, S. A., Atwell, G. J., Finlay, G. J., Baguley, B. C., Denny, W. A. *J. Med. Chem.*, **1997**, 1919
84. Gunaratnam, M., Greciano, O., Martins, C., Reszka, A.P., Schultes, C.M., Morjani, H., Riou, J.F., Neidle, S. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 679
85. Moore, M. J., Schultes, C. M., Cuesta, J., Cuenca, F., Gunaratnam, M., Tanious, F. A., Wilson, W. D., Neidle, S. *J. Med. Chem* **2006**, *49*, 582.
86. Fechter, E.J., Olenyuk, B., Dervan, P.D., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3591
87. Gamage, S. A., Spicer, J. A., Atwell, G. J., Finlay, G. J., Baguley, B. C., Denny, W. A. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 2383.
88. Spicer, J. A., Gamage, S. A., Rewcastle, G. W., Finlay, G. J., Bridewell, D. J. A., Baguley, B. C., Denny, W. A. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1350.
89. Lorente, A., Vázquez, Y., Fernández, M. J., Fernández, A. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 4307
90. Fernández, M. J., Grant, K., Herraiz, F., Yang, X., Lorente, A. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 5701
91. Fechter, E.J., Dervan, P. D., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8476
92. Kielkopf, C. L., Erkkila, E.K., Hudson, B.P., Barton, J.K., Rees, D.C. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 117
93. Wilson, B., Gude, L., Fernández, M.-J., Lorente, A., Grant, K. B. *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 6159
94. Fitzsimons, M.P, Barton, J.K, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 3379.
95. Gourdie, T. A., Prakash, A. S., Wakelin, L. P. G., Woodgate, P. D., Denny, W. A. *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 240
96. Atwell, G. J., Fan, J.-Y., Tan, K., Denny, W. A. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4744
97. Fan, J.-Y., Tercel, M., Denny, W. A. *Anti-Cancer Drug Des*, **1997**, *12*, 277.
98. Temple, M. D., McFadyen, W. D., Holmes, R. J., Denny, W. A., Murray, V. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 5593
99. Lipson, R. L., Baldes, E. J., *Arch. Dermatol.* **1960**, *82*, 508
100. Dougherty, T. J., Grindey, G. B., Fiel, R., Weishaupt, K. R., Boyle, D. G. *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, *55*, 115.
101. Hansen, J. B., Koch, T. H., Buchardt, O., Nielsen, P. E., Wirth, M., Norden, B. *Biochemistry*, **1983**, *22*, 4878.
102. Viola, A., Mannoni, P., Chanon, M., Julliard, M., Mehta, G., Maiya, B. G., Muthusamy, S., Sambaiah, T., *J. Photochem. Photobiol. B*, **1997**, *40*, 263.
103. Gude, L., Fernández, M. J., Grant, K. B., Lorente, A., *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 1856.

104. Berthet, N., Boudali, A., Constant, J.-F., Decout, J.-L., Demeunynck, M., Fkyerat, A., Garcia, J., Laayoun, A., Michon, P., Lhomme, J., *J. Mol. Recogn.*, **1994**, 7, 99.
105. Fkyerat, A., Demeunynck, M., Constant, J.-F., Michon, P., Lhomme, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 9952.
106. Uhlmann, E., Peyman, A., *Chem. Rev.*, **1990**, 90, 543.
107. Marcusson, E. G., Yacyshyn, B. R., Shanahan, W. R., Dean, N. M. *Mol. Biotechnol.*, **1999**, 12, 1.
108. Maher, L. J. *Cancer Investigation*, **1996**, 14, 66.
109. De Piedoue, G., Andrieu-Soler, C., Concordet, J.P., Maurisse, R., Sun, J., Lopez, B., Kuzniak, I., Leboulch, P., Feugeas, J., *Oligonucleotides.*, **2007**, 17, 258
110. Cain, B.F. Atwell, G.J. Seelye, R.N. *J. Med. Chem.* **1969**, 12, 199.
111. Cain, B.F. Atwell, G.J. Seelye, R.N. *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 611
112. Cain, B.F. Atwell, G.J. Seelye, R.N. *J. Med. Chem.* **1974**, 17, 922
113. Su, T.L., Chou, T.C., Kim, J.Y. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3226.
114. Cain, B.F. Atwell, G. J. *J. Med. Chem.* **1976**, 19, 1124
115. Gao, H. Denny, W., Gary, K., Hansch, C. *Chemico-biological Interactions*, **1998**, 116, 157.
116. B.C. Baguley, W.A. Denny, G.J. Atwell, G.J. Finlay, G.W. Rewcastle, S.J. Twigden, W.R. Wilson, *Cancer Res.* **1984**, 44, 3245.
117. Ganta, S., Paxton, J.W., Baguley, B.C., Garg, S., *J. Pharm. Biom. Anal.*, **2008**, 46, 386.
118. Finlay G.J., Holdaway K.M., Baguley B.C. *Cancer Chemother Pharmacol* **1994**, 34, 159.
119. Baguley, B.C., Leteurtre, F., Riou, J., Finlay, G.J., Pommier, Y. *Eur. J. Cancer*, **1997**, 33, 272.
120. Su, T.L., Chou, T.C., Kim, J.Y. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3226.
121. Shoemaker, D.D. Cysik, R.L., Gormiey, D.E., De Souza, *J. Cancer Res.* **1984**, 44, 1939
122. Scarborough, A., Su, T.L., Pommier, Y., Chou, T.C., *Bioorg. Med. Chem.*, **1996**, 24, 229.
123. Wermuth, C.G. "Analogues as a Means of Discovering New Drugs" en Analogue-based drug discovery. Fischer, J., Ganellin, C.R. (Eds). Wiley-VCH. Alemania. 2006
124. Hegde, S., Carter, J., *Ann. Rep. Med. Chem.*, **2004**, 39, 337.
125. Iyer C.G.S., Languillon J., Ramanujam, K. *Bull. World Health Org.*, **1971**, 45, 719.
126. Korth C., May B.C.H., Cohen F.E., Prusiner S. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98, 9836.
127. Terret N. K., Bell A. S., Brown D., Ellis P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, 6, 1819.
128. Poroikov V., Akimov D., Shabelnikova E., Filimonov D., *Environ. Res.*, **2001**, 12, 327..
129. Wermuth C. G. *Med. Chem. Res.*, **2001**, 10, 431.
130. Andrés, J. I. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2054.
131. Doble, A. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **1992**, 47, 407
132. Lima, E., Barreiro, E.J. *Curr. Med. Chem.*, **2005**, 12, 23
133. Erlenmeyer, H., Leo, M. *Helv. Chim. Acta.*, **1932**, 15, 1171.
134. Thornber, C. W. *Chem. Soc. Rev.*, **1979**, 8, 563.
135. Makhey, D., Yu, C. Liu, A. Liu, L.F., La Voie, E.J., *Bioorg. Med. Chem.*, **2000**, 8, 1171.
136. Elomri, A., Mitaku, S., Michel, S., Skaltsounis, A., Tillequin, F., Koch, M., Pierré, M. A., Guilbaud, N., Léonce, S., Kraus-berthier, L., Rolland, Y., Atassi, G.J., *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 4762.
137. Costes, N., Le Deit, H., Michel, S., Tillequin, F., Koch, M., Pfeiffer, B., Renard, P., Léonce, S. Guilbaud, N., Kraus-Berthier, L., Pierré, A., Atassi, G. J., *J. Med. Chem.*, **2000** 43, 2395.
138. Bontemps-Gracz, M. M., Kupiec, A., Antonini, I., Borowski, E. *Acta Biochim. Pol.* **2002**, 49, 87.
139. Stefanska, B., Bontemps-Gracz, M. M., Antonini, I., Martelli, S., Arciemiuik, M., Piwkowska, A., Rogacka, D., Borowski, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 1969-1975.
140. Chen, Y., Chen, I., Wang, T., Han, C., Tzeng, C., *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, 40, 928
141. Chen, I.-L., Chen, Y.-L., Tzeng, C.-C. *Helv. Chim. Act.* **2002**, 85, 2214.
142. Chen, I.-L., Chen, Y.-L., Tzeng, C.-C., Wang, Y.-P. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 387

143. Zhang, H., Claassen, G., Crogran-Grundy, C., Tseng, B., Drewe, J., Cai, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 222
144. Rodríguez, P., Quintero, A., Rodríguez, R., Solano, J. D., Lira, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 5
145. Loza-Mejía, M. A. Maldonado-Hernández, K. Rodríguez-Hernández, F. Rodríguez-Sotres, R., González-Sánchez, I. Solano, J. D., Lira-Rocha, A., *Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, *16*, 1142
146. Cain, B. F. Atwell, G. J. Seelye, R. N. *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 1242
147. Ferlin, M., Marzano, C., Chiarello, G., Baccichetti, F., Bordin, F. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 827
148. Advait A. Joshi, A. A., Narkhede S. S., Viswanathan, C.L., *Bioorg. Med. Chem. Lett*, **2005**, *15*, 73
149. Alvarez-Ibarra, C., Fernández-Granda. R., Cárdenas, F., Giralt, E., *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 668
150. Olvera Vázquez, S. Síntesis de 2-alkilamino-9-anilino-tiazolo[5,4-b]quinolina como potenciales antitumorales Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 2005
151. Guadarrama Salgado, T. Síntesis de derivados de tiazolo[5,4-b]quinolina con heterociclos saturados en la posición 2. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 2008
152. Maldonado Hernández, K. Síntesis y determinación de las propiedades intercalantes de derivados de 7-fluorotiazolo[5,4-b]quinolina. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México México. 2006
153. Wavefunction, Inc. Irving, California, USA
154. Braga, S., de Melo, L., Barone, P., *J. Mol. Structure (Theochem)*, **2004**, *710*, 51
155. Lauria, A., Bruno, M., Diana, P. Barraja, P., Montalbano, A. Cirrincione, G., Dattolo, G., Almerico, A.M., *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 1545
156. Alvarez-Ibarra, C., Cereceda, J.A., Ortiz, P, Vicente, A., Quiroga, M.L., *Tetrahedron Letters*, **1985**, *26*, 243
157. Alvarez-Ibarra, C., Gil, M. Ortiz, P., Quiroga, M.L. *Heterocycles*, **1988**, *27*, 2175
158. Tardy, C., Facompré, M., Laine, W., Baldeyrou, B., García-Gravalos, D., Francesch, A., Mateo, C., Pastor, A., Jiménez, J.A., Manzanares, I., Cuevas, C., Bailly, C. *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 1697
159. Hawkes, G. E., Herwig, K., Roberts, J. D., *J. Org. Chem.*, **1974**, *39*, 1017
160. Meanwell, N., Roth, H., Wedding, D., Fleming, J., Gillespi, E. *J. Med. Chem.*, **1991**, *34*, 2906
161. Meanwell, N., Deniss, R., Roth, H., Fleming, J. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2688
162. Zhu, Z., Lippa, B., Townsend, L., *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4159
163. Cai, S., Zhou, Z., Huang, J., Whittemore, E., Keana, J., *J. Med. Chem.*, **1996**, *39*, 4682
164. Izumi, T, Sakaguchi, S., Takeshita, M., Watanabe, Y., Kato, H., *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, *11*, 2541
165. Chen, Y., Hung, H., Lu, C., Li, K., Tzeng, C., *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, *12*, 6539
166. Li, S., Shikiya, R., Marky, L., *Biochemistry*, **2004**, *43*, 1440
167. Surrey, A. Cutler, R. , *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 2413
168. Van Galen, P., Nissen, P., Soudijnt, W. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1202
169. Tsou, H., Overbeek-Klumpers, E., Hallett, W., Rabindran, S., Shen, R., Shi, X., Wang, Y., Upešlacis, J., Wissner, A., *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1107
170. Kadin, S., Lamphere, C. *Synthesis* **1977**, 500
171. Lima, E., Laspéras, M., de Ménorval, L., Tichit, D., Fajula, F. *J. Catalysis*, **2004**, *223*, 28
172. Katritzky, A.R., Pilarski, B., Urogdi, L., *Synthesis*, **1998**, 949
173. Stýskalá, J. Lycka, A., Slouka, J. *J. Het. Chem.*, **2002**, *39*, 1305
174. Dinica, R., Charmantray, F., Demeunynck, M., Dumy, P. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7883

- 
175. Su, T., Lin, T., Chou, T., Zhang, X., Bacherikov, V.A., Chen, C., Liu, F., Tsai, T., *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3710
  176. Davis, M., Scanlon, D.B. *Aust. J. Chem.*, **1977**, *30*, 433
  177. Granoth, I., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1974**, 2166.
  178. Wilson, B., Gude, L., Fernández, M., Lorente, A., Grant, K., *Inoorg. Chem.* **2005**, *44*, 6159
  179. Gude, L. "Síntesis de compuestos intercalantes del ADN: procesos de interacción y rotura fotoquímica de ácidos nucleicos en presencia de cationes metálicos". Tesis doctoral. Universidad de Alcalá. España. 2004.
  180. Hall, D. Swann, D.A., Waters, T.N. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1974**, 1334
  181. Denny, WA, Atwell, G.J., Baguley, B.C., *J. Med. Chem.*, **1983**, *26*, 1625
  182. Gallego, J., Ortiz, A.R., Gago, F. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1548
  183. Medhi, C., Mitchell, J. Price, S., Tabor, A., *Biopolymers (Nucleic Acids Sci.)*, **1999**, *52*, 84
  184. Hypercube, Inc. <http://www.hyper.com>
  185. Case, D., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K.M., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B., Woods, R. *J. Computat. Chem.* 2005, **26**, 1668
  186. Cheatham, T.E., Brooks, B.R., Kollman, P.A., "Molecular Modeling of Nucleic Acid Structure" en *Current protocols in Nucleic Acid Chemistry* Beaucage, S., Herdewijn, P., Matusda, A. (Eds.) Wiley & Sons. 2001.
  187. Fischer, G. Pindur, U., *Pharmazie*, **1999**, *54*, 83.
  188. Miri, R. Javidnia, K., Sarkarzadeh, H., Hemmateenejad, B., *Bioorg. Med. Chem*, **2006**, *14*, 4842
  189. Zhang, Q. Chen, E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *217*, 755
  190. Wadkins, R.M., Graves, G.E. *Biochemistry*, **1991**, *30*, 4277.
  191. Lu, X., Olson, W.K., *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5108
  192. Dickerson, R.E., *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 1797
  193. Quintero, A., Pelcastre, A., Dolores, J., Guzmán, A., Díaz, E. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **1999**, *2*, 108.
  194. De Oliveira, D., Gaudio A.C. *Quant. Struc.-Act. Rel.*, **2001**, *19*, 599
  195. Nakatani, K., Matsuno, T., Adachi, M., Hagihara, S., Saito, I., *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 5695
  196. Li, S., Cooper, V.R., Thonhauser, T., Lundqvist, B.I., Langreth, DC., *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 11166
  197. Prasanna, S., Doerksen, R. J, *Curr. Med. Chem.*, **2009**, *16*, 21

## 9. ANEXOS

**ANEXO 1.** ARTÍCULOS PUBLICADOS

**ANEXO 2.** ESPECTROS

**ANEXO 3.** ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN. INTERCALANTES DEL ADN. SÍNTESIS Y ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON ÁCIDOS NUCLEICOS

**ANEXO 4.** IMÁGENES DE LAS MOLÉCULAS MODELADAS COMO ENTIDADES AISLADAS

**ANEXO 5.** IMÁGENES DE LOS COMPLEJOS DE INTERCALACIÓN

## **ANEXO 1 ARTÍCULOS PUBLICADOS**

- Marco A. Loza-Mejía, Rafael Castillo, Alfonso Lira-Rocha “Molecular modeling of tricyclic compounds with anilino substituents and their intercalation complexes with DNA sequences”. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, **2009**, *27*, 900-907
  
- Marco A. Loza-Mejía, Susana Olvera-Vázquez, Karina Maldonado-Hernández, Teresita Guadarrama-Salgado, Ignacio González-Sánchez, Fernando Rodríguez-Hernández, José D. Solano, Rogelio Rodríguez-Sotres, Alfonso Lira-Rocha. “Synthesis, cytotoxic activity, DNA topoisomerase-II inhibition, molecular modeling and structure–activity relationship of 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, *17*, 3266-3277



# Molecular modeling of tricyclic compounds with anilino substituents and their intercalation complexes with DNA sequences<sup>☆</sup>

Marco A. Loza-Mejía, Rafael Castillo, Alfonso Lira-Rocha<sup>\*</sup>

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Coyoacán, 04510, Mexico

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 9 October 2008

Received in revised form 28 January 2009

Accepted 2 February 2009

Available online 12 February 2009

### Keywords:

DNA

Intercalation complexes

Tricyclic compounds

Docking

Acridines

Imidazo[4,5-*b*]quinolines

Thiazolo[5,4-*b*]quinolines

## ABSTRACT

Although 9-anilinoacridines are among the best studied antitumoral intercalators, there are few studies about the effect of isosteric substitution of a benzene moiety for a heterocycle ring in the acridine framework. According to these studies, this approach may lead to effective cytotoxic agents, but good cytotoxic activity depends on structural requirements in the anilino ring which differ from those in 9-anilinoacridines. The present paper deals with molecular modeling studies of some 9-anilino substituted tricyclic compounds and their intercalation complexes (in various DNA sequences) resulting from docking the compounds into various DNA sequences. As expected, the isosteric substitution in 9-anilinoacridines influences the LUMO energy values and orbital distribution, the dipole moment, electrostatic charges and the conformation of the anilino ring. Other important differences are observed during the docking studies, for example, changes in the spatial arrangement of the tricyclic nucleus and the anilino ring at the intercalation site. Semiempirical calculations of the intercalation complexes show that the isosteric replacement of a benzene ring in the acridine nucleus affects not only DNA affinity but also base pair selectivity. These findings explain, at least partially, the different structural requirements observed in several 9-anilino substituted tricyclic compounds for cytotoxic activity. Thus, the data presented here may guide the rational design of new agents with different DNA binding properties and/or a cytotoxic profile by isosteric substitution of known intercalators.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Molecules are capable of interacting with duplex nucleic acids in various ways, one of the most significant of which is the intercalation of planar or approximately planar aromatic ring systems between base pairs without breaking up the hydrogen bonds between the bases. Although simple intercalators do not show great sequence selectivity, it has been reported that there is experimental evidence of intercalating agents showing sequence selectivity [1]. Many intercalators possess antitumor activity and seem to act by stabilizing the DNA-intercalator-topoisomerase II ternary complex [2,3]. Among these, 9-anilinoacridines have been extensively studied and some compounds such as amsacrine (*m*-AMSA) **1a** [4] and asulacrincine **1b** [5] (Fig. 1) have entered clinical trials or are used in the treatment of leukemia and lymphoma. Studies on the mechanism action of *m*-AMSA by SERS (surface-enhanced Raman scattering) spectroscopy have shown that this compound interacts via its side chain with the Topo II alone, whereas its ortho-isomer, which is relatively inactive as antitumor

compound, has not shown this interaction [6]. In the same study, it was proposed that the planar acridine moiety of *m*-AMSA intercalates within DNA through a  $\pi$ - $\pi$  interaction between the intercalator and DNA base pairs, the same interaction was observed for the ortho-isomer [7]. We recognize that there is not a straightforward correlation between DNA intercalation potency and Topo II inhibition. Furthermore, some Topo II poisons are void of intercalating activity [8].

On the other hand, the analysis of some bioactive natural products with tricyclic templates in their structures led to the modification of acridine nucleus resulting in some interesting polycyclic templates [9–12], but few efforts have been undertaken on the isosteric substitution of the acridine nucleus. This consideration led to the synthesis of compounds such as 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline **2** [13,14] and 4-anilinothiazolo[2,3-*b*]quinoline **3** [15] derivatives (Fig. 1), which have shown cytotoxic activity. Interestingly, structural requirements in the anilino ring for the improvement of cytotoxic activity differ from those of 9-anilinoacridines [14,15].

The aim of the present study is to investigate how the DNA intercalation properties of 9-anilinoacridine derivatives are affected by the isosteric substitution of a benzene moiety for a heterocyclic ring in the acridine framework. The present paper shows some theoretical studies on several tricyclic compounds such as

<sup>☆</sup> Taken in part from the PhD thesis of Marco Loza-Mejía.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +52 5556 22 52 86; fax: +52 5556 22 53 29.

E-mail address: [lira@servidor.unam.mx](mailto:lira@servidor.unam.mx) (A. Lira-Rocha).

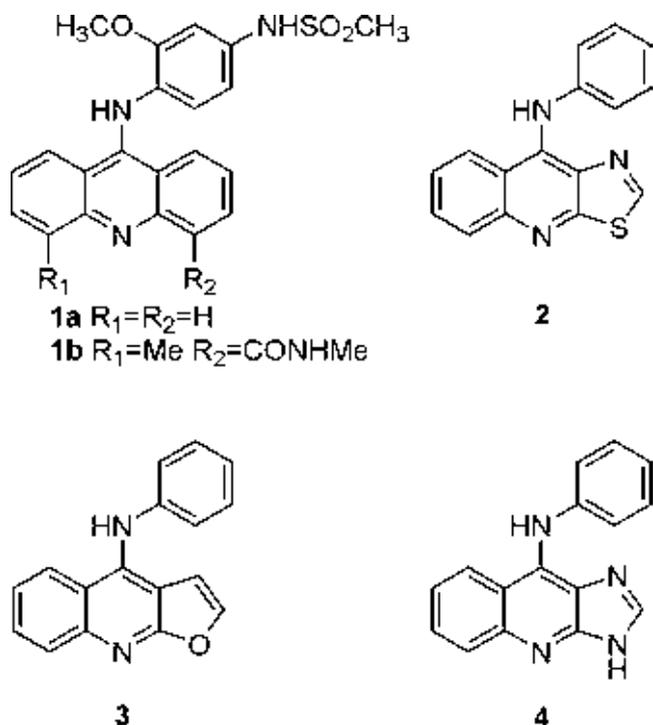


Fig. 1. Chemical structures of some anilino substituted tricycles.

9-anilinoacridines, 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinolines and 9-anilinoimidazo[4,5-*b*]quinolines **4**. These studies consist of the molecular modeling of the isolated molecules by *ab initio* calculations, docking calculations of their intercalation complexes with several DNA sequences employing AMBER99 as force field, as well as, the analysis of the helical parameters of the intercalation complexes.

## 2. Computational procedure

The compounds analyzed are shown in Fig. 2. Calculations on isolated molecules were performed with Spartan'04 software. All molecules were built by assembling standard fragments, the resulting geometries being optimized by molecular mechanics. The conformational analysis of the compounds by Systematic Search protocol around dihedrals  $\tau_a$  and  $\tau_b$  (Fig. 2) was performed using the MMFF94 force field. The most frequent conformer for each compound was selected and the geometry optimization and calculation of their electronic properties were carried out with *ab*

*initio* calculations (HF 6-31G\*). For compounds **7a–i**, tautomer **3H** was selected over tautomer **1H** based on a lower heat of formation (5 kcal/mol).

In order to obtain more information on the effects of the isosteric substitution of the acridine template, it was decided to model DNA intercalation complexes of several anilino-substituted compounds. This was carried out with AMBER99 force field using the Hyperchem 7.0 software by docking the intercalators into the sequence 5'-CGXYCG-3', where XY is every standard double base pair (AA, AC, AG, AT, CC, CG, GC, TA, TC TG). Relative dielectric constant  $\epsilon_r$  was used to simulate a solvent effect, van der Waals and electrostatic contribution being set to 0.5 each and a cut-off of 14 Å being used. Due to the heterotopic faces of some compounds, each ligand was docked in either a "face up" or "face down" orientation prior to initiating the conformational analysis of the anilino ring, and no difference was observed between these orientations.

Initially, the hexanucleotide was built by the nucleic acid database of Hyperchem; sodium counterions were added and the geometry was optimized to 0.1 kcal/Å mol with AMBER99 force field. Then the tricyclic compound (**5a–e**, **6a–e**, **7a–e**, **8**, **9**, **10**, geometry optimized with AMBER99, charges calculated by AM1, single point) was manually stacked between the bases and the intercalation complex geometry was minimized by the steepest-descent protocol to 0.1 kcal/Å mol. The intercalator and the bases were allowed to move during energy minimization. Since previously reported data indicated that the anilino ring of 9-anilinoacridines was placed at the minor groove [16], it was decided to evaluate whether this behavior was true for compounds **6a** and **7a**. In all the sequences, lower energy values were obtained when the anilino ring was positioned within the minor groove.

A conformational analysis was then performed around dihedrals  $\tau_a$  and  $\tau_b$  to observe the preferential conformation of the anilino ring within the intercalation complex. The resulting geometry was minimized again to 0.1 kcal/Å mol. Energy of formation ( $E_{AMBER}$ ) was calculated by the subtraction of the energy of the complex from the sum of the energies of compounds and the DNA fragment [ $E_{AMBER} = E_{complex} - (E_{compound} + E_{DNA})$ ]. Although this binding energy does not accurately reflect the real binding energy, it still can be helpful in the identification of the most likely complexes. A similar approach has been used in other studies [17]. Though all the tricyclic compounds were also docked in their cationic forms, the final geometries obtained were not affected by this condition.

After finding the optimum AMBER geometry, AM1 semiempirical calculations were carried out to evaluate the electronic effects not considered in molecular mechanics. Calculations of electronic

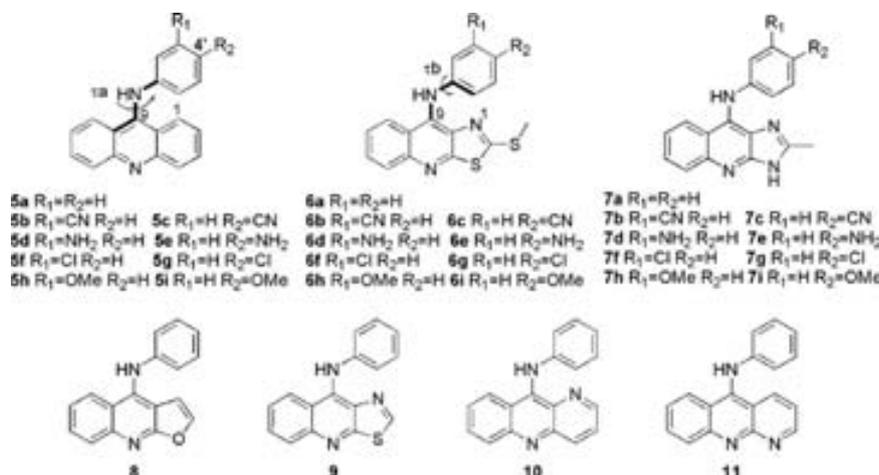


Fig. 2. Compounds analyzed by *ab initio* calculations, atom labeling and descriptions of dihedrals  $\tau_a$  and  $\tau_b$ .

properties of purines and pyrimidines in DNA and RNA using the AM1 semiempirical method have shown good correlation with experimental data [18]. In each intercalation complex, only the tricyclic compound, as a cationic entity, the adjacent two base pairs and their carbohydrate-phosphate backbone were selected for the AM1 calculations, the complex energy being calculated with no further geometry optimization. The heat of formation difference ( $\Delta H_f$ ) was calculated by subtracting the quantity of the complex from the sum of the quantities of the compound and the corresponding pair of bases [ $\Delta H_f = H_{f_{\text{complex}}} - (H_{f_{\text{compound}}} + H_{f_{\text{bases}}})$ ] [19].

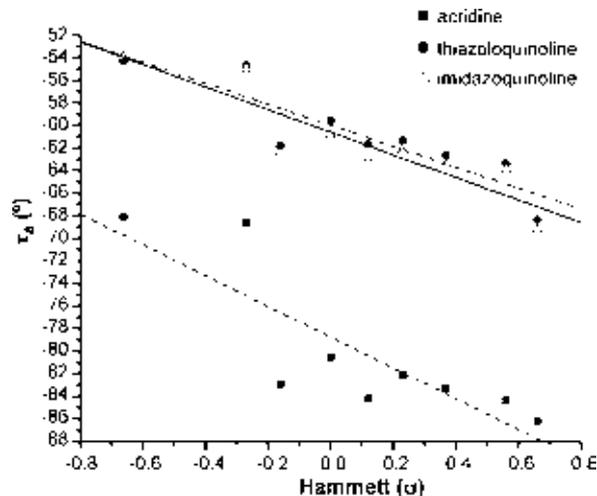
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Molecular modeling of isolated molecules

Table 1 summarizes some calculated properties of the isolated molecules and the dihedral angle values obtained from their conformational analysis. Interesting differences were observed for dihedral angle values. In the case of acridine derivatives,  $\tau_a$  was around  $-80^\circ$  while in compound series **6** and **7**, it was around  $-60^\circ$ – $-70^\circ$ , except in 4'-substituted derivatives ( $-\text{NH}_2$  and  $-\text{OCH}_3$  substituents), where the values were around  $-54^\circ$ – $-68^\circ$ , in close agreement with experimental data for 9-anilinoacridines [20,21]. The  $\tau_b$  value for acridines substituted in position 3' of the anilino ring was around  $3$ – $9^\circ$ , thus indicating that the anilino ring was nearly orthogonal to tricyclic nucleus, while in thiazolo and imidazoquinolines it laid between  $10^\circ$  and  $18^\circ$ . These observations are in agreement with NOESY experiments performed for **6b** and **6f**, which suggest that the anilino ring in these compounds is not orthogonal to tricyclic nucleus but slightly oblique [14]. In addition, a good correlation between the Hammett parameter of the substituent present in the anilino ring and  $\tau_a$  was observed as

**Table 1**  
Some parameters of the compounds shown in Fig. 2 calculated with HF 6-31G\*.

Comp	$\tau_a$ ( $^\circ$ )	$\tau_b$ ( $^\circ$ )	E HOMO (eV)	E LUMO (eV)	Bandgap (eV)	Dipole (Debye)
<b>5a</b>	-80.48	3.97	-7.4781	1.5047	8.9828	2.2066
<b>5b</b>	-84.39	7.19	-7.8013	1.2163	9.0177	3.3251
<b>5c</b>	-86.21	9.23	-7.8686	1.1610	9.0296	5.2428
<b>5d</b>	-82.90	6.47	-7.4512	1.5460	8.9973	3.1156
<b>5e</b>	-68.12	23.07	-7.1831	1.7102	8.8934	3.3401
<b>5f</b>	-83.29	6.52	-7.6629	1.3495	9.0123	0.6773
<b>5g</b>	-82.04	5.04	-7.6368	1.3554	8.9922	2.2833
<b>5h</b>	-84.24	9.08	-7.5014	1.5136	9.0150	2.7304
<b>5i</b>	-68.60	19.31	-7.2549	1.6637	8.9186	3.9872
<b>6a</b>	-59.54	18.72	-7.7398	2.0506	9.7903	3.7510
<b>6b</b>	-63.38	12.67	-8.0843	1.7063	9.7906	2.1396
<b>6c</b>	-68.38	1.20	-8.1635	1.5951	9.7586	4.0305
<b>6d</b>	-61.84	13.31	-7.7032	2.0693	9.7724	4.5764
<b>6e</b>	-54.29	33.25	-7.5350	2.2152	9.7501	4.8971
<b>6f</b>	-62.65	13.37	-7.9358	1.8663	9.8021	1.4274
<b>6g</b>	-61.34	15.88	-7.9013	1.8833	9.7846	2.2842
<b>6h</b>	-61.66	12.52	-7.7372	2.0456	9.7828	4.5177
<b>6i</b>	-54.68	30.95	-7.6177	2.1751	9.7928	5.2612
<b>7a</b>	-60.89	14.41	-7.4356	2.4239	9.8595	2.4416
<b>7b</b>	-63.95	9.95	-7.7912	2.0543	9.8454	6.5274
<b>7c</b>	-69.26	1.63	-7.8828	1.9570	9.8397	7.4377
<b>7d</b>	-62.40	10.12	-7.3918	2.4582	9.8499	3.5850
<b>7e</b>	-53.97	32.52	-7.2299	2.6145	9.8444	1.2184
<b>7f</b>	-63.46	10.13	-7.6390	2.2368	9.8758	3.9599
<b>7g</b>	-62.27	12.49	-7.6043	2.2530	9.8574	4.0910
<b>7h</b>	-62.83	10.62	-7.4601	2.3999	9.8600	3.0899
<b>7i</b>	-54.97	29.78	-7.3049	2.5707	9.8755	2.2630
<b>8</b>	-69.73	6.74	-7.7084	2.1345	9.8429	3.8045
<b>9</b>	-56.46	21.50	-7.7578	2.0155	9.7733	2.3456
<b>10</b>	-52.64	23.10	-7.4121	1.4985	8.9106	1.3549
<b>11</b>	-106.6	1.77	-7.7609	1.3178	9.0787	4.7082



**Fig. 3.** Correlation between dihedral  $\tau_a$  of compounds series and electronic Hammett parameter, acridine  $\tau_a = -13.63\sigma - 78.74$ ,  $R^2 = 0.84$ ; thiazoloquinoline  $\tau_a = -9.30\sigma - 59.98$ ,  $R^2 = 0.90$ ; imidazoquinoline  $\tau_a = -10.10\sigma - 60.61$ ,  $R^2 = 0.90$ .

indicated in Fig. 3, suggesting that the conformation of the anilino ring is affected by electronic factors.

To evaluate the above proposal, the spatial arrangement of compounds **8**–**11** was analyzed (Table 1). The results indicated that the dihedrals  $\tau_a$  and  $\tau_b$  for compounds **9** and **10** were similar to those in series **6** and **7**, whereas in compounds **8** and **11**, lacking a nitrogen atom at position 1, these dihedral angle values were similar to those of **5a**. Moreover, a rough correlation between the electrostatic charge at position 1 of the tricyclic nucleus (C1 for compounds **5a**, **8** and **11**) and dihedral angle  $\tau_a$  was observed, while in **8**  $\tau_a$  was around  $-70^\circ$ ; in **11** it was over  $-100^\circ$  and the electrostatic charge value was more negative in **8** than in **11** or **5a** (Table 2), confirming the strong influence of electronic factors on the anilino ring conformation.

Since nitrogen atoms are frequently highly relevant to the interaction of small ligands with biomolecules, electrostatic charges of these atoms were calculated, several of which are listed in Table 2. The absolute value of the electrostatic charge of the nitrogen atom in the central ring (N4) is lower in compounds **6a** and **9** by effect of the vicinal sulfur atom. Because several studies have established the importance of a functional group in position 3' or 4' for interactions with topoisomerase II, their charges were also determined. In this case, these charges were not affected by changes in the tricyclic nucleus (data not shown).

The forces maintaining the stability of the DNA–intercalator complex include van der Waals, hydrogen bonding, hydrophobic, charge transfer and electrostatic complementarity [22–24]. The interaction between the LUMO orbital of the intercalator and the HOMO orbital of the adjacent bases also has been suggested as an

**Table 2**  
Electrostatic nitrogen atomic charges for selected compounds.

Comp	N1 <sup>a</sup>	N3 <sup>b</sup>	N4 <sup>c</sup>	N1'
<b>5a</b>	-0.133	–	-0.706	-0.756
<b>6a</b>	-0.363	–	-0.464	-0.641
<b>7a</b>	-0.691	-0.606	-0.653	-0.662
<b>8</b>	-0.372	–	-0.703	-0.757
<b>9</b>	-0.562	–	-0.463	-0.600
<b>10</b>	-0.598	–	-0.661	-0.559
<b>11</b>	+0.294	-0.772	-0.757	-0.768

<sup>a</sup> (C1) for compounds **5a**–**i**, **8** and **11**.

<sup>b</sup> (N4) for compound **11**.

<sup>c</sup> (N5) for compounds **10** and **11**.

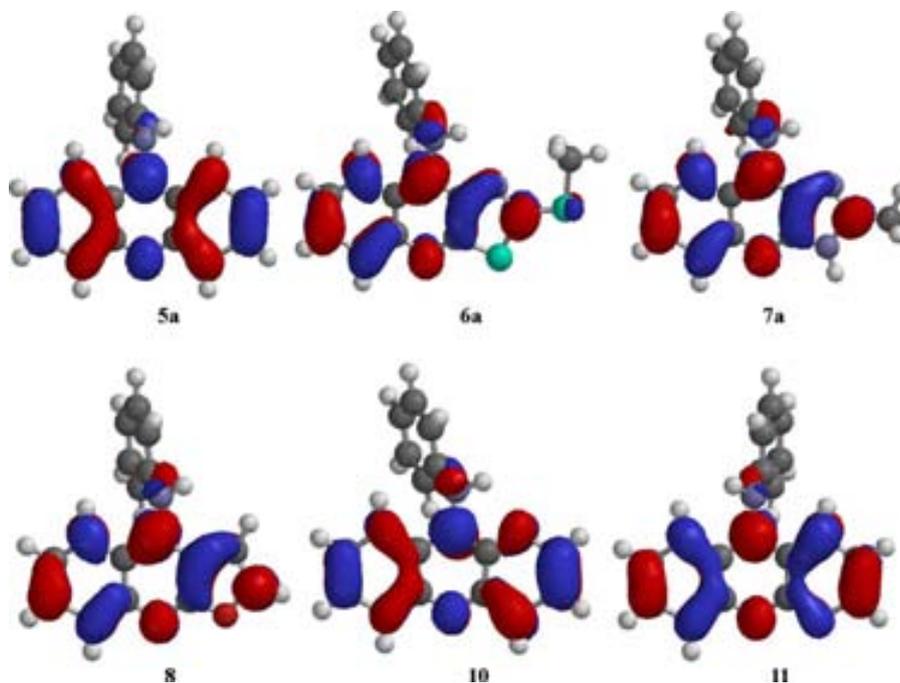


Fig. 4. LUMO distribution for some tricyclic compounds.

important stabilizing factor [25,26]. LUMO and HOMO energy values are related to the substituents present in the anilino ring, as expected, with lower values in those compounds with electron-withdrawing groups. LUMO energy values are lower in acridines and benzonaphthyridines (Table 1), suggesting these should be better intercalators than the other compounds. This is true, at least, for thiazoloquinolines which exhibited lower DNA binding affinity than did acridines, as shown in a previous study [14]. However, intercalation properties do not always correlate with cytotoxic activity; for instance, *o*-AMSA possesses a high affinity for DNA but lower cytotoxic activity than its isomer amsacrine (*m*-AMSA) [27]. LUMO orbitals for some compounds are shown in Fig. 4. Distribution maps for compound 8 and 9 (9 not shown) are similar to 6a, while compounds 10 and 11 resemble 5a. LUMO orbital of the studied compounds is located on the tricyclic template and its distribution is symmetric in series 5, 10 and 11 but not in the other compounds. Our data do not allow discrimination as to whether this asymmetry affects base selectivity, but it is a possibility to be considered.

The dipole moment might play an important role in cytotoxic activity of intercalators, such as in the ellipticine derivatives [28], or it may affect the intercalation process itself [29]; thus, in the present study the dipole moment vector and magnitude were determined. In the analyzed compounds with non-substituent or electron-releasing groups in the aniline ring, the dipole vector is oriented towards the tricyclic template, whereas when an electron-withdrawing group is attached, the vector is directed towards the anilino ring. Interestingly, compounds with a high dipole value have shown poor cytotoxic activity (5b, 6d and 6i) [14,30]. Although there is no agreement between dipole magnitude and cytotoxic activity, the available data suggests that compounds with a dipole value lower than 4.00 might have good cytotoxic activity [14,30]. In a similar fashion, ellipticine-like derivatives with a dipole moment below 2.6 have shown a better cytotoxic activity [28].

Medhi [31] has proposed a central role for the molecular electrostatic potential (MEP) in the binding strength of the chemically modified chromophore. Fig. 5 shows isovalue volumes for some of the compounds under study. Whereas MEP was

concentrated around nitrogen atoms in all compounds, an additional lobule was found in 5a, 10 and 7a around the benzene ring, which was absent in 6a. Importantly, a lower MEP surrounds the anilino ring in compounds 6a and 8 in comparison with 5a. These changes correlate with a different hypothetical mode of binding to the interaction site for the anilino ring in the compounds of series 5 when compared with those of series 6 and 8. MEP could play a significant role in understanding these differences.

These results show how the isosteric substitution of the benzene in acridine template affects geometric and electronic properties of the resulting tricyclic compound. Changes in LUMO energy values and the orbital distribution of the tricyclic compounds and spatial arrangement of the anilino ring could exert some influence on binding and base selectivity, thus partially explaining the differences observed in cytotoxic activity and the DNA binding between these compounds [14,15].

### 3.2. Intercalation complexes of 9-anilino substituted tricyclic compounds with various DNA sequences

The complexes with lower calculated energy for compounds 5a and 6a with 5'-CGCGCG-3' hexanucleotide are shown in Fig. 6. It was observed, that isosteric substitution of the tricyclic template did not affect the position of the chromophore in the intercalation site, but it had influence on the position of the anilino ring, the same behavior was observed during the *ab initio* calculations. Calculated binding energy values for each complex are shown in Table 3. From this data, the order of binding is 6a–e  $\approx$  9  $\approx$  5a–e < 8  $\approx$  7a–e. In general, compounds 6a–e and 9 exhibited *in silico* higher selectivity for sequence 5'-CGCGCG-3' than did the other analyzed compounds (see Supplementary Table S1); thus, isosteric replacement seems to have an important impact on the geometry of the intercalation complex, which is reflected in base selectivity.

The preferred sequence in these calculations was 5'-CGCGCG-3'. Other favored sequences were those with adenine in direction 5' (for compounds 5a–e and 10), those with cytosine in 3' (for 6a–e and 9) and with thymine in 5' (for 7a–e). Hydrogen bonds between DNA and the intercalator were observed in several complexes,

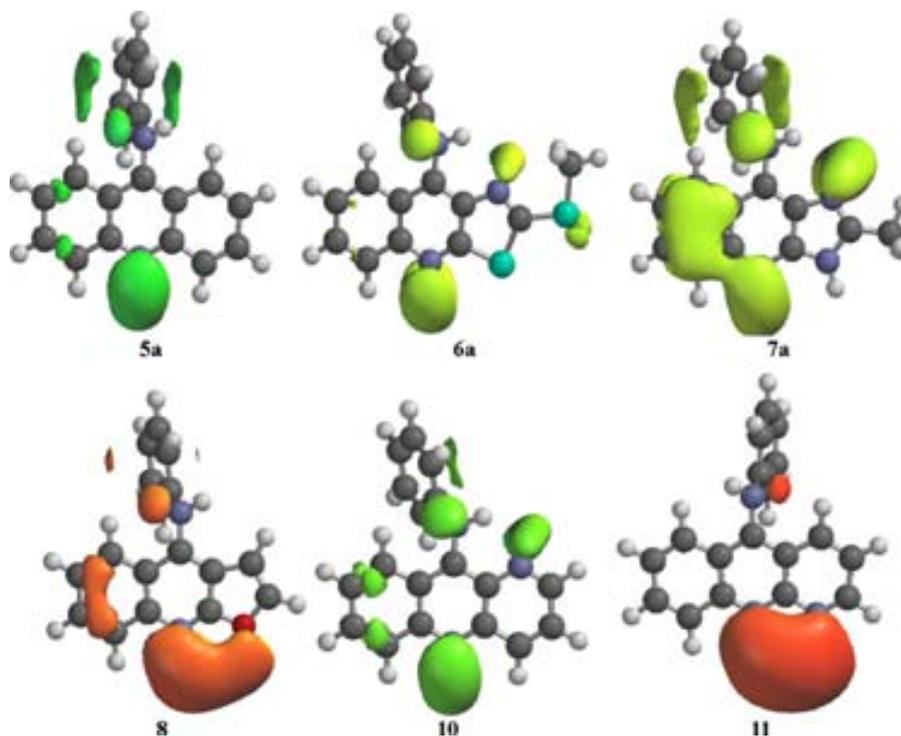


Fig. 5. Isovalue volumes of electrostatic potential ( $-20$  kcal/mol) for **5a**, **6a**, **7a**, **8**, **10** and **11**.

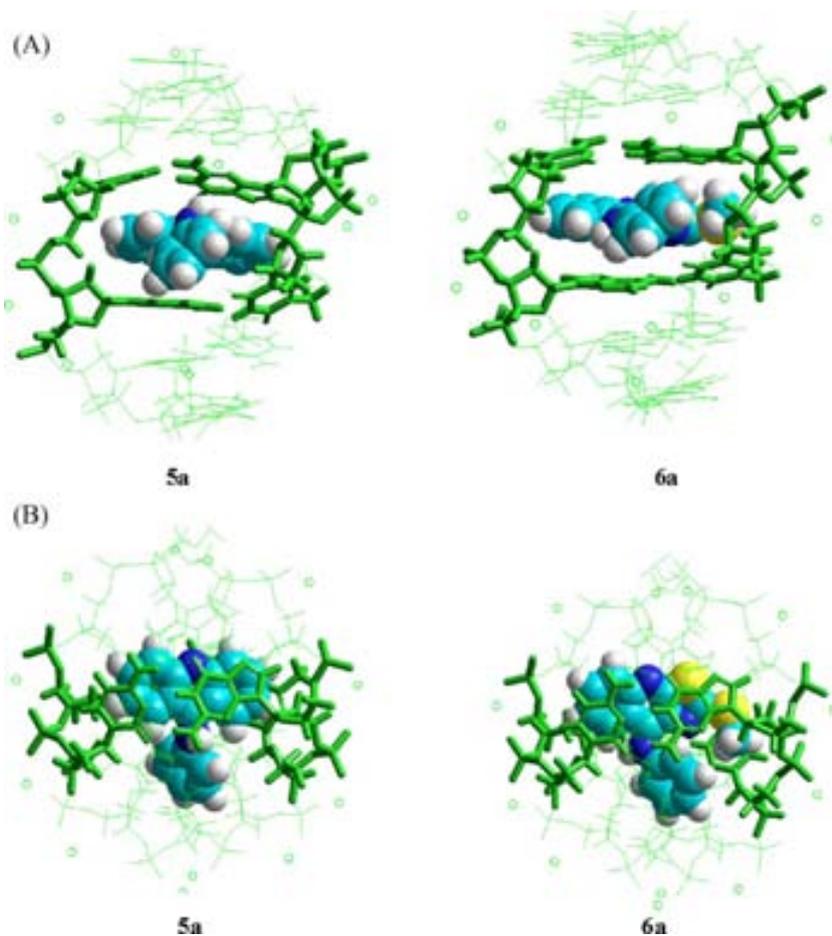


Fig. 6. **5a** and **6a** intercalation complexes with 5'-CGACCG-3' DNA sequence viewed from minor groove (A) and from direction 5' (B).

**Table 3**  
Energy of complex formation ( $E_{\text{AMBER}}$ ) for DNA-intercalator complexes analyzed (kcal/mol).

	AA	AC	AG	AT	CC	CG	GC	TA	TC	TG	AVG
5a	-58.64	-58.73	-53.75	-62.79	-58.28	-65.80	-57.91	-58.36	-56.71	-56.05	-58.70
5b	-60.22	-58.76	-66.33	-58.70	-54.07	-64.46	-54.35	-57.29	-56.50	-54.21	-58.49
5c	-62.68	-53.34	-62.06	-58.41	-52.84	-65.68	-58.35	-55.94	-63.33	-52.67	-58.53
5d	-61.53	-54.69	-56.00	-59.22	-59.59	-64.58	-60.02	-60.02	-56.15	-55.15	-58.70
5e	-60.92	-52.57	-60.46	-58.52	-55.21	-65.26	-54.98	-64.74	-61.28	-54.42	-58.84
6a	-44.69	-55.36	-49.76	-57.01	-58.28	-66.52	-63.68	-59.18	-64.12	-58.02	-57.66
6b	-46.19	-52.18	-46.11	-52.46	-60.11	-67.89	-61.73	-46.82	-58.38	-47.45	-53.93
6c	-46.25	-54.41	-51.63	-58.58	-60.59	-67.72	-45.77	-56.16	-55.93	-47.72	-54.48
6d	-45.47	-54.19	-47.19	-54.32	-60.16	-67.07	-51.43	-42.88	-66.16	-52.87	-54.18
6e	-49.75	-56.93	-58.19	-49.95	-59.27	-68.01	-48.53	-54.08	-60.96	-60.67	-56.63
7a	-42.85	-64.56	-59.42	-65.23	-59.77	-69.52	-63.88	-65.34	-61.72	-57.63	-60.99
7b	-45.10	-62.47	-53.51	-62.12	-62.31	-71.90	-62.14	-61.13	-59.98	-58.77	-59.94
7c	-45.00	-60.39	-56.90	-61.72	-61.82	-71.30	-60.03	-61.34	-63.18	-57.07	-59.87
7d	-44.69	-61.44	-54.45	-60.80	-60.95	-71.25	-62.00	-65.07	-59.08	-58.78	-59.85
7e	-44.44	-55.97	-58.41	-63.09	-62.93	-71.25	-66.28	-63.74	-63.38	-56.39	-60.59
8	-59.84	-61.46	-58.10	-63.34	-55.56	-63.76	-66.29	-58.68	-61.33	-57.58	-60.59
9	-49.35	-60.13	-55.04	-60.95	-56.13	-66.98	-62.45	-59.90	-57.74	-55.64	-58.43
10	-63.00	-56.69	-53.08	-60.87	-62.12	-62.84	-55.76	-58.25	-56.54	-56.96	-58.61

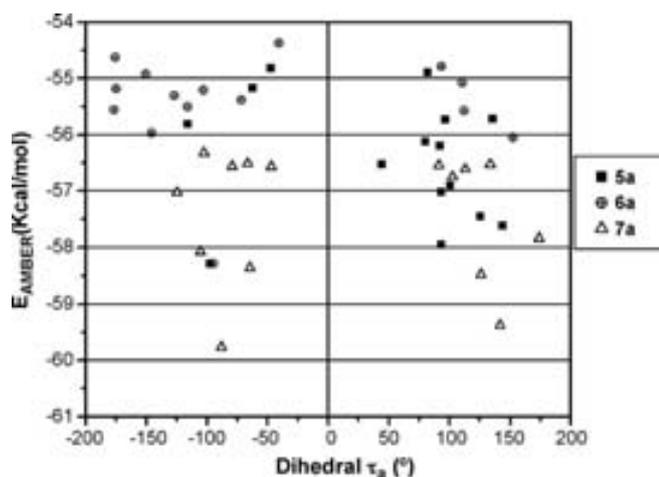
some of which were between amino groups in position 3' or 4' or the amino group (N1'), the link between aniline, the tricyclic template and carbonyl groups of the bases.

When the conformation of the anilino ring was analyzed, it was oriented, in some cases preferentially to direction 5', while in others, to direction 3', and without preference in the rest, (Fig. 7). In acridines **5a–e** the preferred orientation was to 5', while in thiazoloquinolines **6a–e**, it was to 3'. For compounds **7a–e**, **8**, **9**, the orientation is alike in thiazoloquinolines and acridines. The values of  $\tau_a$  were roughly orthogonal in acridines but were oblique in the rest of the compounds, (see Supplementary Table S2) in agreement with *ab initio* calculations.

The geometric variations in the DNA caused by the intercalating agents affected the helical parameters [32], which were calculated by 3DNA software [33]. Only the complementary base pair parameters were used for the analysis [34], a subscript 1 being assigned to the helical parameters of the base pair with 5' to 3' direction whereas a subscript 2 was assigned to the base pair 3' to 5' direction (Table 4). In general, the largest observed effects were on the two base pairs next to the tricyclic nucleus, as expected. Important changes were found in the buckle ( $\kappa$ ), propeller ( $\omega$ ),

opening ( $\sigma$ ) and rise ( $D_z$ ) parameters (step parameter), with only minor effects on  $S_x$ ,  $S_y$  and  $S_z$  values.

The average angular values in Table 4 are arranged by the heterocyclic nucleus, as well as the AMBER and the  $\Delta H_f$  average calculated energies. It is evident that the replacement of a benzene moiety by a thiazole or imidazole ring in the acridine skeleton affects mainly the buckle and propeller angular values, which is attributed to the different arrangement of the acridine skeleton within the DNA sequence. The position and the electronic nature of the substituent slightly diminish the values of the same parameters (see Supplementary Table S3). This could be related to the negative steric effect which has been observed in QSAR studies on DNA affinity and the cytotoxicity of acridine derivatives [30]. On the other hand, there was a rough correlation between the  $\kappa$  and  $\omega$  parameters and the  $\Delta H_f$  energy values because higher values of  $\kappa$  and lower values of  $\omega$  showed lower energy values of  $\Delta H_f$ . In order to determine whether there was a correlation between the helical parameters and the DNA-intercalating agent complex energy values, calculated by AM1, several models for each sequence and type of compound were generated by means of the BuildQSAR program [35]. Though a global equation accounting for the calculated  $\Delta H_f$  values against all sequences was not found, the  $\kappa$  and  $\omega$  parameters showed a relevant role in almost all models



**Fig. 7.** Values of dihedral  $\tau_a$  against  $E_{\text{AMBER}}$  for complexes of **5a** (direction 5' preferred), **6a** (direction 3' preferred) and **7a** (none direction preferred) with 5'-CGCCCG-3'.

**Table 4**  
Average values of helical parameters for all DNA sequences arranged by heterocycle ring.

	Heterocyclic nucleus		
	ACR	TZQ	IMQ
AMBER	-58.65	-56.15	-61.14
$\Delta H_f$	6.96	13.34	10.21
$Sx_1$	-0.45	-0.13	-0.42
$Sy_1$	0.23	0.27	0.17
$Sz_1$	0.94	0.46	0.71
$\kappa_1$	24.51	16.48	16.10
$\omega_1$	-15.98	-21.39	-20.85
$\sigma_1$	4.69	-2.09	2.63
$Sx_2$	0.42	0.87	0.50
$Sy_2$	0.33	0.50	0.37
$Sz_2$	0.77	0.80	0.70
$\kappa_2$	-23.07	-15.48	-18.49
$\omega_2$	-17.82	-23.09	-21.57
$\sigma_2$	5.61	3.24	4.37

ACR: acridine; TZQ: thiazoloquinoline; IMQ: imidazoquinoline.

**Table 5**  
Average value of rise ( $D_z$ ) parameter for all DNA sequences.

sequence	ACR	TZQ	IMQ
AA	8.27	7.45	7.29
AC	8.53	7.78	8.37
AG	8.41	8.22	8.49
AT	8.84	8.17	8.68
CC	8.29	7.12	7.10
CG	8.17	7.11	7.20
GC	8.57	8.15	8.07
TA	7.76	7.52	7.46
TC	7.99	7.68	7.68
TG	7.93	8.34	7.53
AVG	8.28	7.75	7.79

evaluated. It is possible the structural requirements within the intercalation site might be sequence-specific.

The acridine compounds had a greater effect on the rise ( $D_z$ , opening between two adjacent pair bases) parameter than the other compounds (Table 5). This was consistent with the intercalation mode of the acridine derivatives found in the docking study. All compounds studied resulted in greater changes for the sequences 5'-CGAnCG-3', where  $n$  was G, C, T. Although the weaker AT pair at position 5' rendered these sequences prone to distortion, AT pairs at 3' being less sensitive, other factors had to participate.

The electronic effect of the substituents at positions 3' and 4' of the anilino ring was evaluated from semiempirical calculations of the intercalation complex core. The results for  $\Delta H_f$  are shown in Table 6. As expected, substituents with higher calculated DNA binding have electron releasing substituents in series 5 for almost all of the sequences. However, no clear trend was observed for series 6 or 7. In general, all compounds showed a calculated preference for the sequence 5'-CGATCG-3', as it has been reported in calculations carried out with amsacrine intercalation complexes [36]. The order of  $\Delta H_f$  was **10** > **9**  $\approx$  **8** > **5a** > **7a** > **6a** in agreement with experimental data, because the compounds of series 6 were weaker intercalators than some 9-anilinoacridines [14].

The comparison of  $\Delta H_f$  values for thiazoloquinolines **6a** and **9** complexes indicated that compound **9** not only could have better DNA binding properties than **6a** but also different base sequence selectivity because their sequence-preferences were quite different. This behavior was also observed in AMBER calculations implying that lateral chains, even small ones such as methylthio,

could have an important effect on base selectivity. Further studies on this topic are necessary to evaluate this proposal.

The spatial disposition of the aniline substituent and of the tricyclic template is a factor relevant to the DNA binding and, in particular, to the complex geometry. In turn, the complex geometry could be the cause of the different cytotoxic profiles observed in previous studies. Another example of the importance of geometrical properties in cytotoxicity was observed for acenaphtho[1,2-*b*]pyrrole derivatives, where the binding geometry and not only the binding affinity contributed to the antitumor capacity of these compounds [37]. Thus, even subtle changes in the electronic features (such as LUMO energy and orbital disposition, dipole moment) and geometrical features (dihedral angles of the lateral chains respect to the template) of the tricyclic compounds should be considered in the design of intercalators as potential antitumorals because both properties are surely involved in the factors that result in different structural requirements for cytotoxic activity and DNA binding.

Our data offer possible grounds for the rational design of new agents with different intercalation properties and/or a cytotoxic activity profile by the isosteric replacement in known polycyclic nuclei, but clearly experimental data will be needed to test the validity of such designs.

#### 4. Conclusion

The isosteric replacement of benzene moiety in 9-anilinoacridines for a heterocyclic ring appears to have an important influence on both the geometry and electronic properties of the resulting compounds and their DNA binding properties. The most important differences are (i) the position of the anilino ring, which is nearly orthogonal in acridines but oblique for the rest of analyzed compounds, (ii) the LUMO distribution density which is symmetric in **5a–i** but not in the other studied compounds and (iii) the effect on the electrostatic charge of N4 and MEP isovalues, which are lower in thiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives. Additional important differences were observed in the simulation of DNA-intercalator complexes, particularly those relating to the position of the aniline ring in the intercalation site and the sequence selectivity which was different depending on the nature of the tricyclic compound and the substituents attached to the anilino ring. These are factors that could have a strong influence on cytotoxicity, affecting the structural requirements for biological

**Table 6**  
Calculated heat of complex formation ( $\Delta H_f$ , kcal/mol, AM1 calculations.) for the intercalation complexes analyzed.

	AA	AC	AG	AT	CC	CG	GC	TA	TC	TG	AVG
<b>5a</b>	9.02	18.17	8.59	-5.25	6.16	18.63	3.27	0.97	2.88	11.97	7.44
<b>5b</b>	4.65	14.63	6.65	-4.39	4.76	23.87	-5.69	5.60	-2.46	14.06	6.17
<b>5c</b>	1.49	5.12	6.09	2.26	7.68	29.74	-0.56	6.78	5.35	11.03	7.50
<b>5d</b>	3.14	0.50	8.71	-0.08	16.16	18.36	13.62	9.09	1.93	18.88	9.03
<b>5e</b>	0.84	0.41	12.49	1.19	-3.75	16.73	1.37	1.79	2.76	12.86	4.67
<b>6a</b>	11.26	15.93	29.63	2.23	8.21	18.35	15.81	15.24	-0.87	19.59	13.61
<b>6b</b>	5.36	4.39	39.39	-0.11	8.19	21.03	8.39	8.58	13.43	27.44	13.61
<b>6c</b>	11.33	8.63	26.05	-5.64	11.46	15.34	4.37	10.80	0.44	28.84	11.22
<b>6d</b>	12.68	27.11	32.05	7.01	1.63	15.69	10.96	13.98	1.21	19.91	14.29
<b>6e</b>	12.59	15.55	8.45	12.73	13.17	15.35	7.34	11.86	15.41	26.64	13.96
<b>7a</b>	0.61	11.00	12.45	-0.98	5.58	11.07	15.81	2.85	4.96	12.70	7.65
<b>7b</b>	7.45	5.74	20.88	7.52	9.78	19.01	7.42	9.00	9.86	16.05	11.30
<b>7c</b>	9.29	17.53	14.63	5.37	6.82	25.45	20.57	15.56	0.32	10.43	12.65
<b>7d</b>	5.89	5.40	10.89	0.05	4.05	14.21	8.80	1.70	12.12	13.82	7.72
<b>7e</b>	17.47	6.51	26.87	-1.28	3.63	18.79	18.86	3.33	7.83	14.41	11.72
<b>8</b>	-0.39	7.91	8.14	-5.40	8.12	10.01	6.75	10.60	0.52	12.37	5.89
<b>9</b>	1.98	7.54	5.00	3.23	8.71	14.61	5.77	6.18	-2.20	6.69	5.77
<b>10</b>	12.48	-0.49	1.02	-3.63	-7.29	12.11	1.27	7.45	-4.27	5.57	2.42

activity and should be considered in the design of new intercalators with potential antitumoral activity.

## Acknowledgments

M.A. Loza-Mejía acknowledges the fellowship awarded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-Mexico) to carry out graduate studies and Dr. Juan Antonio Cogordán (Instituto de Química, UNAM) for his interest and valuable comments. We thank Dr. Rogelio Rodríguez-Sotres for allowing us to use Hyperchem software.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jmgm.2009.02.001.

## References

- [1] K.R. Fox, M.J. Waring, Footprinting at low temperatures: evidence that ethidium and other simple intercalators can discriminate between different nucleotide sequences, *Nucl. Acids Res.* 15 (1987) 491–507.
- [2] Y. Pommier, P. Pourquier, Y. Fan, D. Strumberg, Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta* 1400 (1998) 83–105.
- [3] D.A. Burden, N. Osheroff, Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta* 1400 (1998) 139–154.
- [4] W.A. Denny, in: W.O. Foye (Ed.), *Cancer Chemotherapeutic Agents*, American Chemical Society, USA, 1995, pp. 218–239.
- [5] B.C. Baguley, W.A. Denny, G.J. Atwell, G.J. Finlay, G.W. Rewcastle, S.J. Twigden, W.R. Wilson, Synthesis, antitumor activity, and DNA binding properties of a new derivative of Amsacrine, *N*-5-Dimethyl-9-[(2-methoxy-4-methylsulfonylamino)-phenylamino]-4-acridinecarboxamide, *Cancer Res.* 44 (1984) 3245–3251.
- [6] I. Chourpa, M.J. Manfait, Specific molecular interactions of acridine drugs in complexes with topoisomerase II and DNA. SERS and resonance Raman study of *m*-AMSA in comparison with *o*-AMSA, *Raman Spectrosc.* 26 (1995) 813–819.
- [7] I. Chourpa, H. Morjani, J.-F. Riou, M. Manfait, Intracellular molecular interactions of antitumor drug amsacrine (*m*-AMSA) as revealed by surface-enhanced Raman spectroscopy, *FEBS Lett.* 397 (1996) 61–64.
- [8] K.-C. Chow, T.L. MacDonald, W.E. Ross, DNA binding by epipodophyllotoxins and *N*-acyl anthracyclines: implications for mechanism of topoisomerase II inhibition, *Mol. Pharmacol.* 34 (1988) 467–473.
- [9] D. Makhey, C. Yu, A. Liu, L.F. Liu, E.J. La Voie, Substituted benz[*a*]acridines and benz[*c*]acridines as mammalian topoisomerase poisons, *Bioorg. Med. Chem.* 8 (2000) 1171–1182.
- [10] A. Elomri, S. Mitaku, S. Michel, A. Skaltsounis, F. Tillequin, M. Koch, A. Pierré, N. Guilbaud, S. Léonce, L. Kraus-Berthier, Y. Rolland, G.J. Atassi, Synthesis and cytotoxic and antitumor activity of esters in the 1,2-dihydroxy-1,2-dihydroacronycine series, *J. Med. Chem.* 39 (1996) 4762–4766.
- [11] N. Costes, H. Le Deit, S. Michel, F. Tillequin, M. Koch, B. Pfeiffer, P. Renard, S. Léonce, N. Guilbaud, L. Kraus-Berthier, A. Pierré, G.J. Atassi, Synthesis and cytotoxic and antitumor activity of benzo[*b*]pyrano[3,2-*h*]acridin-7-one analogues of acronycine, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 2395–2402.
- [12] R.T. Dorr, J.D. Liddil, Development of a parenteral formulation for the antitumor agent acronycine, *J. Drug Dev.* 1 (1988) 31–39.
- [13] P. Rodríguez-Loaiza, A. Quintero, R. Rodríguez-Sotres, J.D. Solano, A. Lira-Rocha, Synthesis and evaluation of 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives as potential antitumorals, *Eur. J. Med. Chem.* 39 (2004) 5–10.
- [14] M.A. Loza-Mejía, K. Maldonado-Hernández, F. Rodríguez-Hernández, R. Rodríguez-Sotres, I. González-Sánchez, J.D. Solano, A. Lira-Rocha, Synthesis, cytotoxic evaluation, and DNA binding of novel thiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 11421–12149.
- [15] Y.-L. Chen, I.-L. Chen, T.-C. Wang, C.-H. Han, C.-C. Tzeng, Synthesis and anticancer evaluation of certain 4-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline and 4-anilinothiazolo[3,2-*c*]quinoline derivatives, *Eur. J. Med. Chem.* 40 (2005) 928–934.
- [16] G. Fischer, U. Pindur, A molecular modeling study of B-DNA-intercalation complexes with amsacrine and related 9-anilino-acridines, *Pharmazie* 54 (1999) 83–93.
- [17] A. Rajendran, B. Nair, Unprecedented dual binding behaviour of acridine group of dye: a combined experimental and theoretical investigation for the development of anticancer chemotherapeutic agents, *Biochim. Biophys. Acta* 1760 (2006) 1794–1801.
- [18] Q. Zhang, E.C.M. Chen, The experimental hardness and electronegativity of the purines and pyrimidines in DNA and RNA supported by the AM1 calculation of the electron affinities and ionization potentials, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217 (1995) 755–760.
- [19] R. Miri, K. Javidnia, H. Sarkarzadeh, B. Hemmateenejad, Synthesis, cytotoxicity, QSAR, and intercalation study of new diindenopyridine derivatives, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 4842–4849.
- [20] D. Hall, D.A. Swann, T.N. Waters, Crystal and molecular structure of 4'-(acridin-9-ylamino) methanesulphonamide hydrochloride, a compound showing antileukemic activity, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* (1974) 1334–1337.
- [21] W.A. Denny, G.J. Atwell, B.C. Baguley, Potential antitumor agents. 39. Anilino ring geometry of amsacrine and derivatives: relationship to DNA binding and antitumor activity, *J. Med. Chem.* 26 (1983) 1625–1630.
- [22] M.J. Waring, C. Bailly, The purine 2-amino group as a critical recognition element for binding of small molecules to DNA, *Gene* 149 (1994) 69–79.
- [23] C. Rehn, U. Pindur, Molecular modeling of intercalation complexes of antitumor active 9-aminoacridine and a [*d,e*]-annelated isoquinoline derivative with base paired deoxytetranucleotides, *Monatsh. Chem.* 127 (1996) 645–648.
- [24] M. Baginski, F. Fogolari, J.M. Briggs, Electrostatic and non-electrostatic contributions to the binding free energies of anthracycline antibiotics to DNA, *J. Mol. Biol.* 274 (1997) 253–267.
- [25] X. Shui, M.E. Peek, L.A. Lipscomb, Q. Gao, C. Ogata, B.P. Roques, C. Garbay-Jaureguiberry, A.P. Wilkinson, L.D. Williams, Effects of cationic charge on three-dimensional structures of intercalative complexes: structure of a bis-intercalated DNA complex solved by MAD phasing, *Curr. Med. Chem.* 7 (2000) 59–71.
- [26] S. Patterson, J. Coxon, L. Strekowski, Intercalation of ethidium and analogues with nucleic acids: a molecular orbital study, *Bioorg. Med. Chem.* 5 (1997) 277–281.
- [27] R.M. Wadkins, G.E. Graves, Interactions of anilinoacridines with nucleic acids: effects of substituent modifications on DNA-binding properties, *Biochemistry* 30 (1991) 4277–4283.
- [28] S. Braga, L. de Melo, P. Barone, Semiempirical study on the electronic structure of antitumor drugs ellipticines, olivacines and isoellipticines, *J. Mol. Struct. (Theochem.)* 710 (2004) 51–59.
- [29] J. Gallego, A.R. Ortiz, F. Gago, A molecular dynamics study of the bis-intercalation complexes of echinomycin with d(ACGT)<sub>2</sub> and d(TCGA)<sub>2</sub>: rationale for sequence-specific Hoogsteen base pairing, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 1548–1561.
- [30] H. Gao, W.A. Denny, R. Garg, C. Hansch, Quantitative structure-activity relationships (QSAR) for 9-anilinoacridines: a comparative analysis, *Chem. Biol. Interact.* 116 (1998) 157–180.
- [31] C. Medhi, J. Mitchell, S. Price, A. Tabor, Electrostatic factors in DNA intercalation, *Biopolymers (Nucleic Acids Sci.)* 52 (1999) 84–93.
- [32] R.E. Dickerson, Definitions and nomenclature of nucleic acid structure components, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 1797–1803.
- [33] X.-J. Lu, W.K. Olson, 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 5108–5121.
- [34] W.K. Olson, M. Bansal, S.K. Burley, R.E. Dickerson, M. Gerstein, S.C. Harvey, U. Heinemann, X.-J. Lu, S. Neidle, Z. Shakked, H. Sklenar, M. Suzuki, C.-S. Tung, E. Westhof, C. Wolberger, H.M. Berman, A standard reference frame for the description of nucleic acid base-pair geometry, *J. Mol. Biol.* 313 (2001) 229–237.
- [35] B.D. De Oliveira, A.C. Gáudio, BuildQSAR: A new computer program for QSAR studies, *Quant. Struct.-Act. Rel.* 19 (2003) 599–601.
- [36] K. Chen, N. Gresh, B. Pullman, Energetics and stereochemistry of DNA complexation with the antitumor AT specific intercalators tilorone and *m*-AMSA, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 3061–3073.
- [37] Z. Zhang, Y. Yang, D. Zhang, Y. Wang, X. Qiana, F. Liu, Acenaphtho[1,2-*b*]pyrrole derivatives as new family of intercalators: Various DNA binding geometry and interesting antitumor capacity, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 6962–6970.



## Synthesis, cytotoxic activity, DNA topoisomerase-II inhibition, molecular modeling and structure–activity relationship of 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives

Marco A. Loza-Mejía<sup>a,†</sup>, Susana Olvera-Vázquez<sup>a</sup>, Karina Maldonado-Hernández<sup>a</sup>,  
Teresita Guadarrama-Salgado<sup>a</sup>, Ignacio González-Sánchez<sup>b</sup>, Fernando Rodríguez-Hernández<sup>c</sup>,  
José D. Solano<sup>b</sup>, Rogelio Rodríguez-Sotres<sup>c</sup>, Alfonso Lira-Rocha<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Coyoacán, México 04510, Mexico

<sup>b</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Coyoacán, México 04510, Mexico

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, Coyoacán, México 04510, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 February 2009

Revised 20 March 2009

Accepted 25 March 2009

Available online 1 April 2009

#### Keywords:

Thiazolo[5,4-*b*]quinoline

Molecular modeling

Cytotoxic activity

DNA topoisomerase-II inhibition

Structure–activity relationship

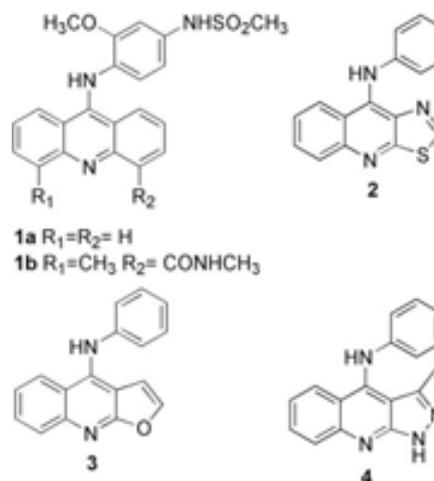
### ABSTRACT

Some novel 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives were synthesized and their cytotoxic activities were examined. The inhibition of some of the most active compounds over human topoisomerase II (Topo II) activity was assessed with the kDNA decatenation assay. The novel compounds differ in the substituents attached to the anilino ring, a dialkylamino alkylamino group, a saturated heterocyclic moiety, a methylthio group at position 2 and a fluorine atom present or absent at 7-position. According to the data, compounds with a diethylaminopropylamino group and a chlorine atom at 4'-position of the anilino ring were the most cytotoxic. The molecular models of all compounds indicated a correlation between hydrophobicity and cytotoxic activity although the direction and magnitude of the dipole moment also had a significant influence on its cytotoxicity. The 2-dialkylaminoalkylamino substituent is flexible and is known to facilitate the crossing of cell membranes; thus, this last barrier may be a limiting step in the mechanisms mediating the cytotoxicity. On the other hand, the activity of 2-methylthio derivatives seems to rely more on the electronic effects brought about by the substitution of the aniline ring. The synthesis, cytotoxicity against cancer cell lines, *in vitro* inhibition of human topoisomerase II, molecular modeling and the preliminary analysis of structure–activity relationships are presented.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Several compounds based on tricyclic templates have been studied in the search for better anticancer agents. Among these, 9-anilinoacridines have been extensively studied as potential antitumorals, and their capability of interacting with DNA and inhibiting the DNA topoisomerase II has been proposed as a mechanism of action. The stabilization of a enzyme–drug–DNA ternary complex covalent-intermediate has been shown to lead to DNA lesions, the interaction anilino ring–enzyme being one of the principal stabilizing factors.<sup>1–3</sup> One of these derivatives, amsacrine (Fig. 1, *m*-AMSA, **1a**), has been clinically used for leukemia and lymphoma treatment.<sup>4,5</sup> Structural modifications in the acridine nucleus have led to a novel agent, asulacrine **1b**,<sup>6</sup> which was capable of inhibiting the growth of some solid tumors. On the other hand, the isosteric replacement of a benzene moiety in the acridine template has

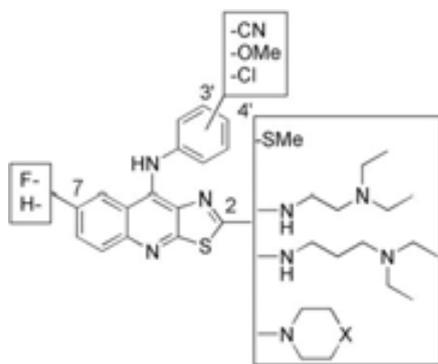


**Figure 1.** Chemical structures of amsacrine **1a**, asulacrine **1b** and some aniline-substituted tricyclic templates **2–4**.

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56 22 52 86; fax: +52 55 56 22 53 29.

E-mail address: lira@servidor.unam.mx (A. Lira-Rocha).

<sup>†</sup> Taken in part from the PhD dissertation of Marco A. Loza-Mejía.



**Figure 2.** 9-Anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline template and the substituents considered in the present study.

led to compounds such as 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline **2**,<sup>7,8</sup> 4-anilino-furo[2,3-*b*]quinoline **3**<sup>9</sup> and 4-anilino-pyrazolo[3,4-*b*]quinoline **4**<sup>10</sup> derivatives which have shown good cytotoxic activity. The incorporation of a five- or six-membered heterocyclic ring fused to an anthracenedione or acridine nucleus usually increases the cytotoxic activity, thus enabling the compounds to overcome multidrug resistance of tumor cells.<sup>11,12</sup>

In our previous paper, the importance of the substitution pattern in the anilino ring of 2-methylthio derivatives of **2** was explored by introducing different substituents at positions 3' and 4' of the anilino ring as well as a diethylaminoethylamino chain at positions 2 and 9 of the tricyclic nucleus. Electron withdrawing groups (EWG) and hydrogen bond acceptors (HBA) attached to position 3' of the anilino ring improved cytotoxic activity. Besides, the position of the diethylaminoethylamino chain had less influence on cytotoxicity than it did in the DNA binding affinity.<sup>7,8</sup>

In the present study, the effect of additional substituents on the anilino ring of the 9-anilinothiazoloquinoline system (Fig. 2, Scheme 1, series **7f–7h**) is presented. In those compounds previously identified as good to fair cytotoxics (with substituents at positions 3' or 4' of the anilino ring), the influence of a dialkylaminoalkylamino (diethylaminoethylamino or diethylaminopropylamino) chain at position 2 was studied (Scheme 1, series **10** and **11**). In particular, the chain length and flexibility of the dialkylaminoalkylamino chain was modified by incorporating a saturated heterocycle substituent at position 2, while keeping a nitrogen atom attached to the C-2 of the tricyclic system (Scheme 1, series **8**). Finally, fluorination of position 7 of the thiazoloquinoline system was included in some compounds (Scheme 1, series **7a–7e**) since it was reported to increase cytotoxic effects.<sup>13</sup> Cytotoxic activity as well as the inhibition of human topoisomerase II activity of the novel and some previously reported compounds were evaluated, and a preliminary study structure–activity relationship was carried out. The information obtained has rendered important clues to the understanding of the cytotoxic profile for these types of compounds.

## 2. Chemistry

The synthesis of the proposed compounds is depicted in Scheme 1. Preparation of intermediates for compounds **5a–5b** has already been described.<sup>7,13</sup> Compounds **6a** and **6b** were prepared by cyclization of **5a** and **5b** with POCl<sub>3</sub>/PPA,<sup>7</sup> but lower yields were obtained for the fluorinated analogue (60% for **6a**, 35% for **6b**). Attempts to increase the yield (higher temperature and/or increment of POCl<sub>3</sub>/PPA) were unsuccessful. Although compounds **8a–8c** were obtained from **6a** by direct condensation with the heterocyclic amine in good yields (over 80%), this method was not useful for preparing anilino-substituted compounds **8d–8f** or those of series **10** and **11**. The anilino group diminishes the susceptibility of

the tricyclic ring to the nucleophilic attack, apparently by steric hindrance. Compounds **10a–10f**, **11a–11e** and **8d–8f** were obtained by the oxidation of the methylthio derivative to the respective sulfone, and subsequent condensation with the appropriate amine in moderate to good yields. We also tried to obtain compounds **8d–8f** by condensation of aniline with **8a–8c** by using different conditions, but the starting material was recovered each time. Compounds of series **7** were obtained by a method previously reported,<sup>7</sup> but in the case of fluorinated derivatives it was necessary to extend reaction time. All compounds were characterized by IR, <sup>1</sup>H NMR, MS and elemental analysis. Unequivocal assignment of all <sup>1</sup>H NMR signals was possible by NOESY experiments carried out with compound **10e**.

## 3. Biological

### 3.1. In vitro cytotoxicity

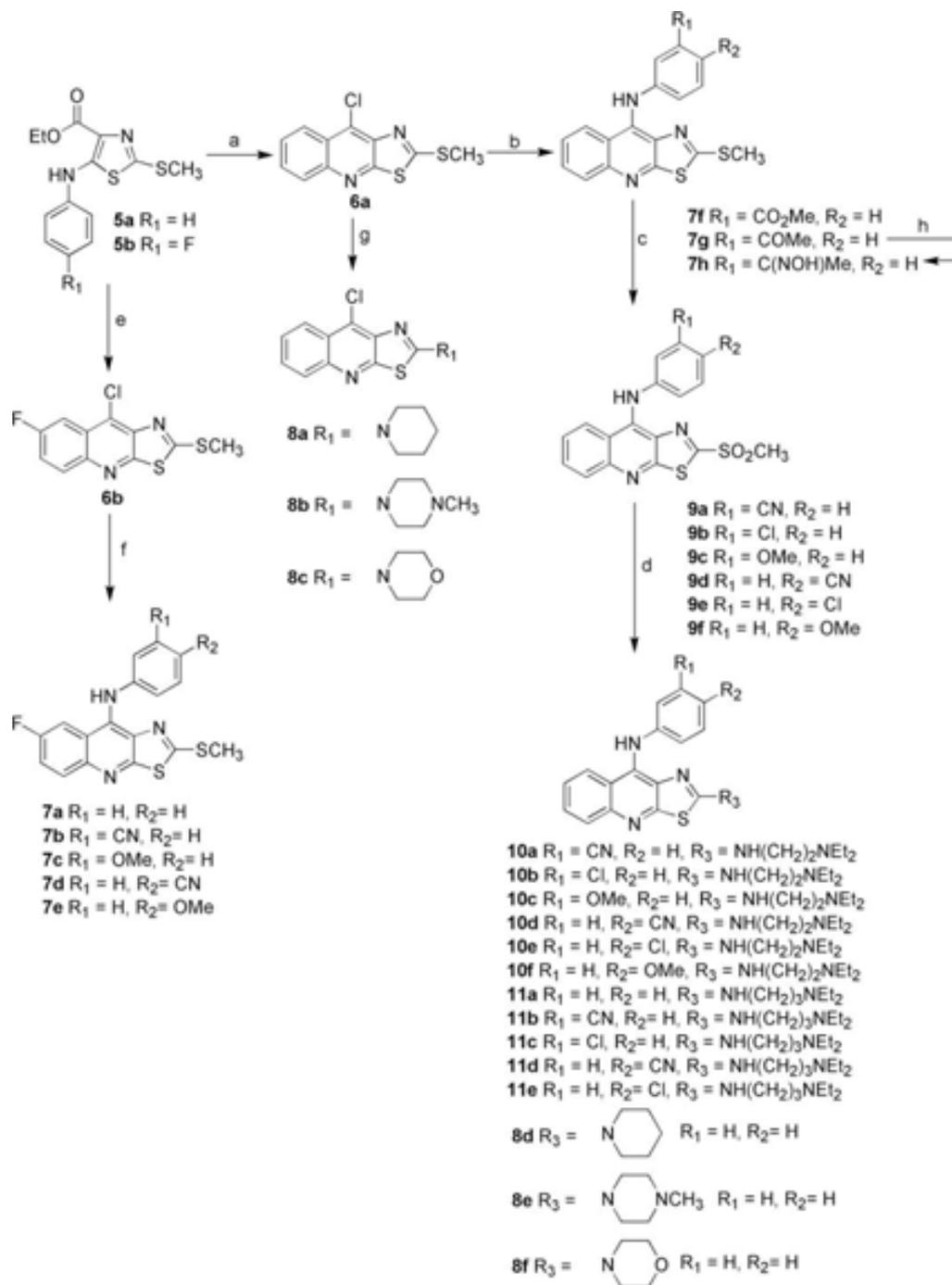
The results of the evaluation of cytotoxic activity of the newly prepared and some previously reported compounds<sup>7,8</sup> are shown in Table 1. 9-Anilino-7-fluoro-substituted derivatives were not as active as their non-fluorinated analogues (compare **7a–e** and **7i–m**), except for compound **7c**, which was more active than the non-fluorinated analogue **7k**. In general, the trend differs from the one found by Alvarez-Ibarra et al. for 9-hydroxythiazoloquinoline derivatives,<sup>13</sup> where a substitution with a fluorine atom in position 7 favored cytotoxicity.

Since, according to our previous studies, the presence of an electron withdrawing group at 3'-position favored cytotoxicity, additional substituents were incorporated at this position, that is, compounds **7f–7h**. As discussed in that preceding paper,<sup>8</sup> a putative hydrogen bond acceptor atom seems to be relevant to cytotoxicity of such a compound series. In the new compounds, only the oxime-substituted compound was cytotoxic. Thus, the cytotoxic activity may be influenced by the distance from the anilino ring to the putative hydrogen bond acceptor atom (distance to HBA, Figure 3), because the cyano derivative **7j** was cytotoxic, but a shorter or longer distance to HBA, as in **7f** and **7g**, eliminated the activity. In addition, the alignment of the cyano group possibly contributes to a better hydrogen bond interaction. Moro, Capranico et al. have proposed a model for the interaction of some intercalators with DNA and DNA topoisomerase II, based on docking studies.<sup>14</sup> Strong interactions were found between a hydroxyl group of Thr744 of topoisomerase II (hydrogen bond donor atom, HBD) and the sulfonamide moiety (HBA) of the *m*-amsacrine. A similar interaction may mediate anilinothiazolo[5,4-*b*]quinolines antitumor activity, and if so, the HBA group could be involved.

Compounds of series **8** that carry a six-member saturated nitrogen-containing heterocyclic substituent at 2-position showed low activity. A similar result was observed for 9-hydroxy-2-saturated thiazoloquinoline substituted compounds.<sup>13</sup> Thus, flexibility of the alkylamino chain at 2-position seems to have a positive influence on cytotoxic activity. In addition, compounds of series **10** and **11** showed similar cytotoxic activity, **11e** being the most active. Since the 'propylenediamine' substituted compounds in these series were more active than 'ethylenediamine' substituted compounds, the length of the alkylamino chain was relevant but not critical for cytotoxic activity. On the other hand, attachment of the substituents at any position of the anilino ring in these derivatives did not improve activity and in some cases it even reduced cytotoxicity.

### 3.2. Inhibition of human DNA topoisomerase II activity

As reported in our previous paper<sup>8</sup>, the cytotoxicity of several thiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives did not correlate with the



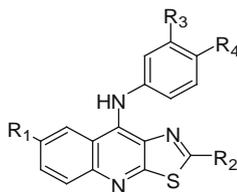
**Scheme 1.** Reactions and conditions (a)  $POCl_3/PPA$ , 130 °C, 4 h; (b)  $H_2N-C_6H_4-R$ , MeOH, reflux, 6 h; (c)  $H_2O_2/AcOH$ , rt, overnight; (d) method A amine, reflux 30 min; method B amine, DMF, rt, 3 h; (e)  $POCl_3/PPA$ , 150 °C, 4 h; (f)  $H_2N-C_6H_4-R$ , EtOH, reflux, 20 h; (g) amine, rt, 24 h; (h)  $NH_2OH$ , MeOH, reflux, 2 h.

in vitro DNA-intercalation ability of the compounds. In the case of acridines the mechanism of action seems to be related to the stabilization of the ternary complex between DNA, Topoisomerase II and the drug.<sup>15</sup> The decatenation of kDNA molecules was used to assay human Topoisomerase II (Topo II) activity. Only topoisomerase type II can resolve individual DNA molecules from the interlocked network of covalently closed minicircles composing the kDNA. The resulting individual molecules were analyzed by agarose-gel electrophoresis, and the activity was calculated from the percentage of kDNA converted to individual DNA molecules, as judged from densitometric analysis of ethidium bromide stained gels. In control lanes no residual kDNA was detected, this activity

being considered 100%. In the initial screening, the most cytotoxic compounds were tested at a final concentration of 160  $\mu M$  in the assay. For those showing significant activity the  $IC_{50}$  was calculated from dose–response curves in the range of concentration of 1–160  $\mu M$ . The resulting curves were sigmoidal in most cases with Hill numbers ranging from 2 to 8. Apparent cooperativity binding may indicate the participation of more than one molecule of the compound in the enzyme–DNA–inhibitor complex or the existence of high and low affinity DNA subsites where the compound binds, yet not all of them lead to the inhibition of Topo II. The concentration values giving 50% inhibition ( $IC_{50}$ ) were calculated by non-linear regression fits of the data to the following equation:

**Table 1**

In vitro cytotoxic activity of novel and already reported thiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	HeLa	SW480	SW620	K-562
<b>7a</b>	F	SMe	H	H	>80	>80	>80	>80
<b>7b</b>	F	SMe	CN	H	>80	>80	>80	55.36
<b>7c</b>	F	SMe	OMe	H	15.8	13.7	12.2	n.t
<b>7d</b>	F	SMe	H	CN	>80	>80	>80	n.t
<b>7e</b>	F	SMe	H	OMe	>80	>80	>80	54.91
<b>7f</b>	H	SMe	CO <sub>2</sub> Et	H	>80	>80	>80	>80
<b>7g</b>	H	SMe	COMe	H	>80	>80	>80	>80
<b>7h</b>	H	SMe	OXM	H	34.2	37.3	39.4	32.8
<b>7i<sup>c</sup></b>	H	SMe	H	H	>80	>80	>80	>80
<b>7j<sup>d</sup></b>	H	SMe	CN	H	7.75	28.68	43.75	8.01
<b>7k<sup>d</sup></b>	H	SMe	OMe	H	25.34	66.65	26.58	22.17
<b>7l<sup>d</sup></b>	H	SMe	Cl	H	69.37	>80	>80	80.26
<b>7m<sup>d</sup></b>	H	SMe	H	CN	>80	>80	>80	>80
<b>7n<sup>d</sup></b>	H	SMe	H	OMe	>80	>80	>80	77.2
<b>7o<sup>d</sup></b>	H	SMe	H	Cl	>80	>80	>80	79.45
<b>7p<sup>d</sup></b>	H	SMe	NMe	H	46.22	>80	>80	46.85
<b>7q<sup>d</sup></b>	H	SMe	(CO)E	H	21.69	13.6	19.72	12.54
<b>7r<sup>d</sup></b>	H	SMe	CF <sub>3</sub>	H	43.34	65.13	62.28	67.06
<b>7s<sup>d</sup></b>	H	SMe	OH	H	>80	>80	>80	>80
<b>7t<sup>c</sup></b>	H	SMe	NH <sub>2</sub>	H	>80	>80	>80	>80
<b>7u<sup>c</sup></b>	H	SMe	NH <sub>2</sub>	<sup>b</sup>	>80	>80	>80	>80
<b>7v<sup>c</sup></b>	H	SMe	NHAc	H	>80	>80	>80	>80
<b>8a</b>	H	PIP	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	>80	>80	>80	>80
<b>8b</b>	H	MPZ	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	>80	>80	>80	>80
<b>8c</b>	H	MOR	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	>80	>80	>80	>80
<b>8d</b>	H	PIP	H	H	>80	>80	>80	>80
<b>8e</b>	H	MPZ	H	H	60.7	41.8	>80	73.01
<b>8f</b>	H	MOR	H	H	>80	>80	>80	>80
<b>10a</b>	H	E	CN	H	13.33	13.10	14.62	12.48
<b>10b</b>	H	E	Cl	H	9.12	14.33	17.78	12.19
<b>10c</b>	H	E	OMe	H	19.2	11.5	20.0	23.5
<b>10d</b>	H	E	H	CN	15.18	14.18	16.49	8.36
<b>10e</b>	H	E	H	Cl	10.16	12.56	12.20	7.26
<b>10f</b>	H	E	H	OMe	13.60	12.04	16.38	10.87
<b>10g<sup>c</sup></b>	H	E	H	H	15.96	37.7	21.6	16.8
<b>11a</b>	H	P	H	H	6.27	6.90	16.56	7.52
<b>11b</b>	H	P	CN	H	19.21	11.53	19.65	12.88
<b>11c</b>	H	P	Cl	H	7.46	7.91	10.17	9.84
<b>11d</b>	H	P	H	CN	24.18	22.70	29.15	12.88
<b>11e</b>	H	P	H	Cl	8.82	4.92	7.48	3.36
			Amsacrine <sup>c</sup>		9.5	27.7	16.7	19.9

IC<sub>50</sub>, μM, compound concentration inhibiting 50% of cellular growth assessed by the MTT assay.

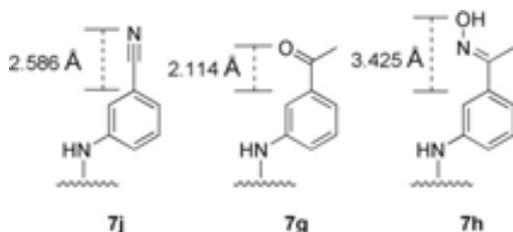
E = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NEt<sub>2</sub>, P = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NEt<sub>2</sub>, PIP = -1-piperidinyl, MPZ = -4-methylpiperazinyl, MOR = 1-morpholinyl, OXM = C(NO<sub>2</sub>)Me, n.t. not tested.

<sup>a</sup> Chlorine atom in position 9 instead of aniline ring.

<sup>b</sup> 5'-CH<sub>2</sub>OH substituted.

<sup>c</sup> Taken from Ref. 7.

<sup>d</sup> Taken from Ref. 8.



**Figure 3.** Distance from aniline ring to hydrogen bond acceptor atom (distance to HBA).

**Table 2**

Inhibitory activity of thiazolo[5,4-*b*]derivatives and *m*-amsacrine, as reference, against on topoisomerase II (IC<sub>50</sub>, μM)

Compound	Activity	±se	Hill	±se
<b>7l</b>	21.20	0.61	8	1.52
<b>7o</b>	20.49	0.24	7	0.57
<b>7p</b>	12.27	0.28	3	0.15
<b>7r</b>	15.42	0.01	6	0.01
<b>7s</b>	64.34	5.13	7	1.86
<b>7t</b>	16.74	0.14	4	0.10
<b>7u</b>	18.04	1.66	2	0.48
<b>7v</b>	29.56	6.21	2	0.40
<b>10g</b>	168.90	6.07	1	0.06
<b>11c</b>	40.95	8.66	1	0.05
<i>m</i> -AMSA	9.94	0.51	4	0.56

$$\text{Activity (\%)} = \frac{100IC_{50}^{n_H}}{IC_{50}^{n_H} + [I]^{n_H}}$$

where  $n_H$  is the cooperativity index and  $I$  the concentration of added compound. Non-linear regression was performed with the Sigmasat 2.0 statistical package (Jendel Sci. Inc. San Rafael, Ca.).

There was no correlation between in vitro Topo II inhibition (Table 2) and the cytotoxicity of the compounds (Table 1). Compound **7p** was as nearly a good Topo II inhibitor as *m*-AMSA, but it exhibited low cytotoxicity, while compound **11c** was highly cytotoxic, but, as an inhibitor of Topo II, it was four times less potent than *m*-AMSA. Thus, the thiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives may not be acting by the same mechanism as *m*-AMSA, may be differentially modified by cell metabolism, or may present large differences in their ability to penetrate the cell.

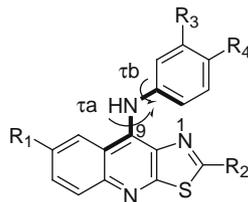
#### 4. Molecular modeling

The cytotoxic activity of these compounds must be related to their molecular structure, and molecular modeling of the isolated molecules may reveal some of the factors involved. Molecular models were obtained with SPARTAN<sup>04</sup><sup>16</sup> software using the semi-empirical AM1 method. A systematic search protocol (torsion angles  $\tau_a$  and  $\tau_b$ ) was used to obtain the minimal energy conformers. Table 3 shows some of the calculated molecular parameters. Optimized geometries of selected compounds are shown in Figure 4. Substituents attached to the phenyl ring linked to the amino group had a greater effect on the phenyl conformation than those attached to 2-position of the tricyclic nucleus system. The results of the conformational analysis show an oblique orientation of the anilino ring in relation to the tricyclic nucleus. In accordance with the models, the analysis of the NOESY spectrum of **10e** showed a long-range interaction between the protons of the anilino ring and those of alkylamino chain.

Because DNA–intercalator complex can be stabilized through frontier molecular orbital interactions, LUMO energy values of the compounds were calculated. All compounds appear to behave as electron acceptors since their LUMO energies were negative. In contrast, the DNA base pairs have been shown to act as electron donors.<sup>17</sup> This type of interaction should be very important for fluorinated compounds **7a–7e** because their LUMO energy values were the lowest. In the case of alkylamino derivatives, a cationic species can be formed due to the basic properties of the side chain, which can interact the phosphate backbone, facilitating DNA intercalation. This last interaction has been shown to occur in similar compounds<sup>18</sup> and was suggested by us based on previous results.<sup>8</sup>

The dipole moment describes the charge distribution in a molecule and somehow summarizes electronic effects involved in molecular recognition. With DNA intercalators, a direct correlation between their dipole moment values and cytotoxicity has been

**Table 3**  
Selected parameters calculated for thiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	E HOMO (eV)	E LUMO (eV)	Dipole (Debye)	PSA (Å <sup>2</sup> )	LogP	τ <sub>a</sub> (°)
<b>7a</b>	F	SMe	H	H	-8.2812	-1.2490	2.7750	25.4798	5.33	-60.9
<b>7b</b>	F	SMe	CN	H	-8.5381	-1.4596	2.9112	40.94	5.37	-66.0
<b>7c</b>	F	SMe	OMe	H	-8.2981	-1.2551	2.9116	32.6213	5.21	-62.4
<b>7d</b>	F	SMe	H	CN	-8.5720	-1.5062	4.3856	40.9403	5.37	-67.2
<b>7e</b>	F	SMe	H	OMe	-8.1733	-1.2143	2.5061	32.6746	5.21	-58.4
<b>7f</b>	H	SMe	CO <sub>2</sub> Et	H	-8.3488	-1.2317	1.5972	44.009	5.33	-64.5
<b>7g</b>	H	SMe	COMe	H	-8.3493	-1.2319	1.8153	38.628	4.49	-63.4
<b>7h</b>	H	SMe	OXM	H	-8.2219	-1.1237	2.2472	59.969	4.88	-62.6
<b>7i</b>	H	SMe	H	H	-8.1929	-1.0978	2.6069	25.4955	5.18	-61.8
<b>7j</b>	H	SMe	CN	H	-8.4384	-1.3072	1.4718	40.9621	5.21	-66.3
<b>7k</b>	H	SMe	OMe	H	-8.2095	-1.1038	3.0656	32.6417	5.05	-63.2
<b>7l</b>	H	SMe	Cl	H	-8.3269	-1.2085	1.0670	25.5319	5.73	-64.6
<b>7m</b>	H	SMe	H	CN	-8.4712	-1.3560	3.0940	40.9473	5.21	-67.1
<b>7n</b>	H	SMe	H	OMe	-8.1371	-1.0973	1.8501	32.6991	5.05	-60.0
<b>7o</b>	H	SMe	H	Cl	-8.3010	-1.2130	1.7710	25.5309	5.73	-64.3
<b>7p</b>	H	SMe	NMe	H	-8.4467	-1.3666	3.9320	37.5510	4.67	-67.9
<b>7q</b>	H	SMe	(CO)E	H	-8.6759	-1.5141	1.9465	53.1684	4.99	-70.9
<b>7r</b>	H	SMe	CF <sub>3</sub>	H	-8.8215	-1.5828	4.1788	25.8454	6.10	-79.0
<b>7s</b>	H	SMe	OH	H	-8.5419	-1.3882	4.2182	45.2594	4.79	-74.0
<b>7t</b>	H	SMe	NH <sub>2</sub>	H	-8.4487	-1.3750	3.4153	50.388	4.37	-70.0
<b>7u</b>	H	SMe	NH <sub>2</sub>	<sup>b</sup>	-8.4069	-1.1691	5.0351	67.5379	3.8	-70.0
<b>7v</b>	H	SMe	NHAc	H	-8.5198	-1.4433	1.045	50.2311	4.08	-68.0
<b>8a</b>	H	PIP	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	-8.5277	-0.9740	2.1853	16.5785	6.13	n/a
<b>8b</b>	H	MPZ	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	-8.5574	-1.0003	1.9366	19.1469	4.82	n/a
<b>8c</b>	H	MOR	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	-8.6512	-1.0832	0.4513	24.4935	4.66	n/a
<b>8d</b>	H	PIP	H	H	-8.1366	-0.8559	2.8936	27.3391	6.52	-67.0
<b>8e</b>	H	MPZ	H	H	-8.1507	-0.8753	2.4780	29.895	5.21	-66.3
<b>8f</b>	H	MOR	H	H	-8.2160	-0.9483	1.1818	35.2189	5.06	-65.2
<b>10a</b>	H	E	CN	H	-8.4021	-1.0062	3.7587	54.4904	5.38	-75.1
<b>10b</b>	H	E	Cl	H	-8.2583	-0.9071	3.2760	39.0601	5.9	-71.1
<b>10c</b>	H	E	OMe	H	-8.1415	-0.8290	4.4488	46.2024	5.22	-68.7
<b>10d</b>	H	E	H	CN	-8.3940	-1.0392	6.0452	54.4736	5.38	-72.7
<b>10e</b>	H	E	H	Cl	-8.2344	-0.9171	3.8532	39.0872	5.9	-71.3
<b>10f</b>	H	E	H	OMe	-8.0092	-0.7954	3.4852	46.2707	5.22	-67.1
<b>10g</b>	H	E	H	H	-8.1317	-0.8131	3.7866	39.0819	5.35	-69.3
<b>11a</b>	H	P	H	H	-8.0845	-0.7612	4.1858	36.7885	5.63	-69.9
<b>11b</b>	H	P	CN	H	-8.3473	-0.9520	4.6902	52.1346	5.66	-75.2
<b>11c</b>	H	P	Cl	H	-8.2280	-0.8615	4.0702	34.2395	6.18	-72.9
<b>11d</b>	H	P	H	CN	-8.3434	-0.9862	6.9274	52.1784	5.66	-73.1
<b>11e</b>	H	P	H	Cl	-8.1920	-0.8659	4.3978	36.7761	6.18	-72.4
		Amsacrine			-8.2450	-1.3367	1.7783		3.11	-114

E = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NEt<sub>2</sub>, P = NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NEt<sub>2</sub>, PIP = -1-piperidinyl, MPZ = -4-methylpiperazinyl, MOR = 1-morpholinyl, OXM = C(NO<sub>2</sub>)Me, n/a = not applicable.

<sup>a</sup> Chlorine atom in position 9 instead of aniline ring.

<sup>b</sup> 5'-CH<sub>2</sub>OH substituted.

found.<sup>19–21</sup> In the present study, the dipole moment vector and magnitude were calculated.

A cyano group or chlorine atom increased the dipole moment magnitude more when placed at 4'-position than when placed at 3'-position. The opposite trend is observed for the methoxy group. For compounds with a dialkylaminoalkylamino substituent, the incorporation of an electron withdrawing group (EWG) notably increased the dipole moment magnitude. The replacement of the methylthio group at 2-position by a dialkylaminoalkylamino residue also resulted in a higher dipole moment, and the incorporation of a saturated heterocycle reduced its magnitude slightly. However, the variations in the direction of the dipole moment may be of greater importance, and based on the dipole moment direction, the compounds can be grouped as indicated in Table 4 and Figure

5. From the data, the presence of EWG in the anilino ring and incorporation of a fluorine atom at position 7 cause changes in the dipole moment direction. It is worthy of note that **7g** and **7f** lack EWG at position 4' but belong to group D, since their dipole vectors resemble the **7m** dipole instead of the one of **7j**.

## 5. Structure–activity relationship

### 5.1. Cytotoxic activity

In Table 4, the compounds with a dialkylaminoalkyl group, regardless of their dipole orientation, are the most active; in the case of 2-methylthio derivatives (series 7), however, only the

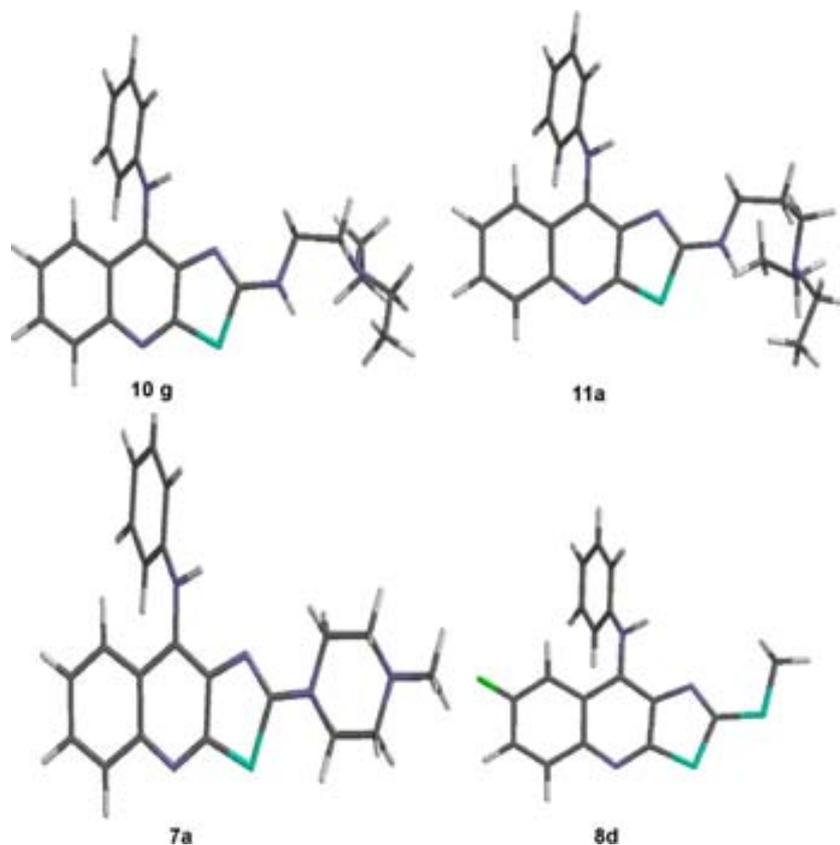
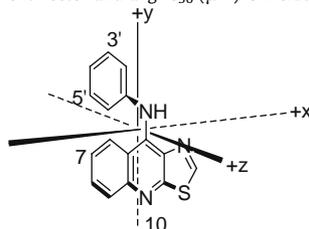


Figure 4. Optimized geometries for selected compounds.

Table 4

Analyzed compounds grouped according to direction of dipole moment vector and avg IC<sub>50</sub> (μM) is included (HeLa cell line)



Group A (position 10)	Avg IC <sub>50</sub>	Group B (position 7)	Avg IC <sub>50</sub>	Group C (position 3')	Avg IC <sub>50</sub>	Group D (position 4')	Avg IC <sub>50</sub>
<b>7h, 7i, 7k, 7l, 7n, 7o, 7s, 7t, 7u, 7v</b>	>80 <sup>a</sup>	<b>7a, 7c, 7e</b>	>80 <sup>b</sup>	<b>7j, 7q, 7r</b>	24.2	<b>7b, 7d, 7f, 7g, 7m</b>	>80
		<b>8a, 8b, 8d, 8e, 8f</b>	>80 <sup>c</sup>			<b>8c</b>	>80
		<b>10b, 10c, 10e, 10f, 10g</b>	13.6			<b>10a, 10d</b>	14.2
		<b>11a, 11c, 11e</b>	7.52			<b>11b, 11d</b>	21.7

<sup>a</sup> Except **7h** IC<sub>50</sub> = 34.2, **7k**, IC<sub>50</sub> = 25.34.

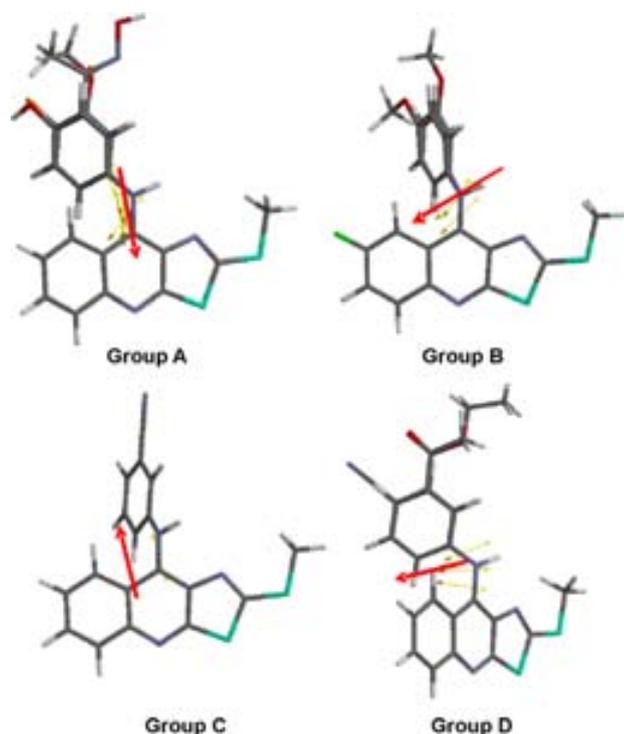
<sup>b</sup> Except **7c** IC<sub>50</sub> = 15.8.

<sup>c</sup> Except **8e** IC<sub>50</sub> = 60.7.

compounds with the dipole orientation through 3'-position and an EWG are active. The comparison of compound **7j** with **10a** and **11d** indicates a greater influence of the alkyl chain on the dipole orientation, and while compounds **10a**, **10d**, **11b** and **11d** show no cell line selectivity at all, compound **7j** is very active only against HeLa and K-562 cell lines. Moreover, the incorporation of a fluorine atom in **7j** severely modifies its dipole orientation (relative to compound **7b**) and diminishes its cytotoxic activity. There is possibly a low density region in the putative interaction site, which is only accessed through a substituent with a high charge density. This proposal would explain the low activity of compound **7l**, which,

in spite of its chlorine atom at 3'-position, has a different dipole orientation relative to **7j**.

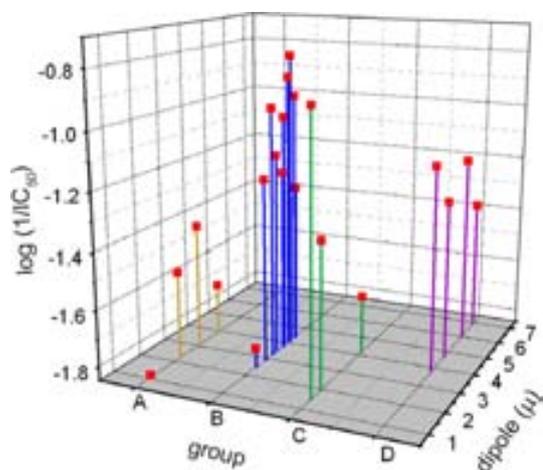
The influence of the dipole moment on cytotoxicity is clear because the 2-methylthio compounds of group D (series 7) have no cytotoxic activity while the same kind of compounds of groups A and C are cytotoxic. Nevertheless, other factors ought to be considered since in 3'-substituted compounds of group A, a higher dipole moment magnitude is associated with higher cytotoxicity (**7h**, **7k**), but the opposite trend was found for compounds in group C (**7j**, **7q**) (Fig. 6). Furthermore, compounds of group D (**10d** and **11d**) with higher dipole moment are among the less active



**Figure 5.** Analyzed compounds grouped according to the direction of the dipole vector. Red arrow indicates dipole orientation.

compounds of the alkylamino series, and hence, other electronic factors influence cytotoxicity. In any case, hydrophobic factors remain among the most relevant.

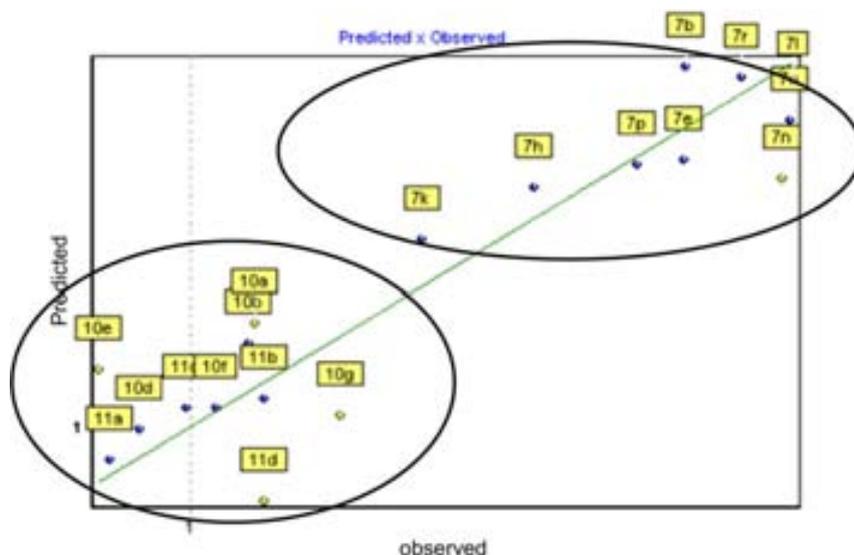
Some QSAR equations were derived, but in this case compounds with  $IC_{50}$  above  $80 \mu\text{M}$  were excluded from the SAR analysis. Compounds **7j**, **7q**, **8e** and **11e** did not fit into the first model. This can possibly be explained by the different direction of the dipole moment toward the nitrogen atom of the central ring instead of pointing towards the anilino ring as in the remaining compounds (see Fig. 4). When these compounds were excluded, the equation found



**Figure 6.** Relationships between dipole moments and cytotoxic activity in HeLa cell line. Groups are those included in Table 4.

for K-562 cell line was:  $\log(1/IC_{50}) = 1.14576 * \text{LUMO} + 0.13084 * \text{dipole moment} - 0.59538$  ( $n = 19$ ;  $r^2 = 0.850$ ;  $F = 45.583$ ). Interestingly, with this subset of compounds, two subgroups become evident, one including alkylamino substituted compounds and the other comprising methylthio substituted compounds (Fig. 7). A similar tendency was observed with data from the other cell lines.

For the compounds with a dialkylaminoalkylamino group, the hydrophobic factors appear to be important since compounds with a higher  $\log P$  were among the most active. To develop a 2D-QSAR, several descriptors representative of size (polar surface area, polar volume, etc.), electronic and lipophilic characteristics were used to characterize the compounds, but only one satisfactory QSAR equation was found for compounds of series **10** and **11** (HeLa cell line):  $\log(1/IC_{50}) = -0.01964 \text{ PSA} - 0.19409$  ( $n = 10$ ;  $r^2 = 0.740$ ;  $F = 24.541$ ), **10c** and **10g** as outliers. Where PSA is the Polar Surface Area descriptor. Thus, one important factor for the activity of these compounds lies in their ability to pass through biological membranes because this parameter strongly correlates with membrane permeability.<sup>22</sup> Therefore, the better activity of series **11** could be



**Figure 7.** Predicted activities, calculated by equation A, versus observed activities. Lower subset includes alkylamino substituted compounds, upper, methylthio substituted compounds.

attributed to higher ability to cross cell membranes and not necessarily to the better binding to DNA.

## 5.2. Topoisomerase II inhibition

For the inhibition of human Topo II, the IC<sub>50</sub> value correlated only with the LUMO parameter [ $\log(1/IC_{50}) = -0.99025 \cdot \text{LUMO} - 2.46625$ ;  $n = 07$ ;  $r^2 = 0.810$ ;  $F = 21.233$ , **8r**, **8s** and **8t** as outliers]. As discussed before, the LUMO parameter is relevant to the DNA intercalation and appears to be important in the formation of the Topoisomerase II-DNA-inhibitor ternary complex, at least for these compounds. An unusual feature of the Topo II inhibition curves is the presence of positive cooperativity, with Hill numbers approaching 4. Therefore, four or more molecules of the compound seem to be required to produce the inhibition. This result does not necessarily reflect the presence of 4 inhibitor molecules at the ternary complex but may result from high-affinity-intercalation of the inhibitor to DNA sites, which are poor substrates of the Topoisomerase II.

Taking all data together, the 2-alkylamino compounds (series **10** and **11**) have different structural requirements for cytotoxic activity as compared with 2-methylthio derivatives (series **7**). For the first group of compounds the capacity to pass through biological membranes is more important and for the latter the nature of the substituent in position 3' becomes predominant. Possibly this last factor affects the binding of these compounds to a putative receptor. Even in series **7**, two different behaviors were observed, one class of compounds with dipole moment oriented to the anilino ring and the other class with dipole moment oriented to the tricyclic template. Perhaps compounds of series **10** and **11** have a different mode of binding to DNA or to topoisomerase II, from those of series **7**. Studies on the determination of mechanism of action of both classes of compounds are in course.

## 6. Conclusions

Novel 9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline derivatives with a different substitution pattern in the anilino ring and in the tricyclic template were synthesized and their cytotoxic activity, tested in vitro. Incorporation of a saturated heterocyclic ring and of a fluorine atom in positions 2 and 7 of the tricyclic template, respectively, resulted in a depletion of activity. A flexible dialkylaminoalkylamino residue in position 2 improves activity; its length is important but not critical for cytotoxicity. For 2-methylthio derivatives, the nature of the substituent in position 3' is relevant for cytotoxicity, apparently through the formation of hydrogen bonds with its in vivo molecular target, the direction of dipole moment being likely to orient the compound into the target molecule, thus enhancing or weakening the binding.

## 7. Experimental

All starting materials were commercially available research-grade chemicals and used without further purification. Reactions were monitored by analytical TLC on precoated silica gel 60 F<sub>254</sub> plates (Aldrich). Column chromatography was carried out on Silica Gel 60 (70–230 mesh, Merck). Melting points were determined on a Fisher–Jones apparatus and are uncorrected. Infrared spectra were recorded on a Nicolet FT-5SX spectrophotometer model. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on a Varian VxR-300S spectrometer (300 and 75.5 MHz, respectively). Chemical shifts are reported in ppm ( $\delta$ ) and the signals are described as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), broad (br) and multiplet (m); coupling constants are reported in Hertz. EI-MS were carried out on a JEOL JMS-AX505-HA apparatus. FAB-MS were carried out on

a JEOL Sx102 apparatus. Compounds **5a–b** and **6a–b** were prepared according to procedures already described.<sup>7,8,13</sup>

## 7.1. General preparation of 2-(methylthio)-9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinolines (**7a–h**)

This method has already been described.<sup>7,8</sup> Briefly, to the compound **6a** or **6b** (0.5 mmol) were successively added methanol or ethanol for fluorinated analogues (5 mL) and two drops of HCl (36%). The cream-colored suspension formed was stirred for ten minutes. Meanwhile, a mixture of the aniline with the desired substitution pattern (0.7 mmol) in 5 mL of methanol or ethanol was prepared. This mixture was added to the suspension of **6a** or **6b** and heated to reflux for 6–18 h. After cooling, the solvent was evaporated under reduced pressure; the residue was suspended in 10 mL of water and a 10% NaHCO<sub>3</sub> solution was added to render pH 8. The solid was collected by vacuum filtration and washed with cold acetone.

### 7.1.1. 7-Fluoro-9-(phenylamino)-2-(methylthio)-9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline (**7a**)

Yellow solid; 138 mg (81.5%); mp 187–190 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3423 (NH), 1624, 1597, 1545, 1525, 1493, (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 2.33 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.15 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), H-2'; H-6'; 7.32 (t,  $J = 8.0$  Hz, 2H), H-3'; H-5'; 7.09 (t,  $J = 7.6$  Hz, 1H) H-4'; 7.99 (dd,  $J = 9.2, 5.2$  Hz, 1H) H-5; 7.71 (ddd,  $J = 10.8, 9.6, 2.8$  Hz, 1H) H-6; 8.27 (dd,  $J = 11.2, 2.1$  Hz, 1H) H-8; 9.70 (br), NHAr. MS (FAB,  $m/z$ ): 342 (M<sup>+</sup>+1, 100%), 341 (M<sup>+</sup>, 41%) Anal. Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>FN<sub>3</sub>S<sub>2</sub>: C, 59.80; H, 3.54; N, 12.31; S, 18.78. Found: C, 59.65; H, 3.79; N, 12.16; S, 18.93.

### 7.1.2. 9-[[3-(Cyano)phenyl]amino]-7-fluoro-2-(methylthio)-9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline (**7b**)

Yellow solid; 153 mg (81%); mp 252–253 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3430 (NH), 2222 (CN), 1603, 1586, 1543, 1511, 1479, (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 2.31 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.65 (s, 1H), H-2'; 7.53 (m, 3H), H-4', H-5', H-6'; 8.01 (dd,  $J = 9.6, 5.6$  Hz, 1H) H-5; 7.57 (dd,  $J = 9.2, 2.0$  Hz, 1H) H-6; 8.49 (dd,  $J = 10.4, 2.1$  Hz, 1H) H-8; 10.42 (br), NHAr. MS (FAB,  $m/z$ ): 367 (M<sup>+</sup>+1, 100%), 366 (M<sup>+</sup>, 17%) Anal. Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>4</sub>S<sub>2</sub>: C, 59.00; H, 3.03; N, 15.29; S, 17.50. Found: C, 59.25; H, 3.18; N, 15.04; S, 17.35.

### 7.1.3. 9-[[3-(Methoxy)phenyl]amino]-7-fluoro-2-(methylthio)-9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline (**7c**)

Yellow solid; 131 mg (70%); mp 193–195 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3424 (NH), 3028 (OMe), 1599, 1578, 1549, 1510, 1486, (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 2.35 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 3.61 (s, 3H) OCH<sub>3</sub>; 6.74 (m, 3H), H-2', H-4', H-6'; 7.25 (t,  $J = 8.7$  Hz, 1H), H-5'; 7.75 (ddd,  $J = 10.5, 7.8, 2.7$  Hz, 1H) H-6; 7.97 (dd,  $J = 9.2, 5.1$  Hz, 1H) H-5; 8.27 (dd,  $J = 10.4, 2.1$  Hz, 1H) H-8; 10.13 (br), NHAr. MS (FAB,  $m/z$ ): 372 (M<sup>+</sup>+1, 100%), 371 (M<sup>+</sup>, 17%) Anal. Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>OS<sub>2</sub>: C, 58.20; H, 3.80; N, 11.31; S, 17.26. Found: C, 58.38; H, 3.87; N, 11.23; S, 17.09.

### 7.1.4. 9-[[4-(Cyano)phenyl]amino]-7-fluoro-2-(methylthio)-9-anilinothiazolo[5,4-*b*]quinoline (**7d**)

Yellow solid; 111 mg (75%); mp 235–238 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3422 (NH), 2220 (CN), 1600, 1575, 1534, 1511, 1496, (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 2.49 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.2 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), H-2', H-6'; 7.66 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), H-3', H-5'; 7.72 (dd,  $J = 9.6, 7.5$  Hz, 1H) H-6; 8.07 (d,  $J = 9.2, 1H$ ) H-5; 8.15 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H) H-8; 9.90 (br), NHAr. MS (FAB,  $m/z$ ): 367 (M<sup>+</sup>+1, 100%), 366 (M<sup>+</sup>, 28%) Anal. Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>4</sub>S<sub>2</sub>: C, 59.00; H, 3.03; N, 15.29; S, 17.50. Found: C, 59.13; H, 3.10; N, 15.16; S, 17.43.

### 7.1.5. 9-[[4-(4-Methoxyphenyl)amino]-7-fluoro-2-(methylthio)-9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline (7e)

Yellow solid; (72%); mp 203–205 °C. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3444 (NH), 3026 (OCH<sub>3</sub>), 1602, 1577, 1545, 1504, 1444, (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 2.30 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 3.77 (s, 3H) OCH<sub>3</sub>, 6.96 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), H-3', H-5'; 7.22 (d,  $J = 8.1$ , 2H), H-2', H-6'; 7.78 (ddd,  $J = 9.6, 8.0, 2.8$  Hz, 1H) H-6; 7.98 (dd,  $J = 9.2, 5.6$  Hz, 1H) H-5; 8.41 (dd,  $J = 11.2, 2.4$  Hz, 1H) H-8; 10.11 (br), NHAr. MS (FAB,  $m/z$ ): 372 ( $M^+ + 1$ , 100%), 371 ( $M^+$ , 28%) Anal. Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>: C, 58.20; H, 3.80; N, 11.31; S, 17.26. Found: C, 58.41; H, 3.91; N, 11.20; S, 17.05.

### 7.1.6. 9-[[3-Ethoxycarbonyl]phenyl]amino]-2-(methylthio)-thiazolo[5,4-b]quinoline (7f)

Yellow solid; (70%); mp 173–5 °C. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3411 (NH), 3129, 3056, 2971 (CH), 1713 (C=O), 1621, 1570, 1545, 1507 (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 1.30 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H) CH<sub>3</sub>; 2.21 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 4.30 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H) OCH<sub>2</sub>; 7.52 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H) H-5'; 7.55 (dt,  $J = 6.9, 1.5$  Hz, 1H) H-6'; 7.68 (ddd,  $J = 8.7, 6.3, 1.2$ , 1H) H-7; 7.70 (dt,  $J = 6.9, 1.5$  Hz, 1H) H-4'; 7.89 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H) H-2'; 7.92 (ddd,  $J = 8.7, 6.3, 1.2$  Hz, 1H) H-6; 7.99 (dd,  $J = 8.7, 1.2$ , 1H) H-5; 8.70 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H) H-8; 10.7 (br, 1H) NH; MS (FAB,  $m/z$ ): 396 ( $M^+ + 1$ , 100%) Anal. Calcd for C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>: C, 60.74; H, 4.33; N, 10.62; S, 16.22. Found: C, 60.52; H, 4.54; N, 10.46; S, 16.39.

### 7.1.7. 1-(3-[[2-(Methylthio)thiazolo[5,4-b]quinolin-9-yl]-amino]phenyl)ethanone (7g)

Yellow solid; (70%); mp 185–7 °C. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3411 (NH), 3129, 3122, 3059 (CH), 1681 (C=O), 1621, 1570, 1550, 1504 (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 2.24 (s, 3H) COCH<sub>3</sub>; 2.55 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.52 (t,  $J = 6.9$  Hz, 1H) H-5'; 7.55 (dt,  $J = 6.9, 1.5$  Hz, 1H) H-6'; 7.67 (ddd,  $J = 8.7, 6.3, 1.2$ , 1H) H-7; 7.78 (dt,  $J = 6.9, 1.5$  Hz, 1H) H-4'; 7.86 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H) H-2'; 7.91 (ddd,  $J = 8.7, 6.3, 1.2$  Hz, 1H) H-6; 7.99 (dd,  $J = 8.7, 1.2$ , 1H) H-5; 8.58 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H) H-8; 10.66 (br, 1H) NH; MS (FAB,  $m/z$ ): 366 ( $M^+ + 1$ , 100%) Anal. Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>: C, 62.44; H, 4.14; N, 11.50; S, 17.55. Found: C, 62.63; H, 4.33; N, 11.42; S, 17.23.

### 7.1.8. (1E)-1-(3-[[2-(Methylthio)thiazolo[5,4-b]quinolin-9-yl]amino]phenyl)ethanone oxime (7h)

To a suspension of 110 mg (0.3 mmol) of compound **7f** in 10 mL of methanol 50 mg of hydroxylamine chlorhydrate in 5 mL of methanol were added and heated to reflux for 1 h. After cooling, the solvent was evaporated under reduced pressure; the residue was suspended in 10 mL of water and a 10% NaHCO<sub>3</sub> solution was added to render pH 8. The solid was collected by vacuum filtration and washed with cold acetone, giving 100 mg (87%) of title compound as a yellow solid, mp 201–3 °C. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3411 (NH), 3227, 3053 (CH), 1617 (C=N), 1585, 1551, 1496, (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ ): 2.10 (s, 3H) C(NO<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>; 2.41 (s, 3H) SCH<sub>3</sub>; 7.08 (m, 1H) H-5'; 7.28 (m, 2H) H-4', H-6'; 7.39 (t,  $J = 1.5$  Hz, 1H) H-2'; 7.51 (ddd,  $J = 8.7, 6.3, 1.2$ , 1H) H-7; 7.71 (ddd,  $J = 8.7, 6.3, 1.2$  Hz, 1H) H-6; 7.92 (dd,  $J = 8.7, 1.2$ , 1H) H-5; 8.37 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H) H-8; 9.36 (br, 1H) NH; 11.12 (s, 1H) OH; MS (FAB,  $m/z$ ): 366 ( $M^+ + 1$ , 100%) Anal. Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>: C, 59.98; H, 4.24; N, 14.73; S, 16.85. Found: C, 59.81; H, 4.37; N, 14.70; S, 16.95.

## 7.2. Preparation of compounds 8a–c

A solution of **6a** (133 mg, 0.5 mmol) in 2 mL of the corresponding amine was stirred for 24 h at room temperature. After that time, 10 mL of a saturated aqueous solution of NH<sub>4</sub>Cl was added, the greenish suspension was extracted with dichloromethane (3 × 5 mL) and the organic extracts were collected, washed with a NaHCO<sub>3</sub> solution (3 × 5 mL) and water (3 × 5 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After concentration under reduced pressure, the pale

yellow crude product was purified by crystallization from methanol or hexane.

### 7.2.1. 9-Chloro-2-(1-piperidinyl)thiazolo[5,4-b]quinoline (8a)

Pale yellow solid; 130 mg (80%); mp 165–168 °C (hexane). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2937, 2850 (CH), 1601, 1543, (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 1.76 (s, 6H) H-3a, H-4a, H-6a; 3.76 (s, 4H) H-2a, H-5a, 7.60 (m, 2H), H-6, H-7; 8.0 (dd,  $J = 7.2, 1.8$  Hz, 1H), H-5; 8.25 (dd,  $J = 7.5, 1.8$  Hz, 1H) H-8. MS (EI,  $m/z$ ): 305 ( $M^+ + 2$ , 37%), 303 ( $M^+$ , 100%) Anal. Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>3</sub>S: C, 59.30; H, 4.64; N, 13.83; S, 10.55. Found: C, 59.45; H, 4.89; N, 13.70; S, 10.28.

### 7.2.2. 9-Chloro-2-[1-[(4-methyl)piperazinyl]]thiazolo[5,4-b]quinoline (8b)

Pale yellow solid; 130 mg (80%); mp 165–168 °C (methanol). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2932, 2841, 2789 (CH), 1601, 1548, (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 2.42 (s, 3H) NCH<sub>3</sub>; 2.64 (t,  $J = 4.8$  Hz, 4H) H-3a, H-5a; 3.86 (t,  $J = 4.5$  Hz, 4H), H-2a, H-6a; 7.61 (m, 2H), H-6, H-7; 8.0 (dd,  $J = 7.8, 1.8$  Hz, 1H), H-5; 8.25 (dd,  $J = 7.5, 1.8$  Hz, 1H) H-8. MS (EI,  $m/z$ ): 320 ( $M^+ + 2$ , 10%), 318 ( $M^+$ , 30%), 70 (100%) Anal. Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>4</sub>S: C, 56.51; H, 4.74; N, 17.57; S, 10.06. Found: C, 56.51; H, 4.74; N, 17.57; S, 10.06.

### 7.2.3. 9-Chloro-2-(1-morphonyl)thiazolo[5,4-b]quinoline (8c)

Pale yellow solid; 130 mg (80%); mp 165–168 °C (hexane). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2967, 2937, 2880 (CH), 1600, 1548, (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ ): 3.80 (s, 4H) H-2a, H-6a; 3.87 (s, 4H) H-3a, H-5a; 7.64 (m, 2H), H-6, H-7; 8.04 (d,  $J = 7.2$ , 1H), H-5; 8.27 (d,  $J = 7.5$ , 1H) H-8. MS (EI,  $m/z$ ): 307 ( $M^+ + 2$ , 37%), 305 ( $M^+$ , 100%) Anal. Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S: C, 54.99; H, 3.96; N, 13.74; S, 10.49. Found: C, 54.84; H, 4.10; N, 13.61; S, 10.66.

## 7.3. General preparation of 2-methylsulphonyl derivatives 9a–f

A suspension of 0.5 mmol of the 2-(methylthio)-9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline derivative with the desired substitution pattern in the aniline ring, in 10 mL of a mixture of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%-acetic acid (1:1) was stirred overnight at room temperature. 20 mL of cold water were then added and the orange precipitate of the 2-methylsulphonyl derivative was collected by filtration, dried by suction and used without further purification.

## 7.4. General preparation of compounds 10a–10f, 11a–11e and 8d–8f

*Method A:* A solution of the 2-methylsulphonyl derivative (0.4 mmol) in 0.5 mL of the corresponding amine was heated to reflux for 30 min. After that time, 30 mL of dichloromethane were added and the yellowish solution was washed with a NaOH 2 N (3 × 5 mL), saturated NH<sub>4</sub>Cl solution (3 × 5 mL) and water (3 × 5 mL) and dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. After concentration under reduced pressure, the pale yellow crude was purified by column chromatography (silica gel, mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/NH<sub>4</sub>OH 98:2:0.1 as eluent) or crystallization from methanol for compounds **8d–f**. *Method B:* An alternative procedure for compounds **10a–f** and **11a–e** was as follows: To a solution of the 2-methylsulphonyl derivative in 1 mL of DMF 1.5 equiv of the aliphatic amine were added and stirred overnight at room temperature; the dark solution was poured into a 10 mL of a well stirred brine solution and left at room temperature overnight. The precipitate formed was filtered, dried by suction and treated with hot hexane. This procedure gave similar yields as method A.

### 7.4.1. 9-[[3-(Cyano)phenyl]amino]-2-[2-(*N,N*-diethylamino)]ethylaminothiazolo[5,4-b]quinoline (10a)

Pale yellow solid; (69%); mp 110–111 °C. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3311 (NH), 2966, 2810 (CH); 2227 (CN); 1600, 1560, 1476 (aromatic);

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 1.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) 2-CH<sub>3</sub>; 2.55 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H) CH<sub>2</sub>; 2.68 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H) CH<sub>2</sub>; 3.48 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H) NHCH<sub>2</sub>; 6.44 (br, 1H) -NH-; 7.00 (s, 1H) -NHAr; 7.04 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H) H-6'; 7.08 (s, 1H) H-2'; 7.18 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H) H-4; 7.26 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H) H-5'; 7.37 (ddd, *J* = 8.7, 6.9, 1.2 Hz; 1H) H-7; 7.60 (ddd, *J* = 8.7, 6.9, 1.5 Hz; 1H) H-6; 7.67 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H) H-5; 8.03 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H) H-8; MS (FAB, *m/z*): 417 (M<sup>+</sup>+1, 100%) Anal. Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>S: C, 66.32; H, 5.81; N, 20.18; S, 7.70. Found: C, 66.17; H, 6.00; N, 20.96; S, 7.51.

#### 7.4.2. 9-[[[3-Chloro]phenyl]amino]-2-[2-(*N,N*-diethylamino)ethylaminothiazolo[5,4-*b*]quinoline (10b)

Yellow solid; (70%); mp 109–110 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3411 (NH), 2966, 2919, 2849 (CH); 1549, 1561, 1475 (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ): 1.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) 2-CH<sub>3</sub>; 2.97 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H) CH<sub>2</sub>; 3.10 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H) CH<sub>2</sub>; 3.59 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H) NHCH<sub>2</sub>; 6.78 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H) H-6'; 6.90 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H) H-4'; 7.20 (t, *J* = 8.1, 1H) H-5'; 7.30 (s, 1H) H-2'; 7.51 (ddd, *J* = 8.7, 6.9, 1.2 Hz, 1H) H-7; 7.64 (ddd, *J* = 8.7, 6.9, 1.5 Hz, 1H) H-6; 7.90 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H) H-5; 8.22 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H) H-8; 8.97 (br, t, *J* = 6.9, 1H) -NH-; 9.22 (s, 1H) -NHAr-; MS (FAB, *m/z*): 426 (M<sup>+</sup>+1, 40%), 86 (M-339, 100%) Anal. Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>5</sub>S: C, 62.03; H, 5.68; N, 20.69; S, 7.49. Found: C, 62.17; H, 5.81; N, 20.52; S, 7.35.

#### 7.4.3. 9-[[[3-Methoxy]phenyl]amino]-2-[2-(*N,N*-diethylamino)ethylaminothiazolo[5,4-*b*]quinoline (10c)

Brownish solid; (50%); mp 118–120 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3120 (NH), 3053, 2966 2850 (CH), 1595, 1571, 1543, 1503, 1476, (aromatic), <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ): 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) 2-CH<sub>3</sub>; 2.41 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H) CH<sub>2</sub>; 2.45 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H) CH<sub>2</sub>; 3.23 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H) NHCH<sub>2</sub>; 6.74 (m, 3H) H-2', H-6'; 7.25 (t, *J* = 8.7 Hz) H-5'; 7.60 (ddd, *J* = 8.4, 6.6, 1.2 Hz) H-7; 7.84 (ddd, *J* = 8.7, 6.6, 1.2 Hz) H-6; 7.97 (dd, *J* = 8.7, 0.9 Hz, 1H) H-5; 8.53 (d, *J* = 8.4 Hz) H-8; 8.13 (br, t, *J* = 6.9, 1H) -NH-; 8.29 (s, 1H) -NHAr-; MS (EI, *m/z*): 421 (M<sup>+</sup>, 15%), 322 (M-99, 80%), 86 (M-335, 100%) Anal. Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>OS: C, 65.53; H, 6.46; N, 16.61; S, 7.61. Found: C, 65.41; H, 6.52; N, 16.67; S, 7.76.

#### 7.4.4. 9-[[[4-Cyano]phenyl]amino]-2-[2-(*N,N*-diethylamino)ethylaminothiazolo[5,4-*b*]quinoline (10d)

Pale yellow solid; (61%); mp 114–115 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3320 (NH); 2967, (CH) 2216 (CN), 1602, 1580, 1560, 1511 (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ): 1.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) 2-CH<sub>3</sub>; 2.97 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H) CH<sub>2</sub>; 3.10 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H) CH<sub>2</sub>; 3.59 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H) NHCH<sub>2</sub>; 6.84 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.55 (m, 3H) H-3', H-5'; H-7; 7.64 (ddd, *J* = 7.2, 6.9, 1.2 Hz, 1H) H-6; 7.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H) H-5; 8.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H) H-8; 8.50 (br, 1H) -NH- 9.3 (s, 1H) -NH- MS (FAB, *m/z*) 430 (M<sup>+</sup>+1, 50%) 86 (M-344, 100%) Anal. Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>6</sub>S: C, 66.32; H, 5.81; N, 20.18; S, 7.70. Found: C, 66.47; H, 5.93; N, 20.10; S, 7.50.

#### 7.4.5. 9-[[[4-Chloro]phenyl]amino]-2-[2-(*N,N*-diethylamino)ethylaminothiazolo[5,4-*b*]quinoline (10e)

Yellow solid; (63%); mp 113–114 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3410 (NH), 2965, 2809, (CH); 1600, 1586, 1566 (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ): 1.08 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) 2-CH<sub>3</sub>; 2.94 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H) CH<sub>2</sub>; 3.08 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H) CH<sub>2</sub>; 3.58 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H) NHCH<sub>2</sub>; 6.82 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H) H-3', H-5'; 7.48 (ddd, *J* = 8.7, 6.9, 1.2 Hz, 1H) H-7; 7.60 (ddd, *J* = 8.7, 6.9, 1.5 Hz, 1H) H-6; 7.88 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H) H-5; 8.16 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H) H-8; 8.4 (br, t, *J* = 6.9, 1H) -NH-; 8.91 (s, 1H) -NHAr-; MS (FAB, *m/z*): 426 (M<sup>+</sup>+1, 40%), 86 (M-339, 100%) Anal. Calcd for C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>5</sub>S: C, 62.03; H, 5.68; N, 20.69; S, 7.49. Found: C, 62.21; H, 5.73; N, 20.64; S, 7.30.

#### 7.4.6. 9-[[[4-Methoxy]phenyl]amino]-2-[2-(*N,N*-diethylamino)ethylaminothiazolo[5,4-*b*]quinoline (10f)

Yellow solid; (65%); mp 110–112 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3179 (NH) 2966, 2827, (CH); 1599, 1563, 1508, 1495, 1469 (aromatic). 1236 (OCH<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ): 0.88 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) 2-CH<sub>3</sub>; 2.41 (q, *J* = 7.2 Hz, 4H) CH<sub>2</sub>; 2.45 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H) CH<sub>2</sub>; 3.23 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H) NHCH<sub>2</sub>; 3.68 (s, 3H) OCH<sub>3</sub>; 6.80 (m, 4H) H-2', H-6', H-3', H-5'; 7.36 (ddd, *J* = 8.7, 6.9, 0.9 Hz, 1H) H-7; 7.52 (ddd, *J* = 8.7, 6.9, 0.9 Hz, 1H) H-6; 7.79 (dd, *J* = 8.7, 0.9 Hz, 1H) H-5; 8.06 (dd, *J* = 8.7, 0.9 Hz, 1H) H-8; 8.13 (br, t, *J* = 6.9, 1H) -NH-; 8.29 (s, 1H) -NHAr-; MS (EI, *m/z*): 421 (M<sup>+</sup>, 15%), 322 (M-99, 80%), 86 (M-335, 100%) Anal. Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>OS: C, 65.53; H, 6.46; N, 16.61; S, 7.61. Found: C, 65.66; H, 6.49; N, 16.59; S, 7.47.

#### 7.4.7. 9-(Phenylamino)-2-[3-(*N,N*-diethylamino)propylaminothiazolo[5,4-*b*]quinoline (11a)

Yellow solid; 62 mg (59%); mp 72–75 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3233, 1562, 1493 (-NH-); 2967, 2818 (CH); 1597 (aromatic). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ): 0.9 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) 2-CH<sub>3</sub>; 1.6 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H) -CH<sub>2</sub>-; 2.4 (m, 6H) 3-CH<sub>2</sub>-; 3.2 (sa, 2H) -CH<sub>2</sub>-; 6.8 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H) H-2', H-4', H-6'; 7.1 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.8 Hz, 2H) H-3', H-5'; 7.4 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.5 Hz, 1H) H-7; 7.5 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.5 Hz, 1H) H-6; 7.9 (dd, *J* = 8.7, 0.9 Hz, 1H) H-5; 8.0 (dd, *J* = 8.7, 0.9 Hz, 1H) H-8; 8.3 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H) -NH-; 8.5 (s, 1H) -NH- MS (EI, *m/z*) 405 (M<sup>+</sup> 100%); 376 (M<sup>+</sup>-29, 15%); 319 (M<sup>+</sup>-89, 56%); 306 (M<sup>+</sup>-99, 53%); Anal. Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>S: C, 68.11; H, 6.71; N, 17.27; S, 7.91. Found: C, 68.15; H, 6.67; N, 17.31; S, 7.87.

#### 7.4.8. 9-[[[3-Cyano]phenyl]amino]-2-[3-(*N,N*-diethylamino)propylaminothiazolo[5,4-*b*]quinoline (11b)

Yellow solid; 68 mg (57%); mp 73–76 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3209 (-NH-); 2960, 2815 (CH), 2277 (CN); 1599, 1562, 1494 (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ): 0.9 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H) 2-CH<sub>3</sub>; 1.6 (q, *J* = 7.2 Hz; 2H) -CH<sub>2</sub>-; 2.4 (m, 6H) 3-CH<sub>2</sub>-; 3.2 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H) -CH<sub>2</sub>-; 7.1 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.2 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H) H-4'; 7.3 (ddd, *J* = 8.4, 7.8, 0.9 Hz, 1H) H-5'; 7.5 (ddd, *J* = 8.1, 6.9, 1.2 Hz, 1H) H-7; 7.6 (ddd, *J* = 8.4, 6.9, 1.2 Hz, 1H) H-6; 7.9 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H) H-5; 8.1 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H) H-8; 8.5 (br) -NH-; 9.0 (br) -NH- MS (EI, *m/z*) 430 (M<sup>+</sup> 100%); 401 (M<sup>+</sup>-29, 12%); 344 (M<sup>+</sup>-86, 30%); 330 (M<sup>+</sup>-100, 27%). Anal. Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>S: C, 66.95; H, 6.09; N, 19.52; S, 7.45. Found: C, 66.74; H, 6.39; N, 19.33; S, 7.54.

#### 7.4.9. 9-[[[3-Chloro]phenyl]amino]-2-[3-(*N,N*-diethylamino)propylaminothiazolo[5,4-*b*]quinoline (11c)

Yellow solid; 45 mg (55.0%); mp 55–58 °C. IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 2966, 1375 (-CH); 1594, 1561, 1497 (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ): 0.9 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) 3-CH<sub>3</sub>; 1.6 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H) -CH<sub>2</sub>-; 2.4 (m, 6H) 3-CH<sub>2</sub>-; 3.3 (c, *J* = 6.6 Hz, 2H) -CH<sub>2</sub>-; 6.7 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H) H-6'; 6.8 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H) H-2', H-4'; 7.1 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H) H-5'; 7.5 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H) H-7; 7.6 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H) H-6; 7.9 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H) H-5; 8.1 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H) H-8; 8.4 (br) -NH-; 8.8 (s, 1H) -NH- MS (EI, *m/z*) 438 (M<sup>+</sup>, 100%); 410 (M<sup>+</sup>-29, 8%); 353 (M<sup>+</sup>-57, 28%). Anal. Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>5</sub>S: C, 62.78; H, 5.96; N, 15.92; S, 7.29. Found: C, 62.78; H, 5.85; N, 15.81; S, 7.29.

#### 7.4.10. 9-[[[4-Cyano]phenyl]amino]-2-[3-(*N,N*-diethylamino)propylaminothiazolo[5,4-*b*]quinoline (11d)

Yellow solid; 92 mg (71%); mp 75–78 °C IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) 3316 (R-NH-R); 2960, 1466, 1378 (CH); 2217 (CN); 1603, 1561, 1512, 1466 (aromatic); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ): 0.9 (t, *J* = 7.2 Hz, 6H) 2-CH<sub>3</sub>; 1.6 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H) -CH<sub>2</sub>-; 2.4 (m, 6H) 3-CH<sub>2</sub>-; 3.2 (sa, 2H) -CH<sub>2</sub>-; 6.8 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.5 (d, *J* = 8.7 Hz, 3H) H-3', H-5', H-7; 7.6 (ddd, *J* = 7.2, 6.9, 1.2 Hz, 1H) H-6; 7.9 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H) H-5; 8.0 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H) H-8; 8.5 (br, 1H) -NH- 9.3 (s, 1H) -NH- MS (EI, *m/z*) 430 (M<sup>+</sup>, 71%) 401 (M<sup>+</sup>-29, 9%) 344 (M<sup>+</sup>-57,

31%); 330 ( $M^+$ -14, 31%). Anal. Calcd for  $C_{24}H_{26}N_6S$ : C, 66.95; H, 6.09; N, 19.52; S, 7.45. Found: C, 66.84; H, 6.28; N, 19.44; S, 7.44.

#### 7.4.11. 9-[[4-(4-Chloro)phenyl]amino]-2-[3-(*N,N*-diethylamino)]propylaminothiazolo[5,4-*b*]quinoline (11e)

Yellow solid; 75 mg (61%); mp 120–123 °C IR (KBr,  $cm^{-1}$ ) 2965, 2809, (CH); 1600, 1586, 1566 (aromatic);  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ ): 0.92 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6H) 2-CH<sub>3</sub>; 1.6 (q,  $J = 6.9$  Hz, 2H) -CH<sub>2</sub>-; 2.4 (m, 6H) 3-CH<sub>2</sub>-; 3.2 (c,  $J = 6.6$  Hz, 2H) -CH<sub>2</sub>-; 6.8 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.1 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H) H-3', H-5'; 7.4 (ddd,  $J = 8.1, 6.9, 1.2$  Hz, 1H) H-7; 7.6 (ddd,  $J = 8.1, 6.9, 1.5$  Hz, 1H) H-6; 7.9 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H) H-5; 8.1 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H) H-8; 8.4 (br, 1H) -NH-; 8.7 (s, 1H) -NH-; MS (EI,  $m/z$ ): 439 ( $M^+$ , 75%) 410 ( $M^+$ -29, 11%); 367 ( $M^+$ -43, 13%); 353 ( $M^+$ -14, 40%). Anal. Calcd for  $C_{23}H_{26}ClN_5S$ : C, 62.78; H, 5.96; N, 15.92; S, 7.29. Found: C, 62.73; H, 5.90; N, 15.86; S, 7.34.

#### 7.4.12. 9-Phenylamino-2-(1-piperidinyl)thiazolo[5,4-*b*]quinoline (8d)

Yellow solid; (84%); mp 200–203 °C (methanol). IR (KBr,  $cm^{-1}$ ) 3440 (NH), 3223, 2953, 2851 (C-H); 1600, 1494 (aromatic);  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 1.71 (s, 6H) H-3a, H-4a, H-6a; 3.64 (s, 4H) H-2a, H-5a, 7.02 (d,  $J = 8$  Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.07 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H) H-7; 7.24 (m, 3H) H-3', H-4', H-5'; 7.54 (td,  $J = 7.6, 1.2$  Hz, 1H) H-6; 7.68 (dd,  $J = 8.4, 0.8$  Hz, 1H) H-5; 8.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H) H-8; MS (EI,  $m/z$ ): 390 ( $M^+$ , 100%) Anal. Calcd for  $C_{21}H_{20}N_4S$ : C, 69.97; H, 5.59; N, 15.54; S, 8.90. Found: C, 69.78; H, 5.53; N, 15.76; S, 8.93.

#### 7.4.13. 9-Phenylamino-2-[1-[(4-methyl)piperazinyl]]thiazolo[5,4-*b*]quinoline (8e)

Pale yellow solid; (97%); mp 150–152 °C (methanol). IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3374 (NH), 2936, 2847, 2799 (CH), 1599, 1494, (aromatic);  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 2.37 (s, 3H) NCH<sub>3</sub>; 2.55 (t,  $J = 4.8$  Hz, 4H) H-3a, H-5a; 3.71 (t,  $J = 5.2$  Hz, 4H), H-2a, H-6a; 6.94 (t,  $J = 7.6, 2H$ ) H-2', H-6'; 6.99 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H) H-7; 7.24 (m, 3H) H-3', H-4', H-5'; 7.53 (td,  $J = 7.6, 1.6$  Hz, 1H) H-6; 7.71 (dd,  $J = 8.8, 1.8$  Hz, 1H) H-5; 7.97 (dd,  $J = 8.4, 0.8$  Hz, 1H) H-8, MS (EI,  $m/z$ ): 375 ( $M^+$ , 30%), 70 (100%) Anal. Calcd for  $C_{21}H_{21}N_5S$ : C, 67.17; H, 5.64; N, 18.65; S, 8.54. Found: C, 67.34; H, 5.87; N, 18.42; S, 8.31.

#### 7.4.14. 9-Phenylamino-2-(1-morphonyl)thiazolo[5,4-*b*]quinoline (8f)

Pale yellow solid; (80%); mp 205–208 °C (methanol-water). IR (KBr,  $cm^{-1}$ ): 3330(NH) 2956, 2904, 2859 (CH), 1600, 1548, (aromatic); 1318 (C-O)  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 3.66 (t,  $J = 4.4$  Hz, 4H) H-2a, H-6a; 3.83 (t,  $J = 4.4$  Hz, 4H) H-3a, H-5a; 7.05 (d,  $J = 8$  Hz, 2H) H-2', H-6'; 7.11 (t,  $J = 7.6, 1H$ ) H-7; 7.28 (m, 3H) H-3', H-4', H-5'; 7.40 (sa, 1H) NH; 7.57 (td,  $J = 7.6, 1.2$  Hz, 1H) H-6; 7.71 (dd,  $J = 8.8, 1.2$  Hz, 1H) H-5; 8.06 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H) H-8. MS (EI,  $m/z$ ): 362 ( $M^+$ , 100%) Anal. Calcd for  $C_{20}H_{18}N_4OS$ : C, 66.28; H, 5.01; N, 15.46; S, 8.85. Found: C, 66.53; H, 5.23; N, 15.24; S, 8.60.

### 7.5. Cytotoxic assay<sup>23</sup>

The effects of the compounds were determined in one cervical cell line (HeLa), two human colorectal cancer cell lines (SW480 and SW620) and one myelogenous leukemia human cell line (K-562). The cytotoxic assays were carried out according to the microculture MTT method. Cells were harvested at  $4.5$  to  $5.0 \times 10^4$  cells/mL/well and inoculated in 24 well microtiter plates. The culture cells were then inoculated free and with the compounds (which were dissolved in DMSO and added in a volume maximum of 2 mL/mL/well). After 72 h incubation, 100 mg/mL of MTT (in PBS, pH 7.2) were added. 1 mL of DMSO was added to each well, followed by gentle shaking, dissolved the formazan dye. After centrifugation the extinction coefficient was measured at 540 nm using a

Beckman photometer model DUR-64. Cell growth inhibition was determined by the formula% cell growth inhibition =  $(1 - \text{absorbance of treated cells/absorbance of untreated cells}) \times 100$ . The assays were carried out in three independent experiments in quadruplicate.

### 7.6. Decatenation assay for topoisomerase II activity<sup>24</sup>

DNA topoisomerase activity was monitored with the  $\kappa$ DNA decatenation assay using human DNA topoisomerase II, and the DNA topoisomerase II determination kit from Topogen<sup>™</sup>. Briefly,  $\kappa$ DNA from *Crithidia fasciculata*, at a concentration of 5  $\mu$ g/mL, was incubated in 30 mM Tris-HCl, pH 7.6 containing 60 mM NaCl, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM 2-mercaptoethanol, 3 mM ATP, 4 units of human DNA topoisomerase II, 8% (v/v) dimethyl sulphoxide, and with or without the indicated concentration of the inhibitor in a final volume of 20  $\mu$ L. Reactions were allowed to proceed for 30 min at 37 °C, terminated by the addition of 2  $\mu$ L of 10% SDS and treated with proteinase K for 15 min at 37 °C. The samples were mixed with 2.2  $\mu$ L of loading dye (0.025% w/v bromophenol blue in 50% glycerol) and extracted with 25  $\mu$ L of chloroform/isoamyl alcohol 24:1. Phase separation was promoted by rapid centrifugation in a microfuge, and the DNA in the aqueous layer was analyzed by electrophoresis in a standard agarose gel with 0.5  $\mu$ g/mL of ethidium bromide. The gel was destained for 30 min and photographed under UV light using a Bio-Rad FluorS<sup>™</sup> imaging system. The relative amounts of decatenated  $\kappa$ DNA were measured using the Bio-Rad's Quantity-one<sup>™</sup> software or the ImageJ software.<sup>25</sup> Both programs essentially rendered the same results. The activity was calculated as the density of the circular-decatenated plus linear DNA bands as a percentage of the total DNA. Activity in a control reaction, in the absence of inhibitors, was taken as 100%.

### 7.7. Molecular modeling procedure

All calculations were performed with SPARTAN'04 software.<sup>16</sup> The molecules were built by assembling standard fragments, and the resulting geometries were optimized by molecular mechanics. Conformational analysis of the compounds by Systematic Search protocol around rotatable bonds was performed using the MMFF94 force field. The most frequent conformer for each compound was selected and geometry optimization and calculation of their electronic properties were carried out with semiempirical AM1 method.

### Acknowledgments

We thank Maricela Gutiérrez, Rosa Isela del Villar, Victor M. Arroyo, Georgina Duarte and Margarita Guzmán for determination of all spectra and Nayeli López for elemental analysis. M. A. L.-M. wishes to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-Mexico) for a scholarship for his doctorate studies. We also thank DGAPA-UNAM for financing project PAPIIT IN202805 as well as Facultad de Química for financial support (PAIP 6390-10, 6290-09).

### Supplementary data

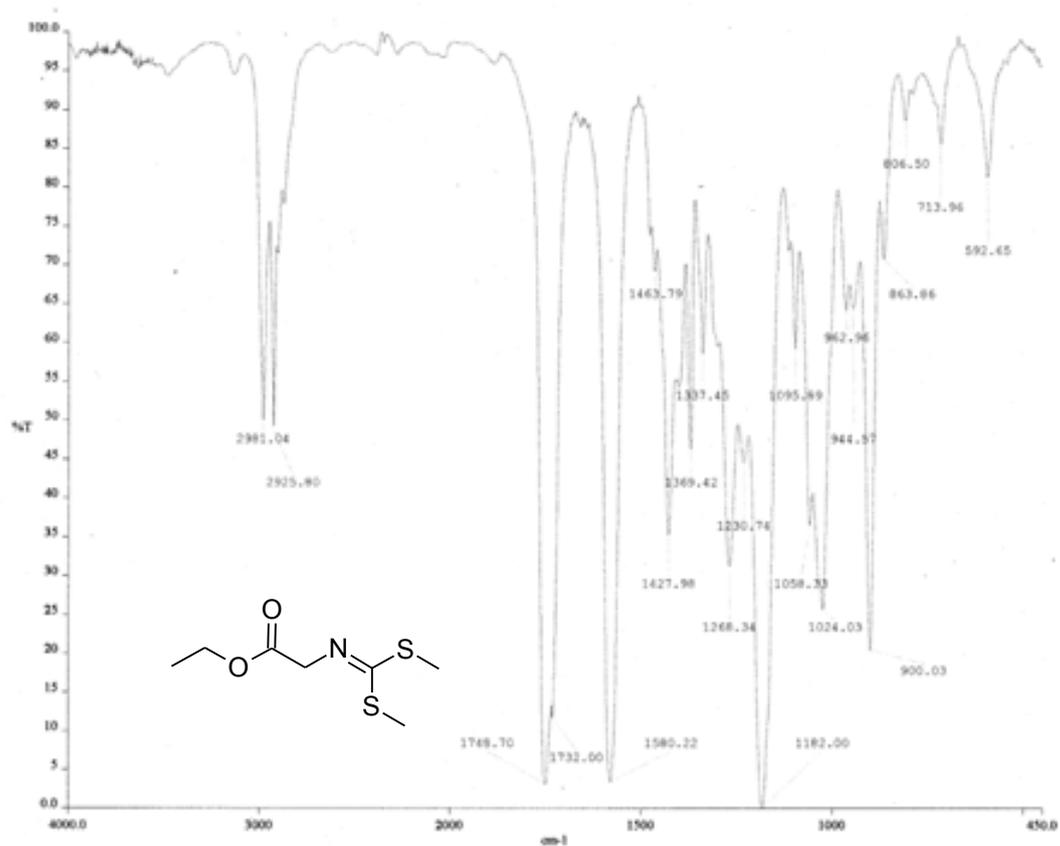
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bmc.2009.03.052.

### References and notes

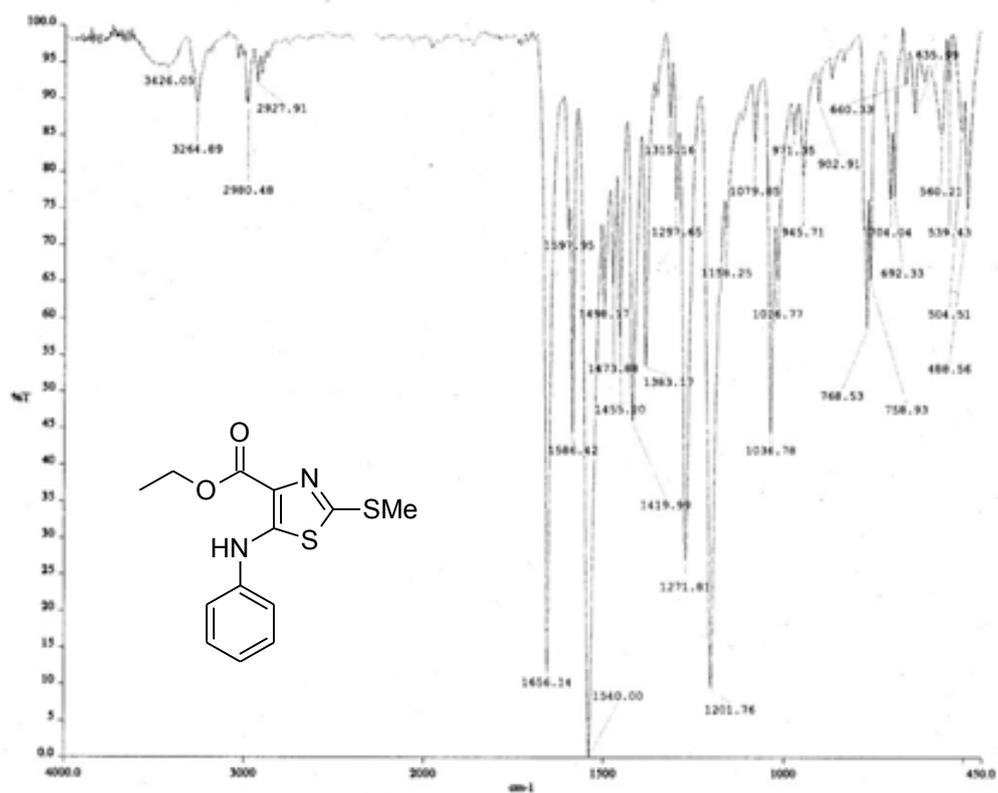
- Capranico, G.; Binaschi, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1400*, 185.
- Osheroff, N.; Burden, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1400*, 129.
- Demecunynck, H.; Charmantray, F.; Martelli, A. *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 1703.

4. Denny, W. A. In *Cancer Chemotherapeutic Agents*; Foye, W. O., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 1995; pp 218–239.
5. Arlin, Z. A. *Cancer Invest.* **1989**, *7*, 607.
6. Su, T. S.; Chou, T.; Kim, J. Y.; Huang, J.; Ciszewska, G.; Ren, W.; Otter, G.; Sirotnak, F.; Watanabe, K. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3226.
7. Rodríguez-Loaiza, P.; Quintero, A.; Rodríguez-Sotres, R.; Solano, J. D.; Lira-Rocha, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 5.
8. Loza-Mejía, M. A.; Maldonado-Hernández, K.; Rodríguez-Hernández, F.; Rodríguez-Sotres, R.; González-Sánchez, I.; Solano, J. D.; Lira-Rocha, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1142.
9. Chen, Y.; Chen, I.; Lu, C.; Tzeng, C.; Tsao, L.; Wang, J. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 387.
10. Chen, Y.; Chen, I.; Wang, T.; Han, C.; Tzeng, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 928.
11. Bontemps-Gracz, M. M.; Kupiec, A.; Antonini, I.; Borowski, E. *Acta Biochim. Pol.* **2002**, *49*, 87.
12. Stefanska, B.; Bontemps-Gracz, M. M.; Antonini, I.; Martelli, S.; Arciemiu, M.; Piwkowska, A.; Rogacka, D.; Borowski, E. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1969.
13. Alvarez-Ibarra, C.; Fernández-Granda, R.; Quiroga, M. L.; Carbonell, A.; Cárdenas, F.; Giralt, E. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 668.
14. Moro, S.; Beretta, G.; Dal Ben, D.; Nitiss, J.; Palumbo, M.; Capranico, G. *Biochemistry* **2004**, *43*, 7503.
15. Kingma, P. S.; Osheroff, N. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1400*, 195.
16. SPARTAN version 5.0, Wavefunction Inc. 18401 Von Karman Avenue, Suite 370, Irvine, CA 92612, USA.
17. Reha, D.; Kabelac, M.; Ryjacek, F.; Sponer, J.; Sponer, J.; Elstner, M.; Suhai, S.; Pavel Hobza, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3366.
18. Antonini, I.; Polucci, P.; Jenkins, T. C.; Kelland, L. R.; Menta, E.; Pescalli, N.; Stefanska, B.; Mazerski, J.; Martelli, S. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3749.
19. Dantas, S. O.; Lavarda, F. C.; Galvão, D. S.; Laks, B. J. *Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1992**, *253*, 319.
20. Barone, P. M. V. B.; Dantas, S. O.; Galvão, D. S. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **1999**, *465*, 219.
21. Braga, S. F.; de Melo, L. C.; Barone, P. M. V. B. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)* **2004**, *710*, 51.
22. Clark, D. E. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 807.
23. Quintero, A.; Pelcastre, A.; Dolores, J.; Guzmán, A.; Díaz, E. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **1999**, *2*, 108.
24. Haldane, A.; Sullivan, D. M. DNA Topoisomerase II-Catalyzed DNA Decatenation. In *Methods in Molecular Biology v. 95. DNA topoisomerase protocols, Part II: Enzymology and drugs*; Osheroff, N., Biornst, N. A., Eds.; Humana Press: Totowa NJ, 2001; pp 13–23.
25. Abramoff, M. D.; Magelhaes, P. J.; Ram, S. J. *Biophoton. Int.* **2004**, *11*, 36.

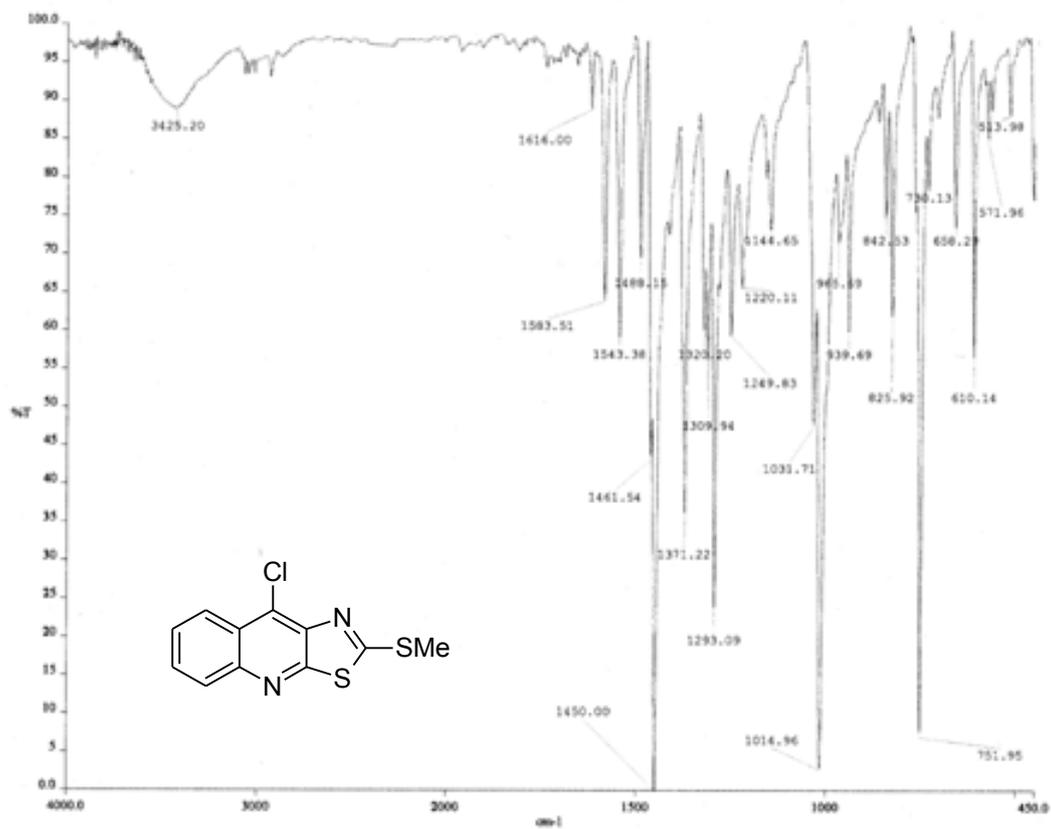
## ANEXO 2. ESPECTROS



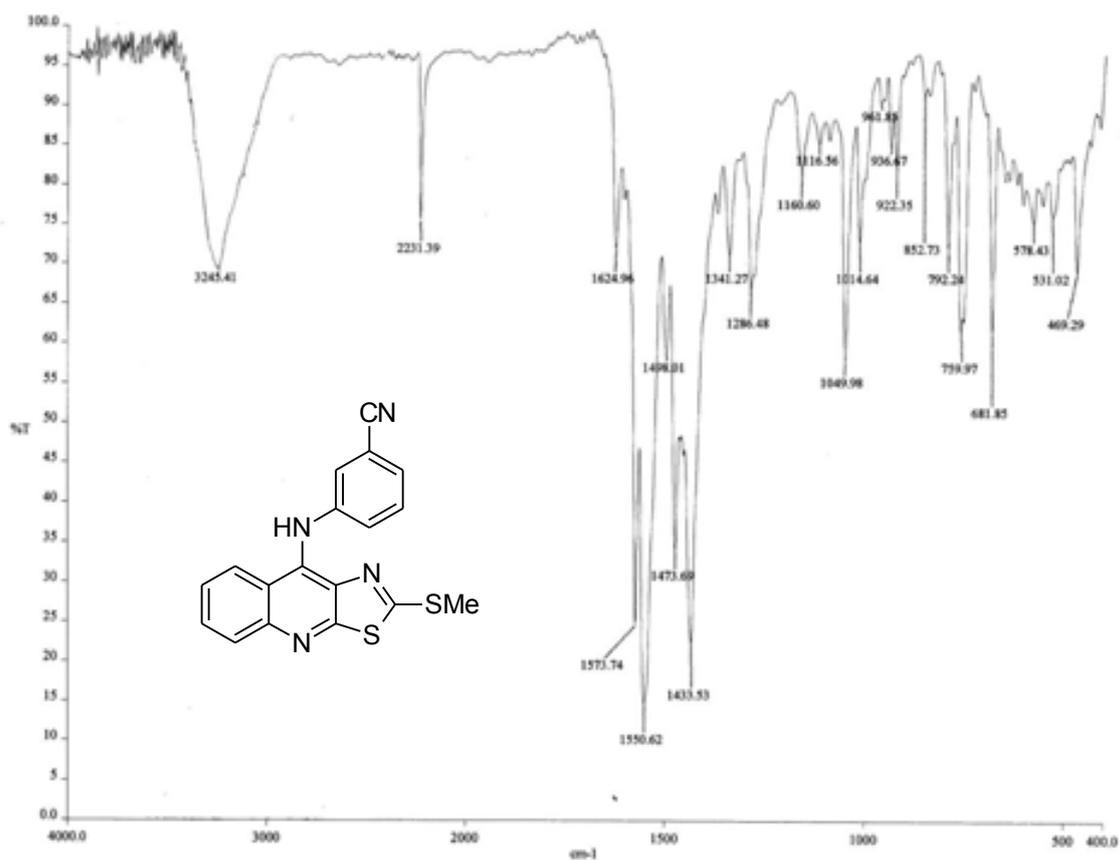
Espectro 1. IR (película) del compuesto 5



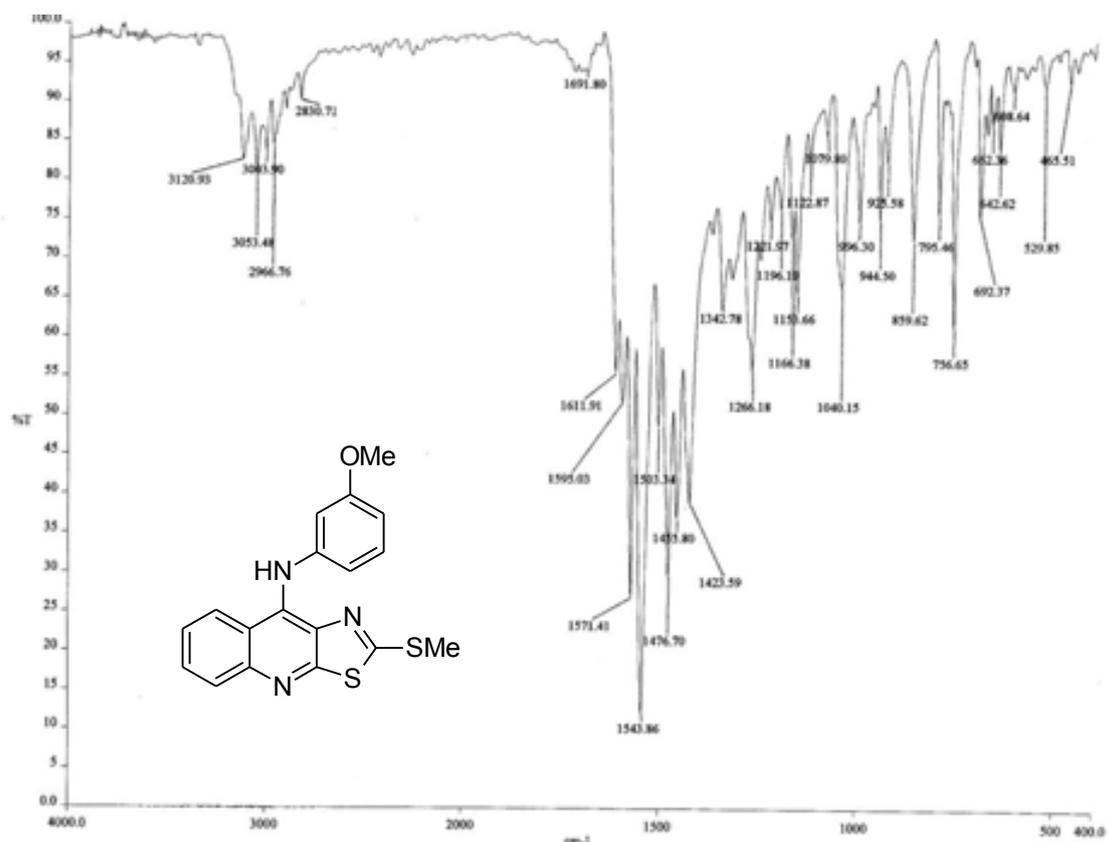
Espectro 2. IR (KBr) del compuesto 6



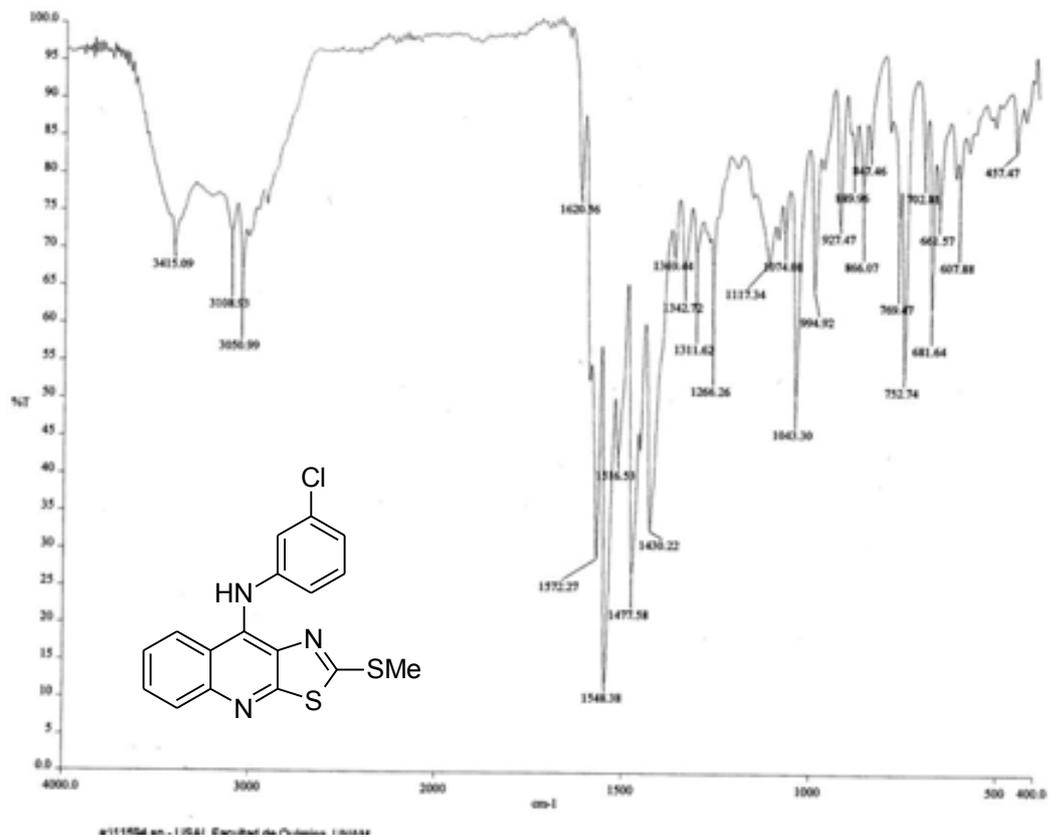
Espectro 3. IR (KBr) del compuesto 7



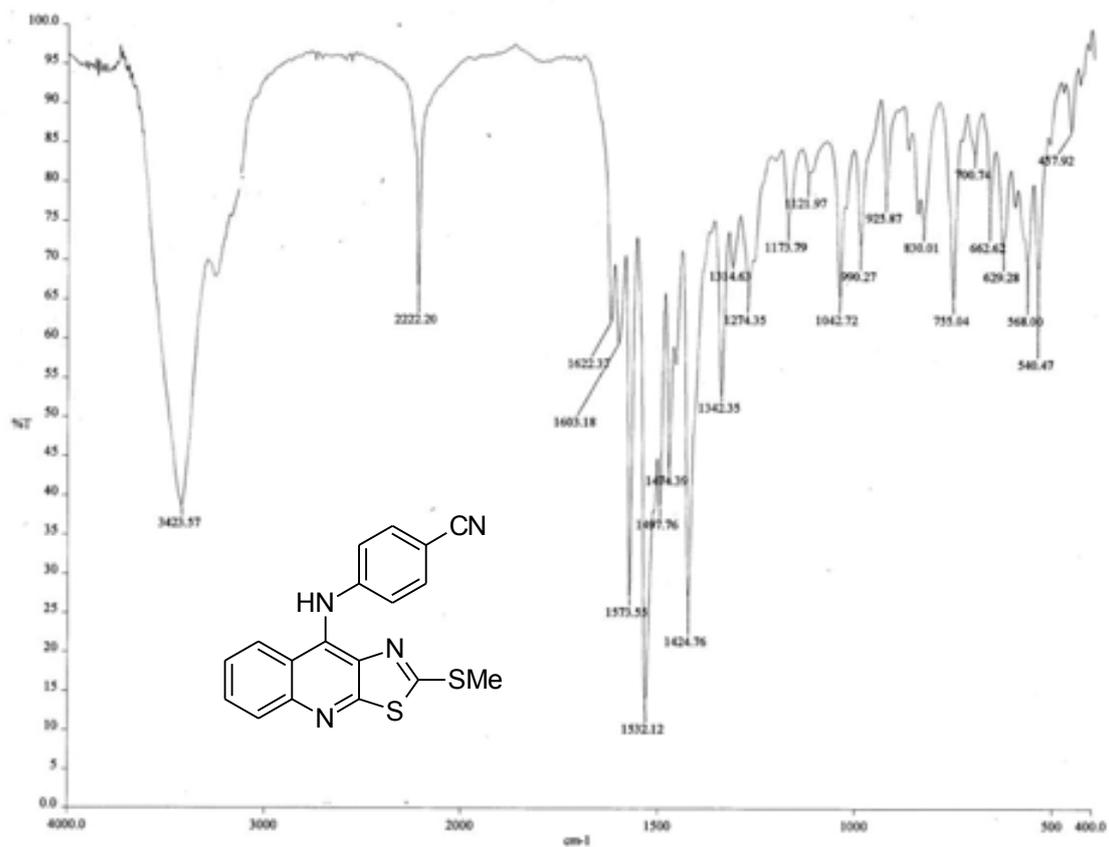
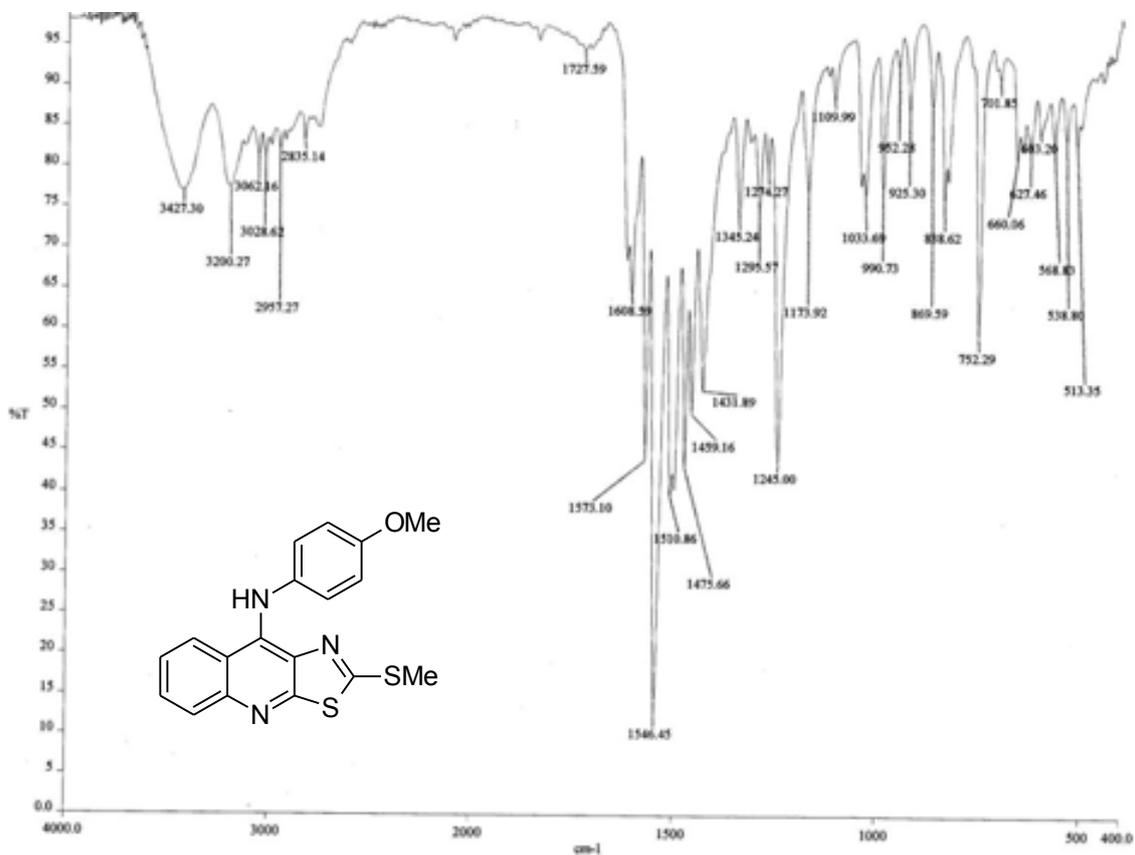
Espectro 4. IR (KBr) del compuesto 8a

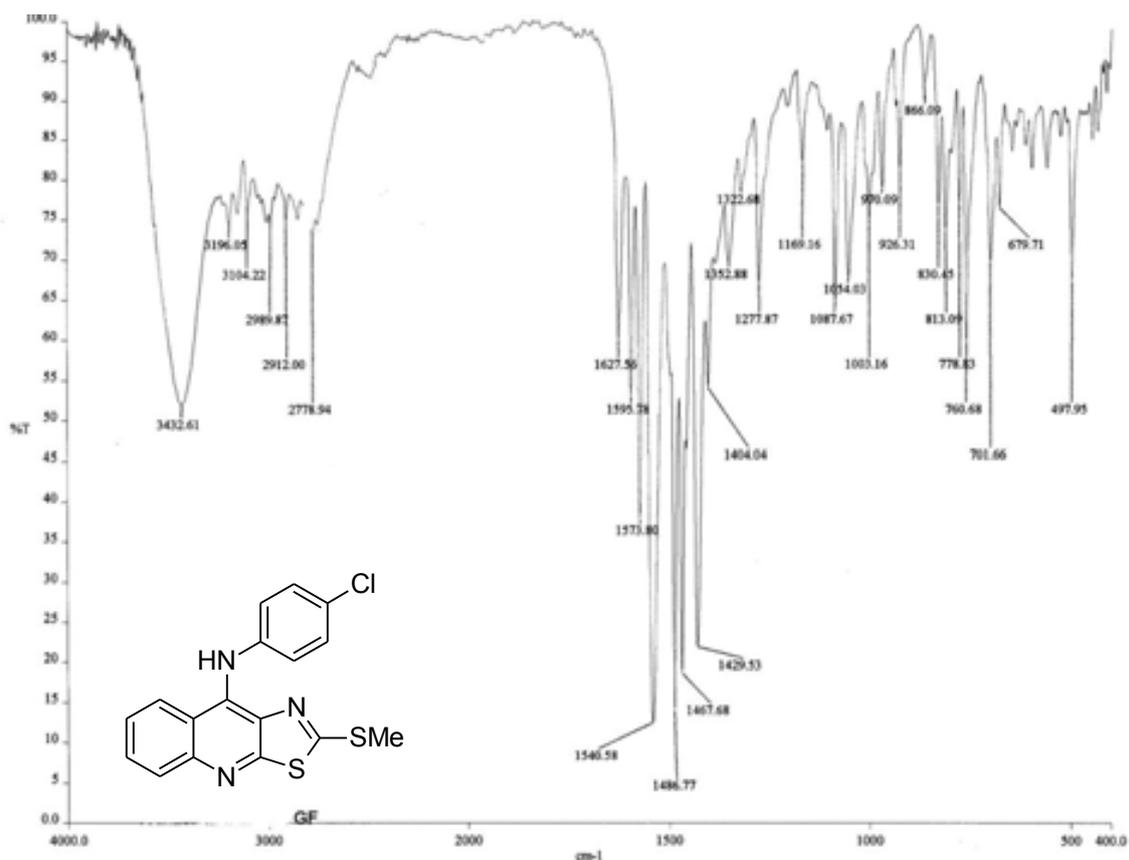


Espectro 5. IR (KBr) del compuesto 8b

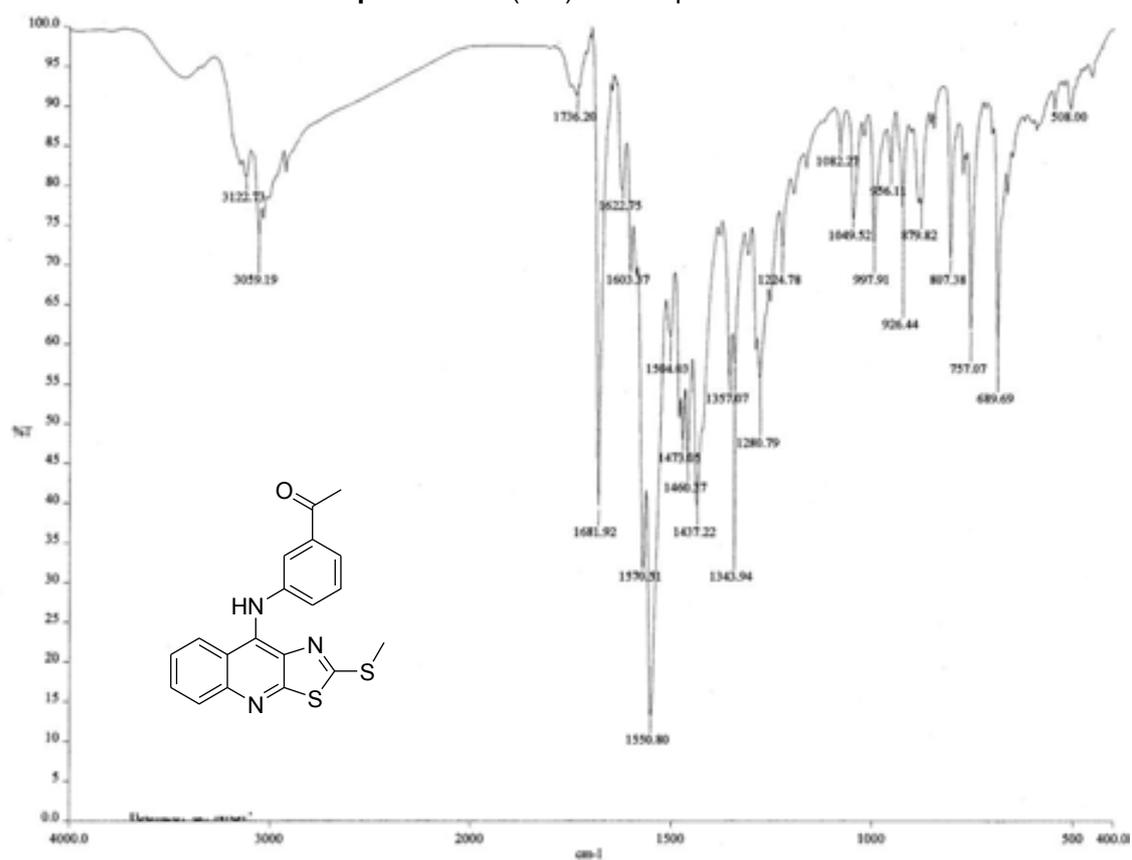


Espectro 6. IR (KBr) del compuesto 8c

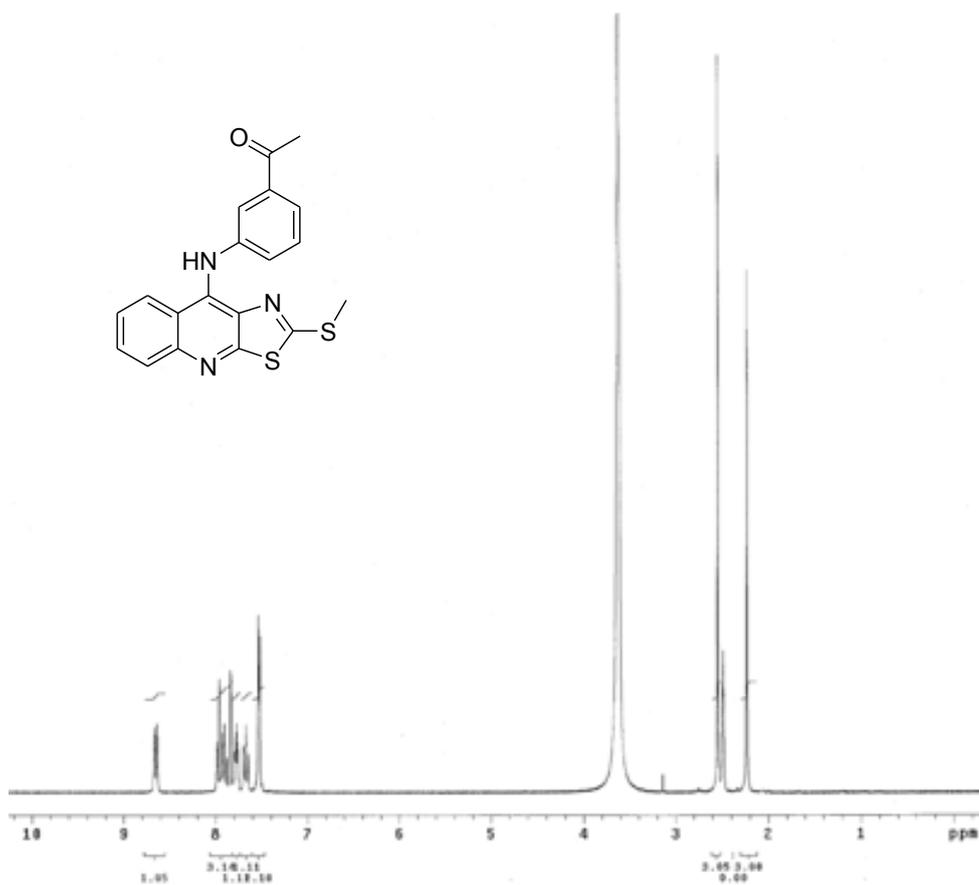
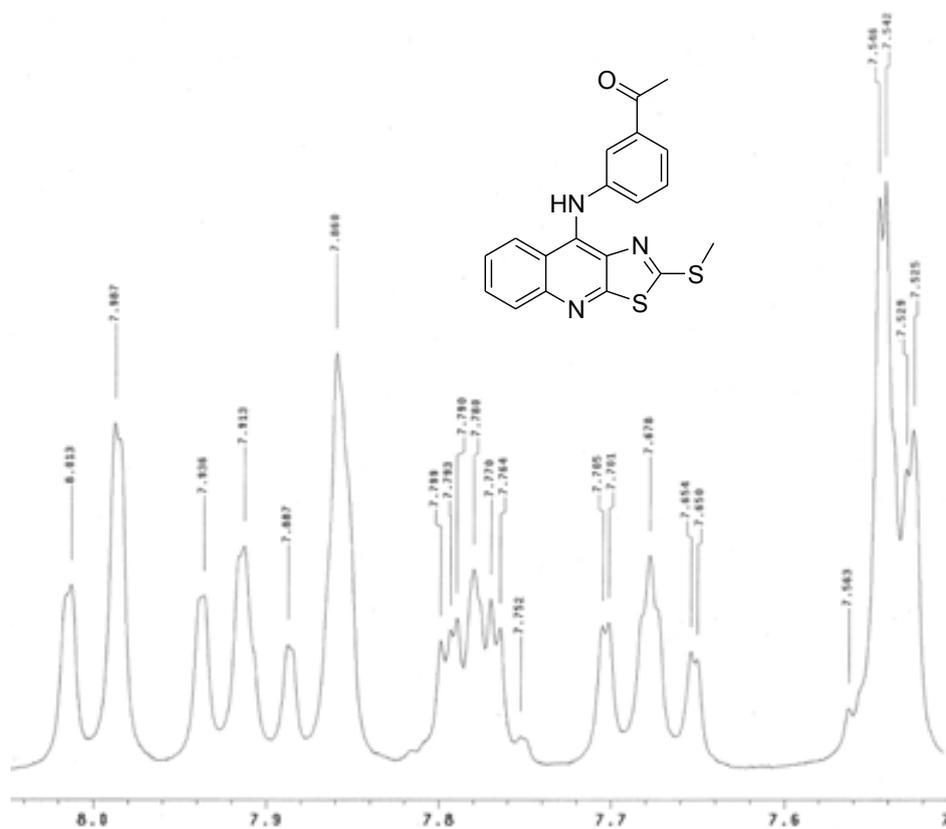
Espectro 7. IR (KBr) del compuesto **8d**Espectro 8. IR (KBr) del compuesto **8e**

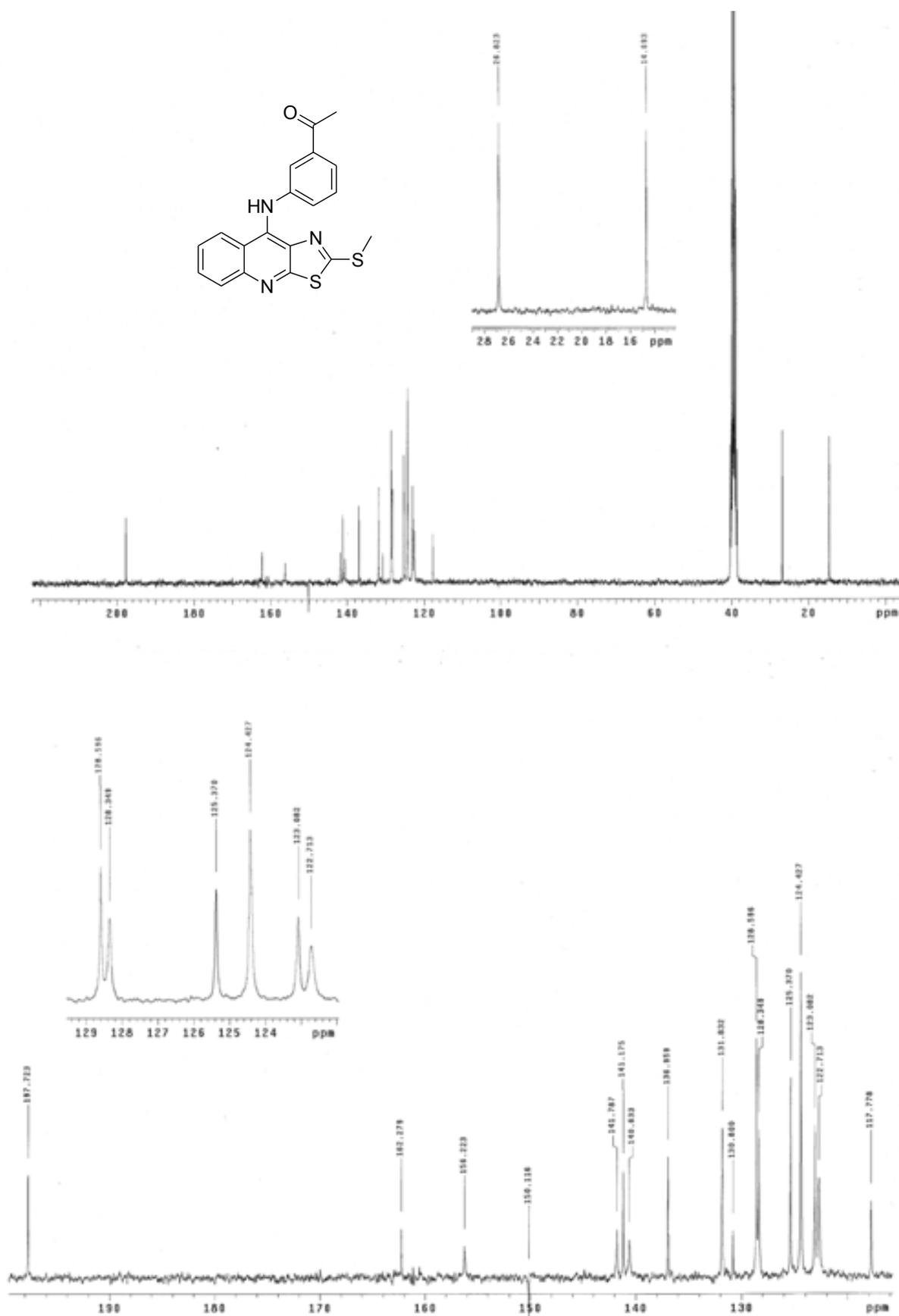


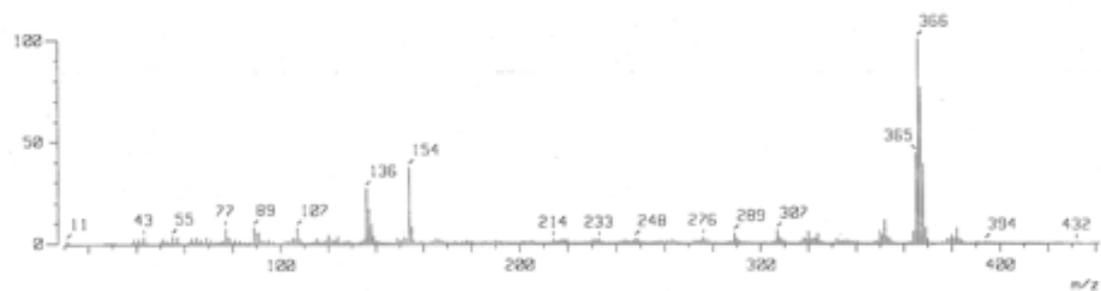
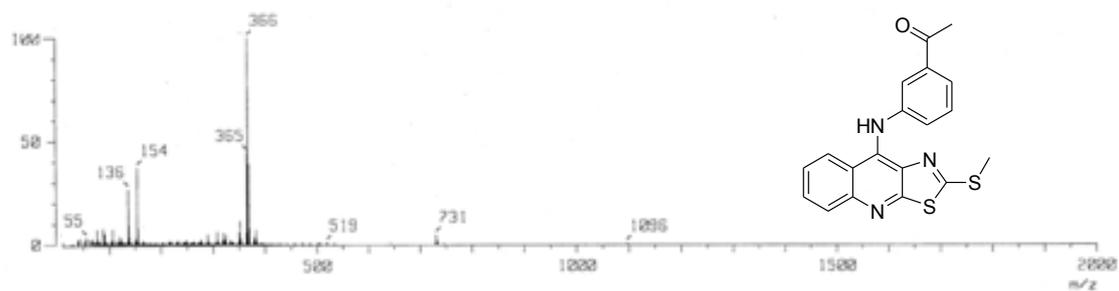
Espectro 9. IR (KBr) del compuesto 8f



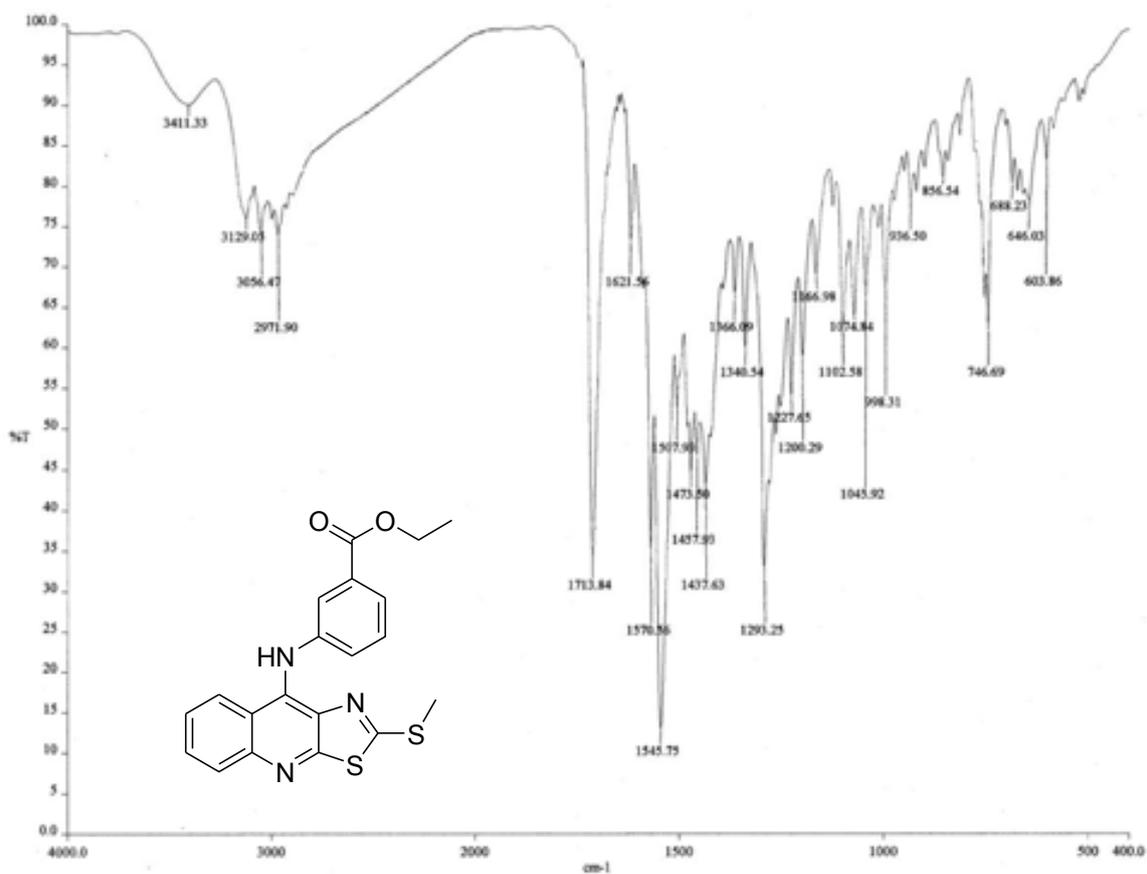
Espectro 10. IR (KBr) del compuesto 2a

Espectro 11. RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 2aEspectro 11. RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 2a. Ampliación zona aromática

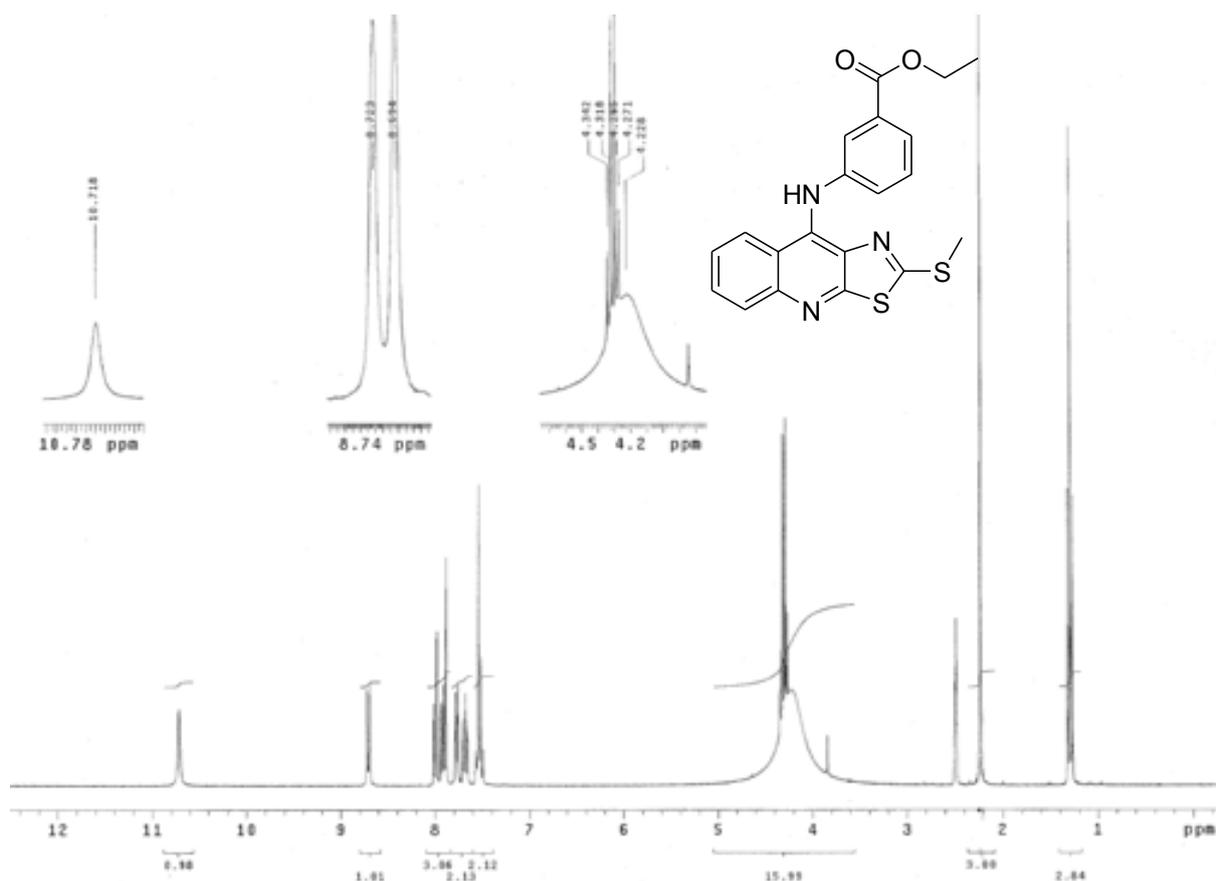
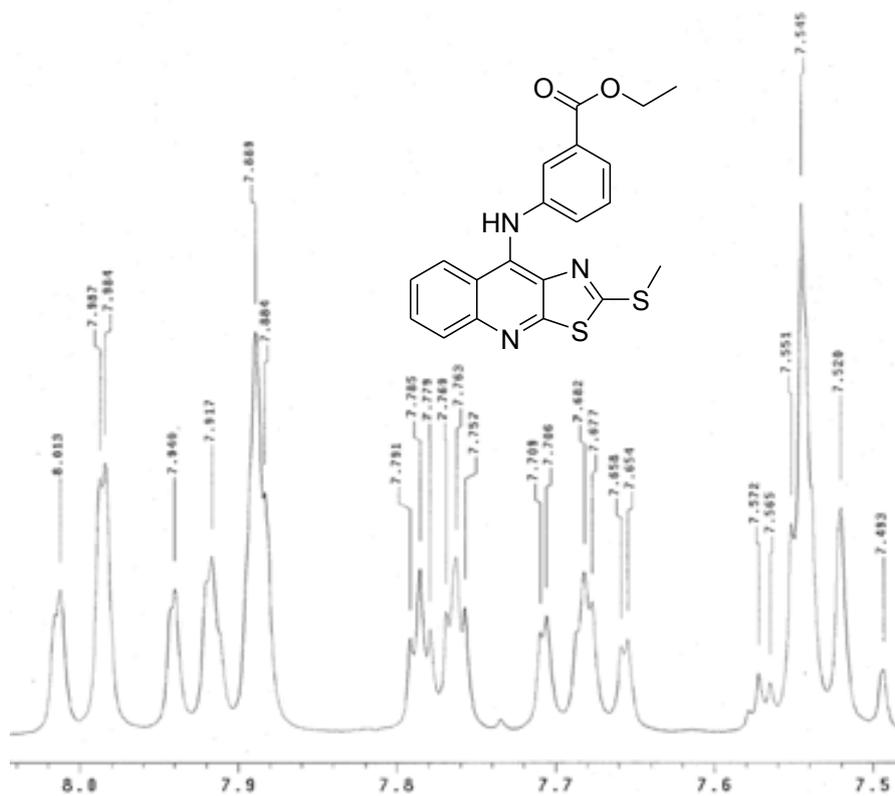
Espectro 12. RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 2a.

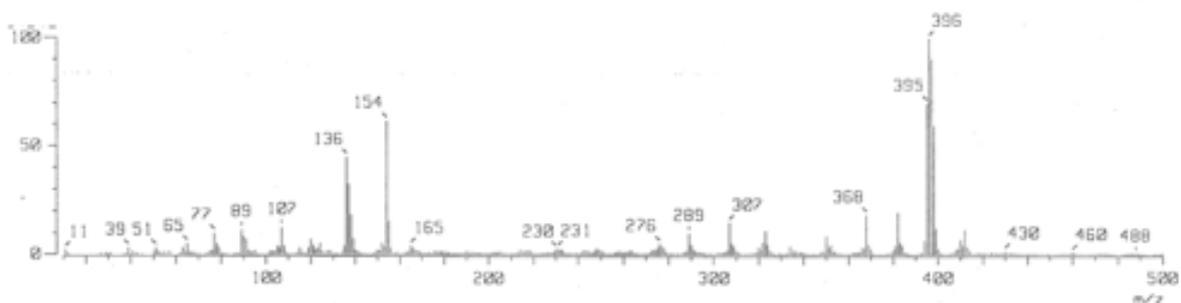
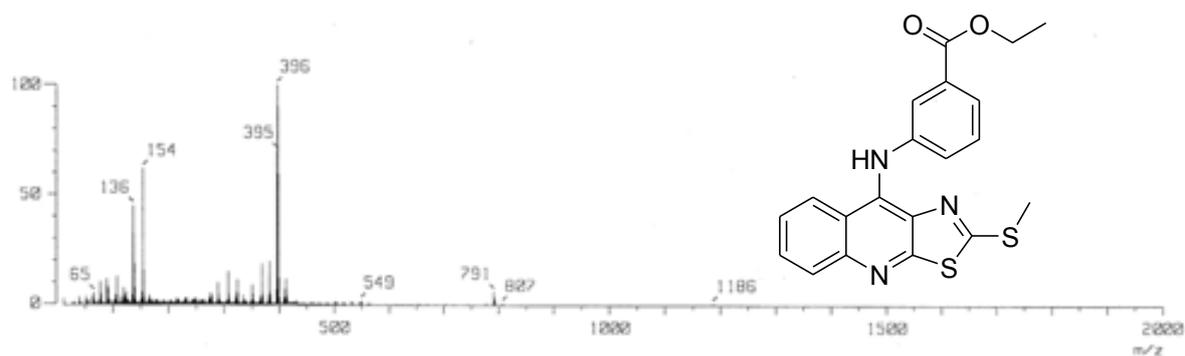


Espectro 13. Espectrometría de masas del compuesto 2a (FAB)

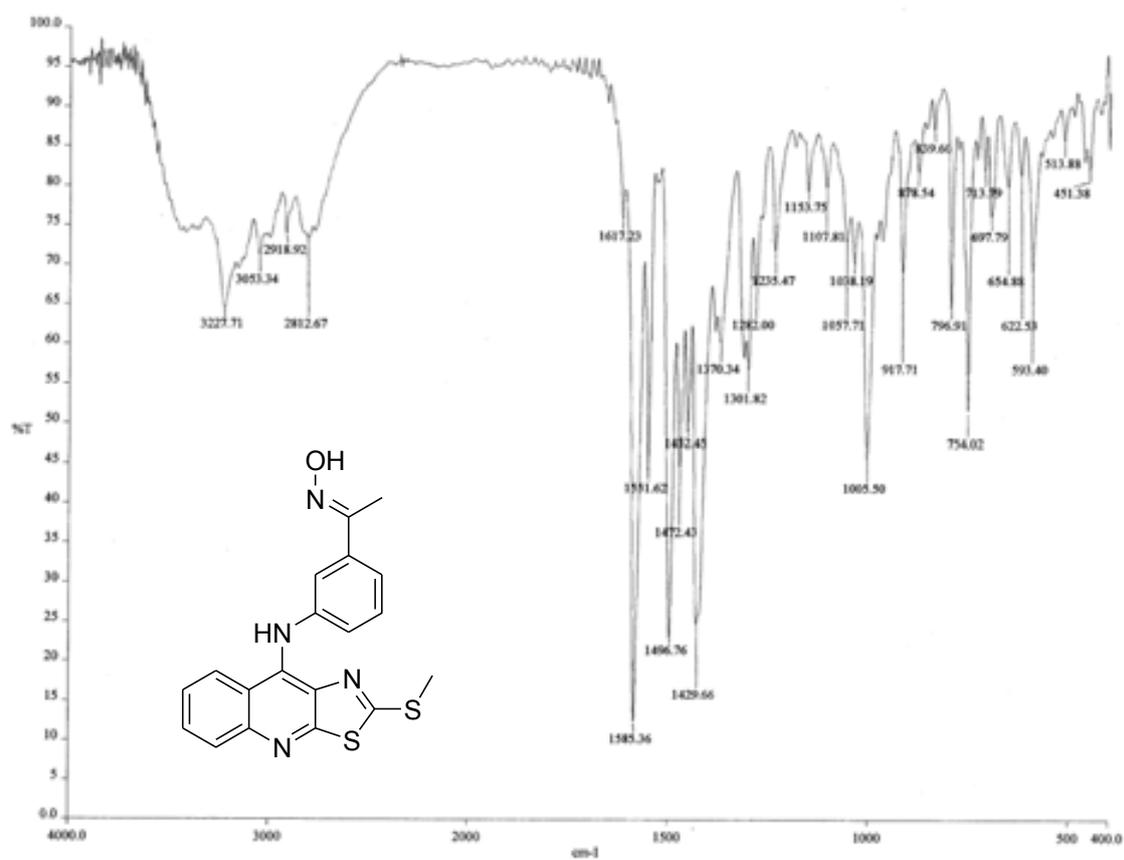


Espectro 14. Espectro IR (KBr) del compuesto 2b

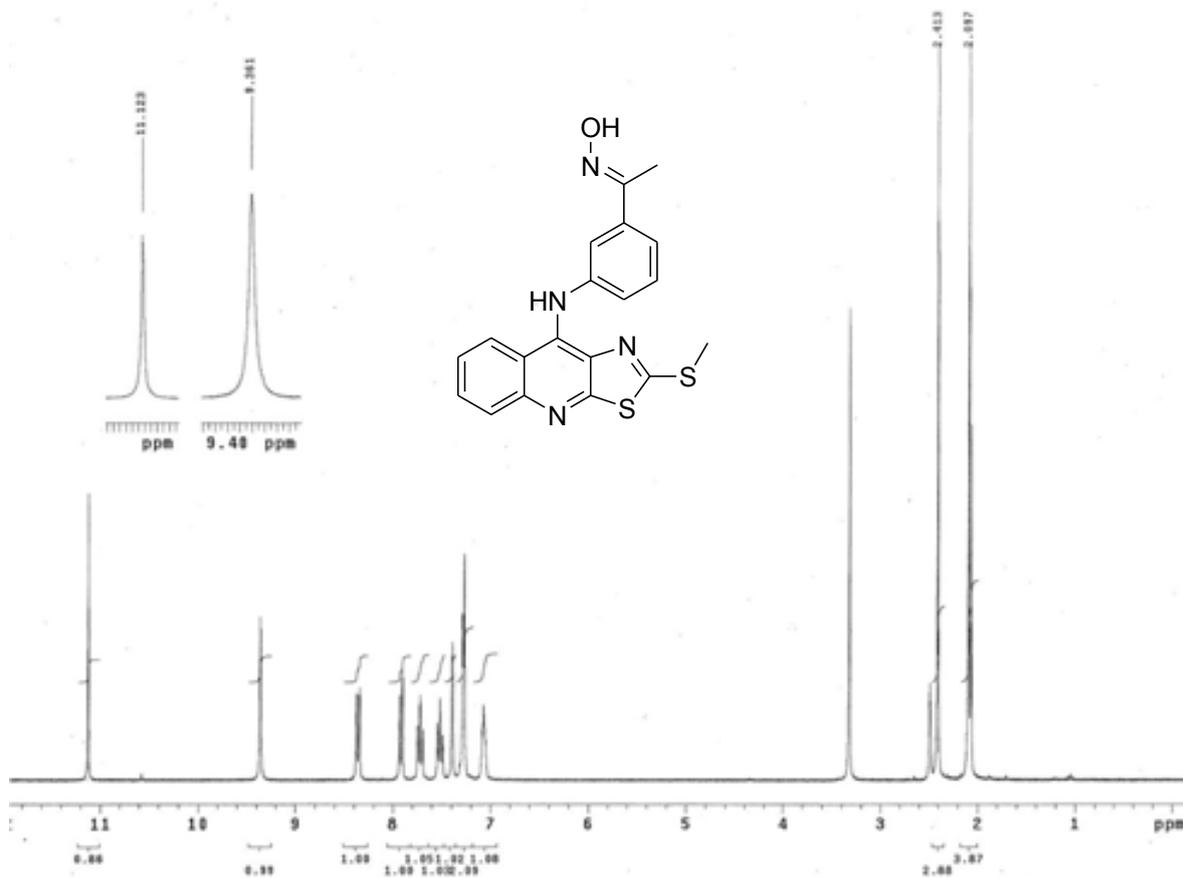
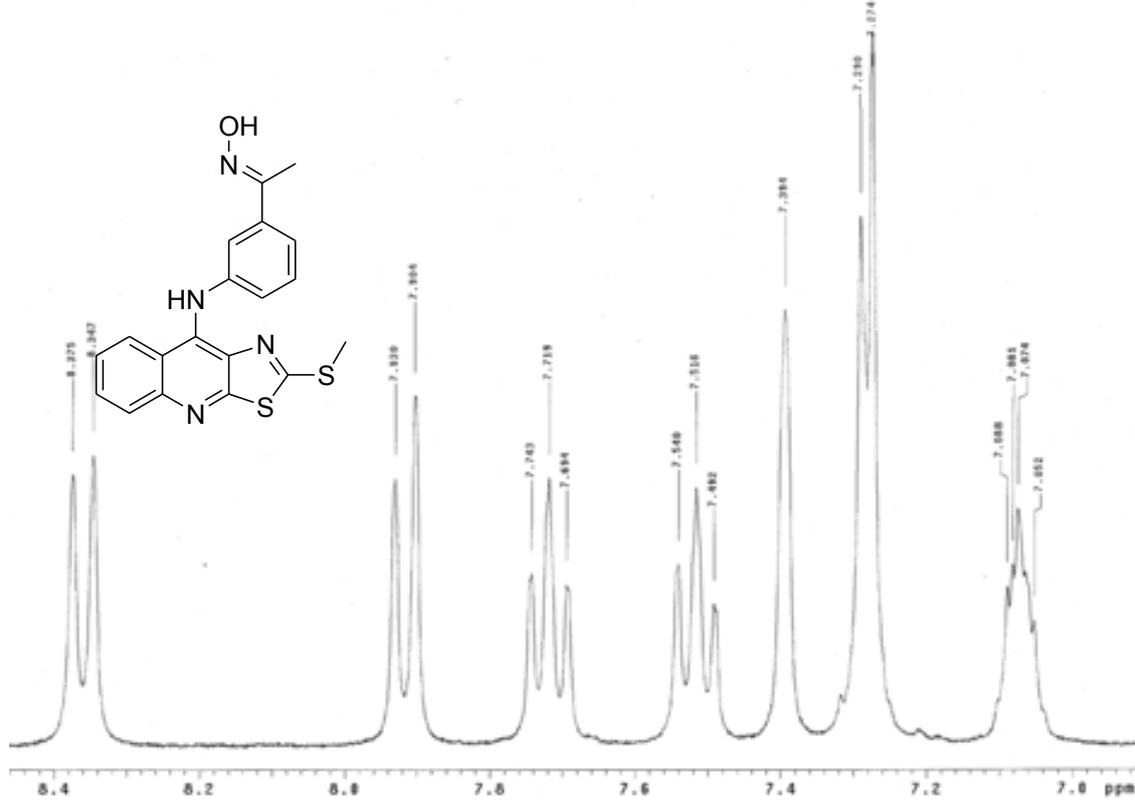
Espectro 15. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **2b**Espectro 15. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **2b**. Ampliación zona aromática.

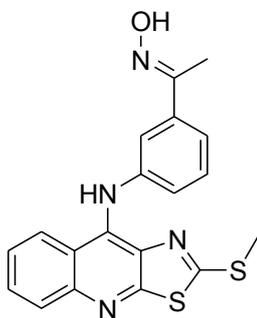
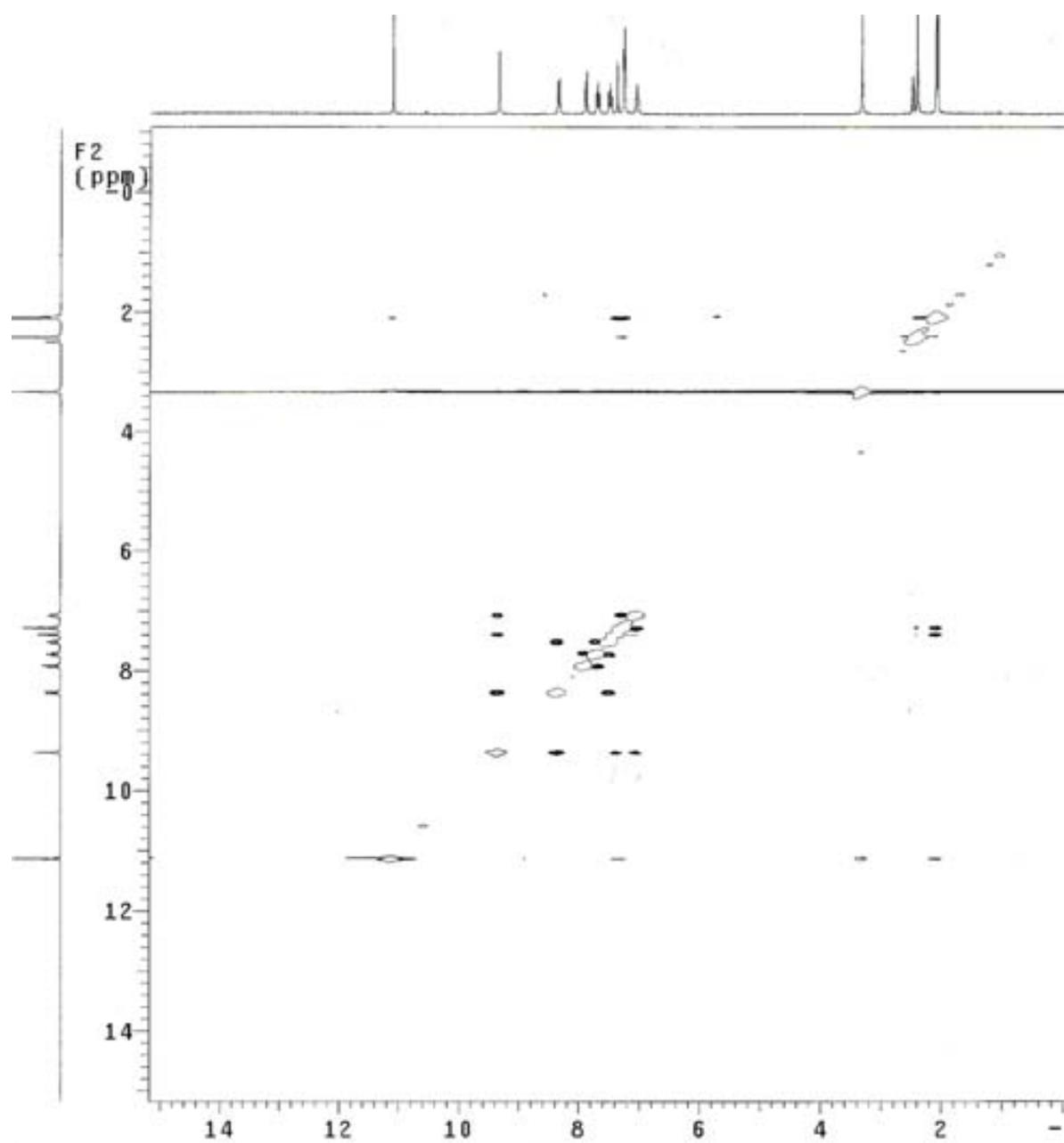


Espectro 16. Espectrometría de masas del compuesto 2b

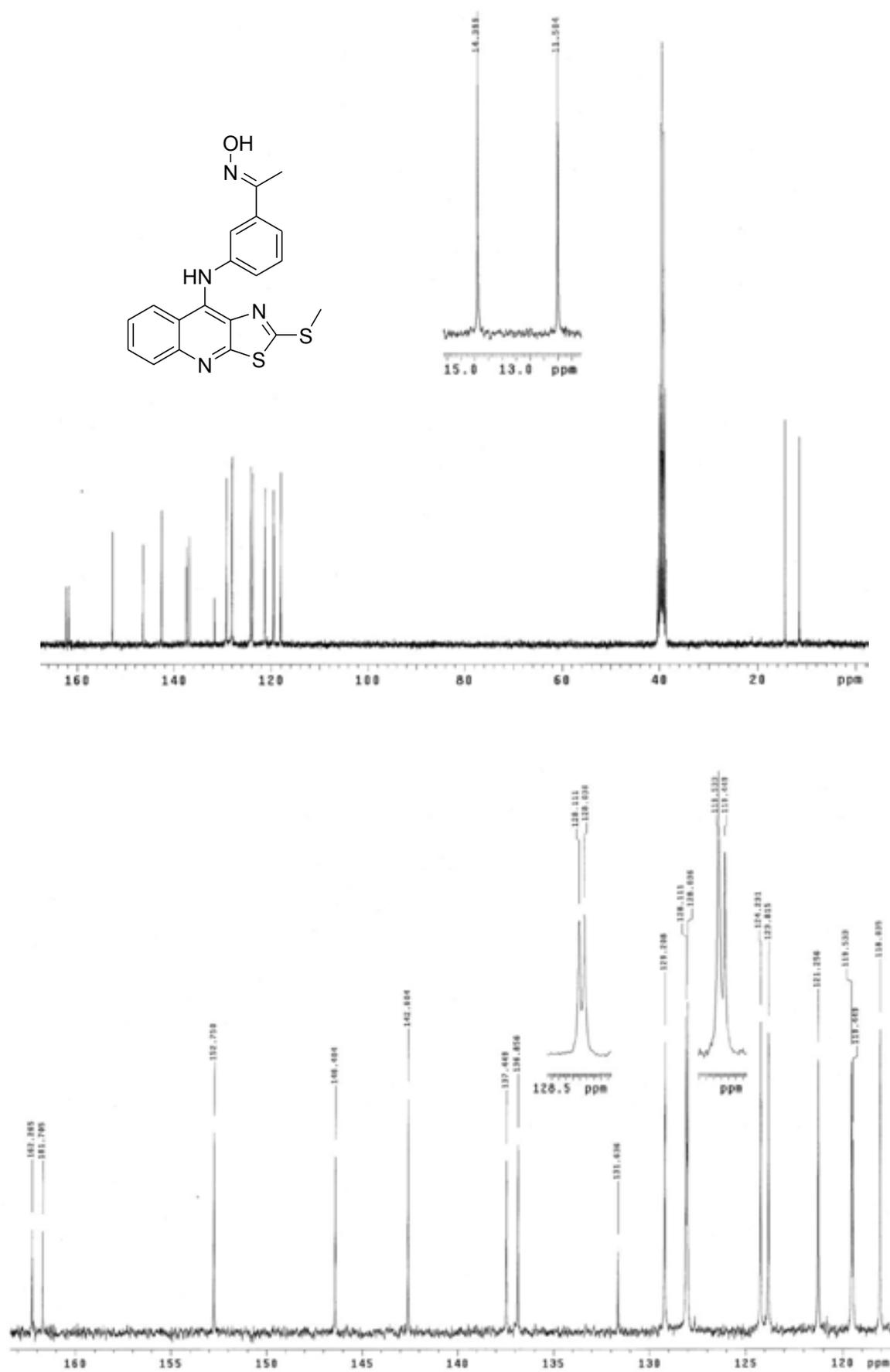


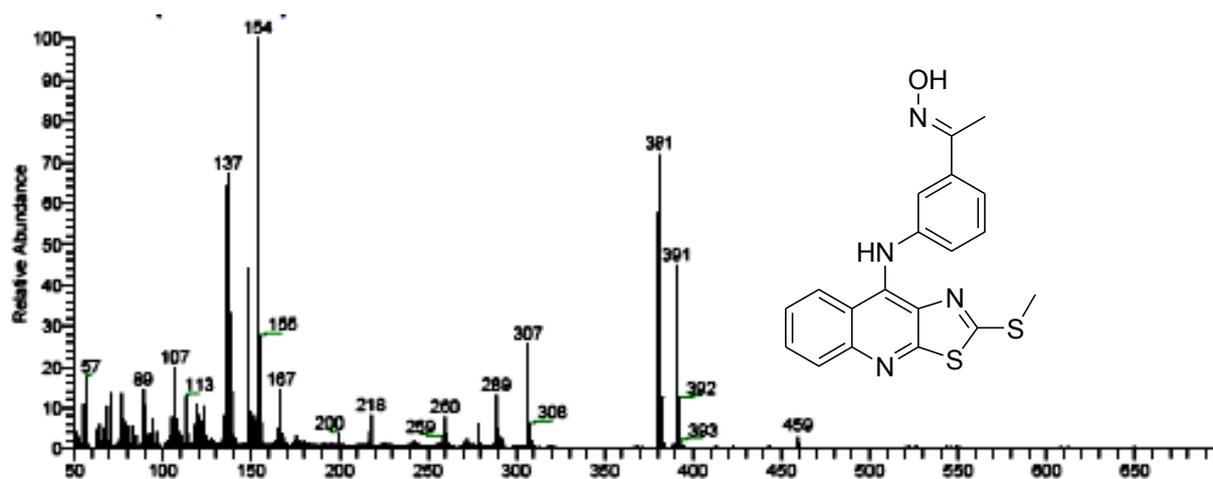
Espectro 17. Espectro IR (KBr) del compuesto 2c

Espectro 18. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 2cEspectro 18. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 2c. Ampliación zona aromática.

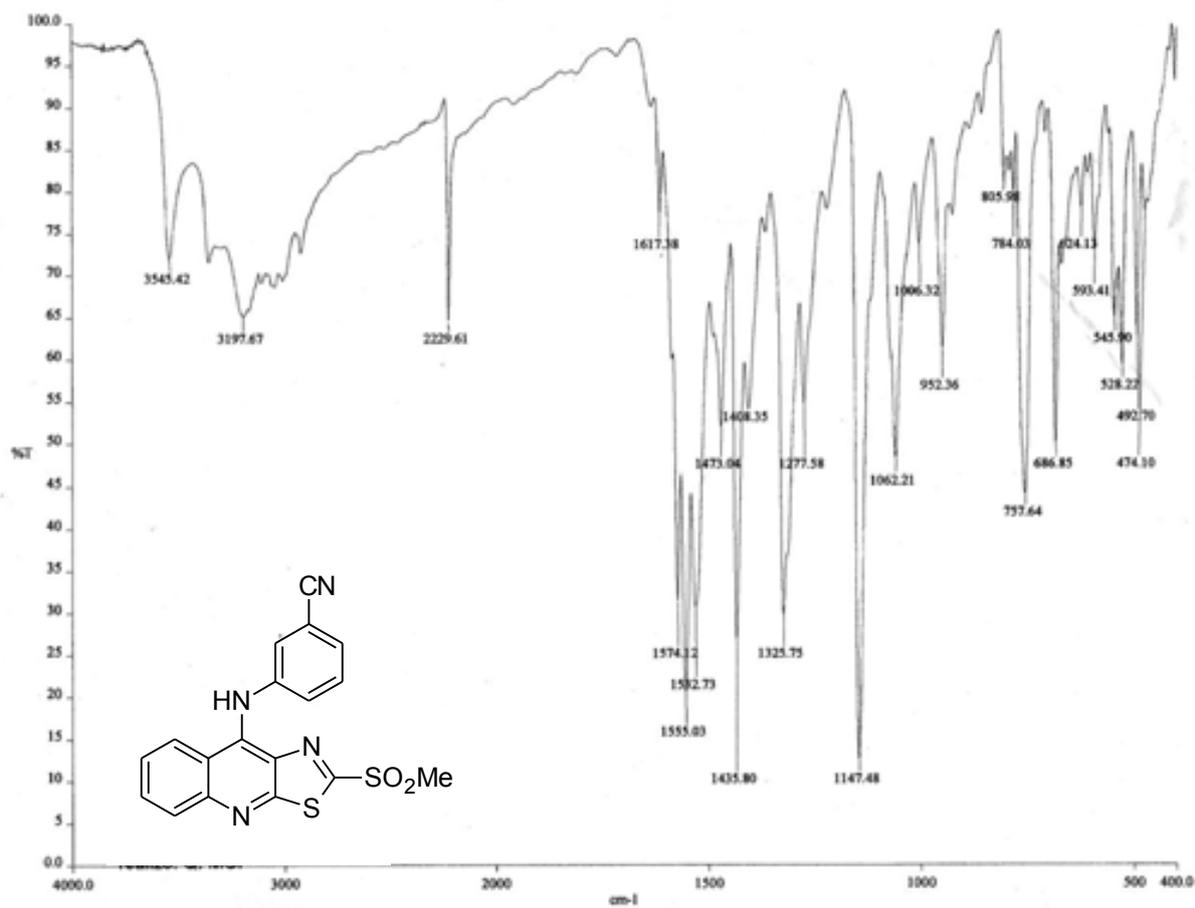


Espectro 19. Espectro NOESY del compuesto 2c

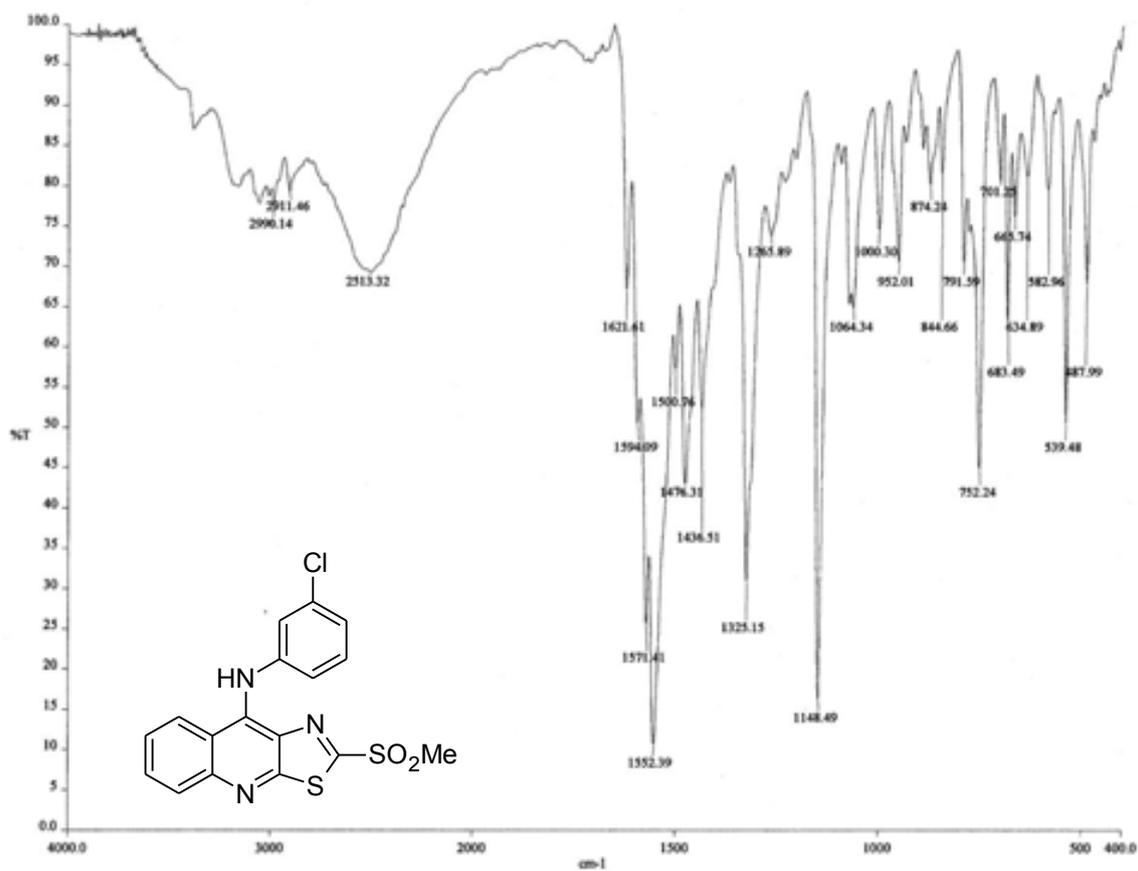
Espectro 20. Espectro RMN <sup>13</sup>C del compuesto 2c



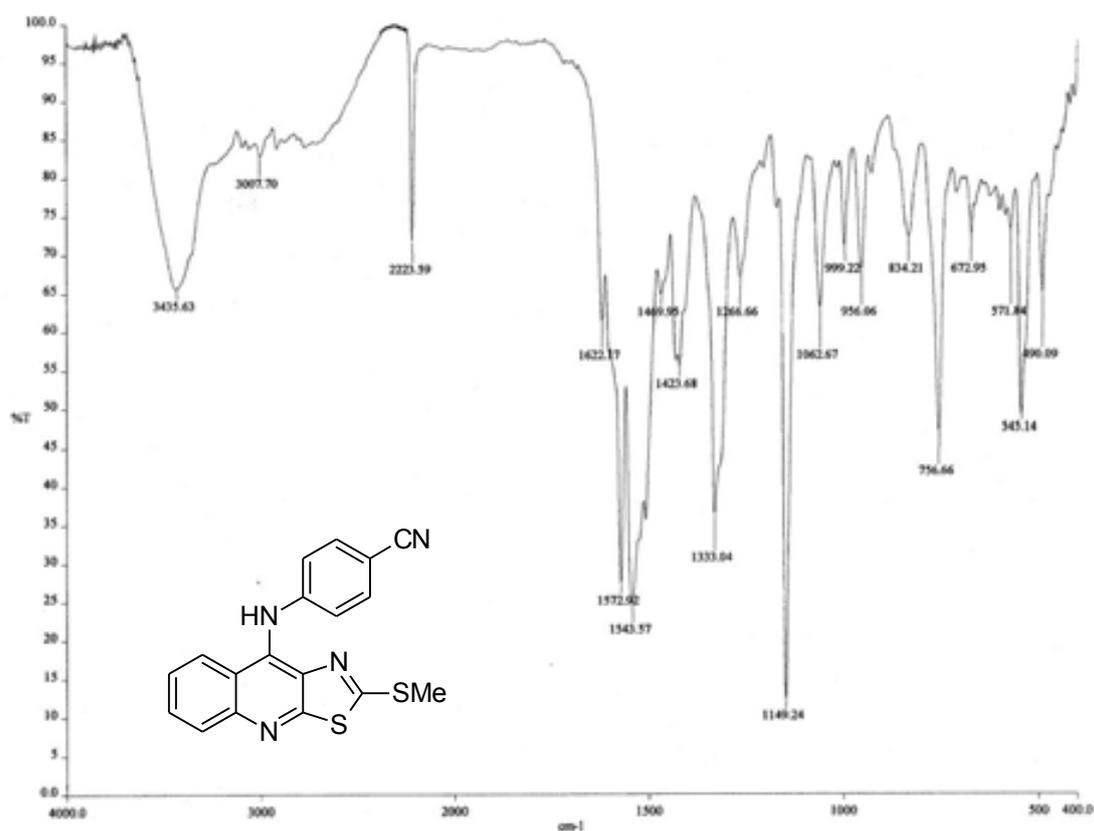
Espectro 21. Espectrometría de masas del compuesto 2c



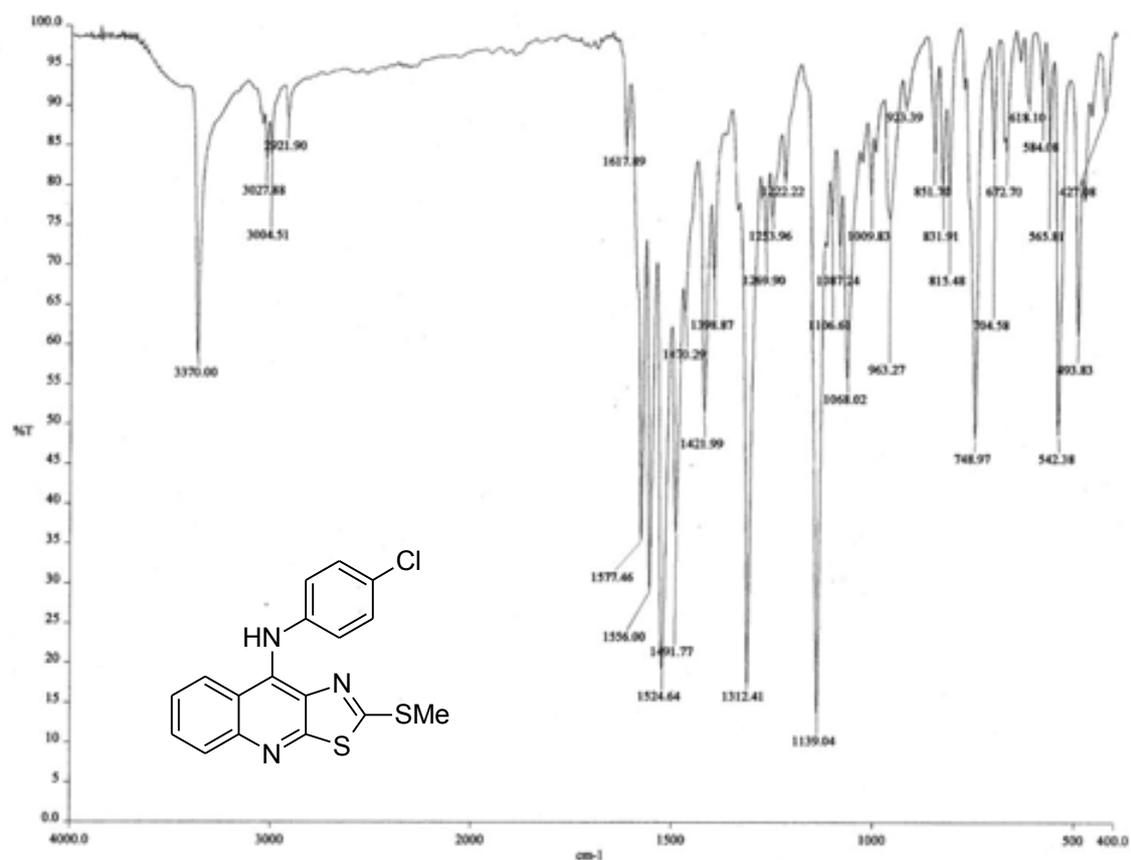
Espectro 22. Espectro IR (KBr) del compuesto 9a



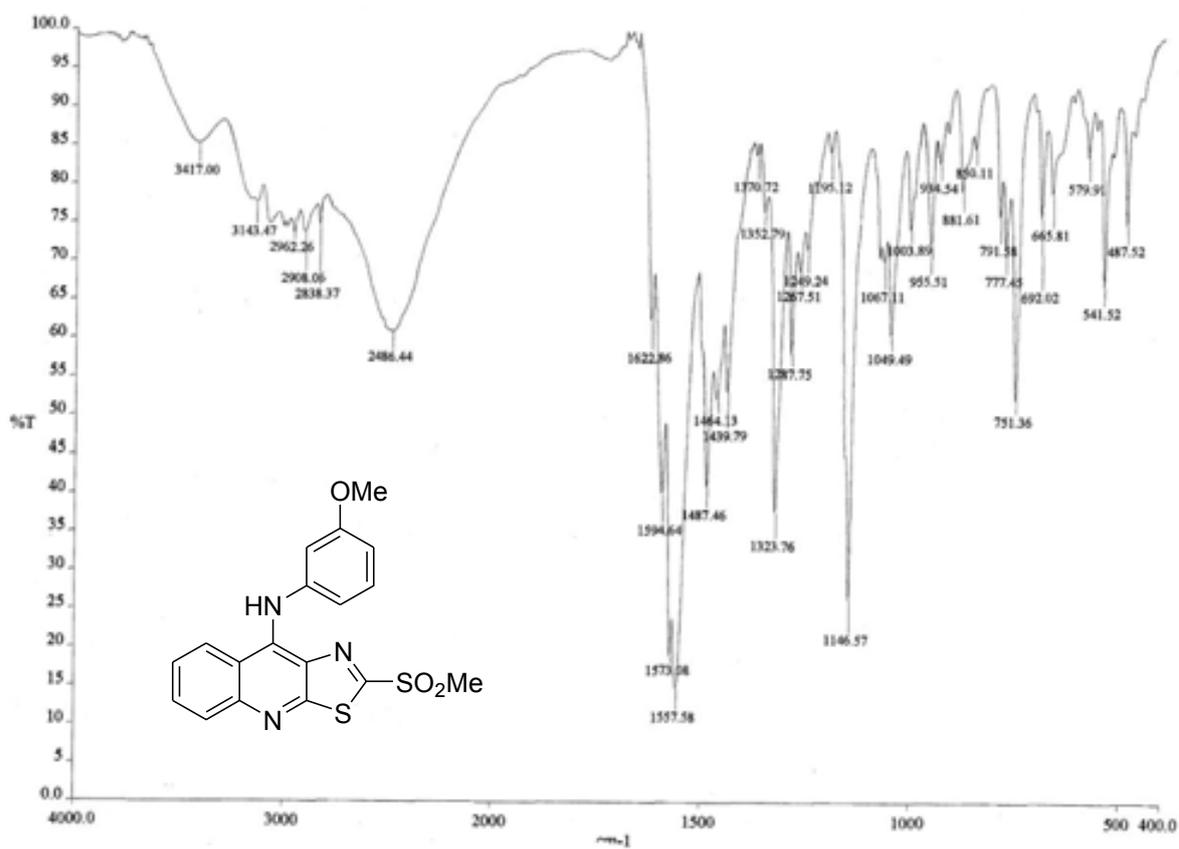
Espectro 23. Espectro IR (KBr) del compuesto 9c



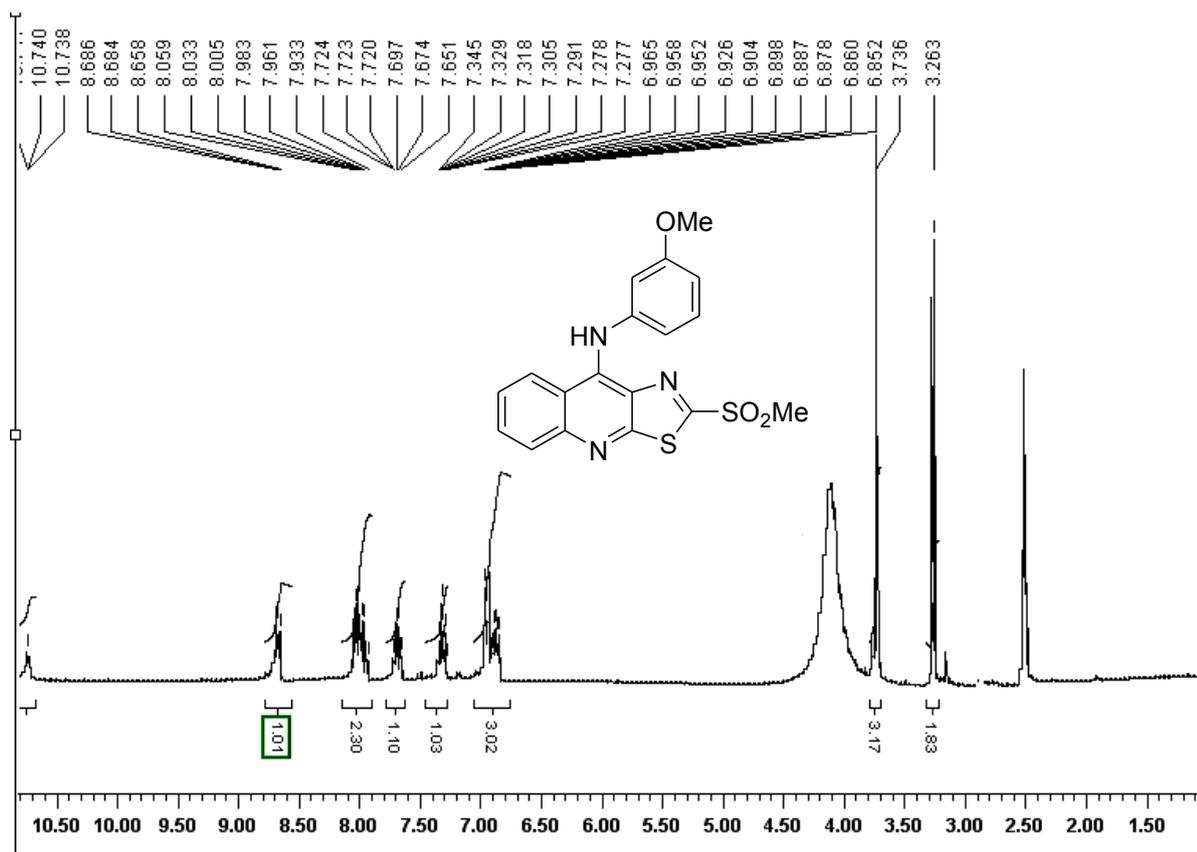
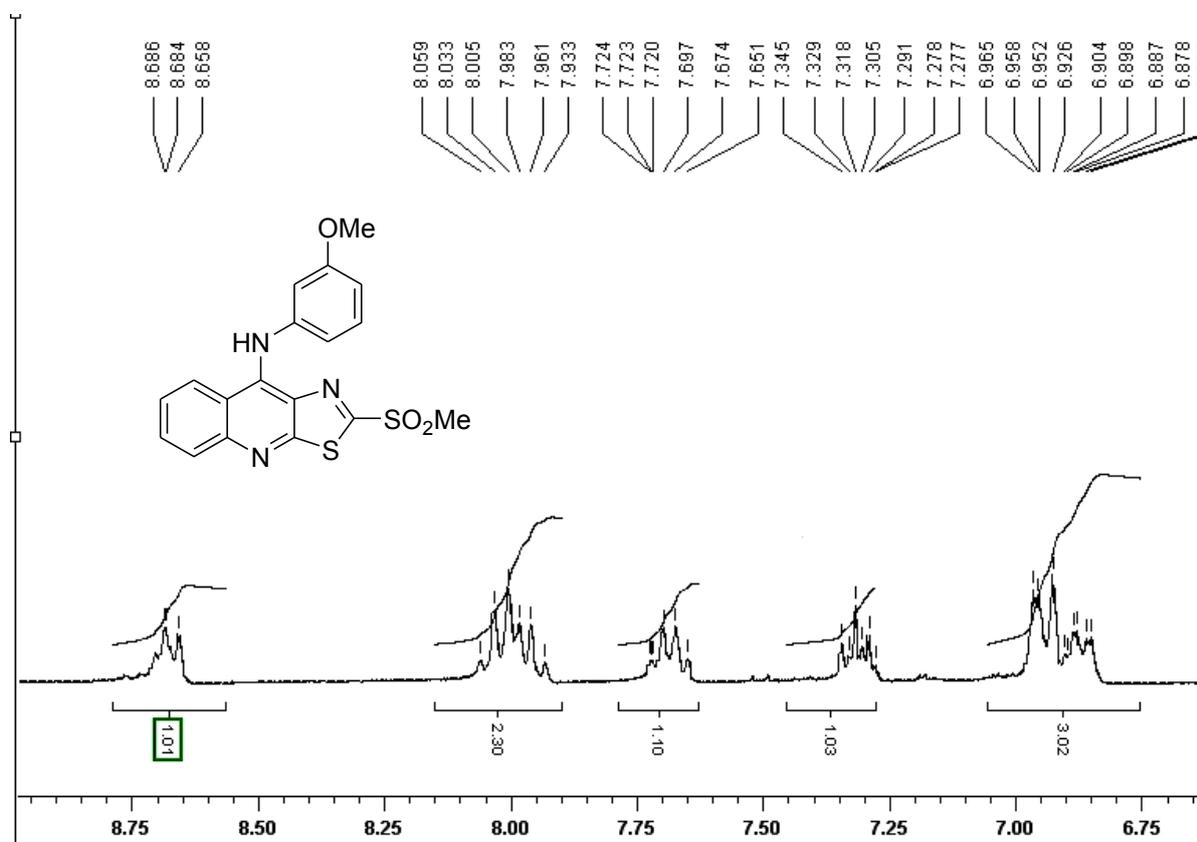
Espectro 24. Espectro IR (KBr) del compuesto 9d

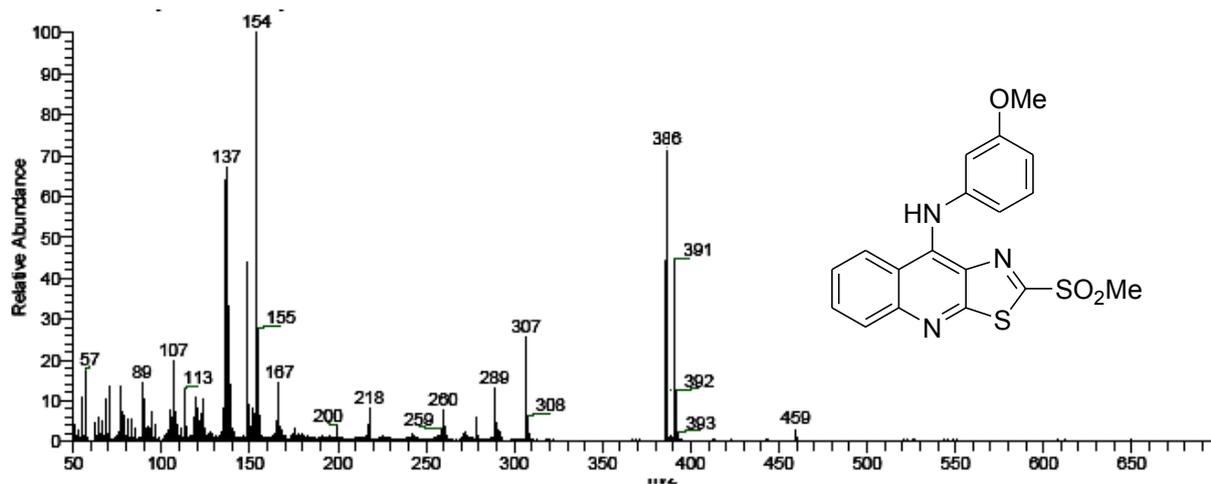


Espectro 25. Espectro IR (KBr) del compuesto 9f

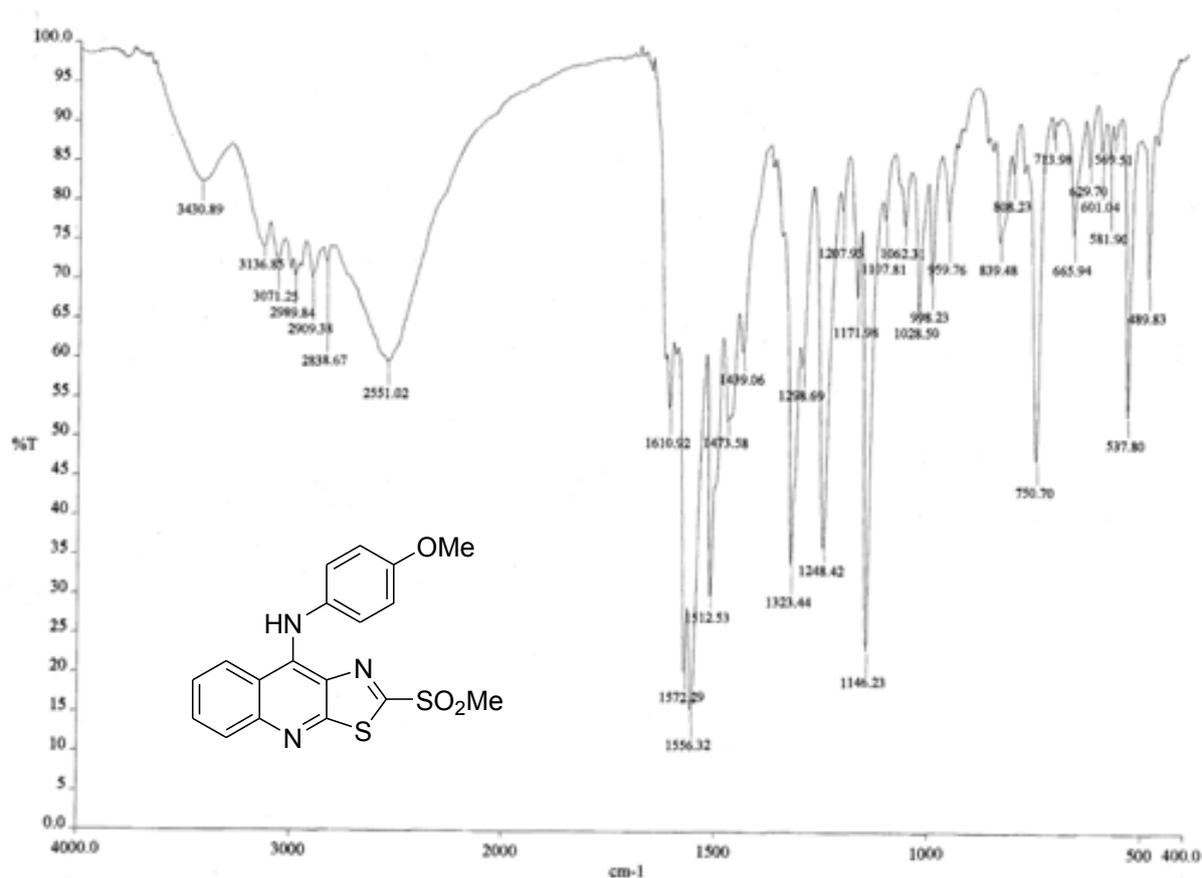


Espectro 26. Espectro IR (KBr) del compuesto 9b

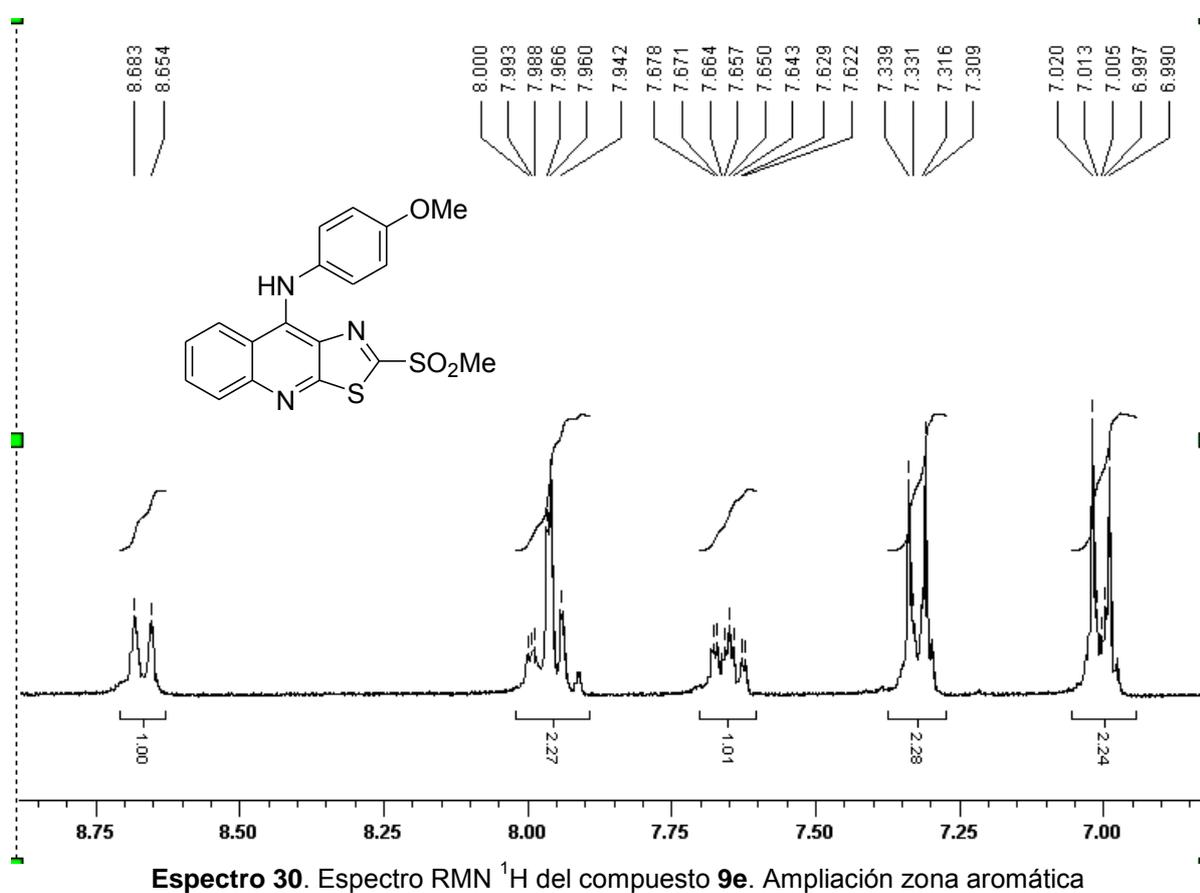
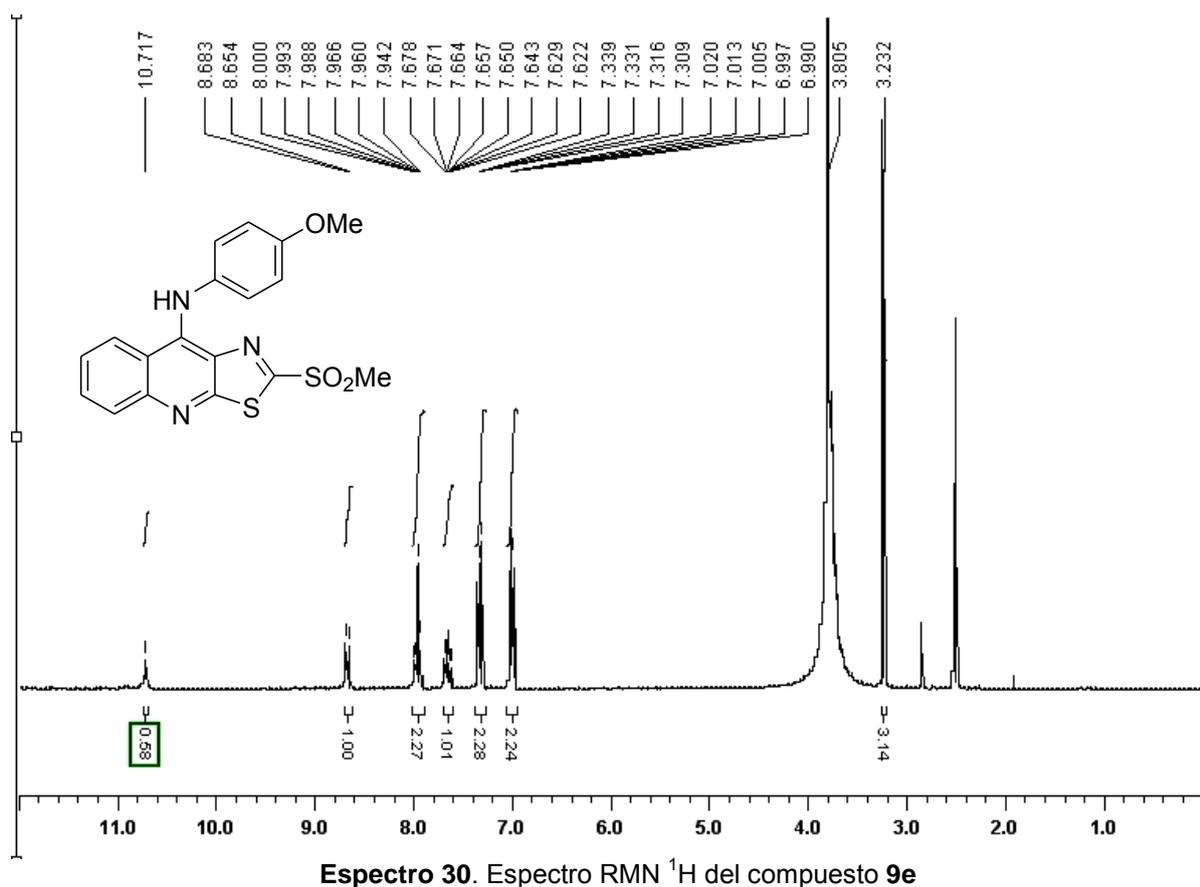
Espectro 27. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 9bEspectro 27. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 9b. Ampliación zona aromática

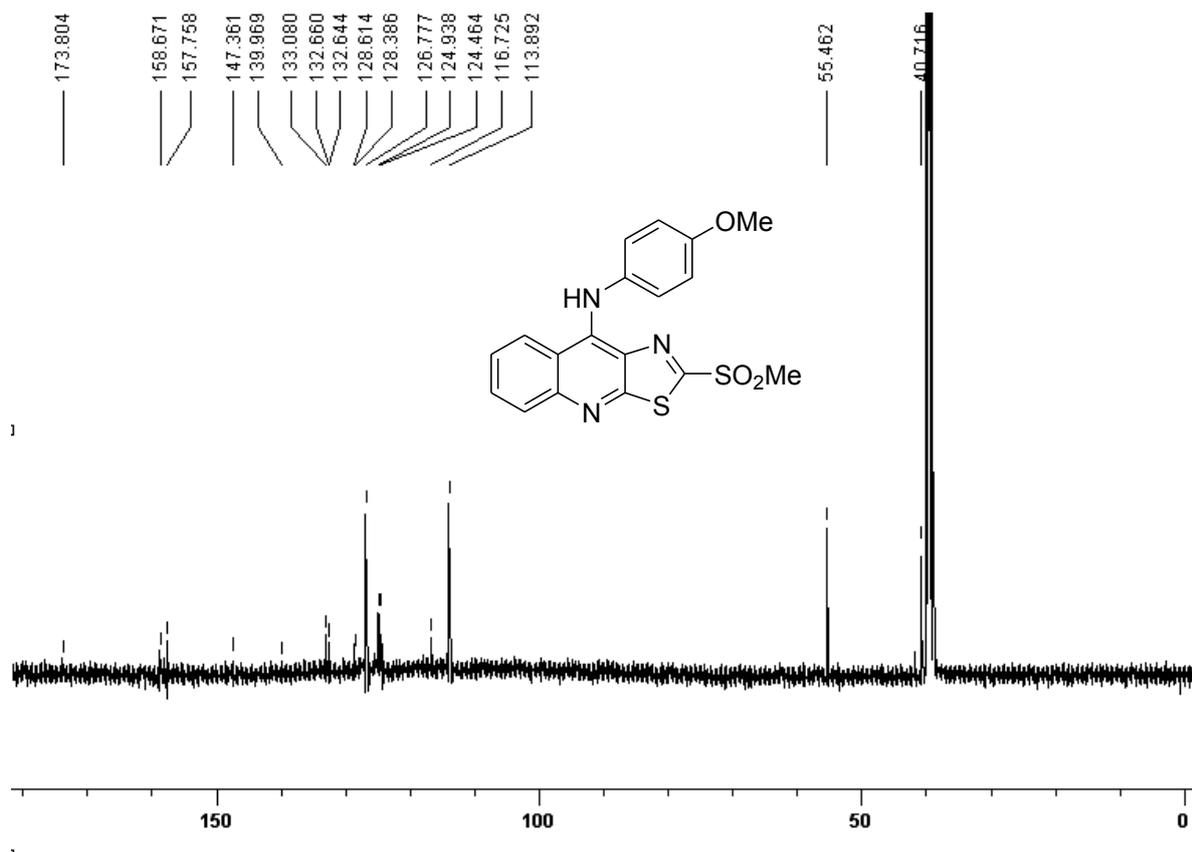
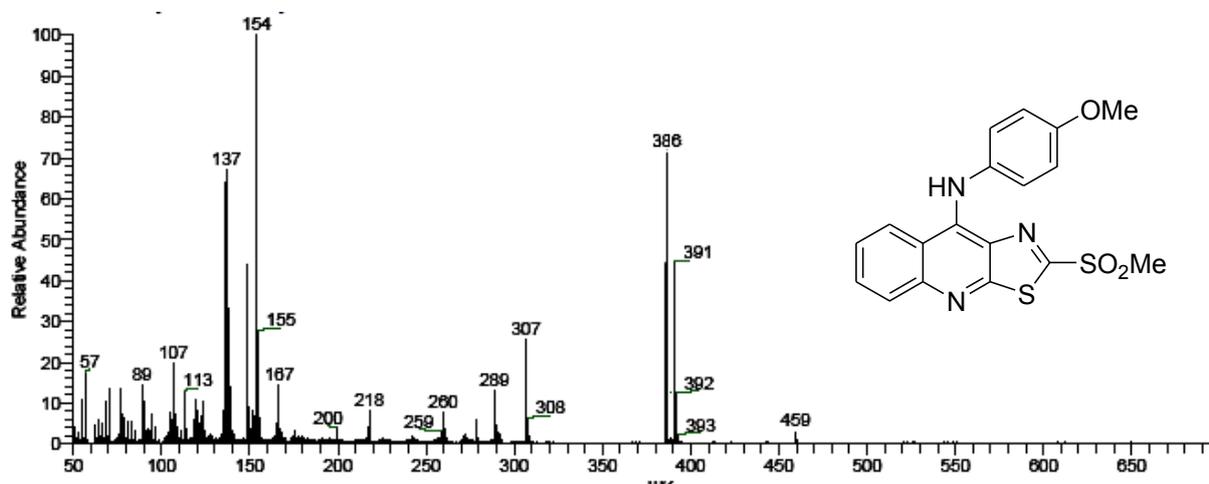


Espectro 28. Espectrometría de masas del compuesto 9b.

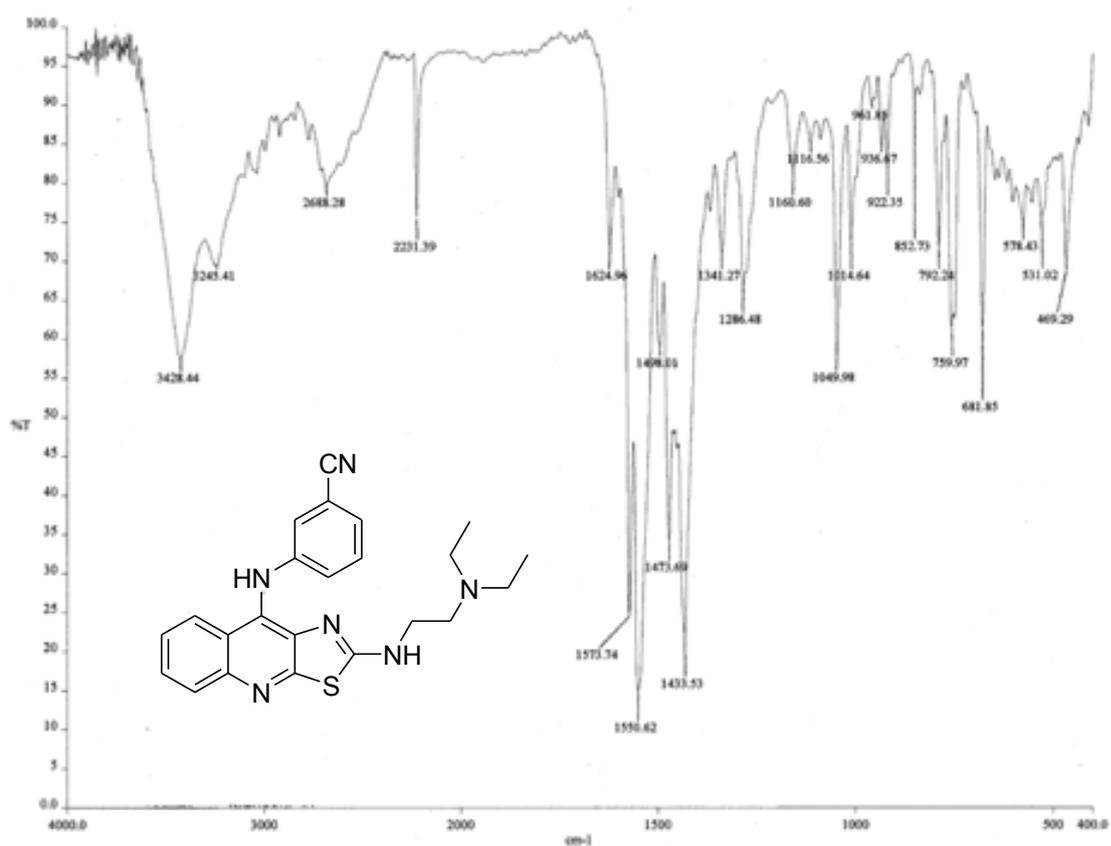


Espectro 29. Espectro IR (KBr) del compuesto 9e.

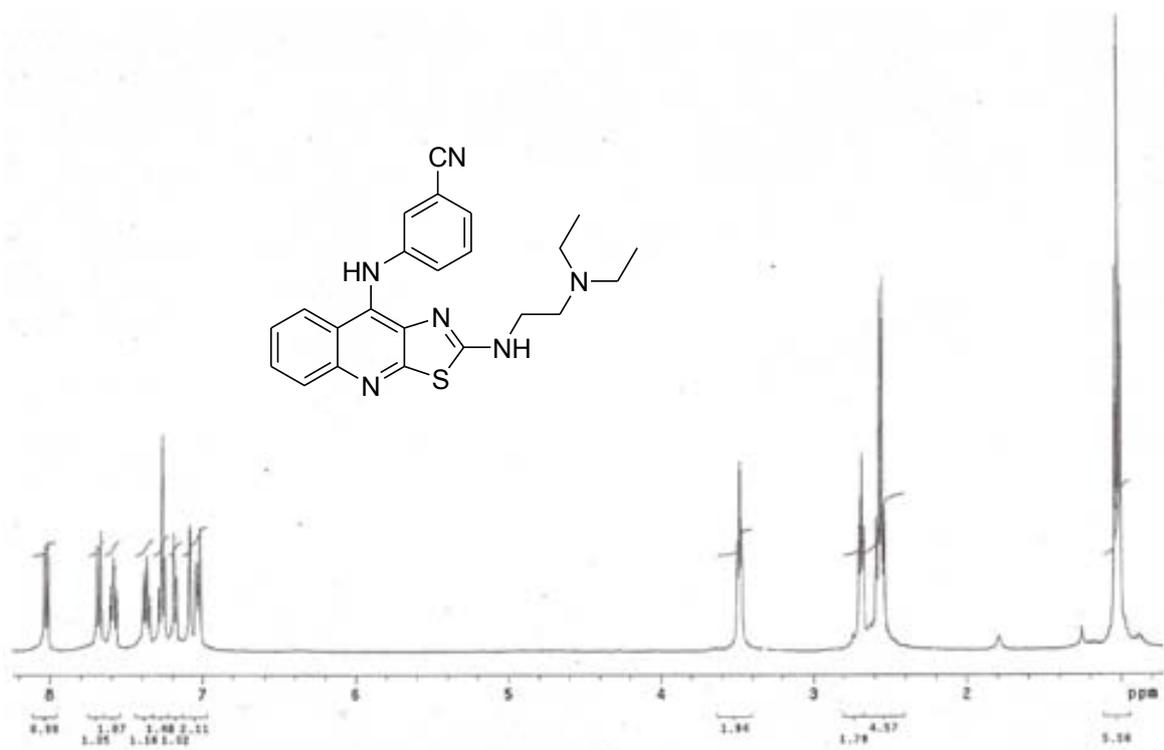


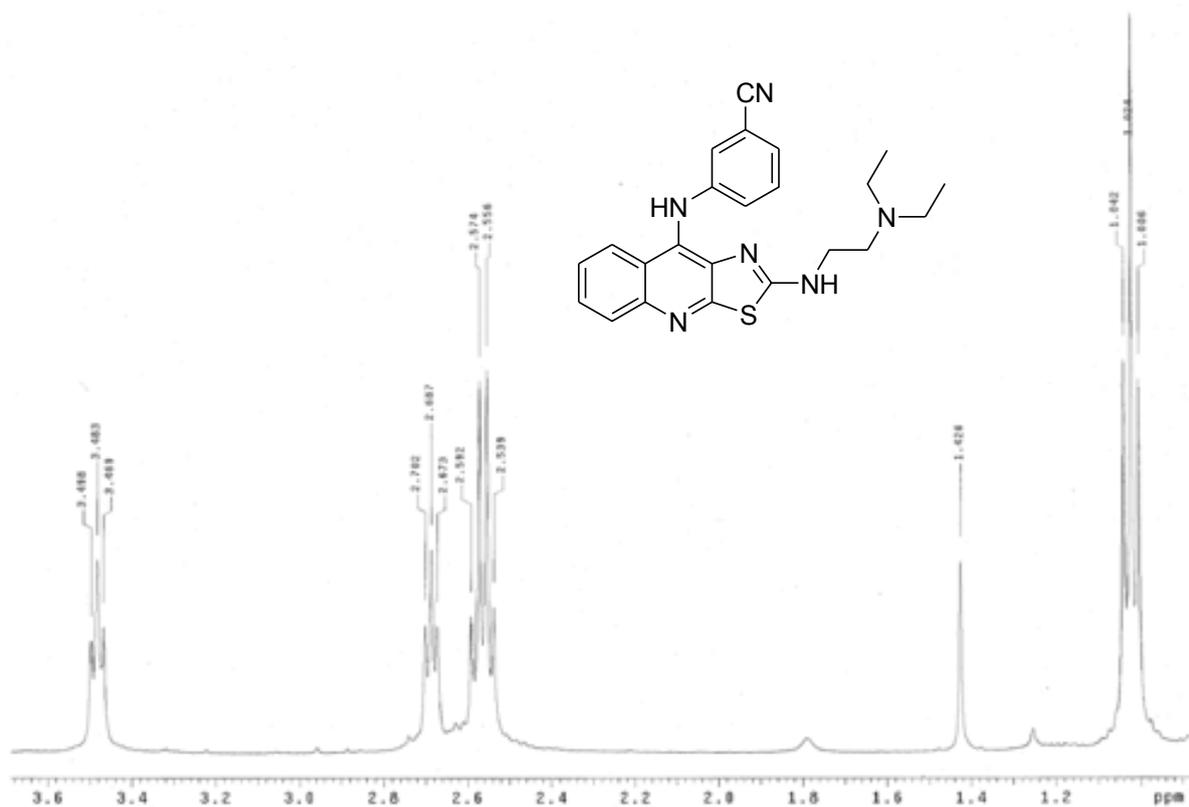
Espectro 31. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 9e.

Espectro 32. Espectrometría de masas del compuesto 9e

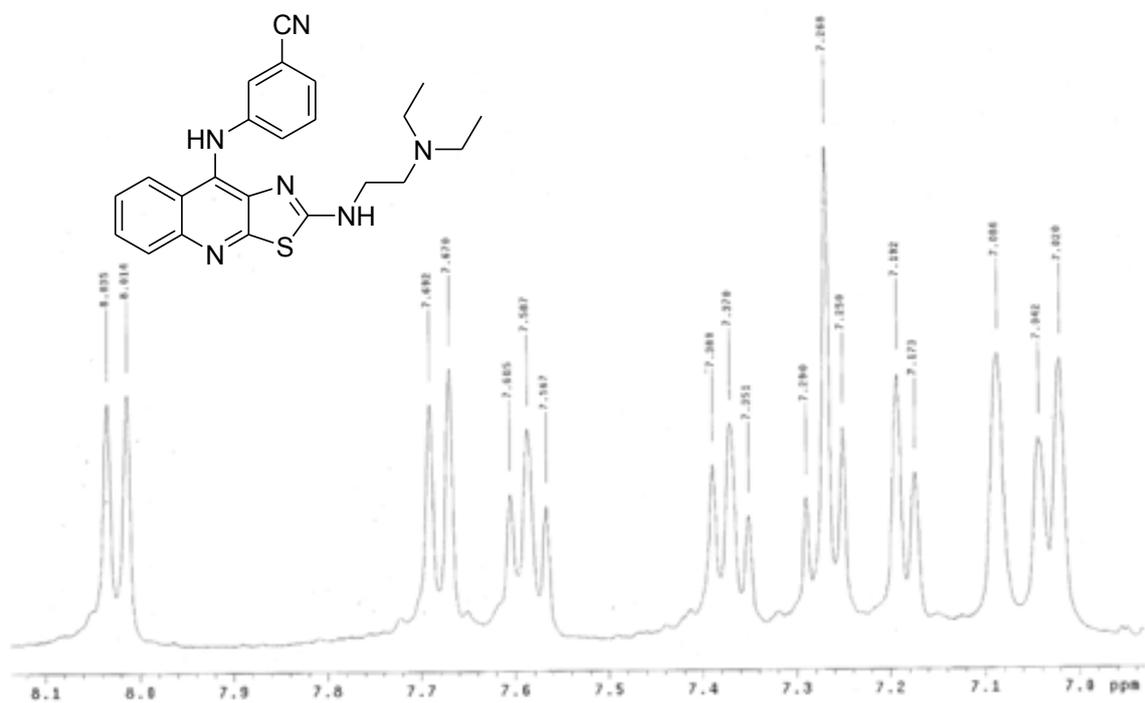


Espectro 33. Espectro IR (KBr) del compuesto 1a

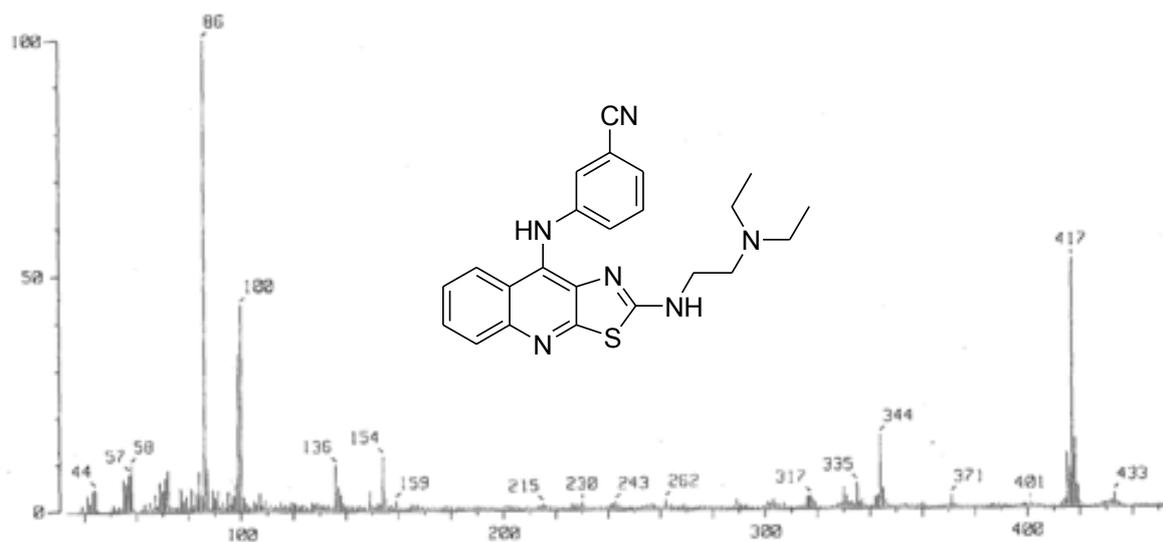
Espectro 34. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto 1a



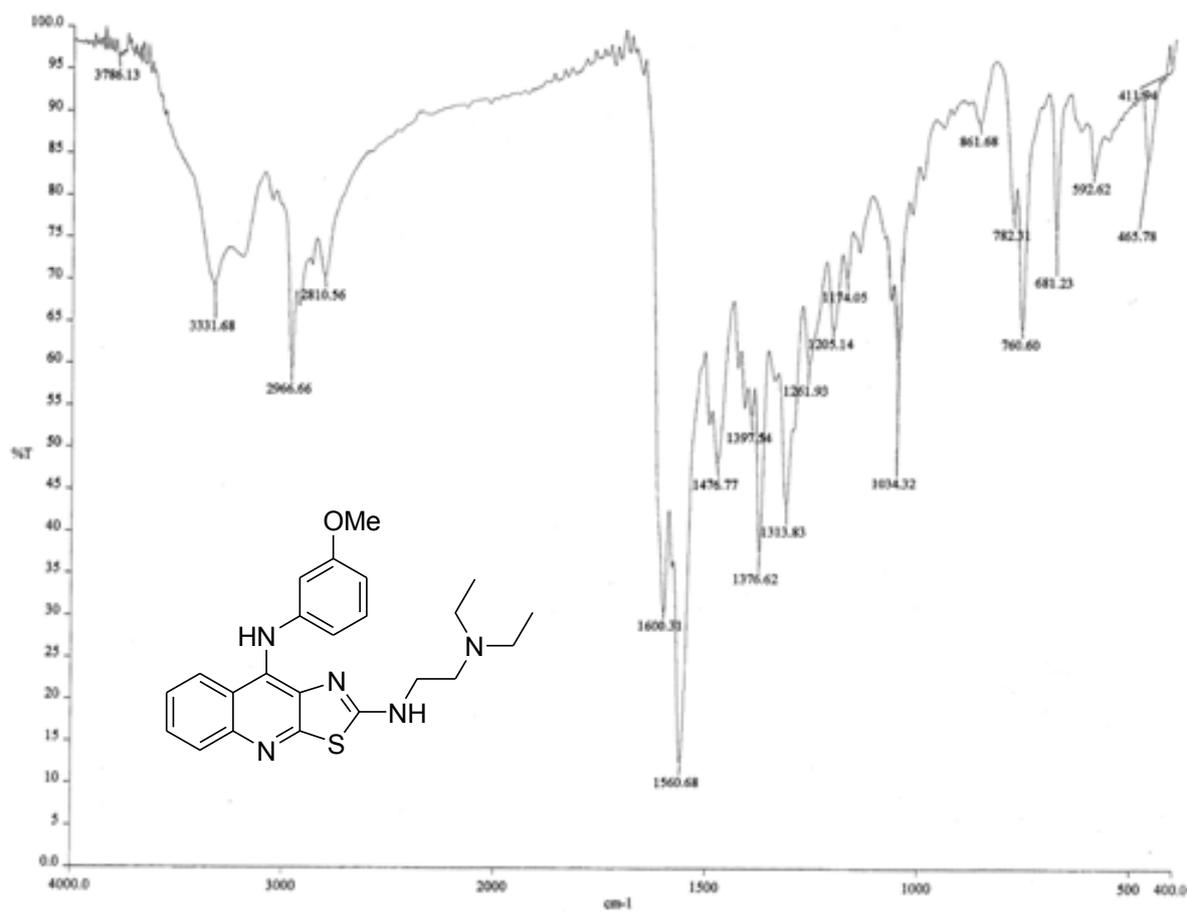
**Espectro 34.** Espectro RMN 1H del compuesto **1a**. Ampliación zona alifática



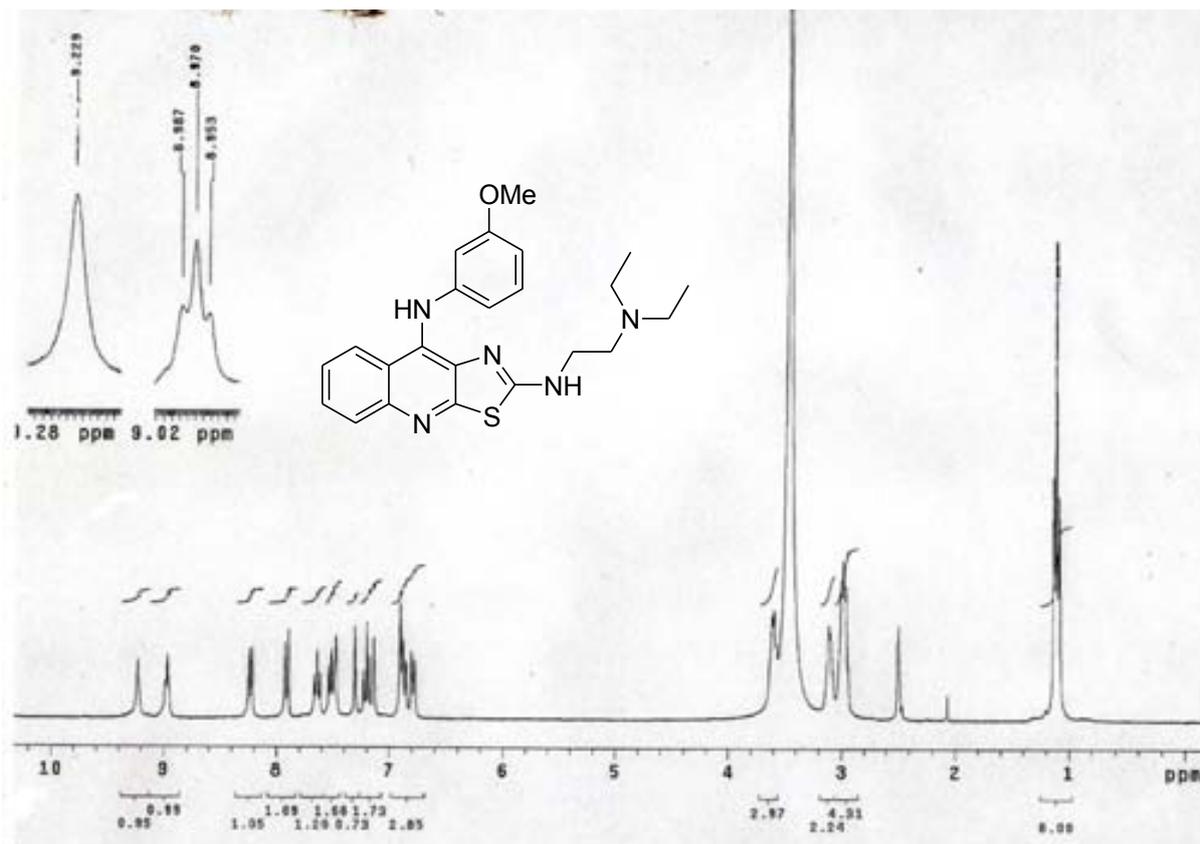
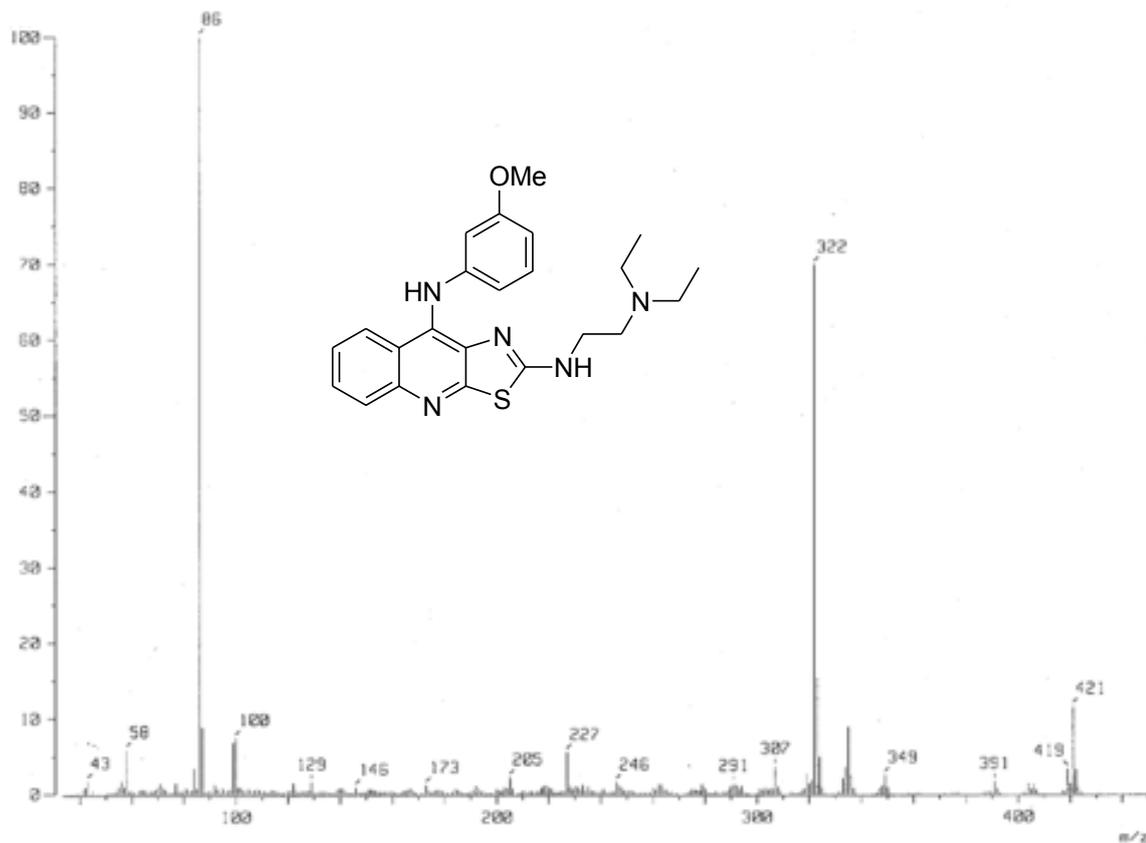
**Espectro 34.** Espectro RMN 1H del compuesto **1a**. Ampliación zona aromática



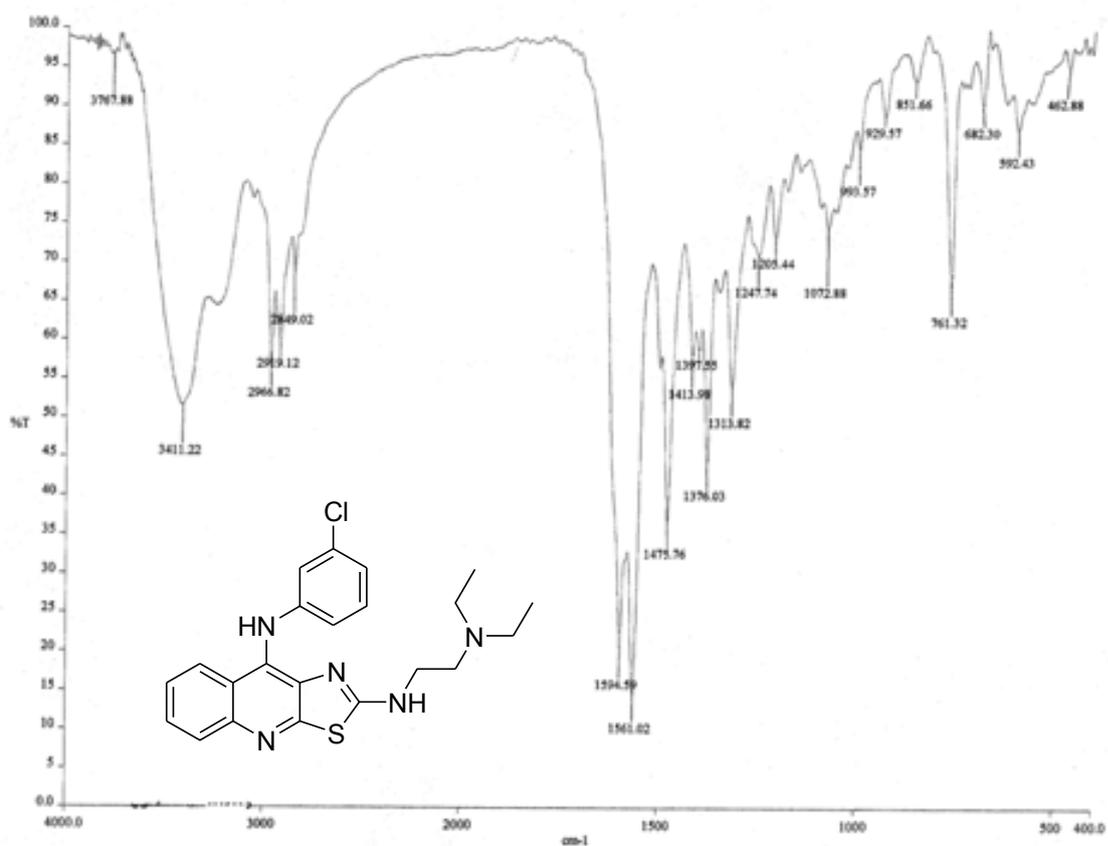
Espectro 35. Espectrometría de masas del compuesto 1a



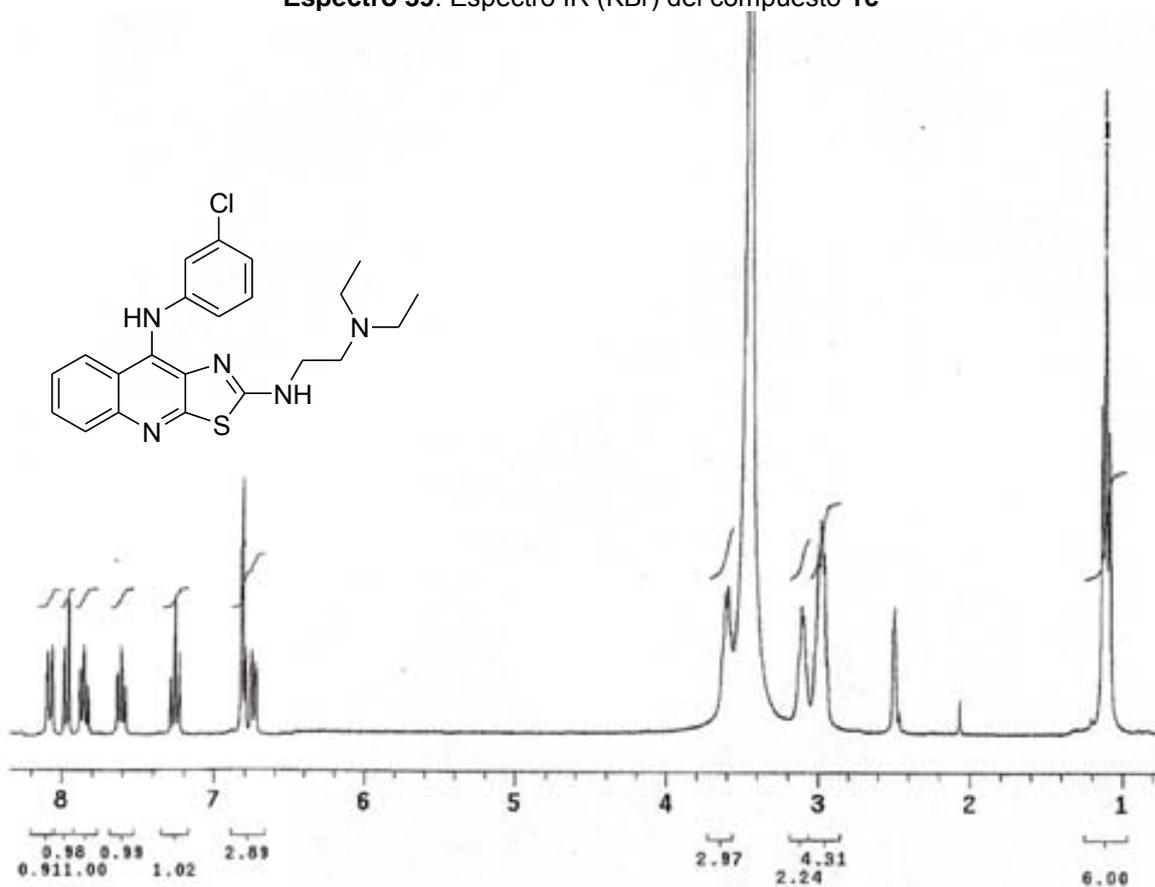
Espectro 36. Espectro IR (KBr) del compuesto 1b

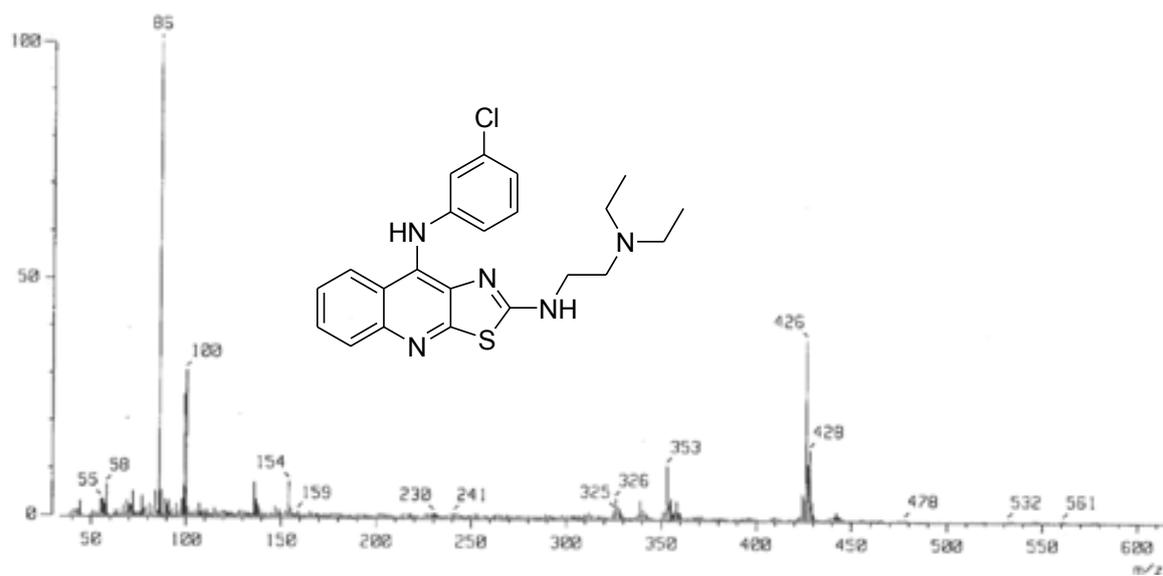
Espectro 37. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 1b

Espectro 38. Espectrometría de masas del compuesto 1b

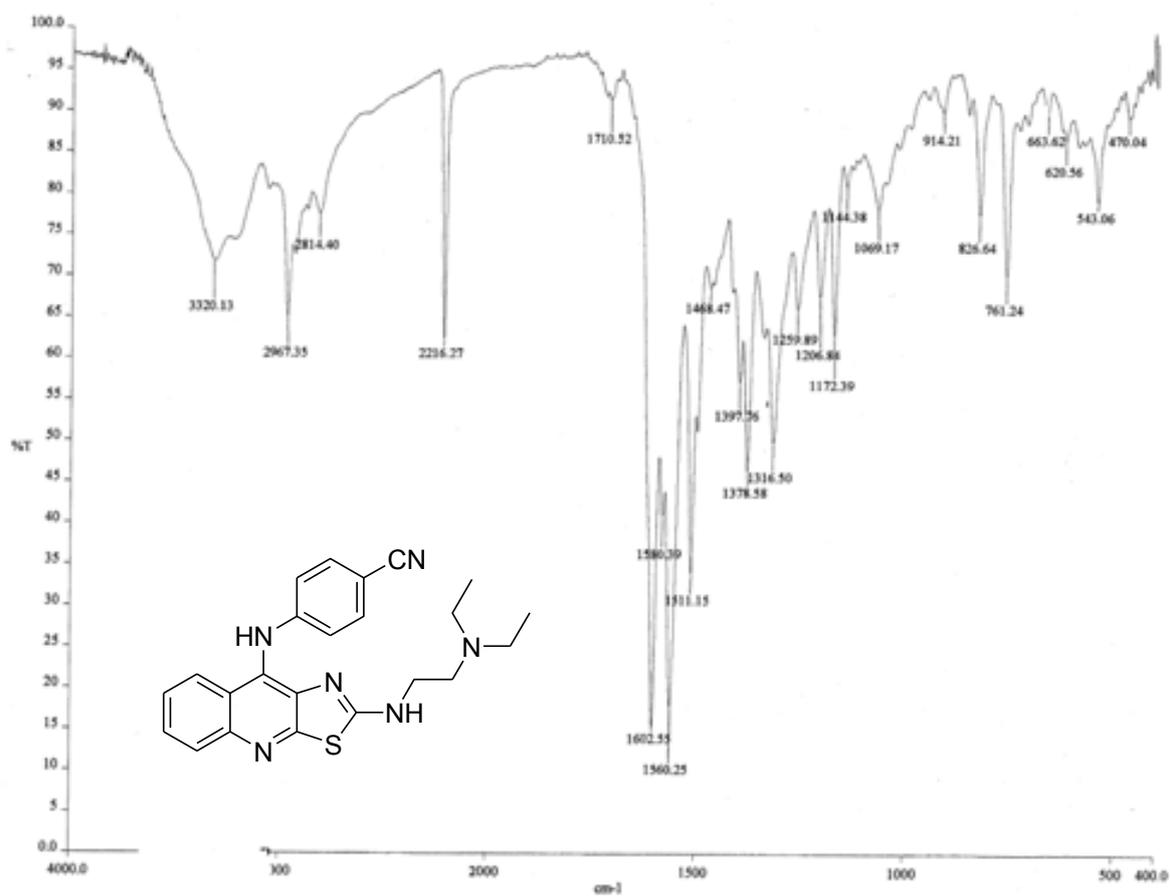


Espectro 39. Espectro IR (KBr) del compuesto 1c

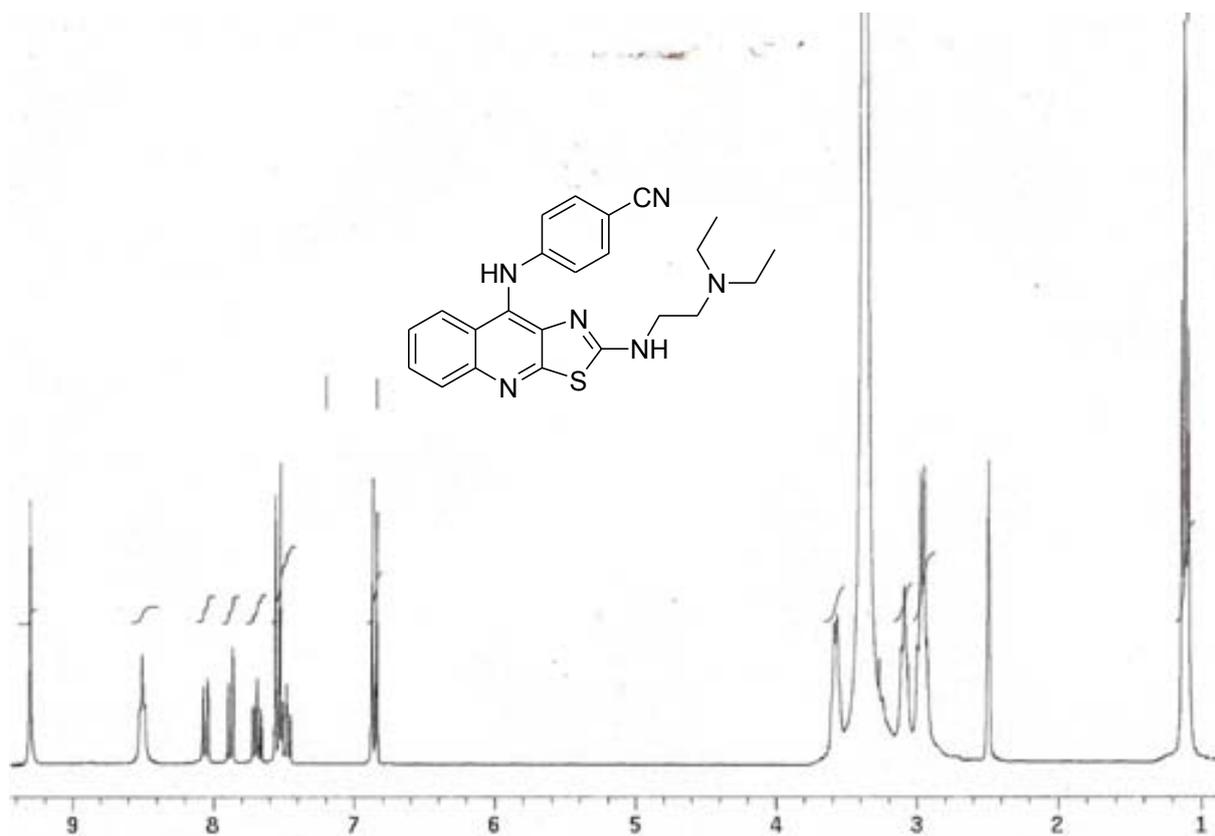
Espectro 40. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto 1c



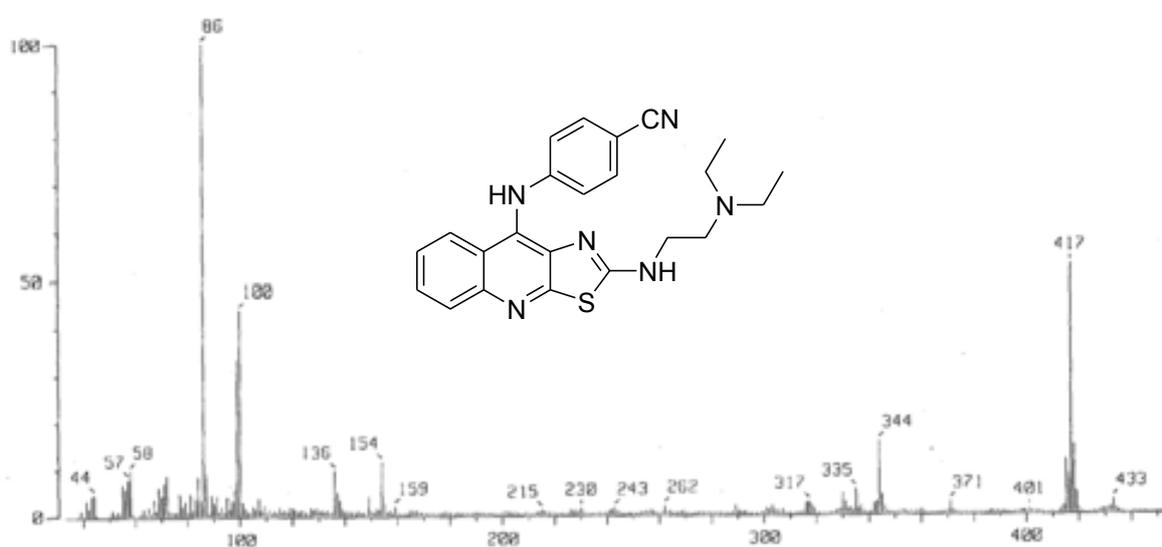
Espectro 41. Espectrometría de masas del compuesto 1c



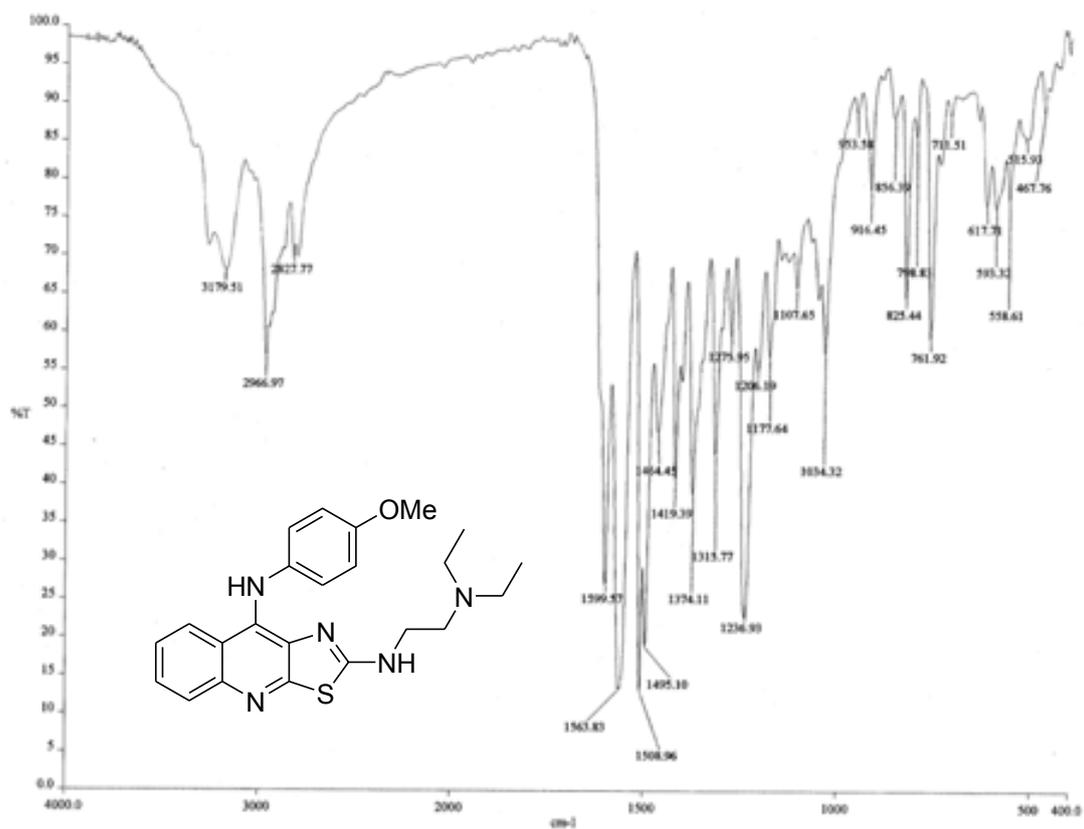
Espectro 42. Espectro IR (KBr) del compuesto 1d



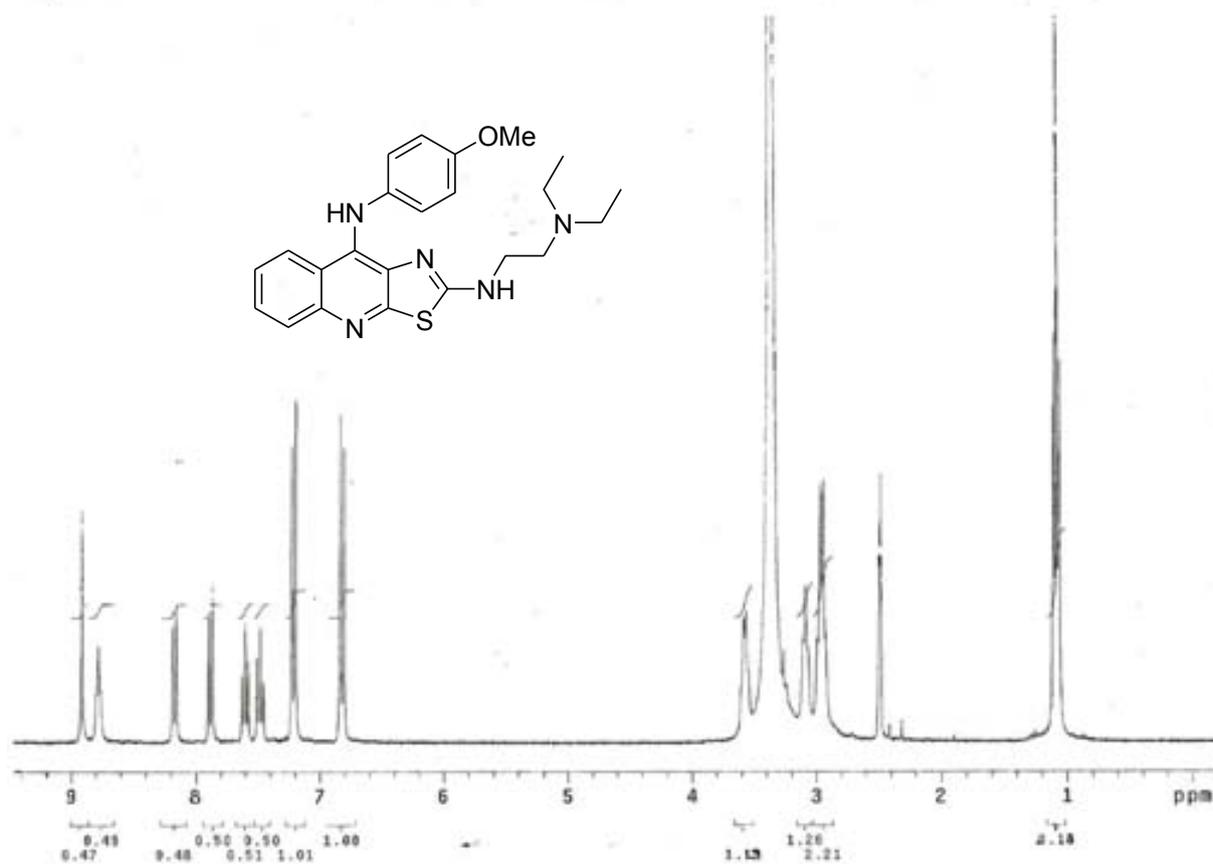
**Espectro 43.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 1d

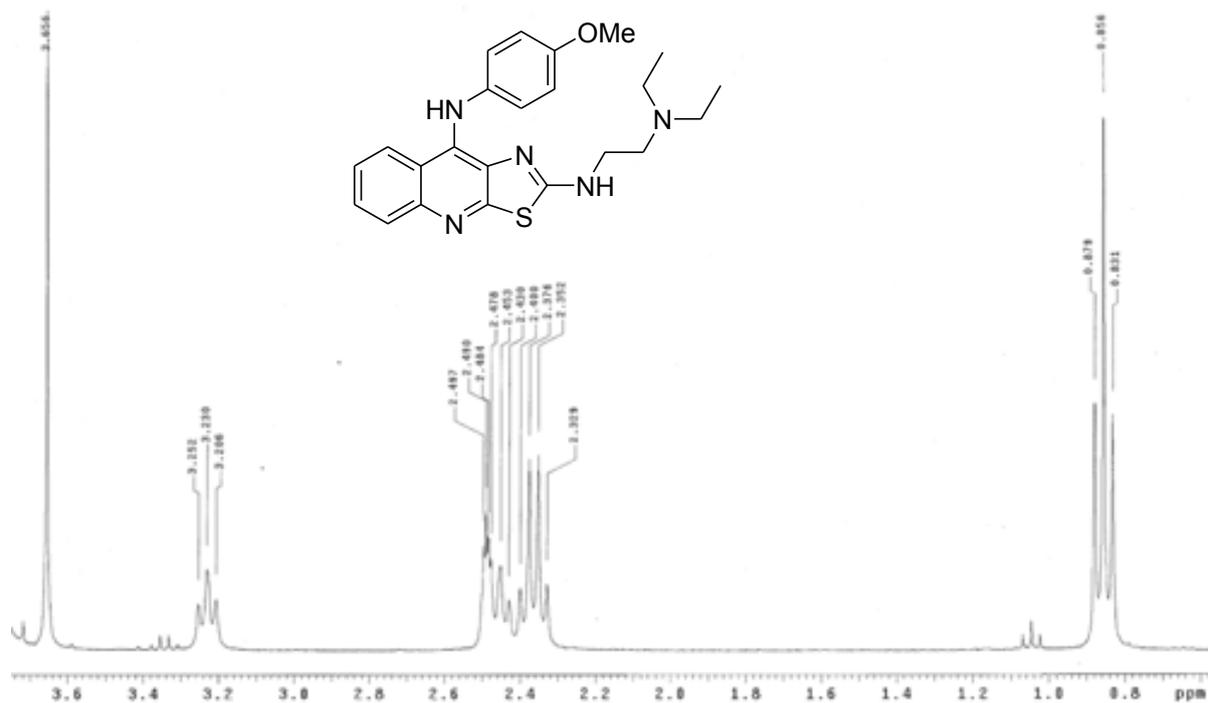
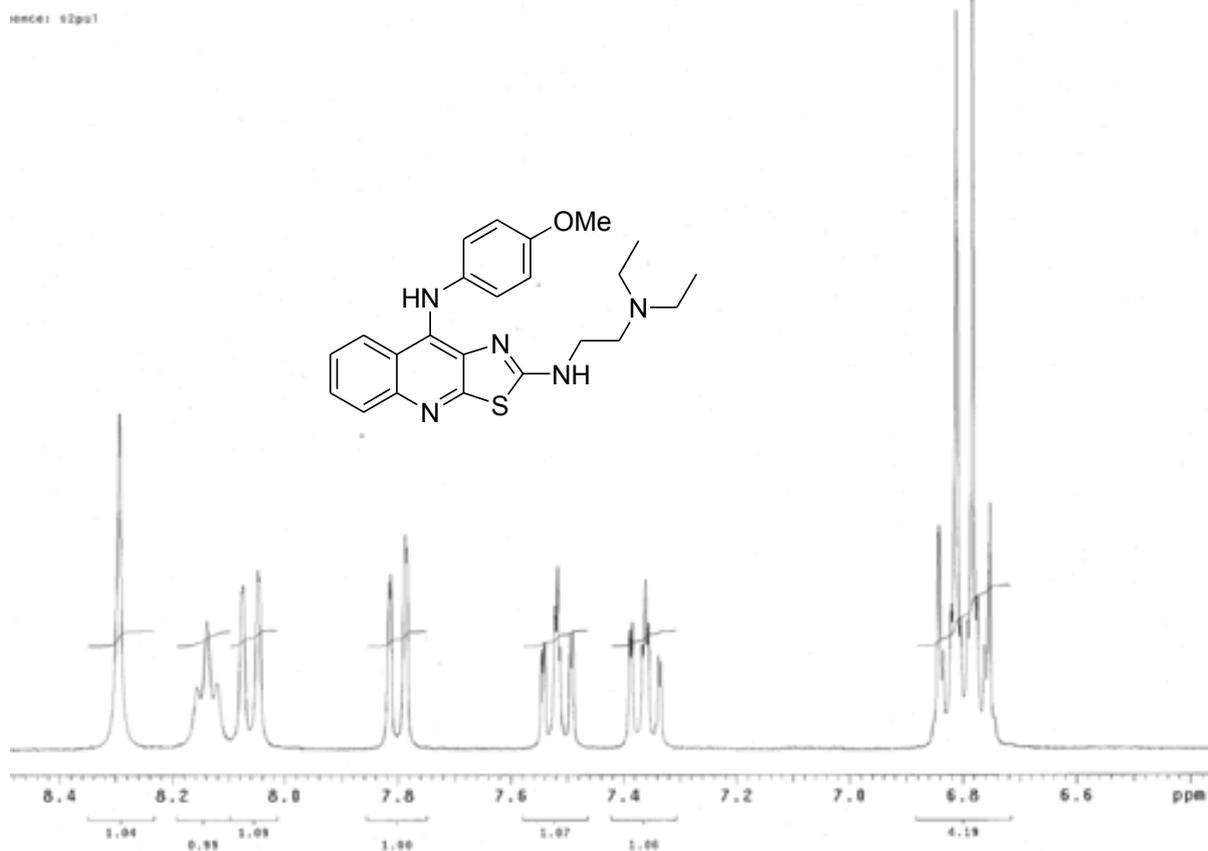


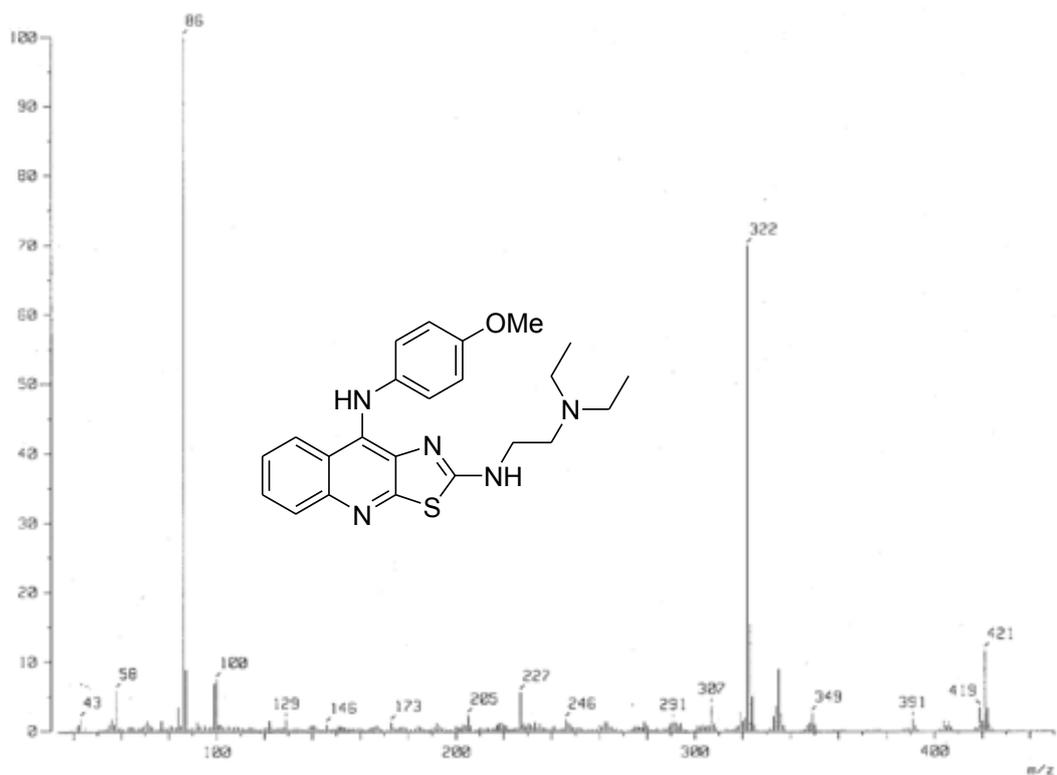
**Espectro 44.** Espectrometría de masas del compuesto 1d



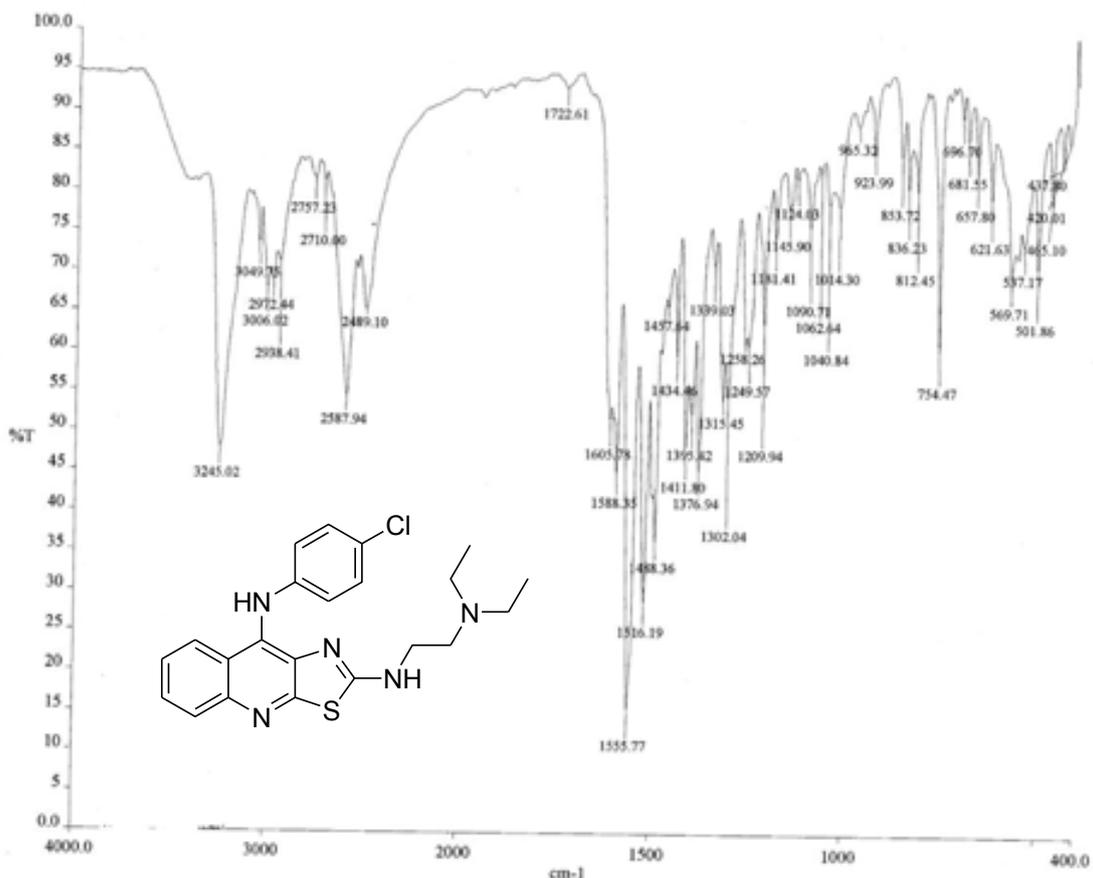
Espectro 45. Espectro IR (KBr) del compuesto 1e

Espectro 46. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto 1e

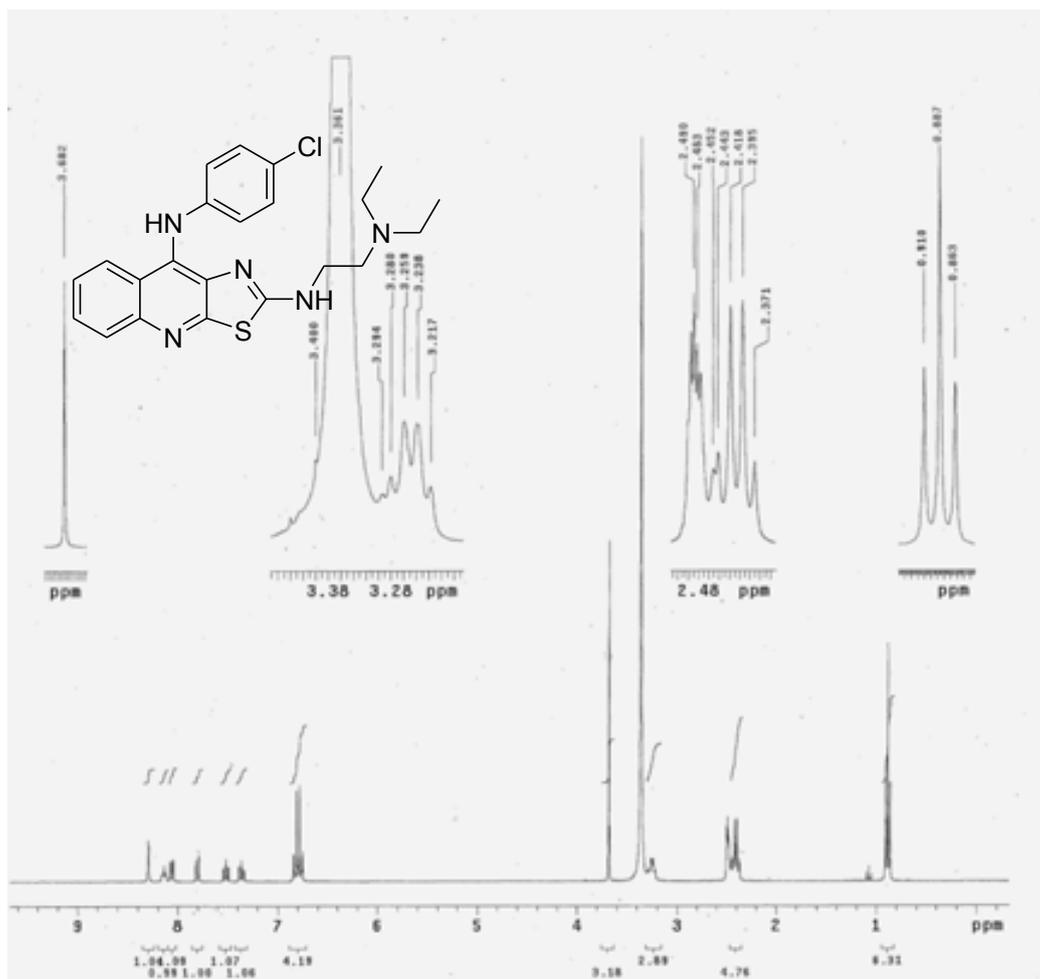
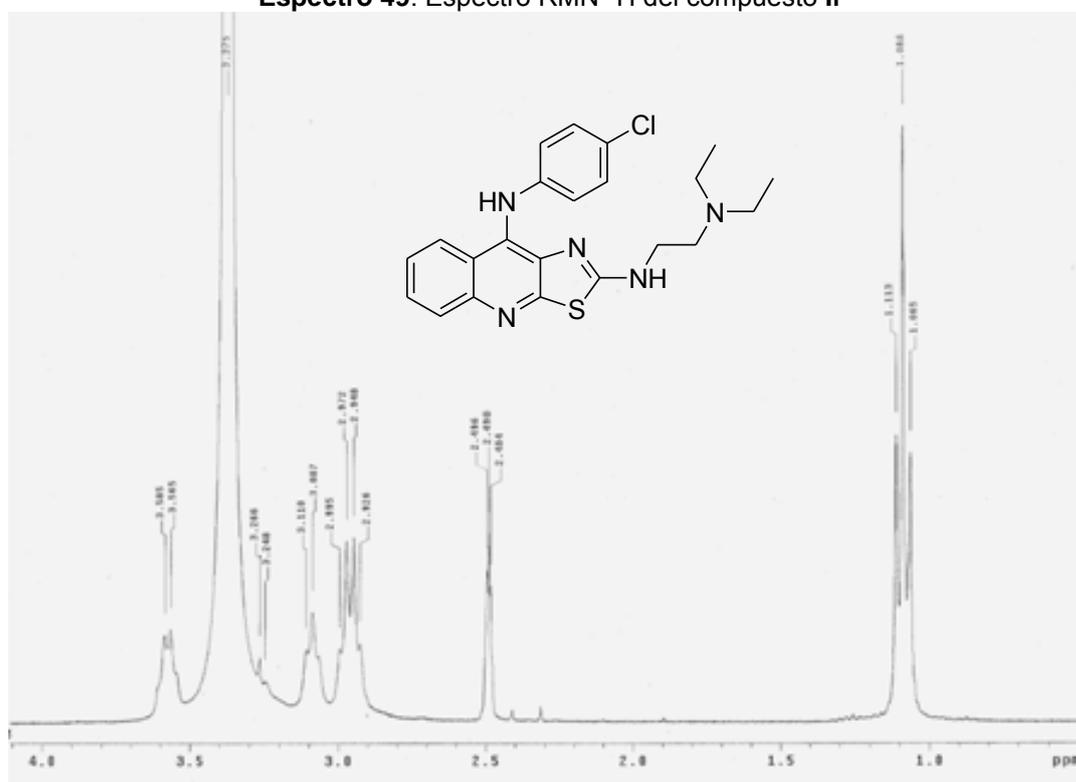
Espectro 46. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 1e. Zona alifáticaEspectro 46. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 1e. Zona aromática

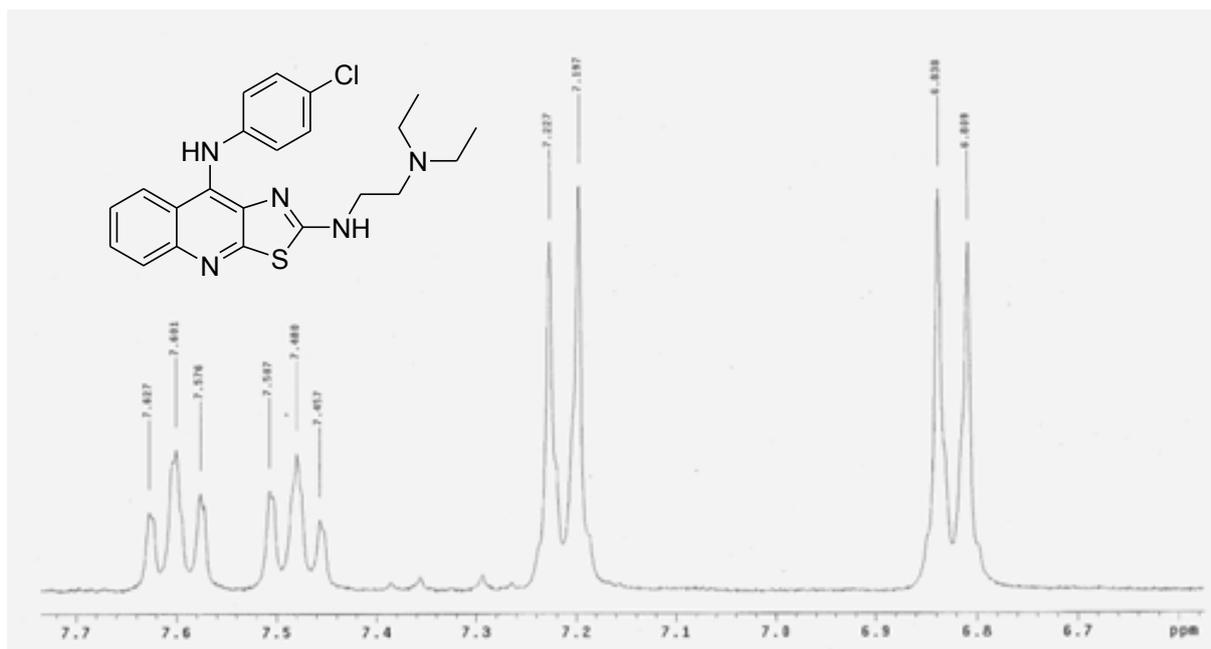


Espectro 47. Espectrometría de masas del compuesto 1e

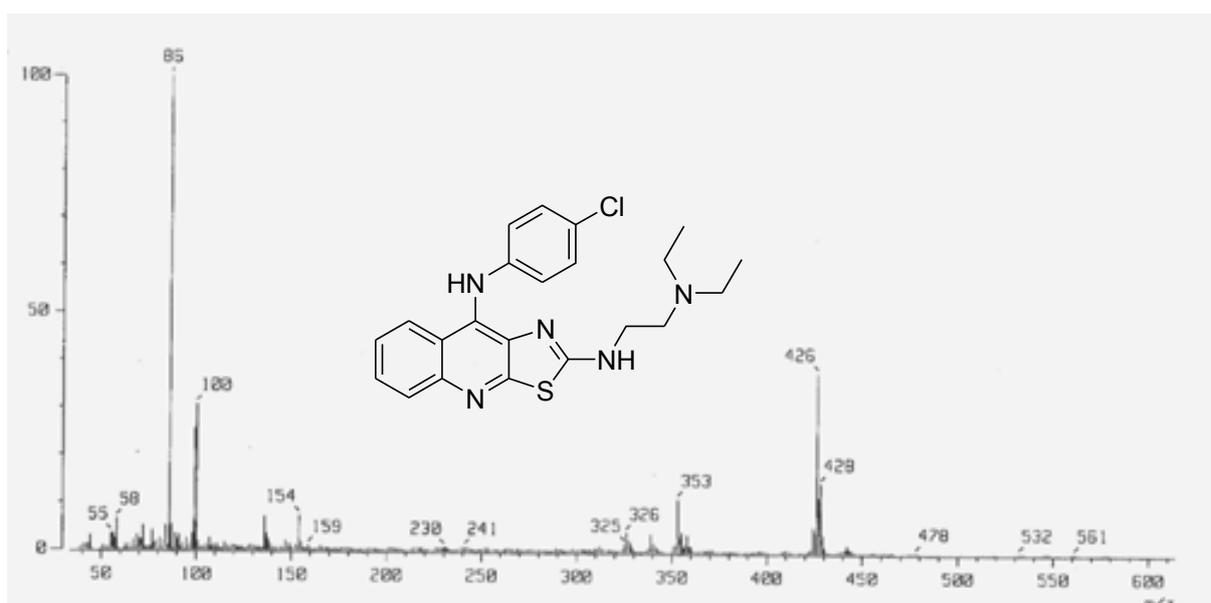


Espectro 48. Espectro IR (KBr) del compuesto 1f

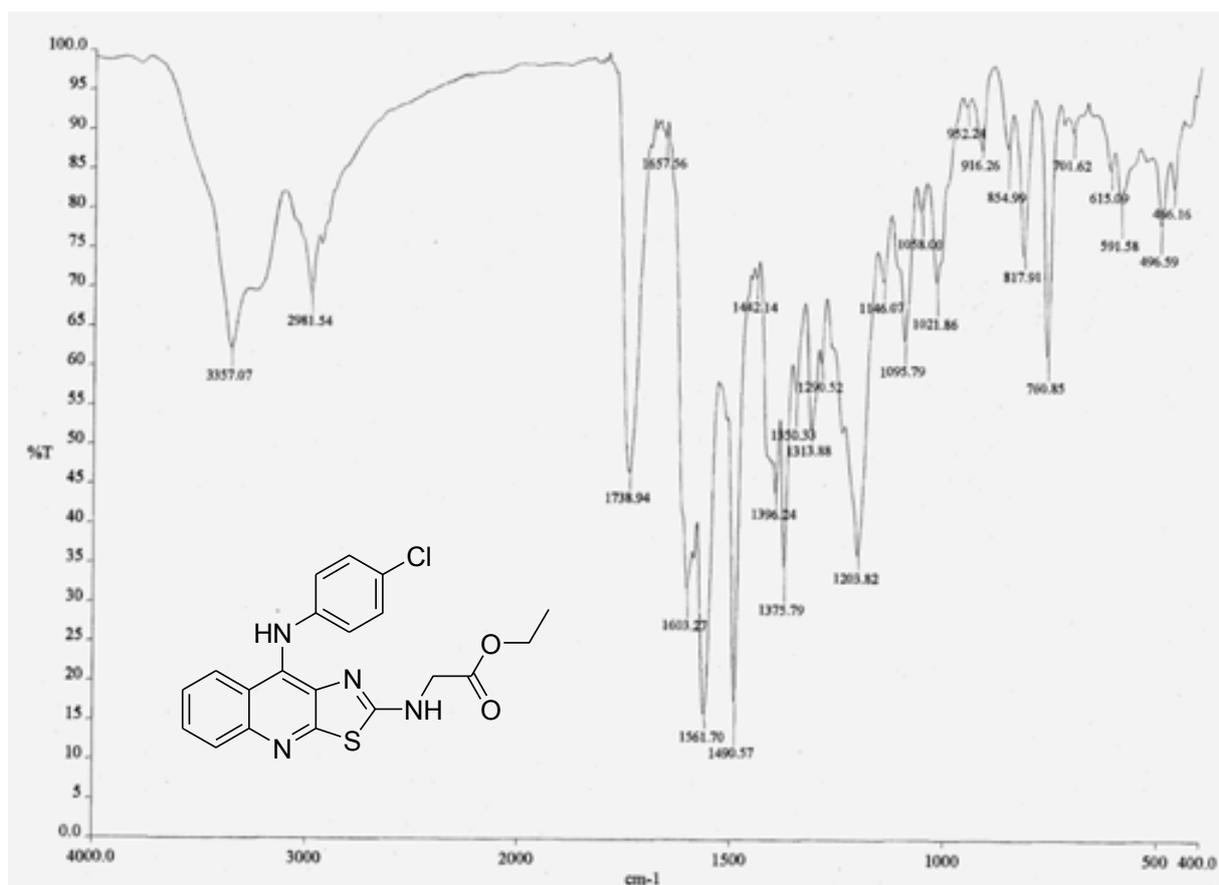
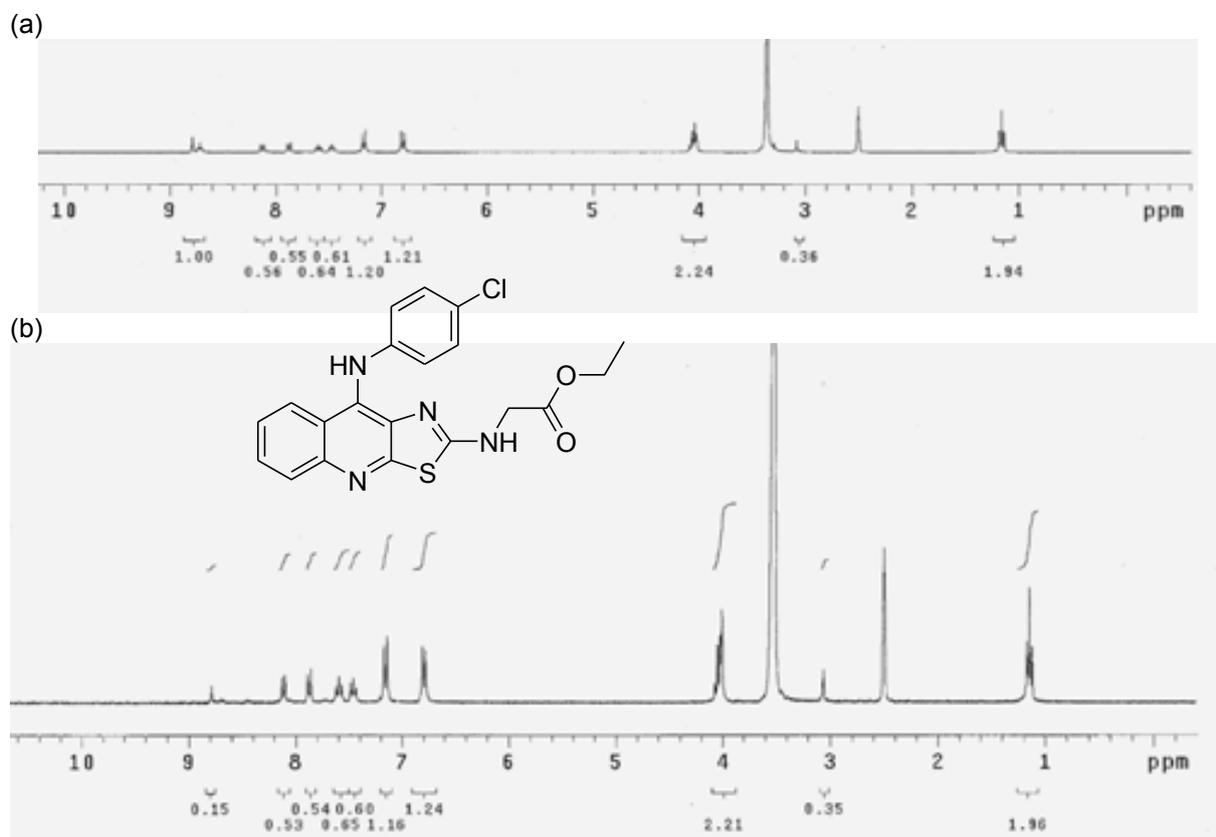
Espectro 49. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto IfEspectro 49. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto If. Ampliación zona alifática

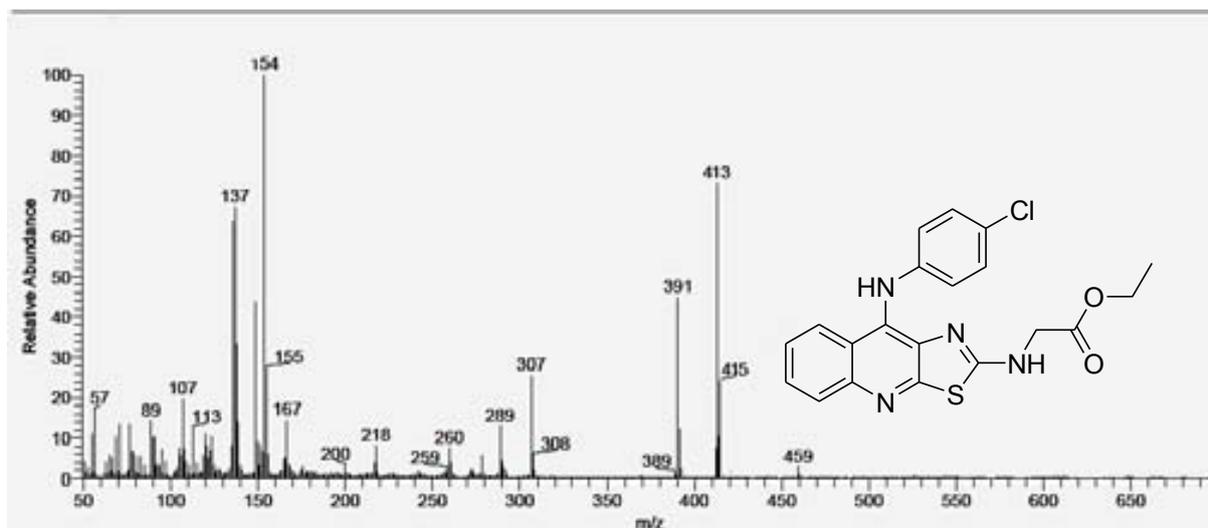


**Espectro 49.** Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto If. Ampliación zona aromática

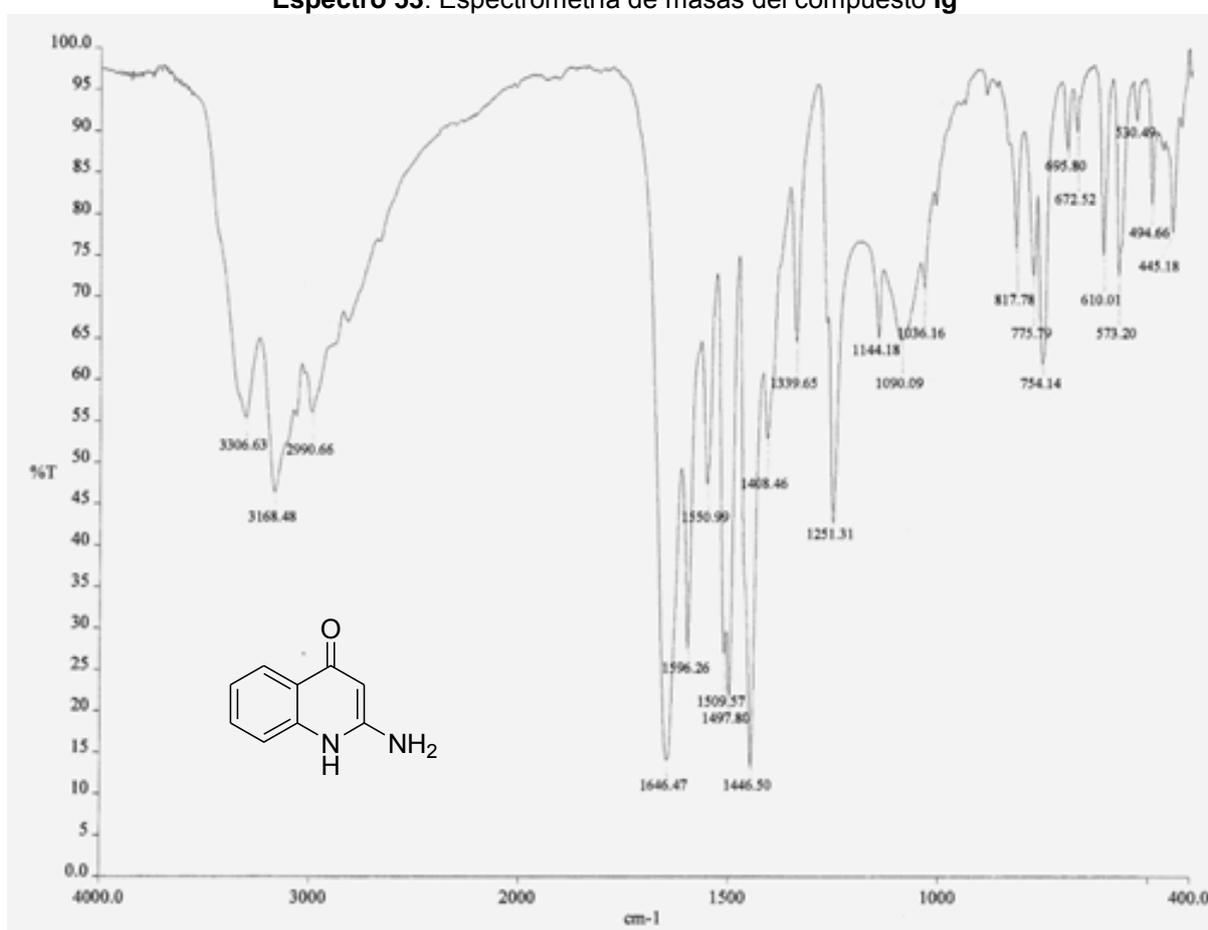


**Espectro 50.** Espectrometría de masas del compuesto If

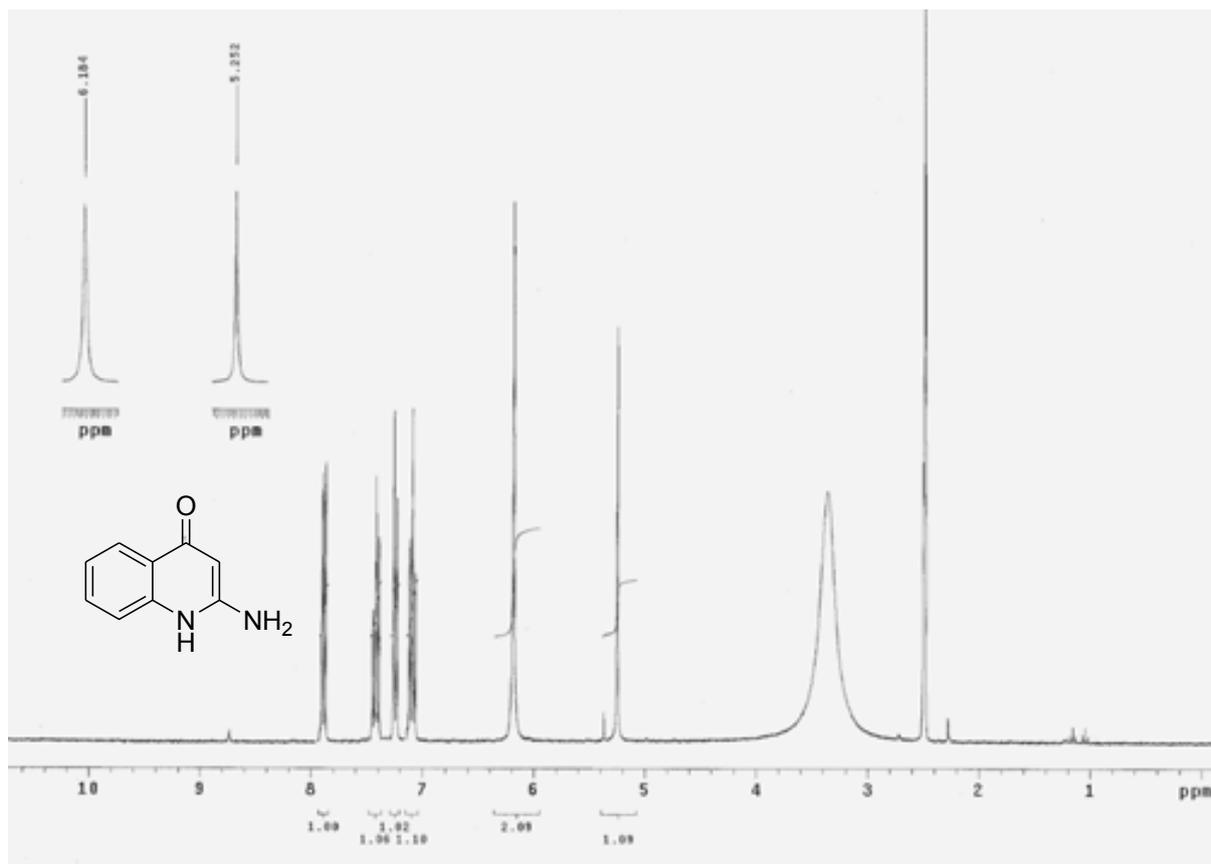
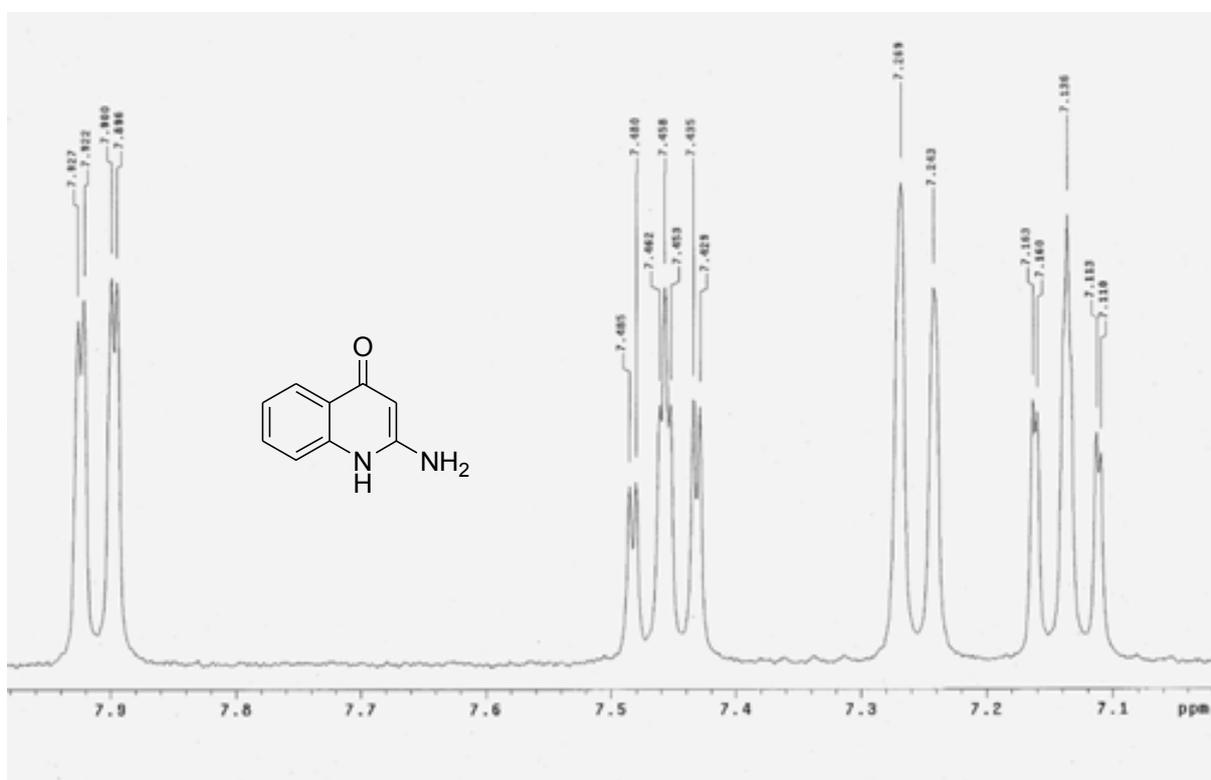
Espectro 51. Espectro IR (KBr) del compuesto **Ig**Espectro 52. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto **Ig** (a) DMSO-d<sub>6</sub> (b) Experimento con D<sub>2</sub>O

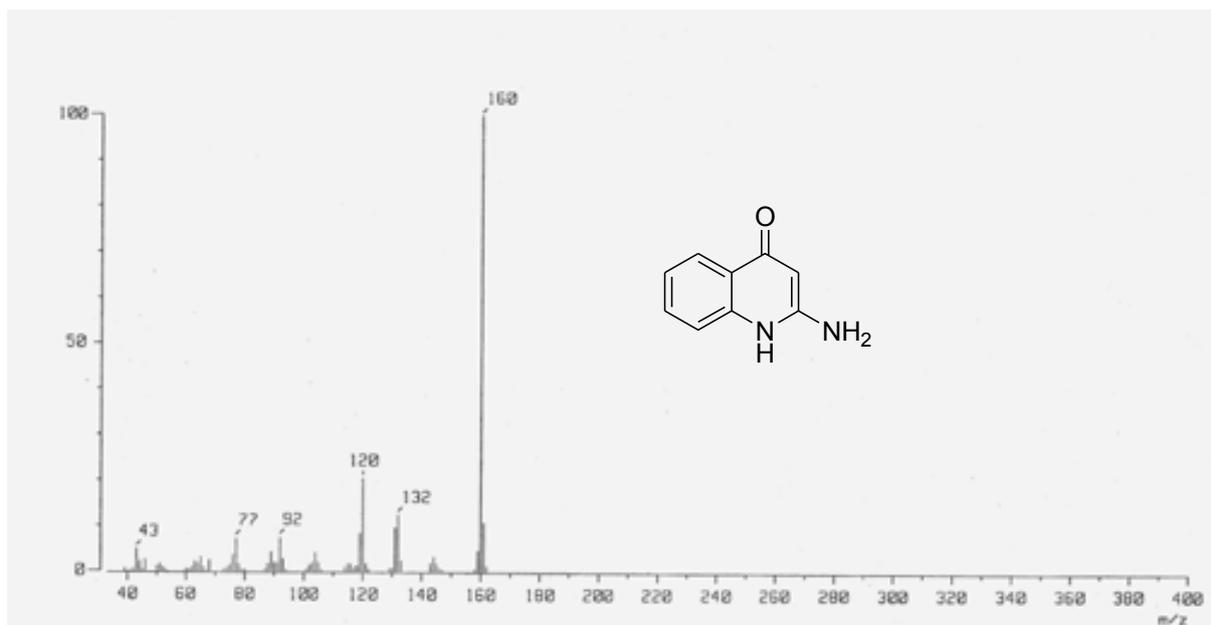


Espectro 53. Espectrometría de masas del compuesto 1g

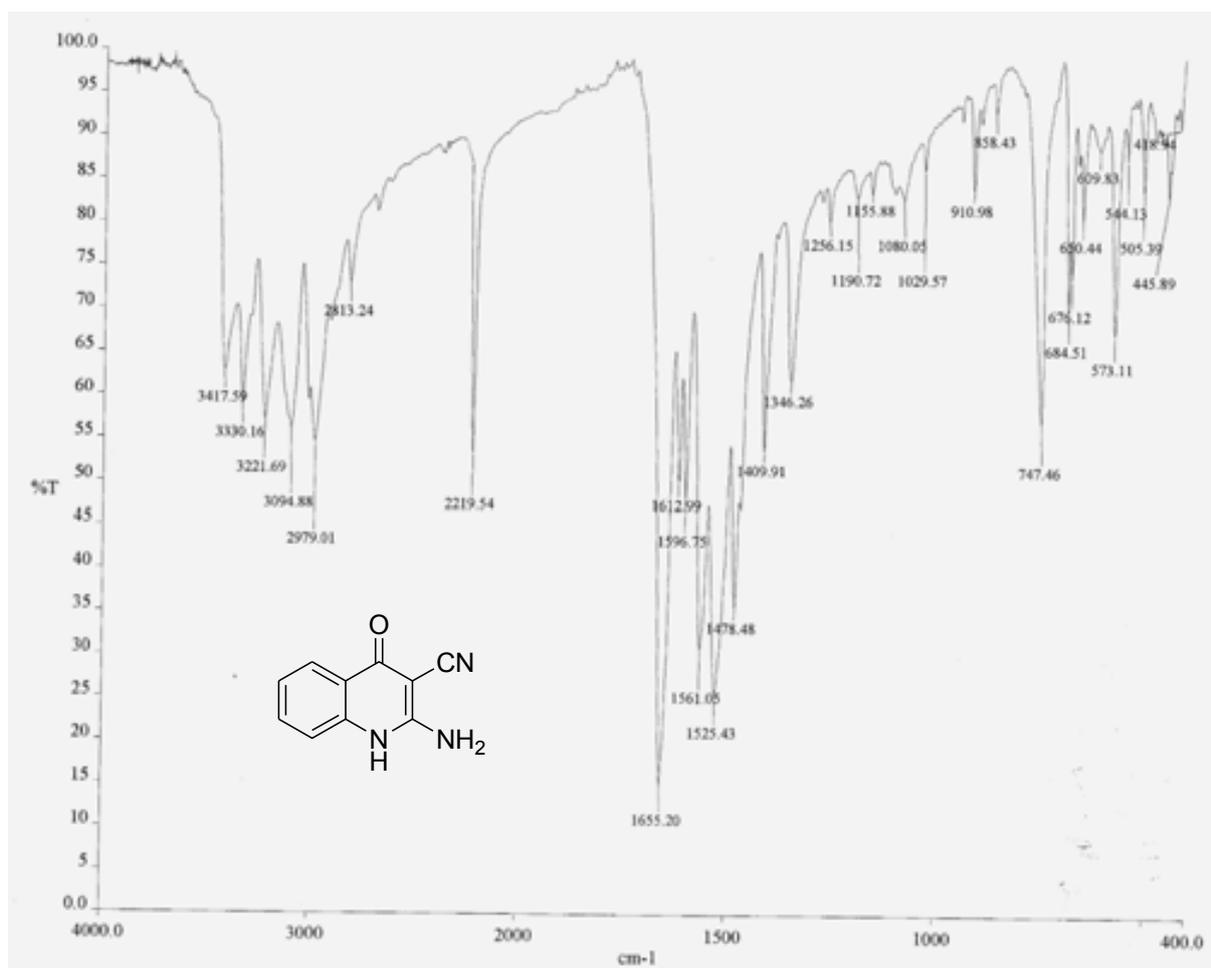


Espectro 54. Espectro IR (KBr) del compuesto 11a.

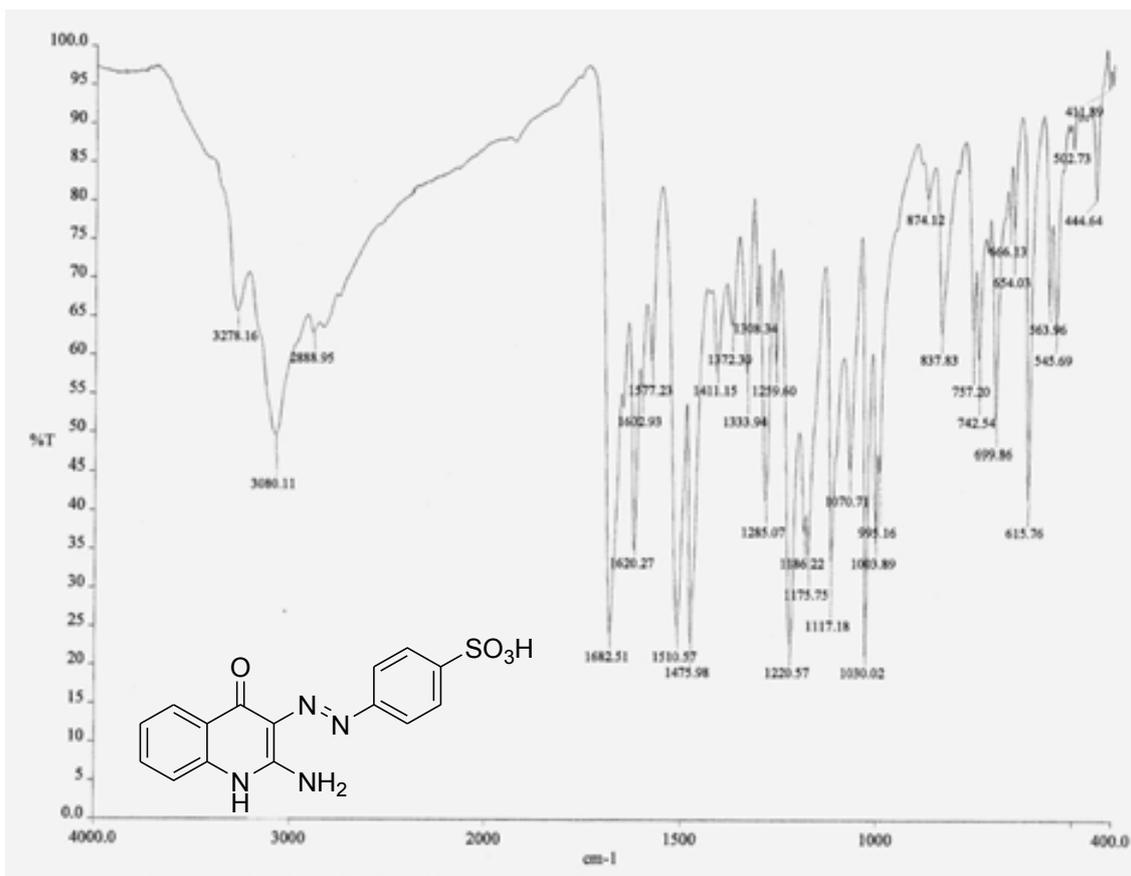
Espectro 55. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 11a.Espectro 55. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 11a. Ampliación zona aromática.



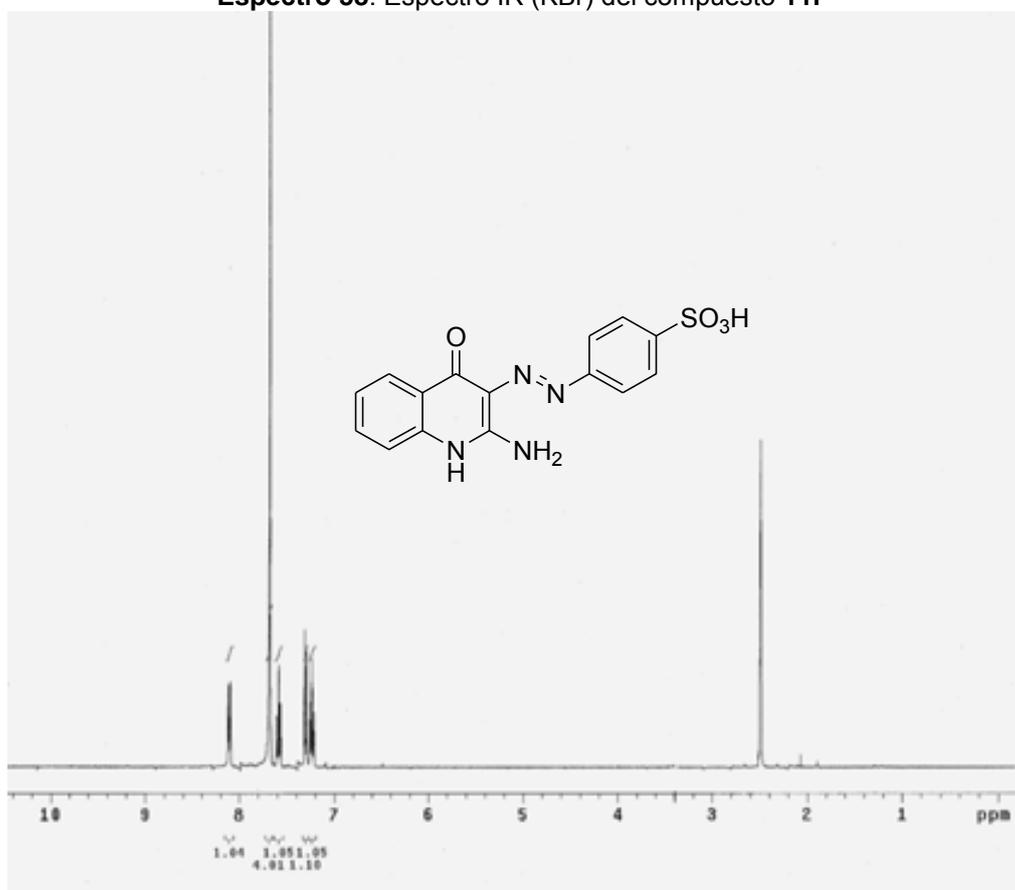
Espectro 56. Espectrometría de masas del compuesto 11a.

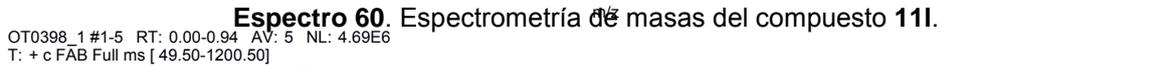
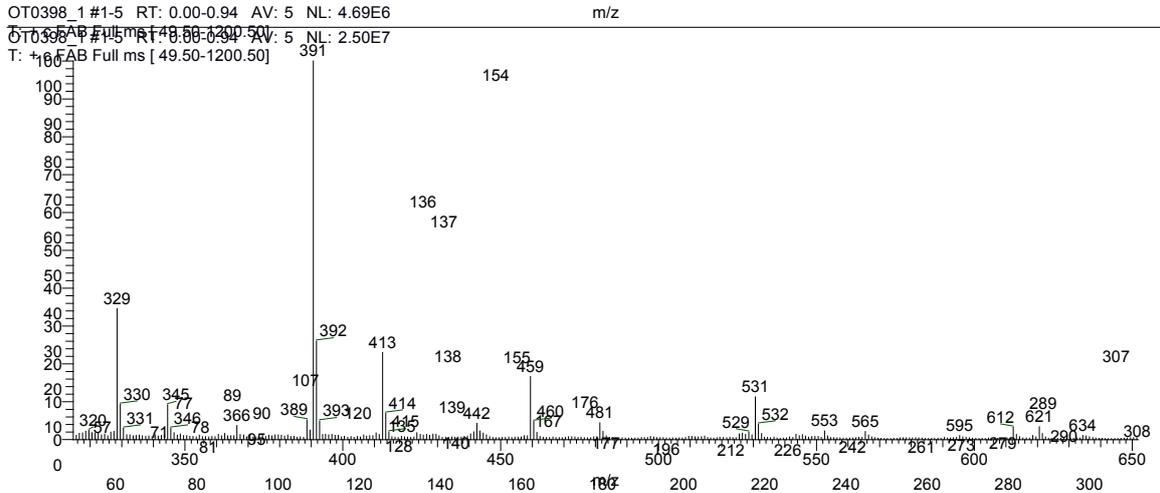
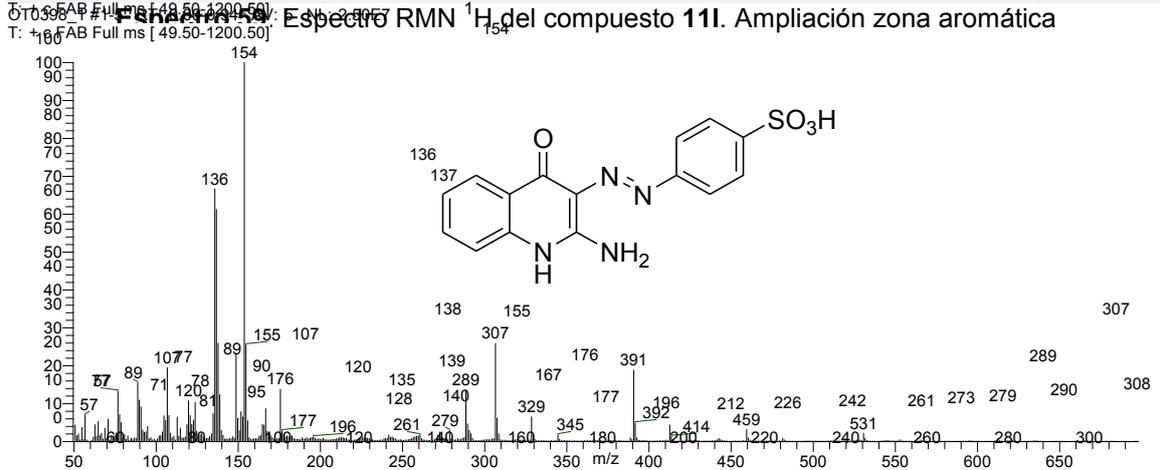
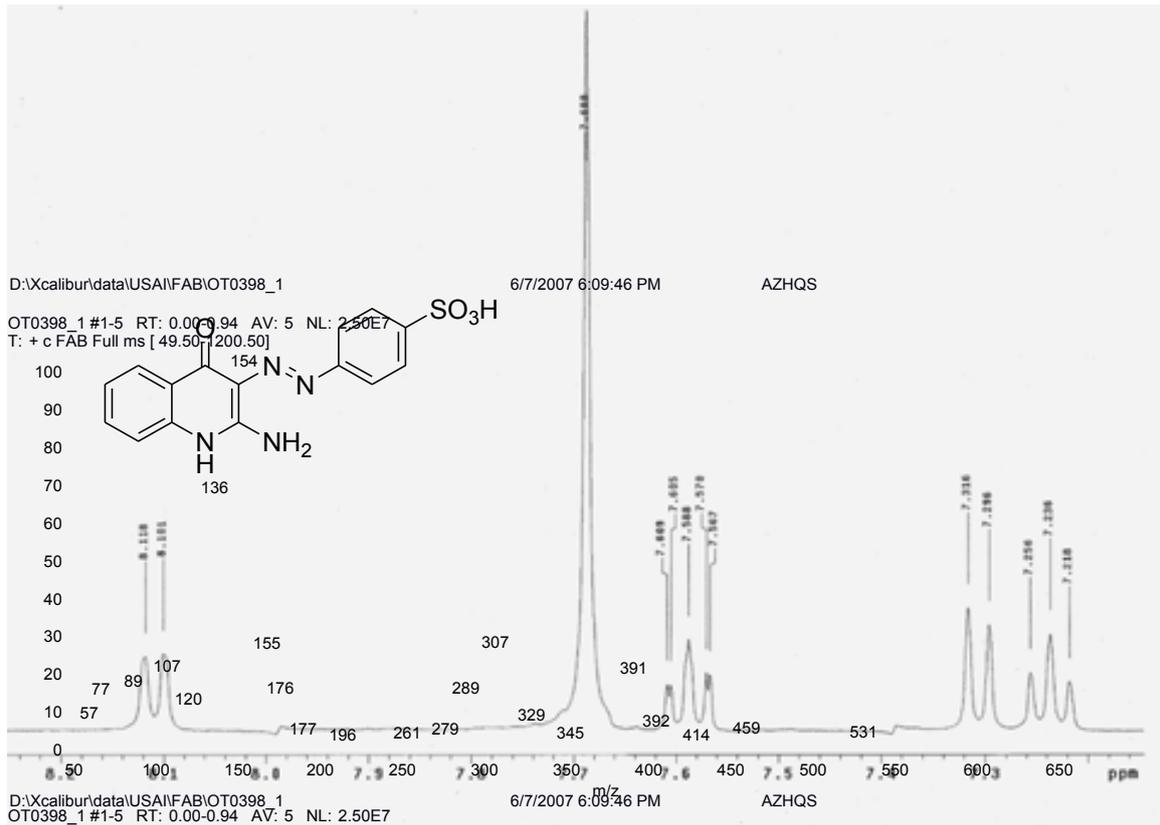


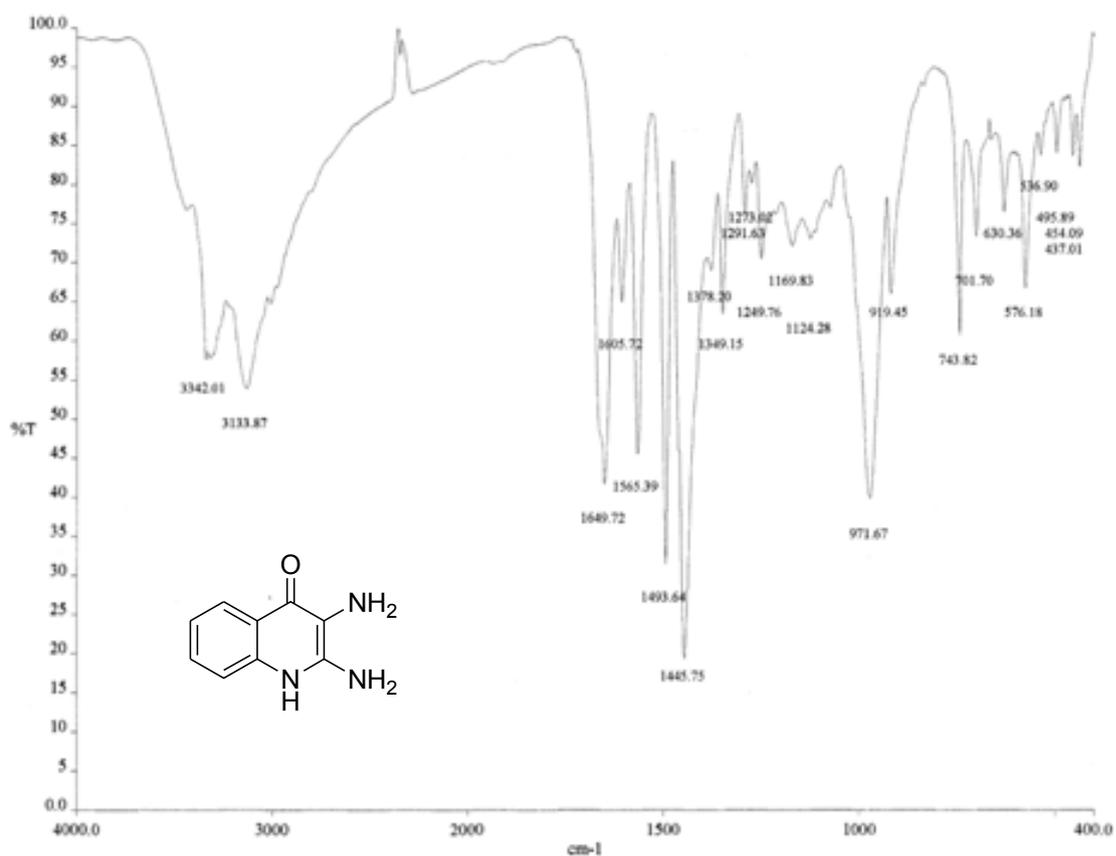
Espectro 57. Espectro IR (KBr) del compuesto 11f.



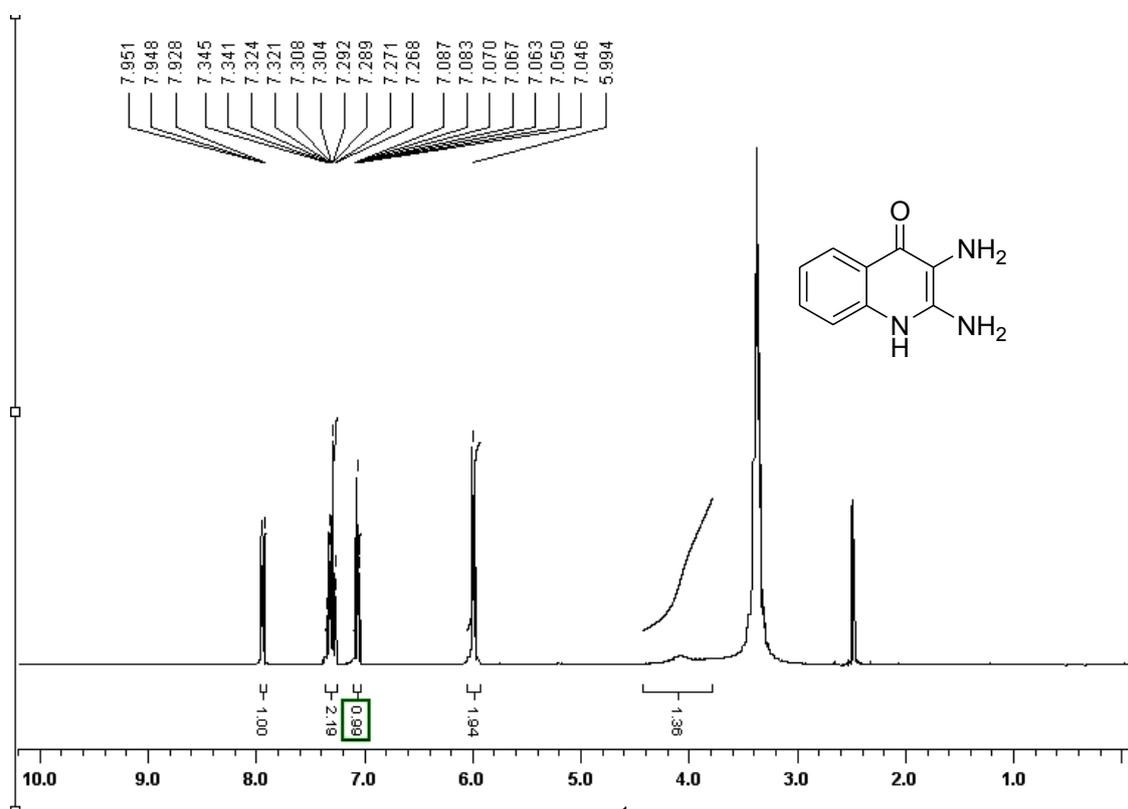
Espectro 58. Espectro IR (KBr) del compuesto 11I

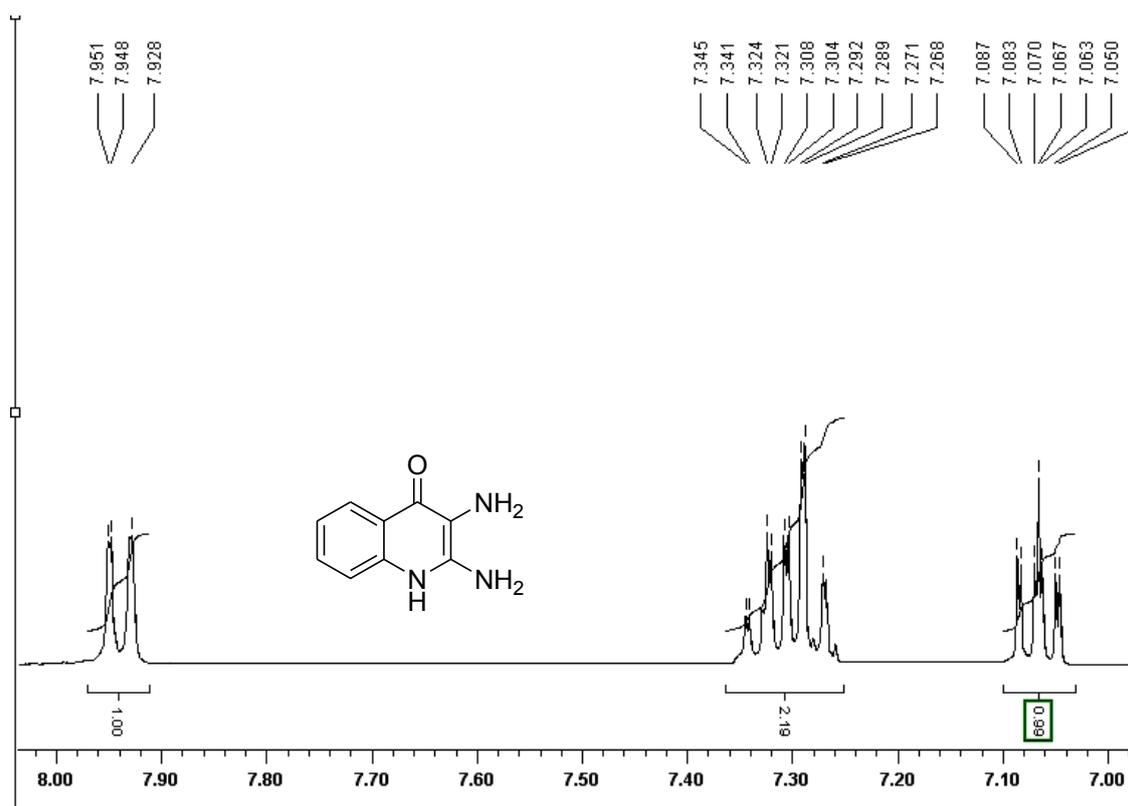
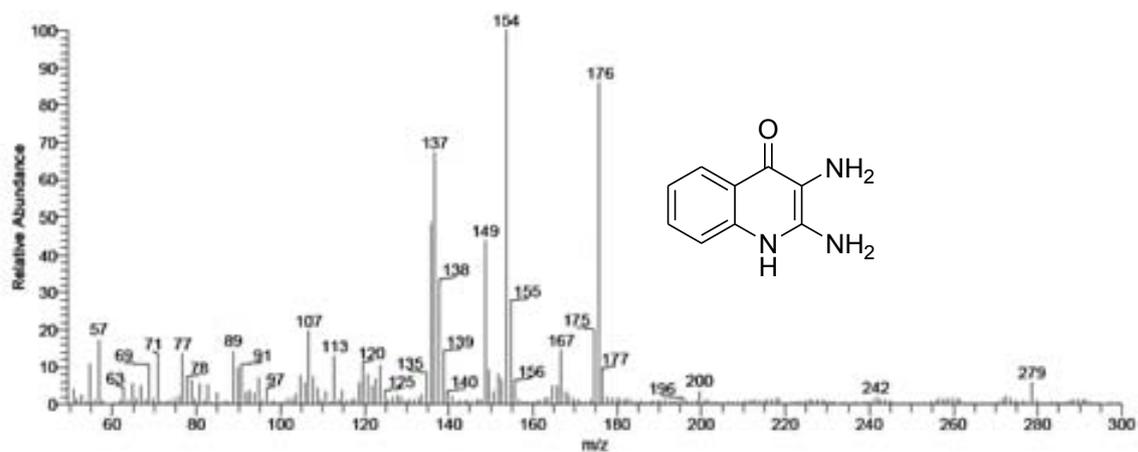
Espectro 59. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto 11I



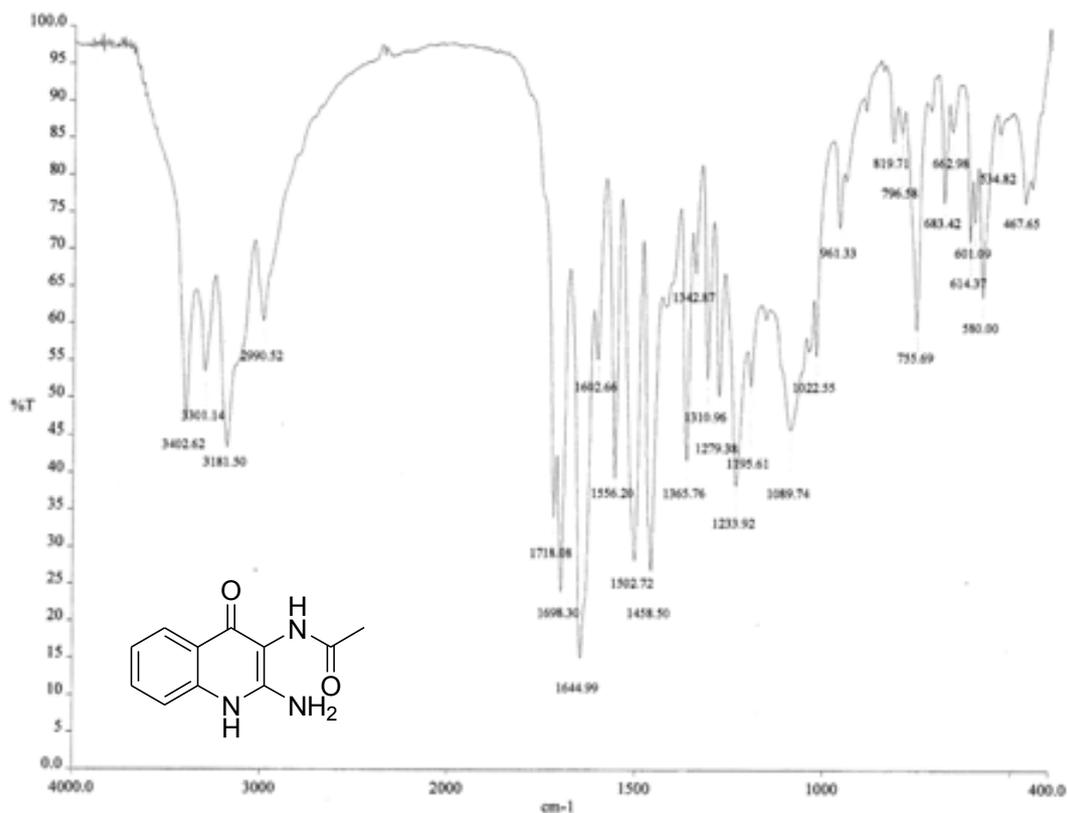


Espectro 61. Espectro IR (KBr) del compuesto 11c

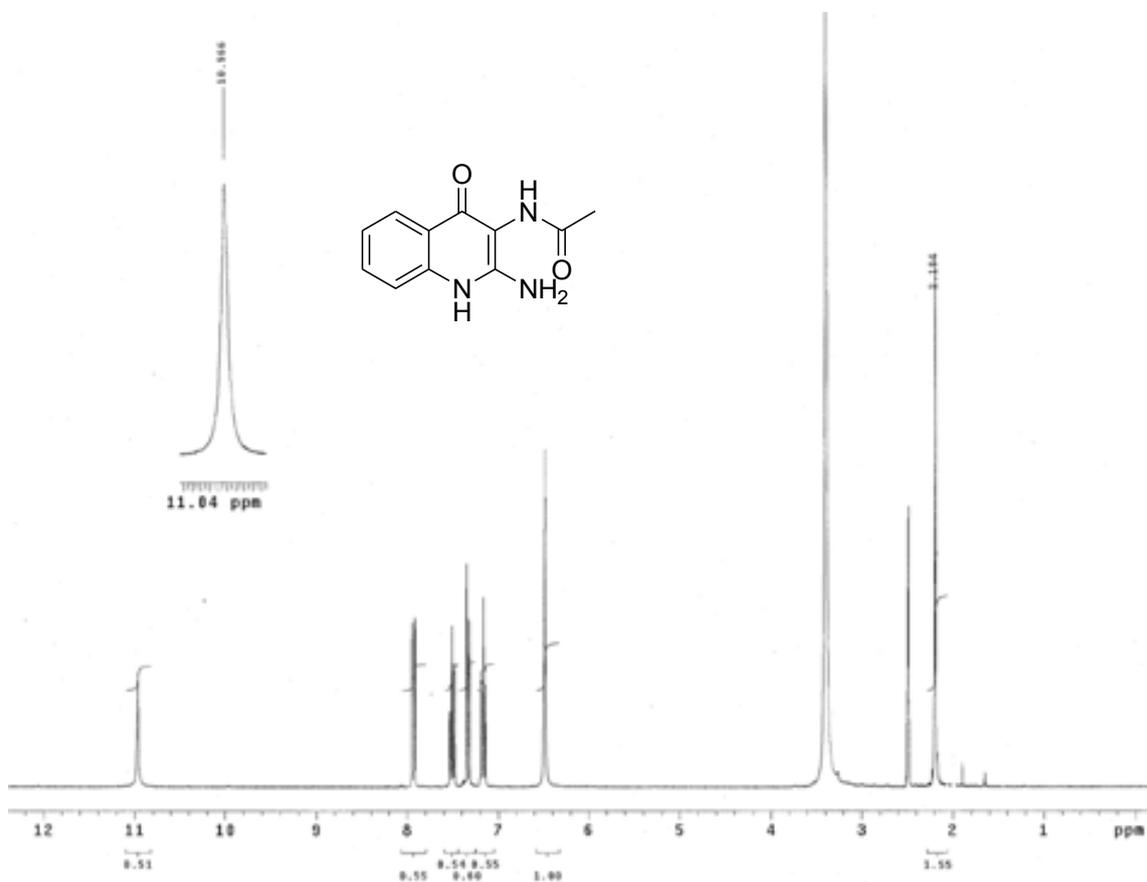
Espectro 62. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto 11c.

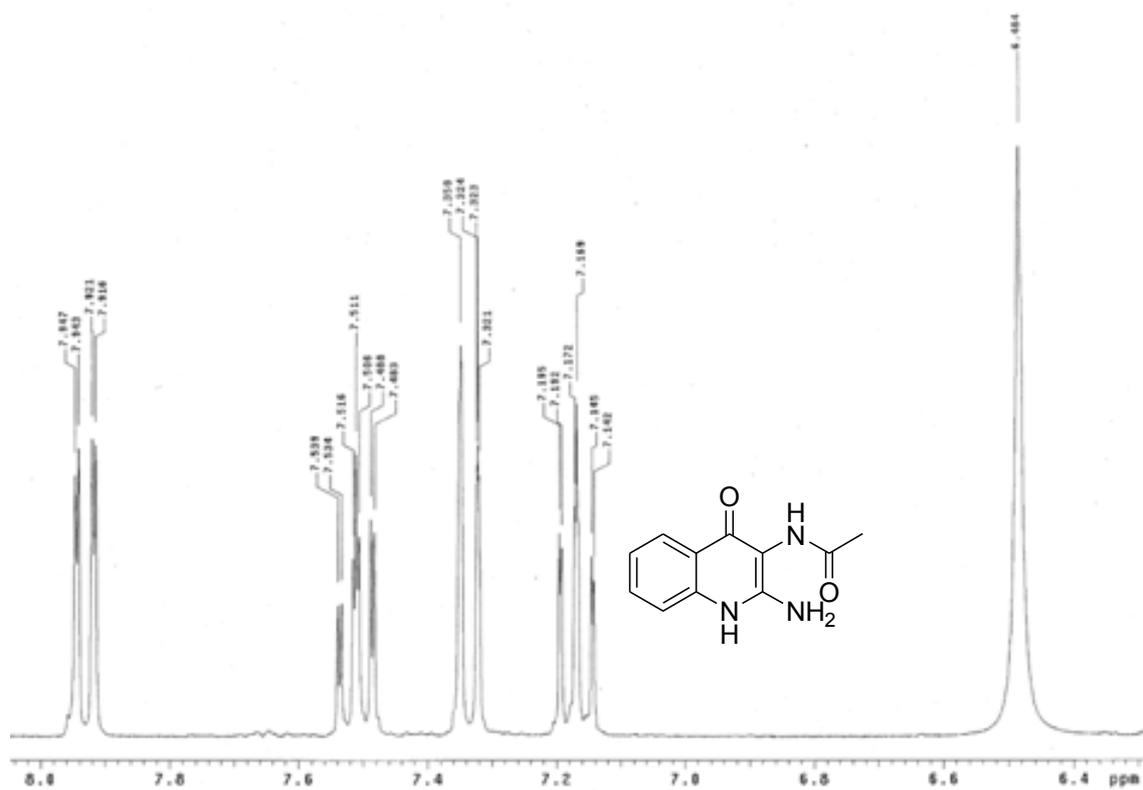
Espectro 62. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 11c. Ampliación zona aromática

Espectro 63. Espectrometría de masas del compuesto 11c.

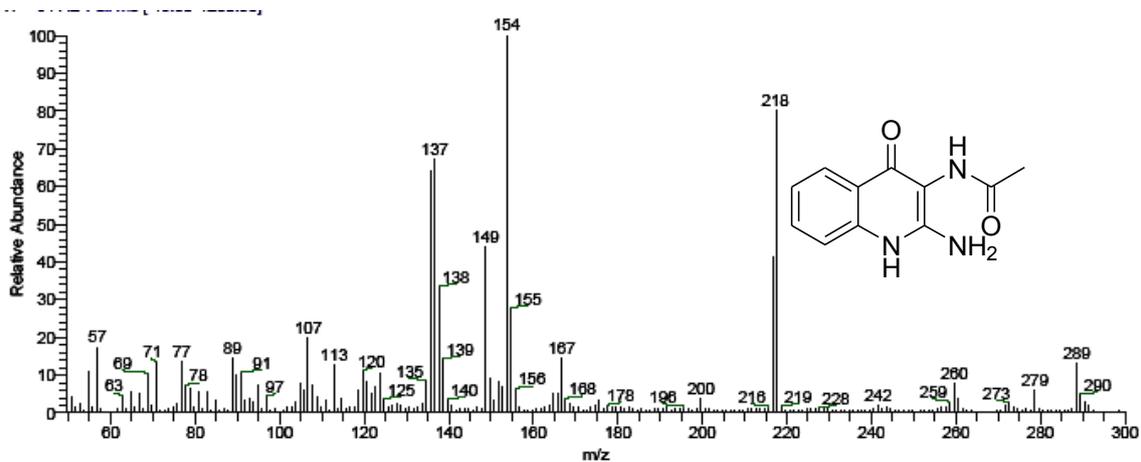


Espectro 64. Espectro IR (KBr) del compuesto 11m.

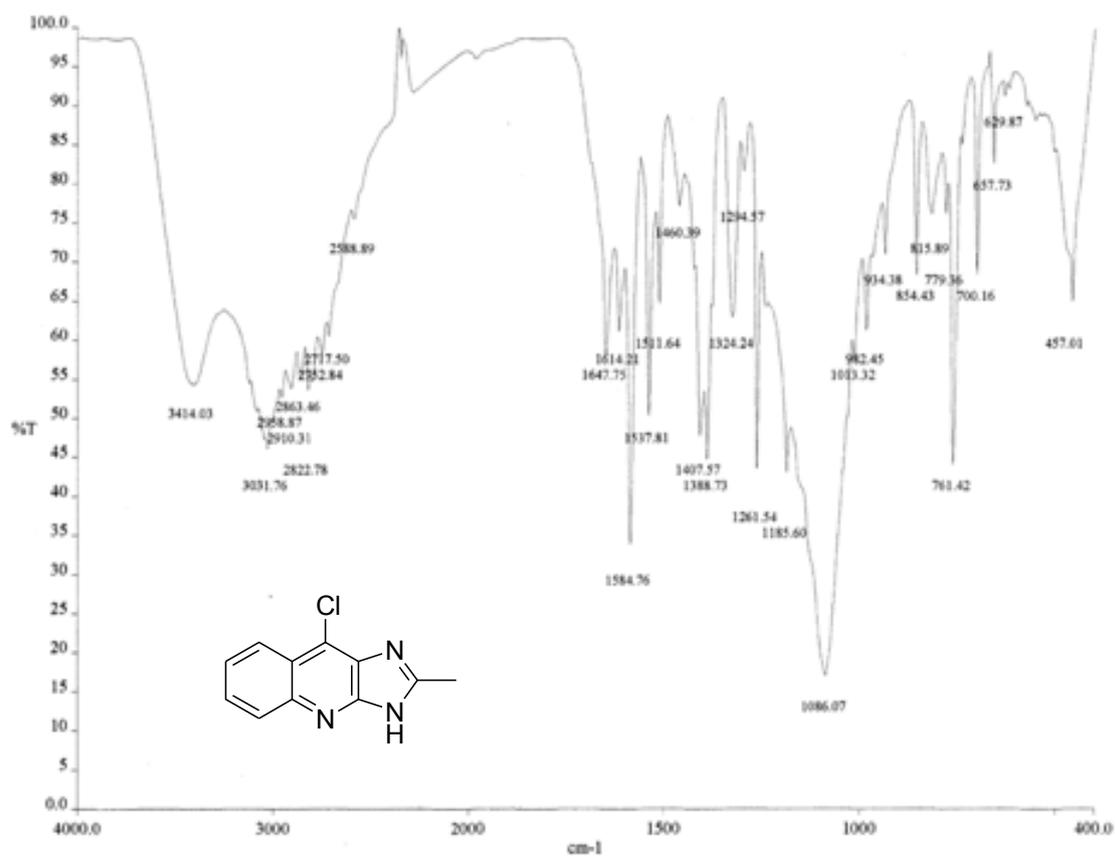
Espectro 65. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto 11m.



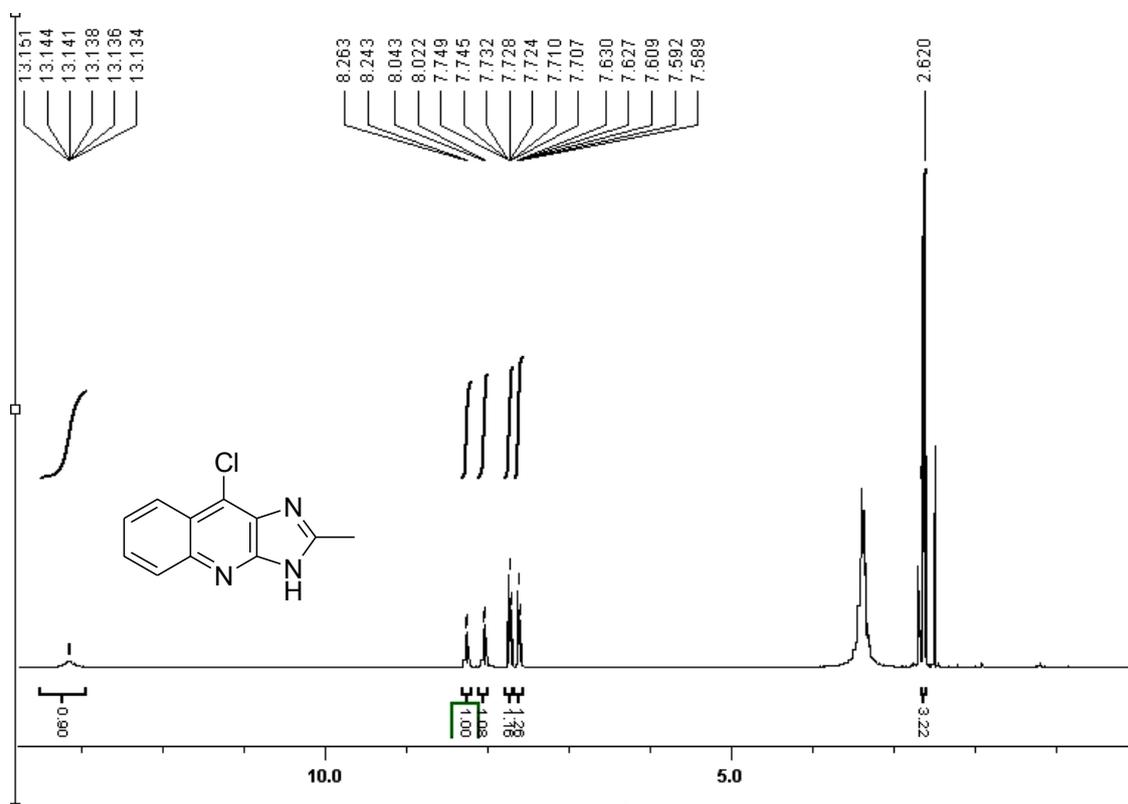
**Espectro 65.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 11m. Ampliación zona aromática.

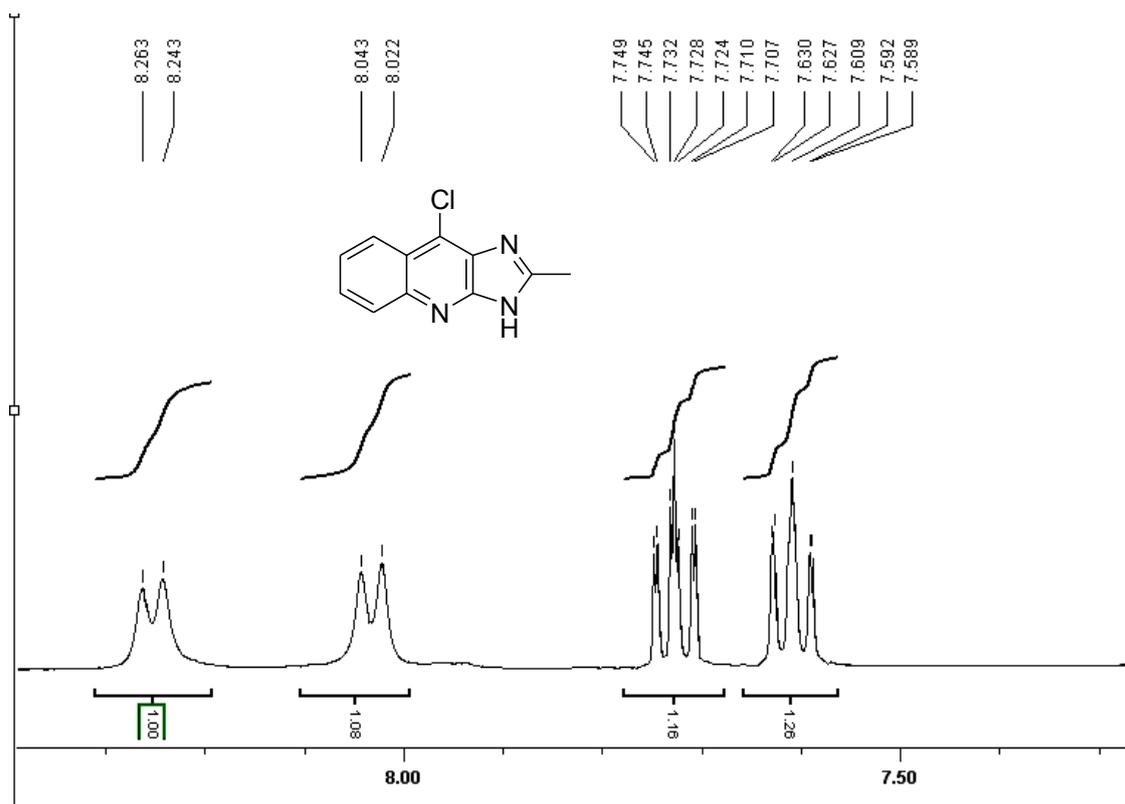
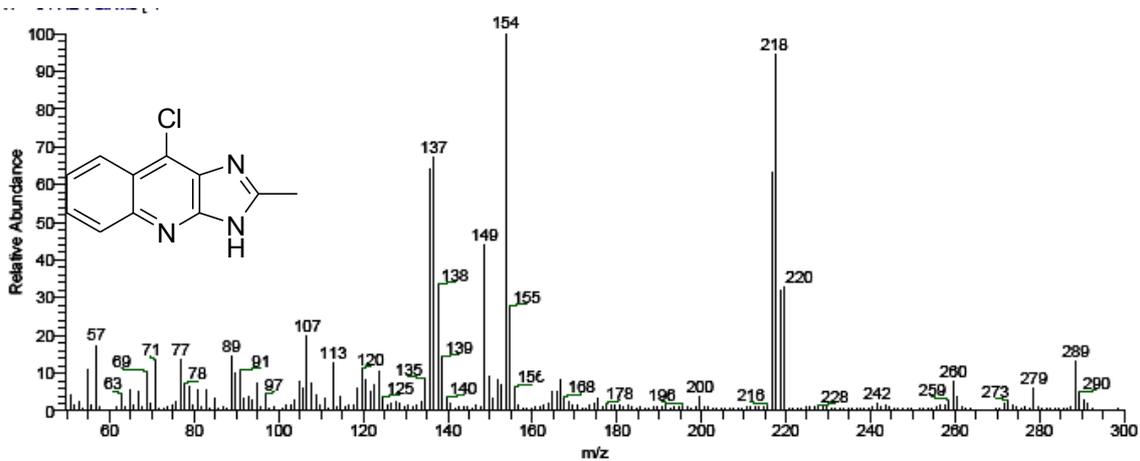


**Espectro 66.** Espectrometría de masas del compuesto 11m.

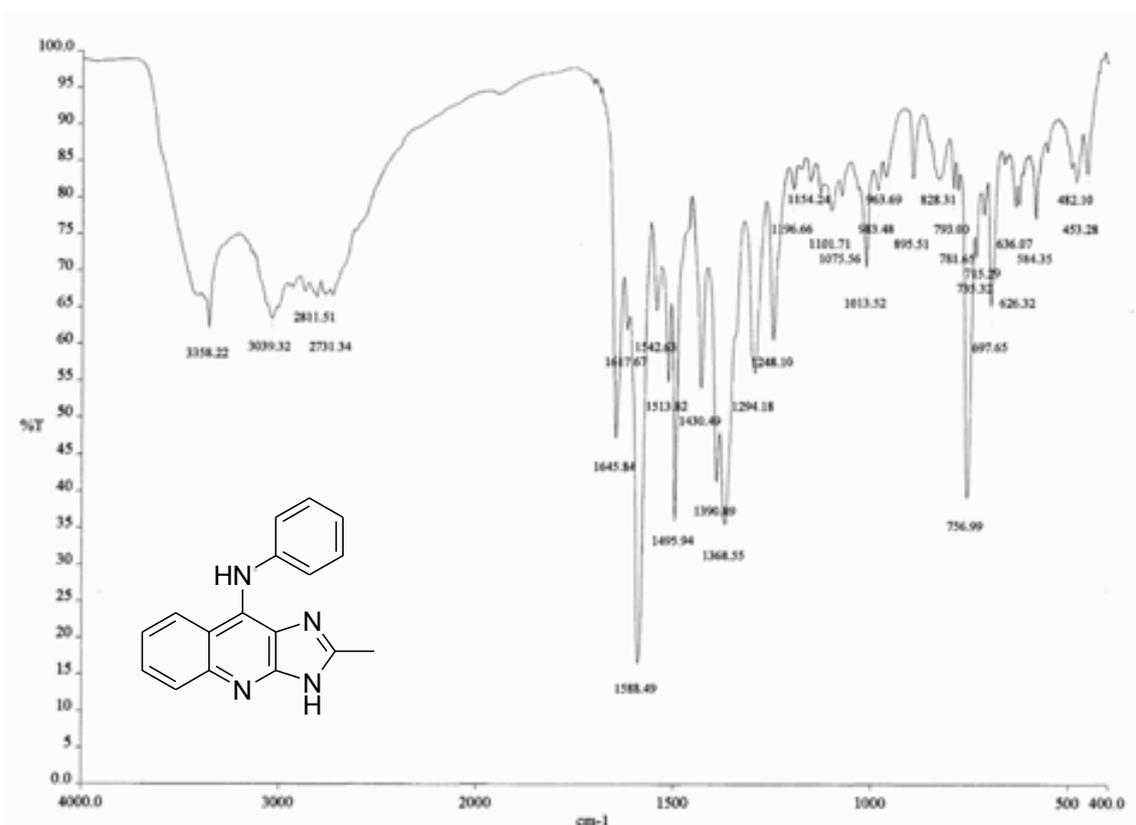


Espectro 67. Espectro IR (KBr) del compuesto 11e.

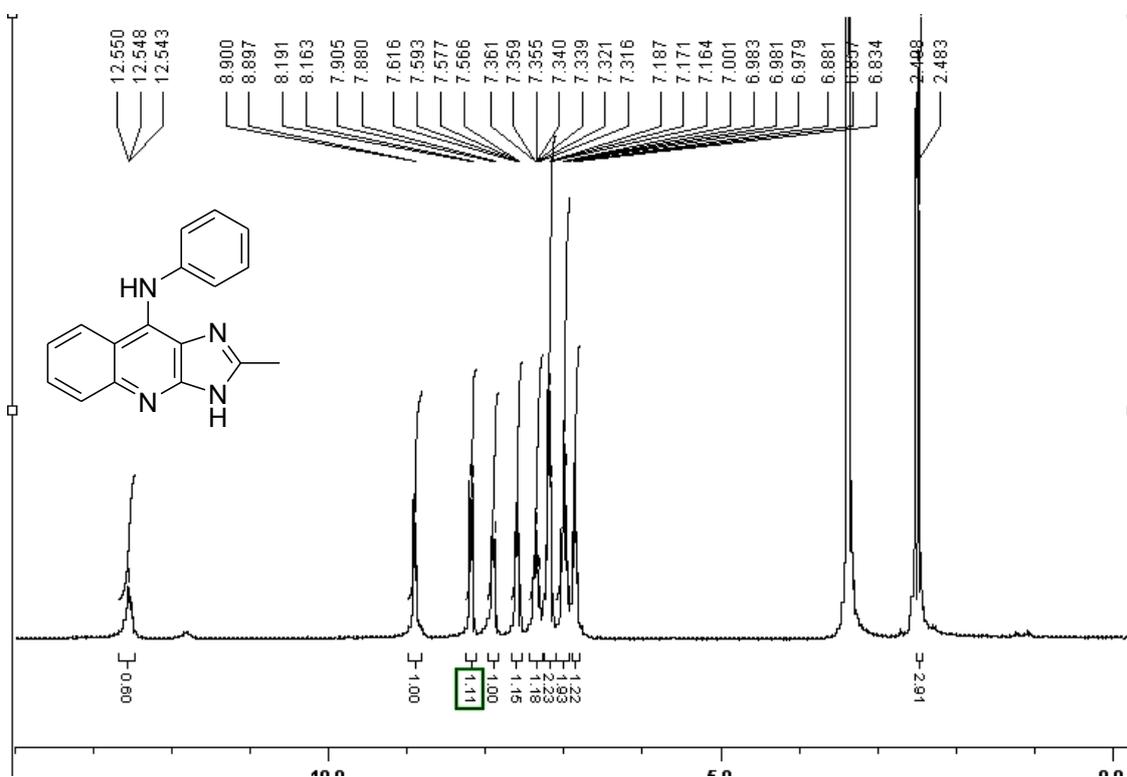
Espectro 68. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto 11e.

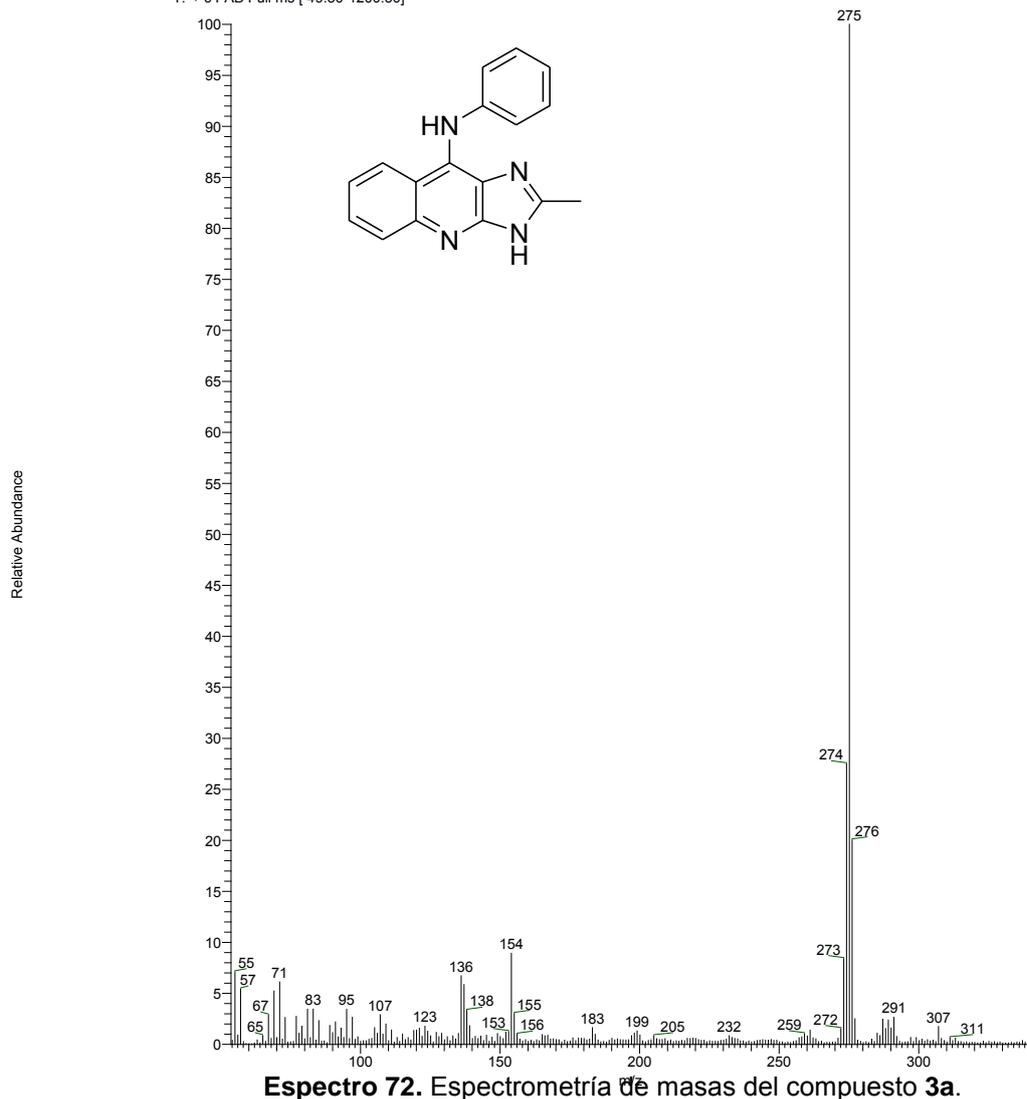
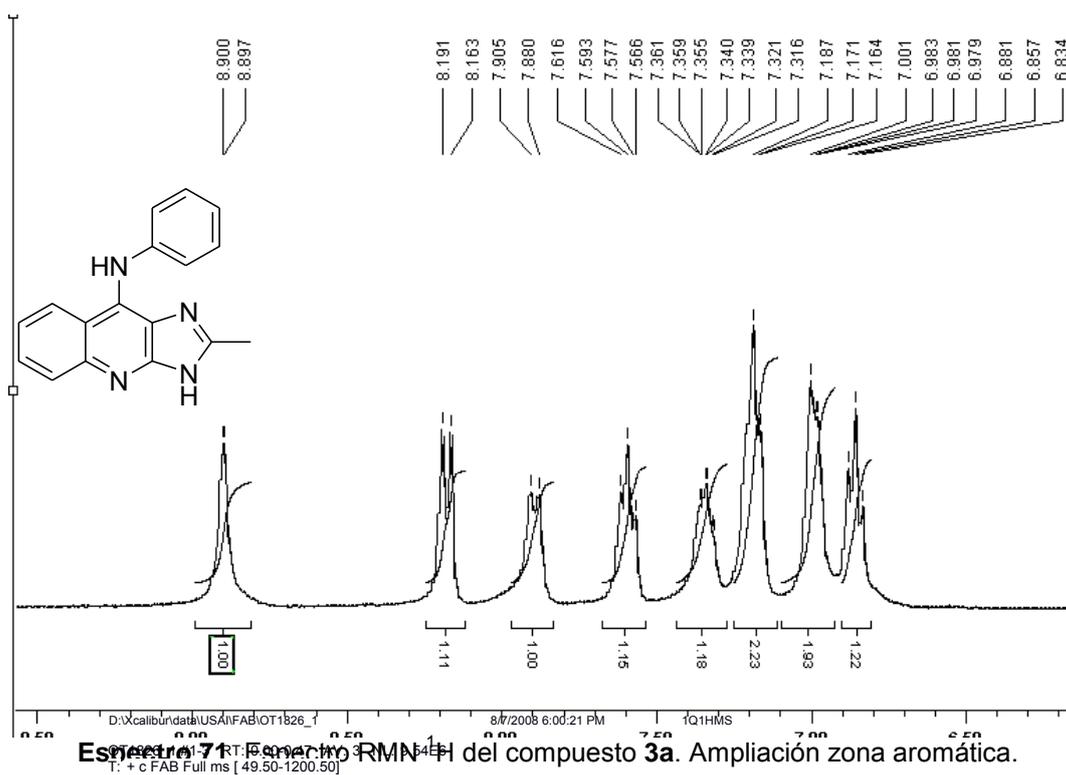
Espectro 68. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 11e. Ampliación zona aromática

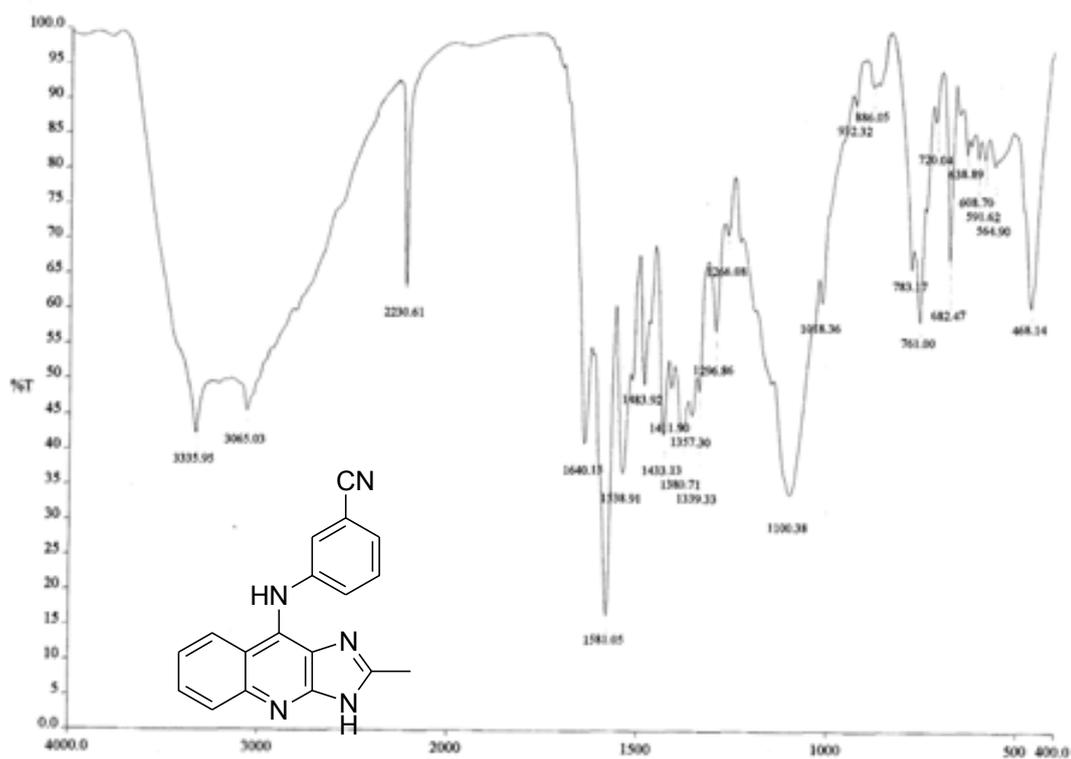
Espectro 69. Espectrometría de masas del compuesto 11e.



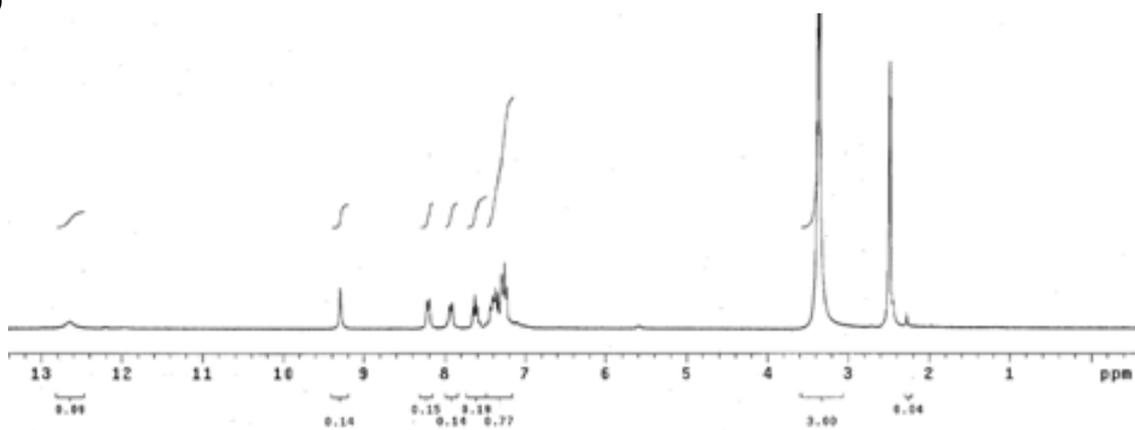
Espectro 70. Espectro IR (KBr) del compuesto 3a

Espectro 71. Espectro RMN <sup>1</sup>H del compuesto 3a.

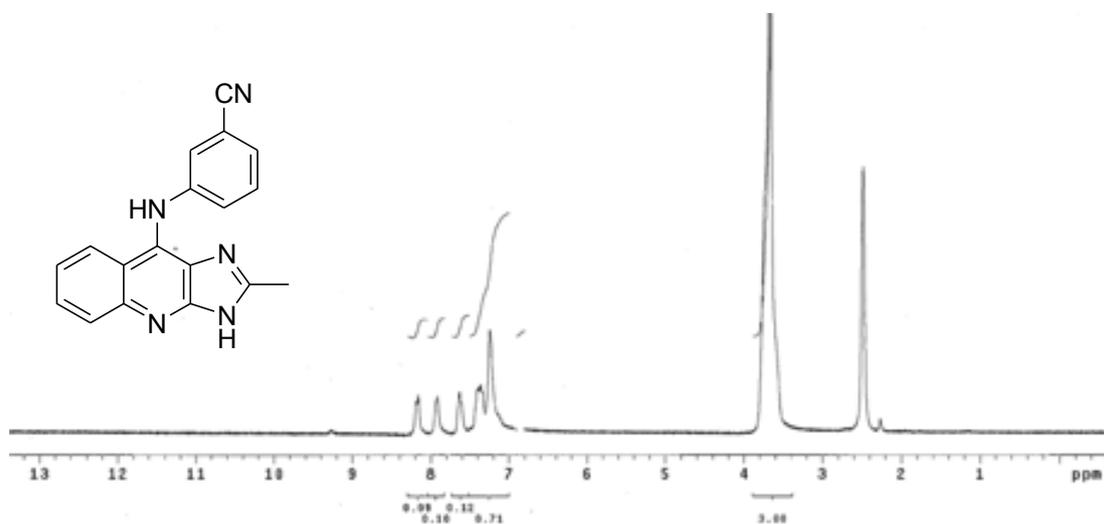


Espectro 73. Espectro IR (KBr) del compuesto **3b**.

(a)



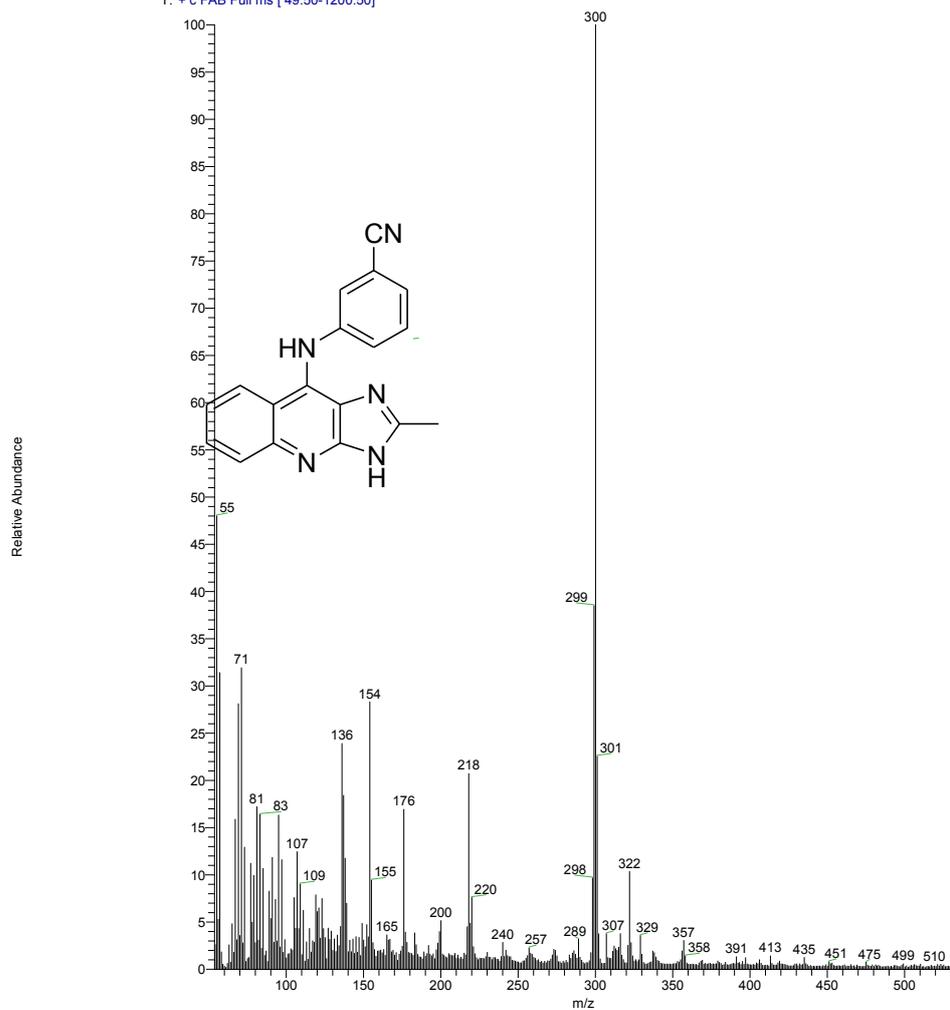
(b)

Espectro 74. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **3b** (a) DMSO- $d_6$ ; (b) Experimento con  $\text{D}_2\text{O}$

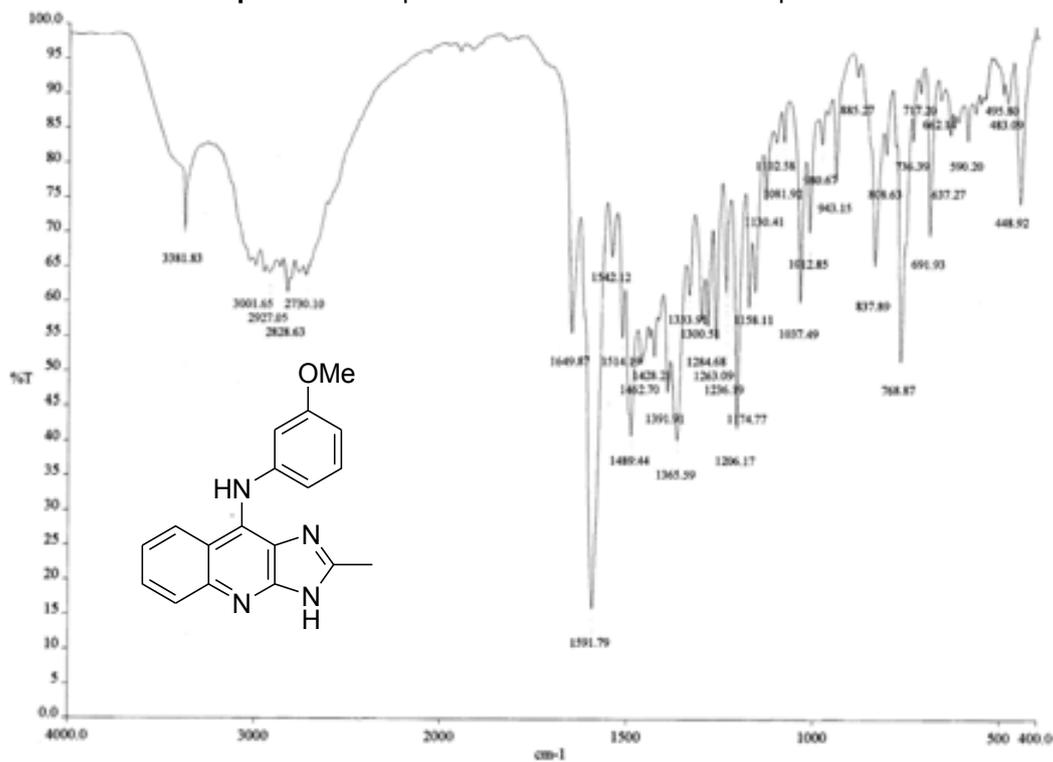
D:\Carbun\data\OSAn\FAB\OT1821\_1

8/7/2008 3:54:19 PM

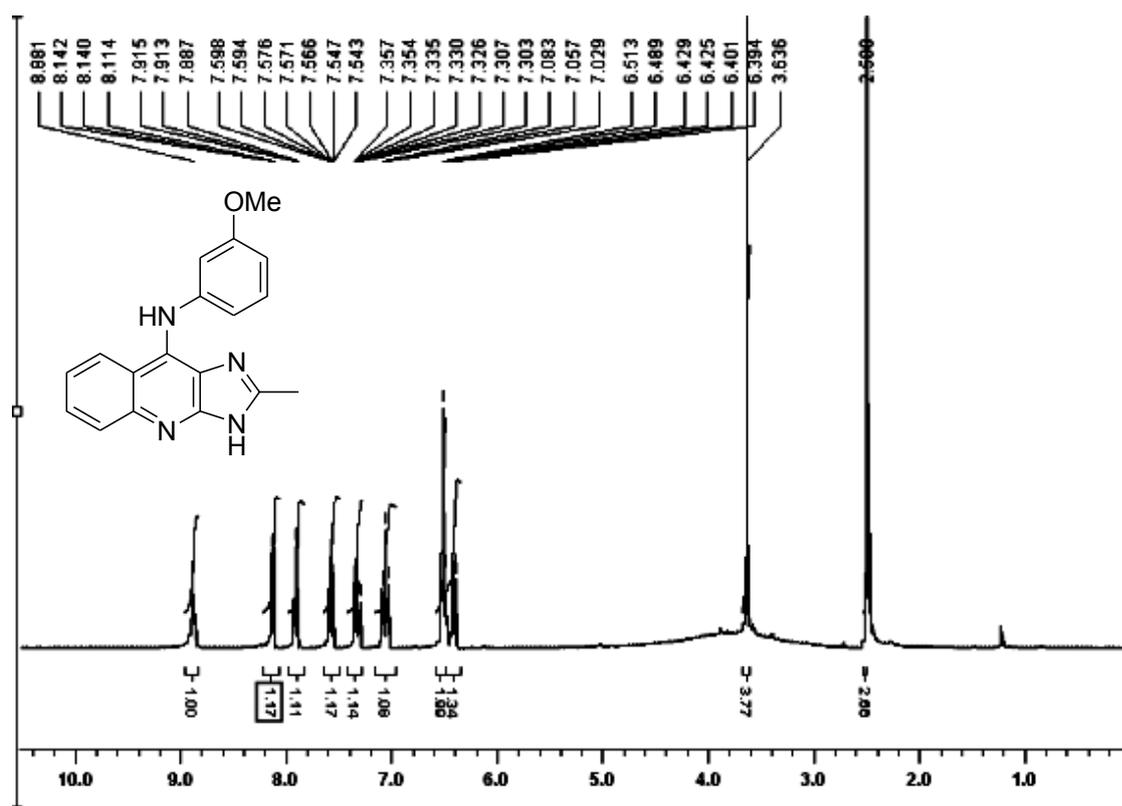
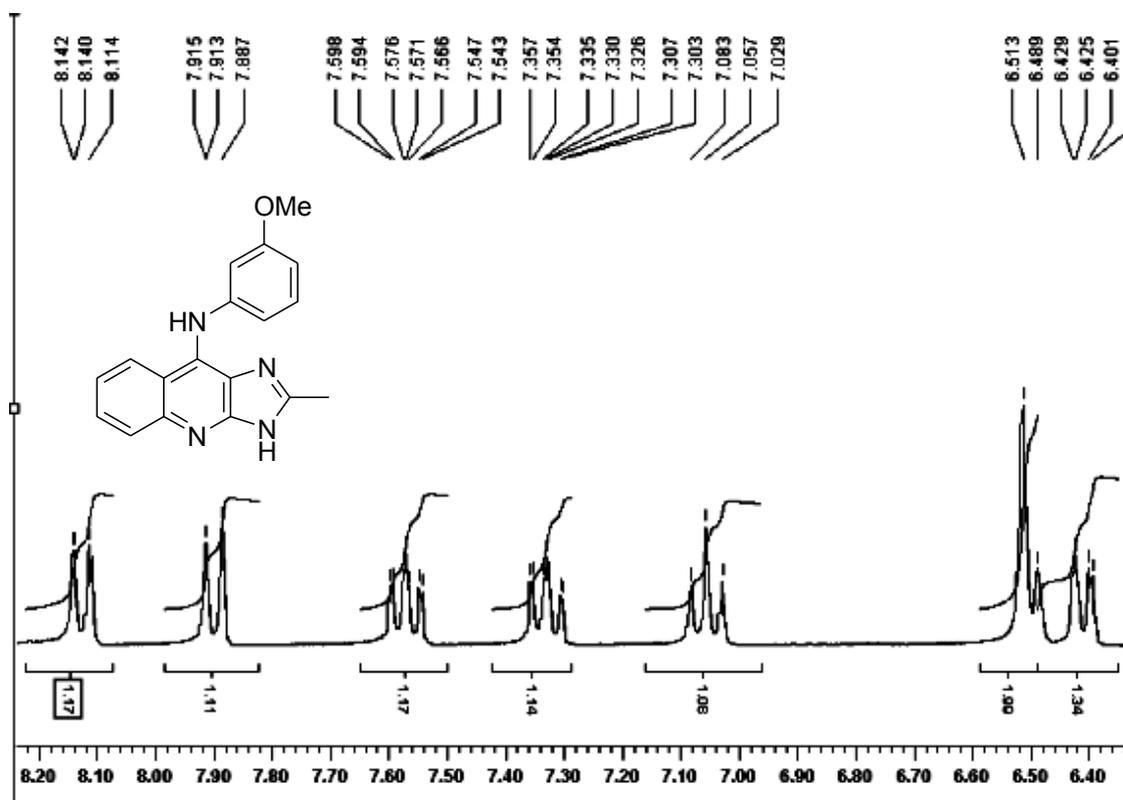
ICARC\NM

OT1821\_1 #1-2 RT: 0.00-0.24 AV: 2 NL: 8.79E6  
T: + c FAB Full ms [ 49.50-1200.50]

Espectro 75. Espectrometría de masas del compuesto 3b



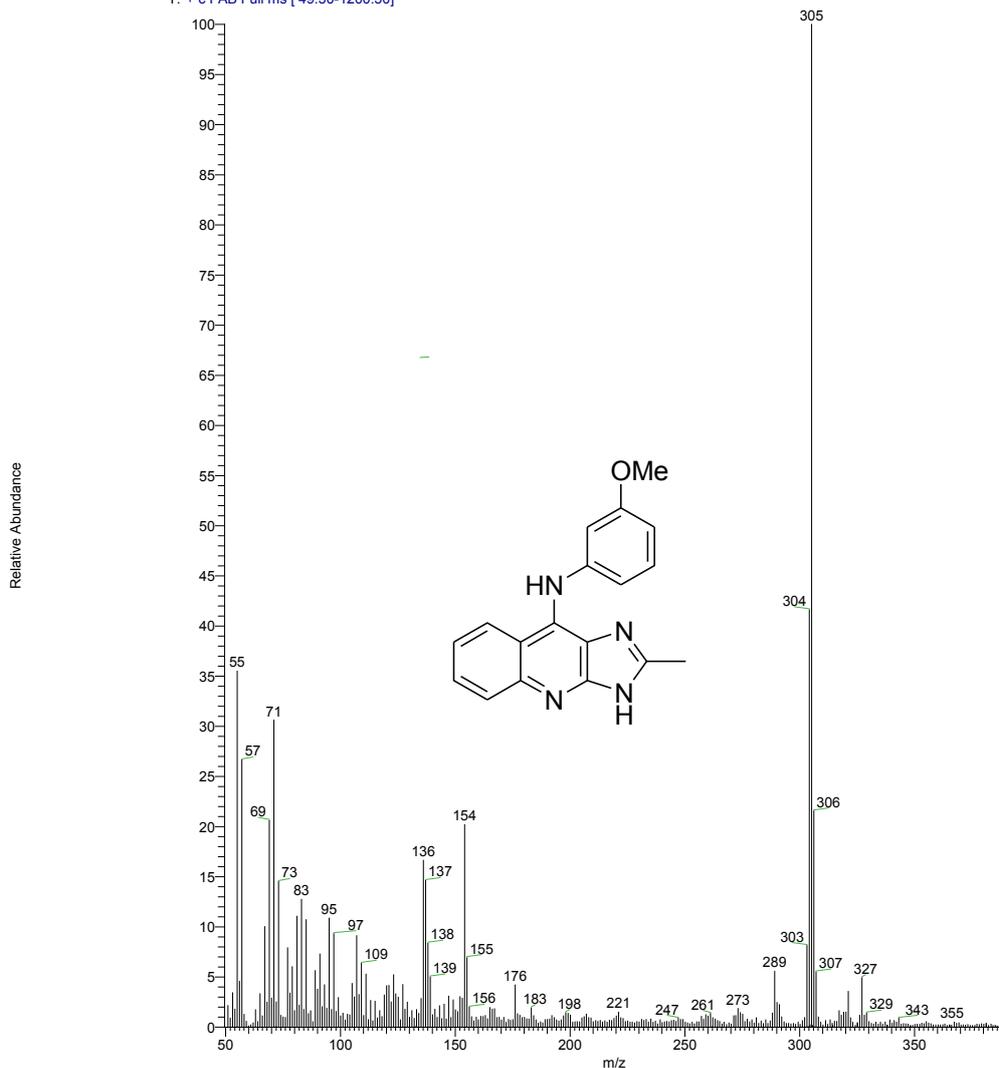
Espectro 76. Espectro IR (KBr) del compuesto 3c.

Espectro 76. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 3cEspectro 77. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 3c. Ampliación zona aromática.

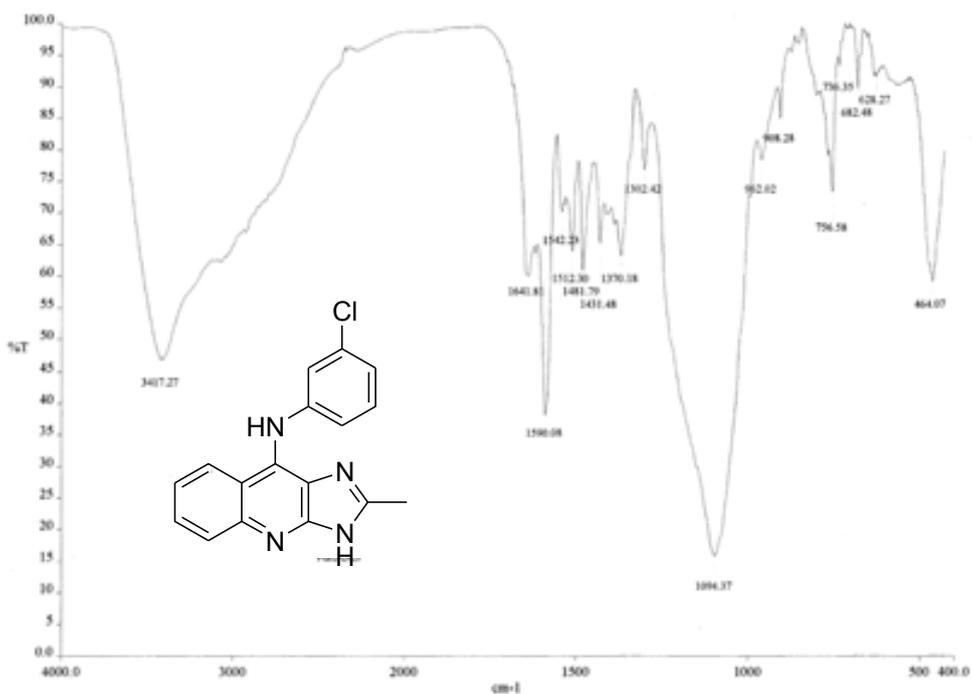
D:\Repositorio\Datos\KBr\11824\_1

07/2000 04:27:47 PM

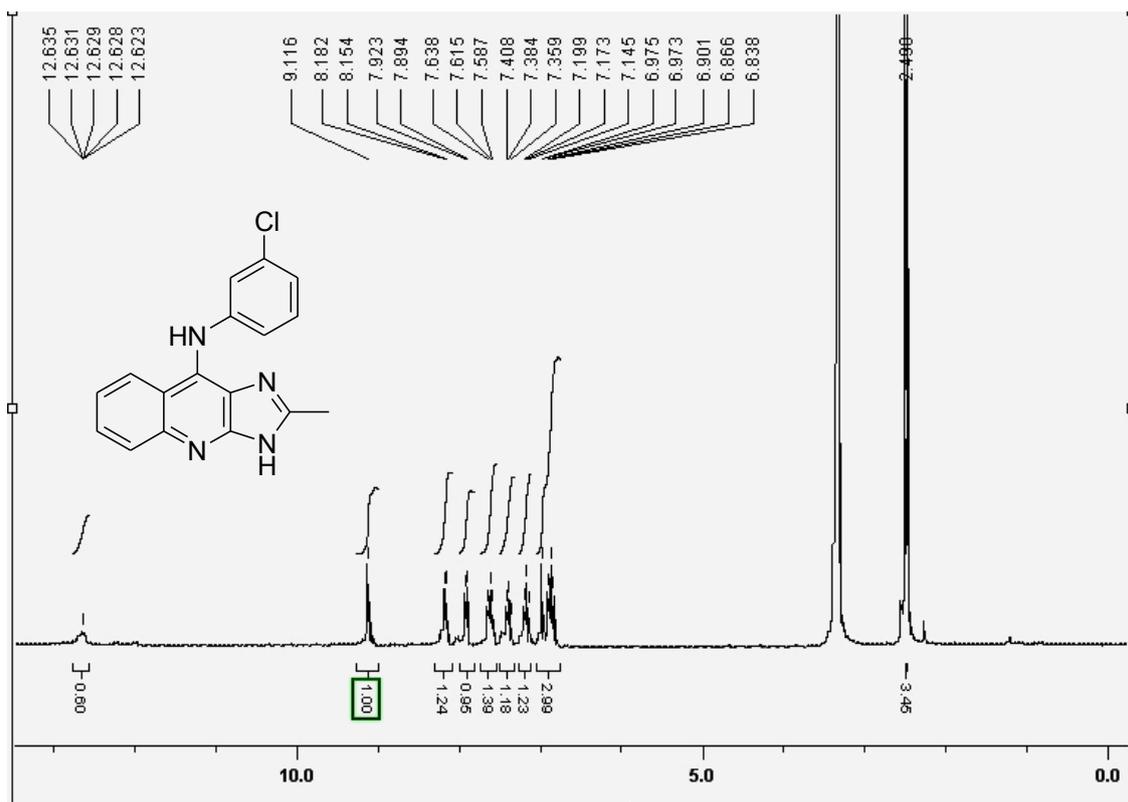
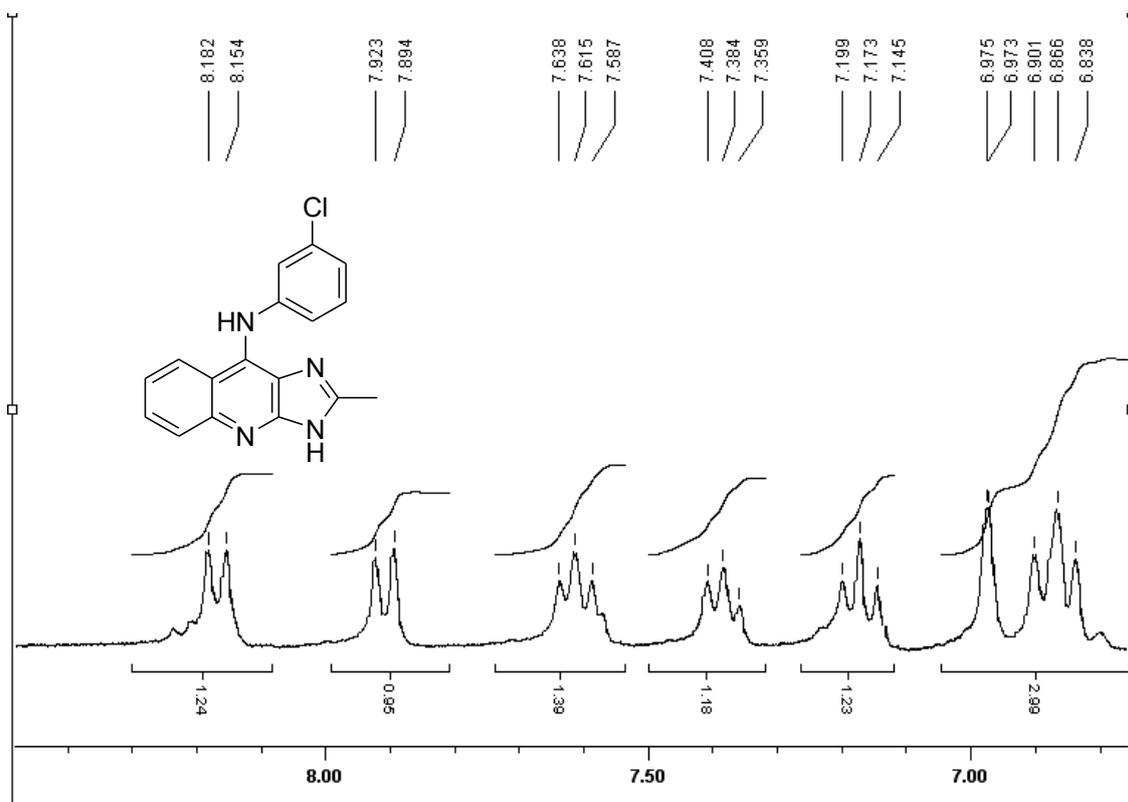
16358

OT1824\_1 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 6.41E6  
T: + c FAB Full ms [ 49.50-1200.50]

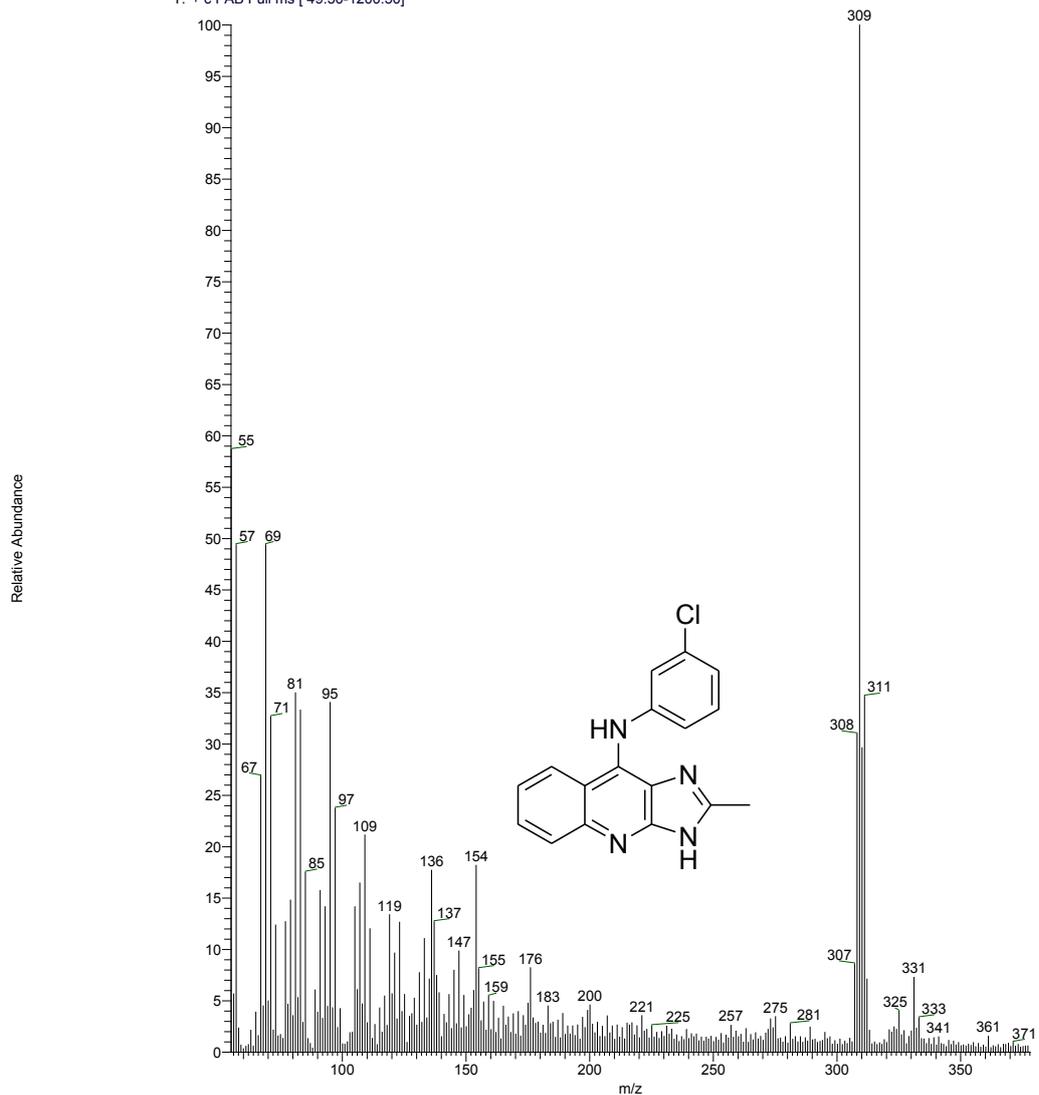
Espectro 78. Espectrometría de masas del compuesto 3c.



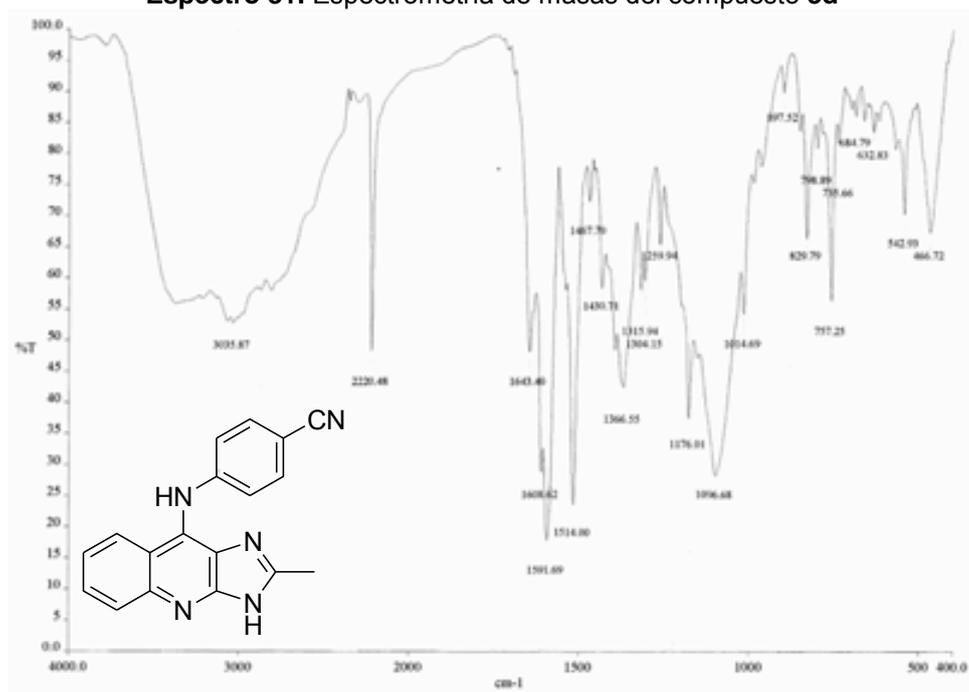
Espectro 79. Espectro IR (KBr) del compuesto 3d.

Espectro 80. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 3d.Espectro 80. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 3d. Ampliación zona aromática.

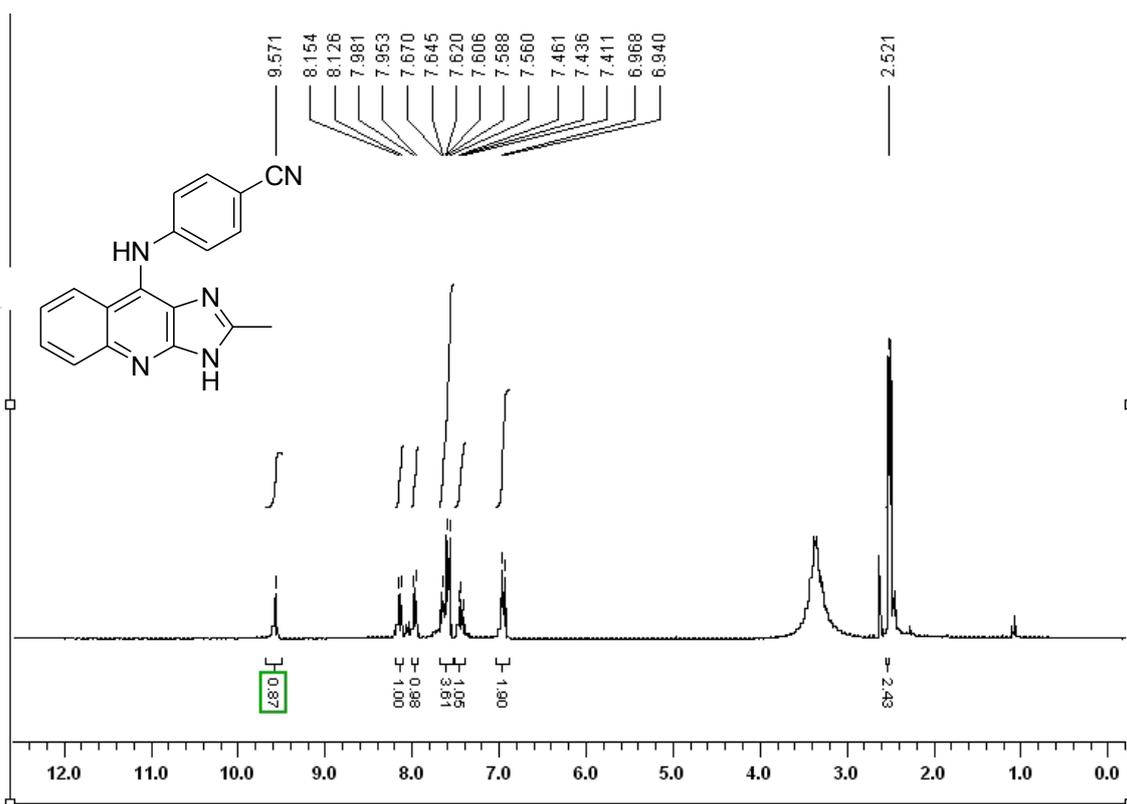
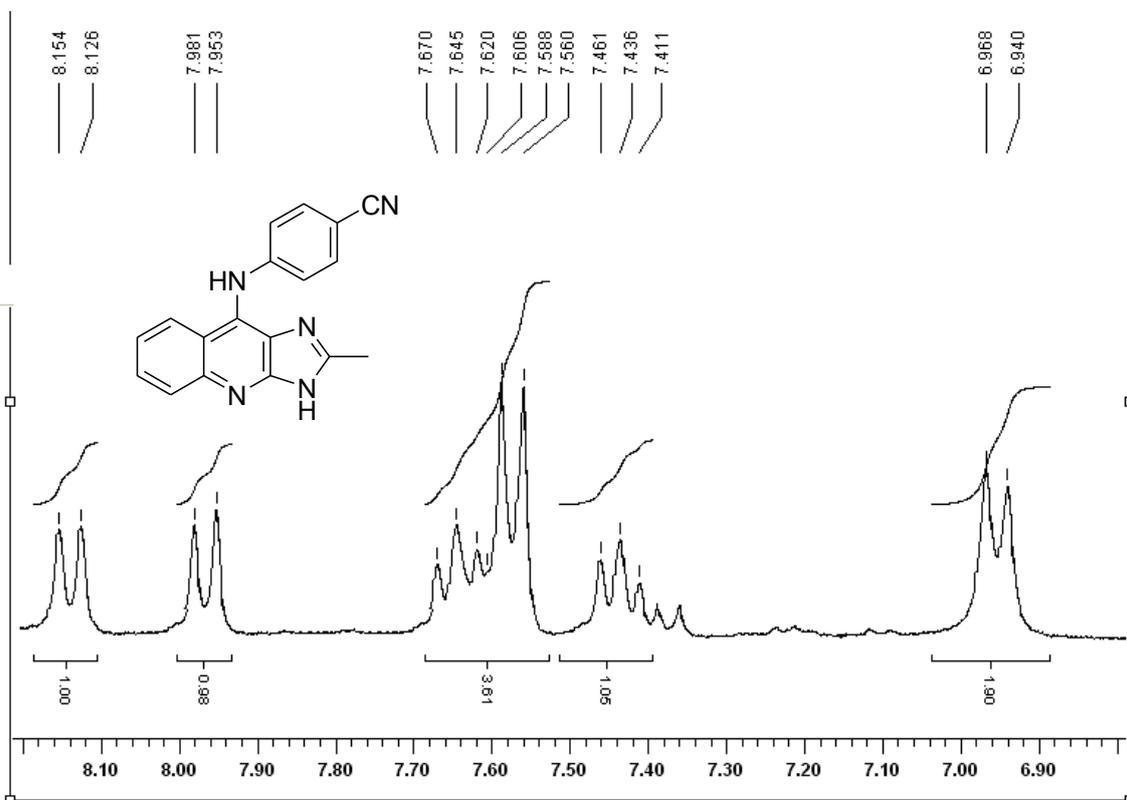
OT1822 2 #1-2 RT: 0.00-0.24 AV: 2 NL: 2.27E6  
T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]

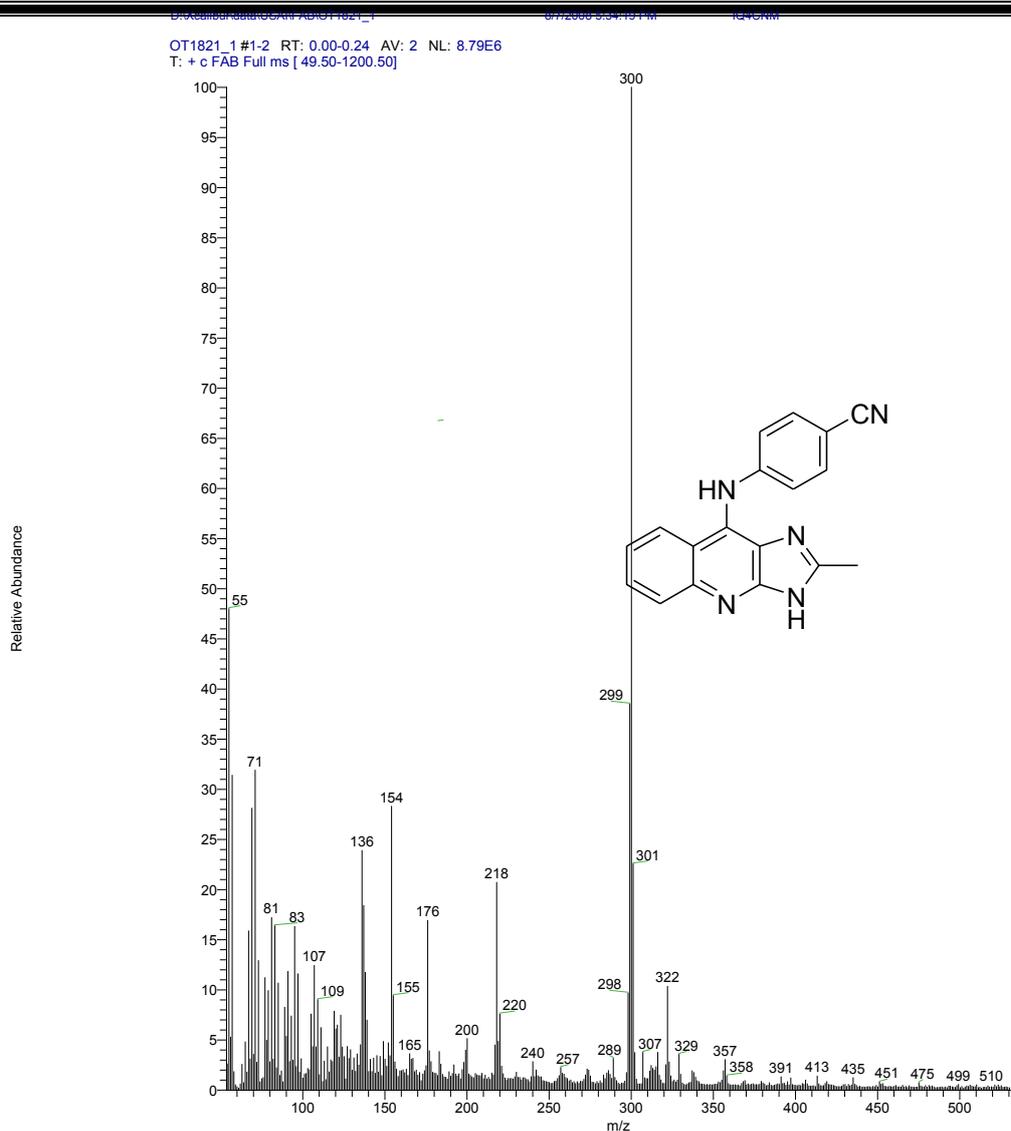


**Espectro 81.** Espectrometría de masas del compuesto **3d**

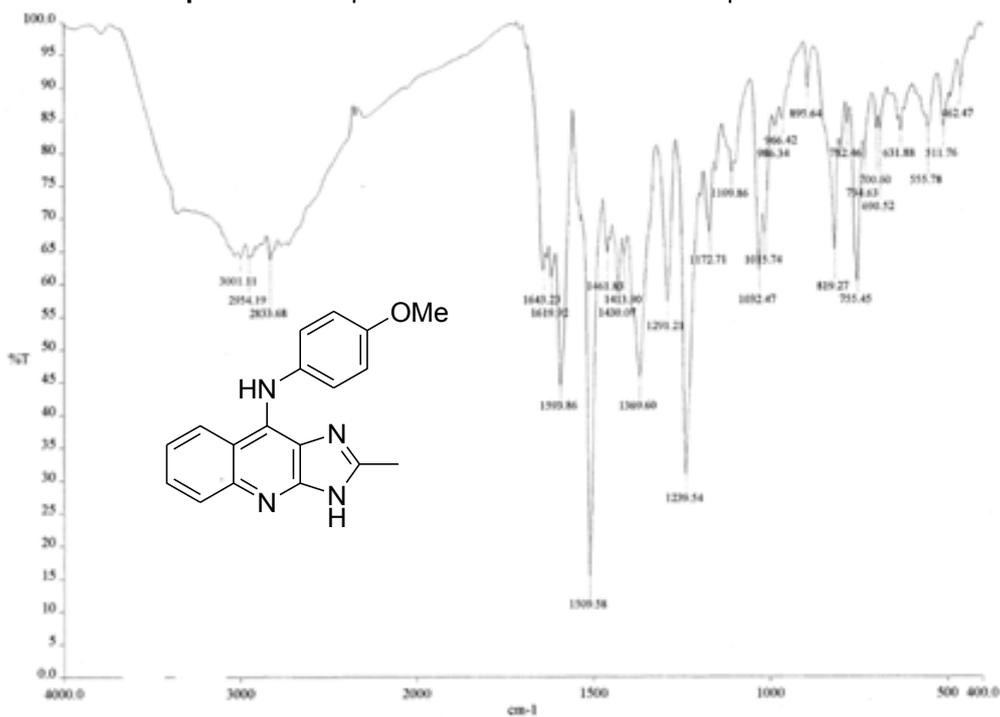


**Espectro 82.** Espectro IR (KBr) del compuesto **3e**

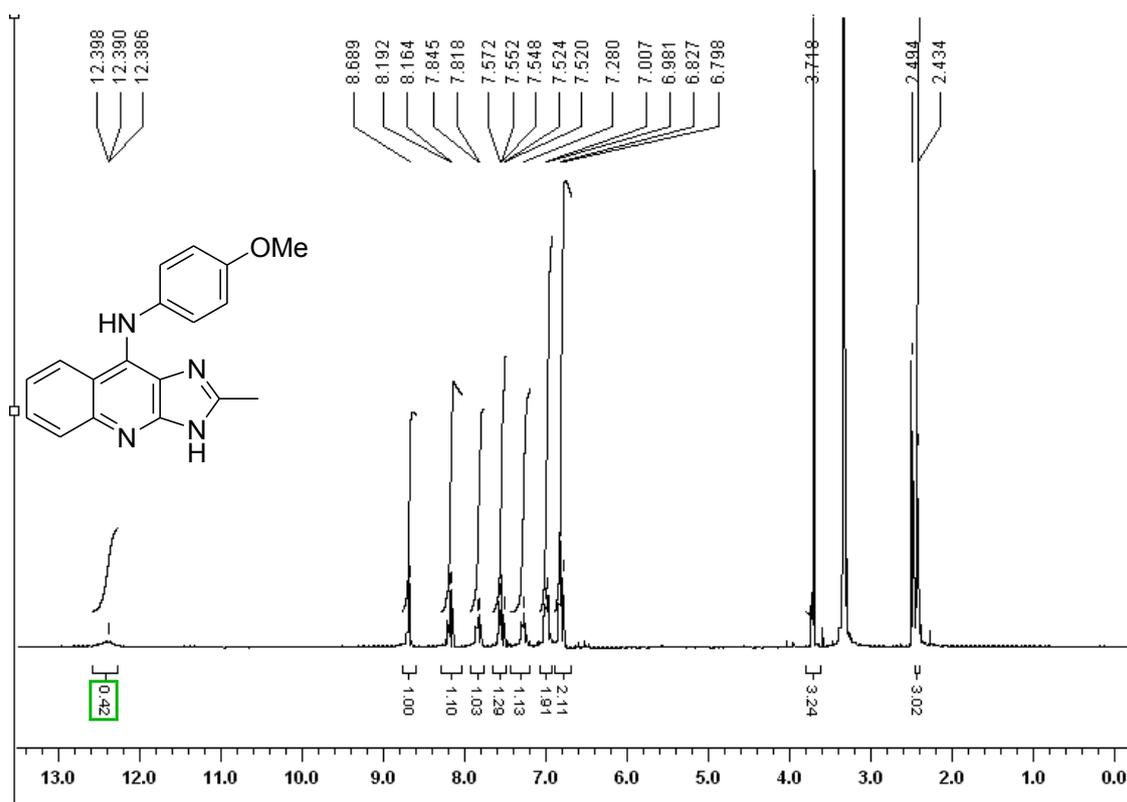
Espectro 83. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 3e.Espectro 83. Espectro RMN  $^1\text{H}$  del compuesto 3e. Ampliación zona aromática.



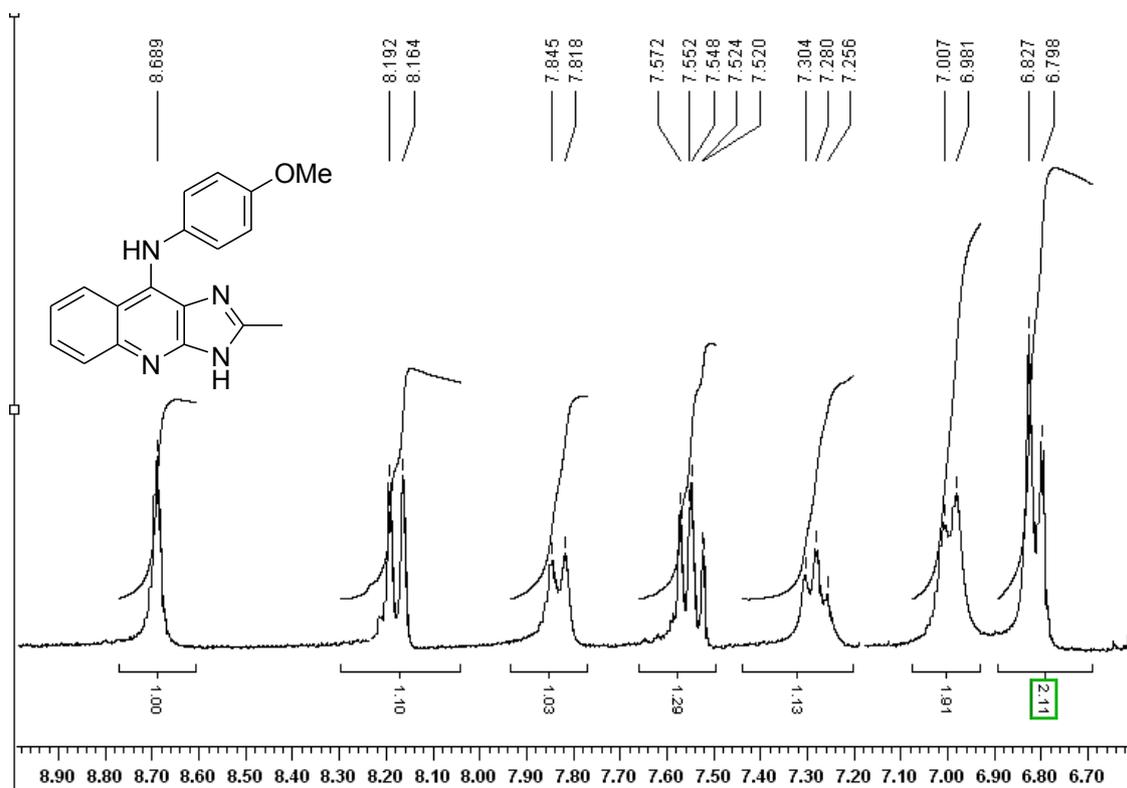
Espectro 84. Espectrometría de masas del compuesto 3e.



Espectro 85. Espectro IR (KBr) del compuesto 3f.



Espectro 86. Espectro RMN 1H del compuesto 3f.

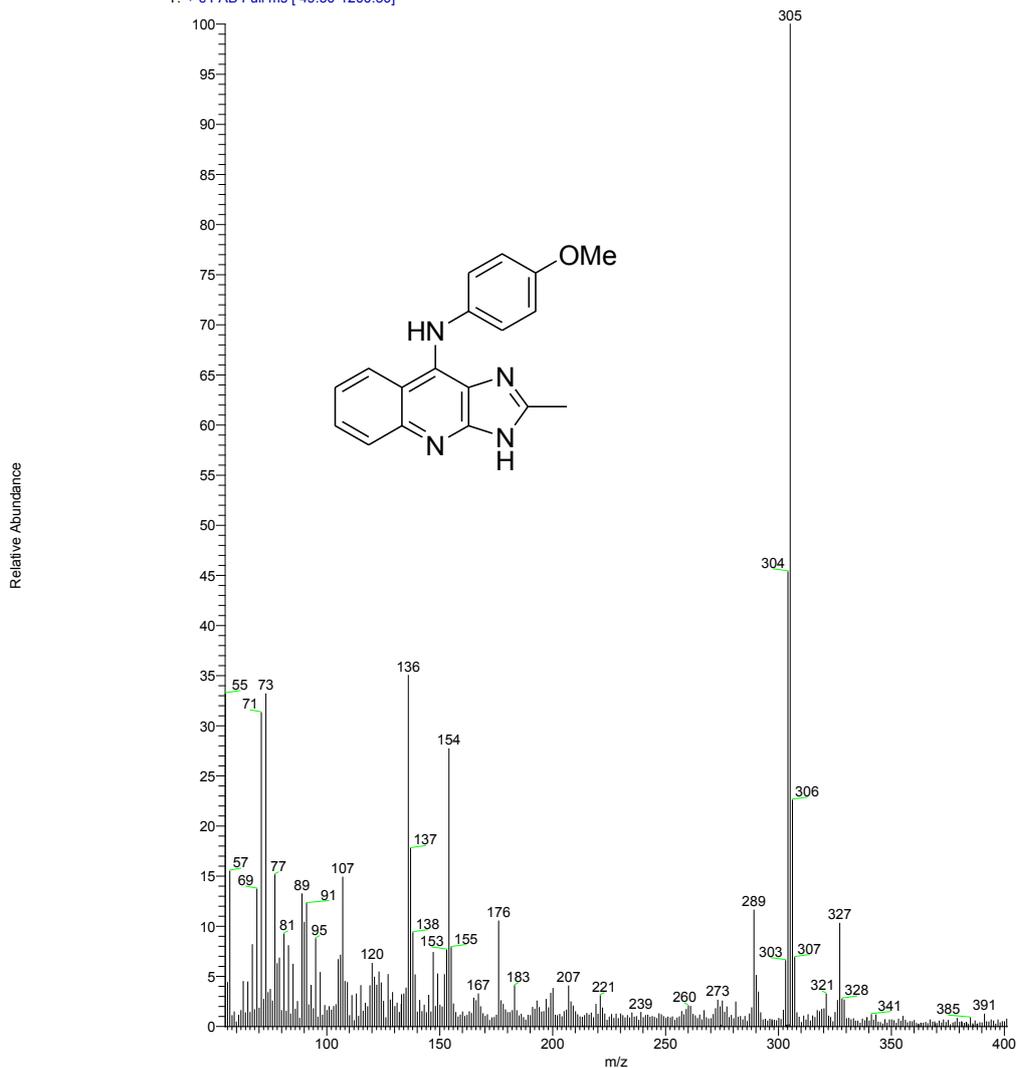


Espectro 87. Espectro RMN 1H del compuesto 3f. Ampliación zona aromática.

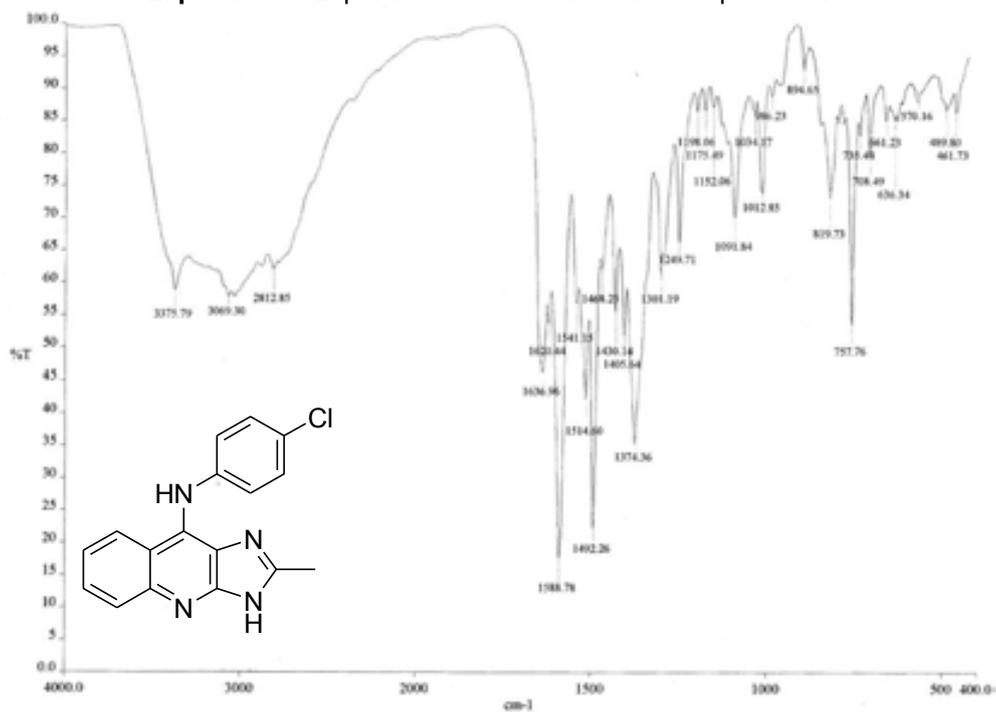
D:\Química Natural\GC-MS\FAB\11025\_2

0172300-20007-FW

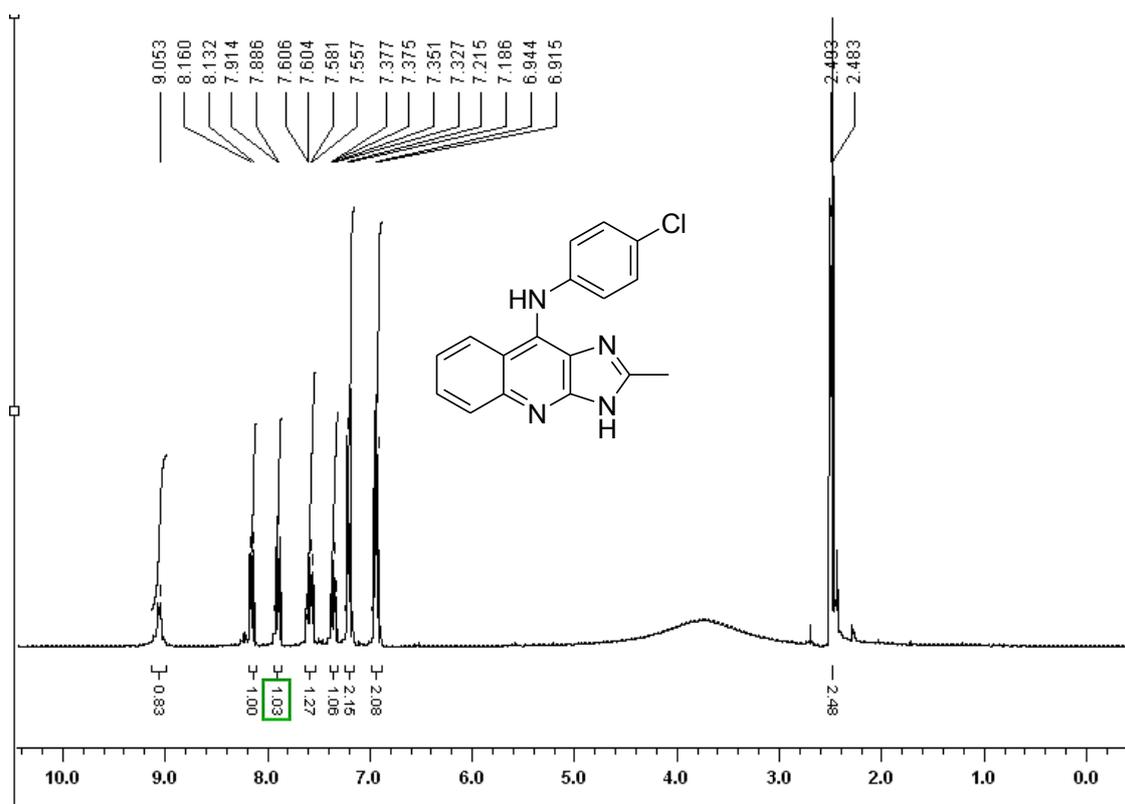
16-10-08

OT1825\_2 #2 RT: 0.24 AV: 1 NL: 1.62E6  
T: + c FAB Full ms [ 49.50-1200.50]

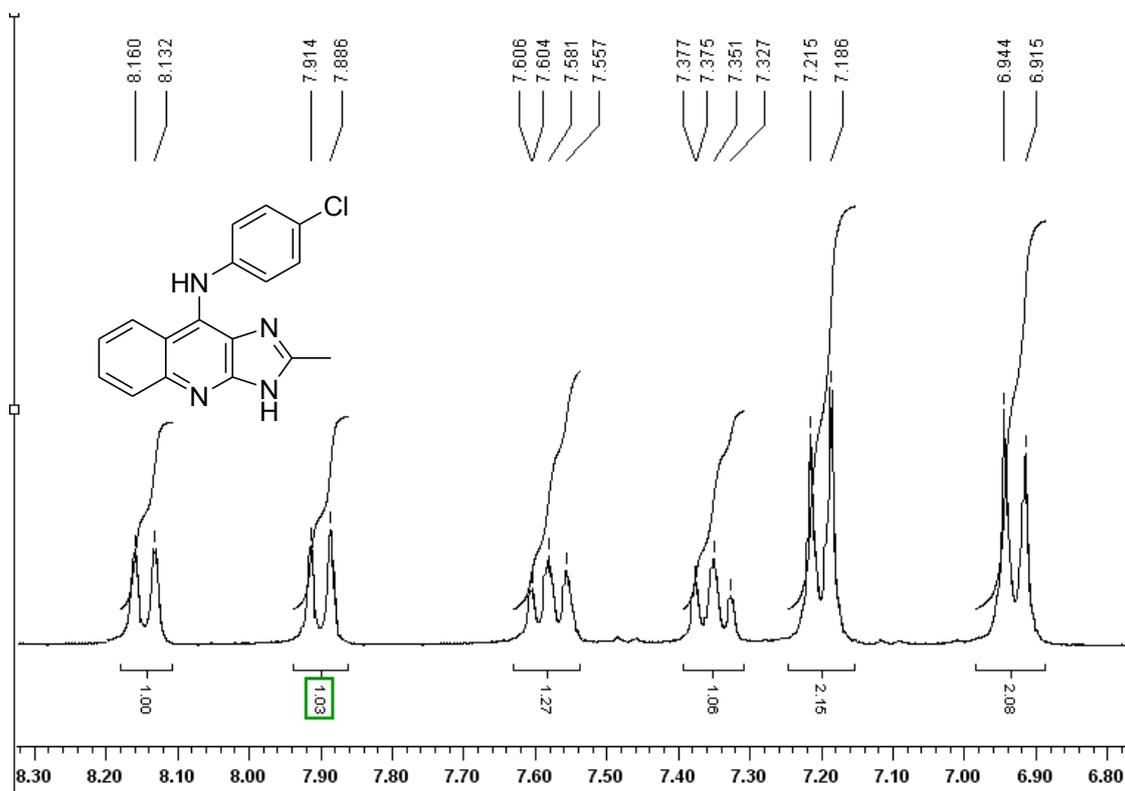
Espectro 87. Espectrometría de masas del compuesto 3f.



Espectro 88. Espectro IR (KBr) del compuesto 3g.



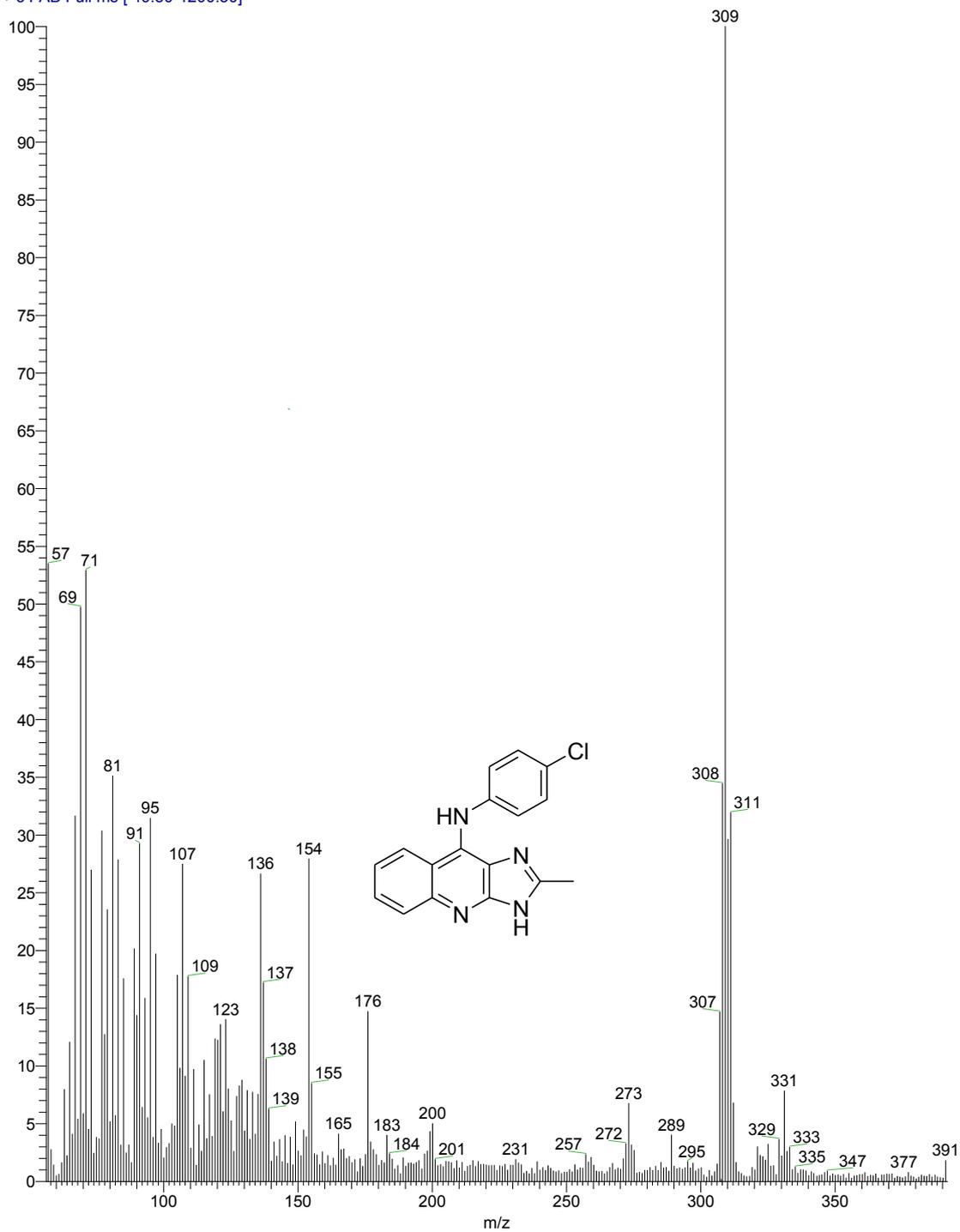
Espectro 89. Espectro RMN 1H del compuesto 3g.



Espectro 89. Espectro RMN 1H del compuesto 3g. Ampliación zona aromática.

OT1823\_1 #2-3 RT: 0.24-0.47 AV: 2 NL: 1.15E6  
T: + c FAB Full ms [ 49.50-1200.50]

Relative Abundance



**Espectro 90.** Espectrometría de masas del compuesto **3g**.

## ANEXO 3

### REPORTE DE ACTIVIDADES ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN EN EL EXTRANJERO

LUGAR DE LA ESTANCIA:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES. FACULTAD DE FARMACIA. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA. ALCALÁ DE HENARES (MADRID). ESPAÑA

PROYECTO:

INTERCALANTES DEL ADN: SÍNTESIS Y ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON ÁCIDOS NUCLEICOS

CO-TUTORES EXTRANJEROS:

DR. ANTONIO LORENTE PÉREZ

DRA. MARÍA JOSÉ FERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ

## 1. Introducción

La asociación de moléculas externas con el ADN presenta un gran interés en química farmacéutica. La formación de estos complejos produce una modificación significativa en la estructura del ADN y en consecuencia puede tener una influencia importante sobre su función fisiológica. Una de las formas en que los fármacos pueden asociarse al ADN es por intercalación.

La actividad antitumoral de los intercalantes se puede atribuir a la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos o a la rotura de la cadena del ADN. La intercalación puede bloquear la progresión de las polimerasas a lo largo del ADN y la reacción selectiva del complejo ADN-intercalante con proteínas implicadas en la replicación, como las topoisomerasas, produce la formación de un complejo ternario ADN-intercalante-topoisomerasa. Por otra parte los ácidos nucleicos se pueden alterar químicamente produciéndose la rotura del esqueleto que constituye cada una de las cadenas. Estas modificaciones se pueden producir por diferentes vías: a) oxidación del anillo de ribosa o desoxirribosa, b) alquilación u oxidación de las bases nucleicas y c) rotura nucleofílica del esqueleto fosfodiéster. Los agentes que producen estos cambios pueden ser desde productos naturales a complejos de metales de transición o formas reducidas del oxígeno altamente reactivas

El descubrimiento y aplicación de las endonucleasas de restricción que producen la rotura hidrolítica del ADN de doble cadena en lugares específicos de 4 a 8 pares de bases, ha proporcionado la herramienta para romper el ADN en determinados lugares. La capacidad para manipular el ADN con enzimas de restricción es fundamental para la ingeniería genética y la biotecnología. Las enzimas de restricción naturales reconocen fragmentos pequeños de bases que no están uniformemente distribuidos en el genoma con lo que la rotura con estas enzimas produce fragmentos pequeños de ADN difíciles de separar. Las enzimas de restricción no naturales pueden reconocer fragmentos mayores (hasta 15 pares de bases) lo que es de gran utilidad, ya que se pueden separar y luego hidrolizar, a fragmentos más pequeños con endonucleasas. Actualmente, sólo las enzimas naturales producen la rotura específica de los ácidos nucleicos, por lo que un objetivo importante en este campo es el desarrollo de nucleasas artificiales que reconozcan una determinada secuencia del ADN

Por lo anterior es importante el explorar compuestos que puedan asociarse al ADN mediante intercalación y posean la capacidad de producir la rotura de su esqueleto por alguno de los mecanismos antes descritos. Una aproximación es incorporar a un núcleo policíclico una cadena que pueda asociarse a cationes metálicos.

## 2. Objetivos de la estancia.

1. Sintetizar alguno de los agentes intercalantes desarrollados en el grupo del Dr. Lorente. Dichos compuestos incluyen agentes que pueden estar asociados a cationes de metales de transición.
2. Estudiar, por diferentes técnicas, la interacción de algunos compuestos con ácidos nucleicos.

## 3. Resultados esperados.

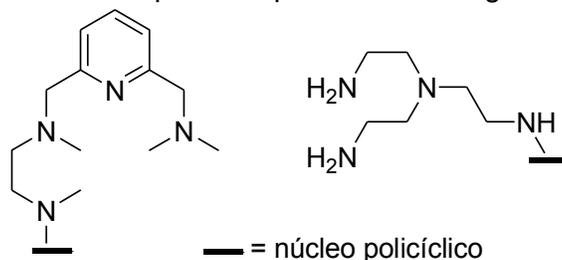
1. Realizar la síntesis de agentes intercalantes con capacidad de asociarse a cationes metálicos

2. Obtener información sobre la interacción con el ADN de alguno de los compuestos sintetizados dentro del grupo del Dr. Lorente
3. Incrementar mis conocimientos sobre el diseño, síntesis y evaluación de agentes intercalantes.

#### 4. Metodología

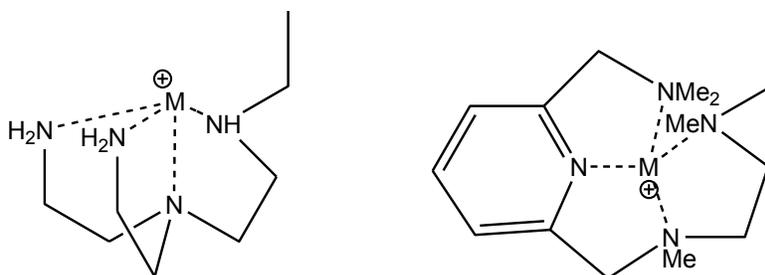
##### 4.1 Parte química

Se propuso la síntesis de compuestos que tuvieran la siguiente estructura general.



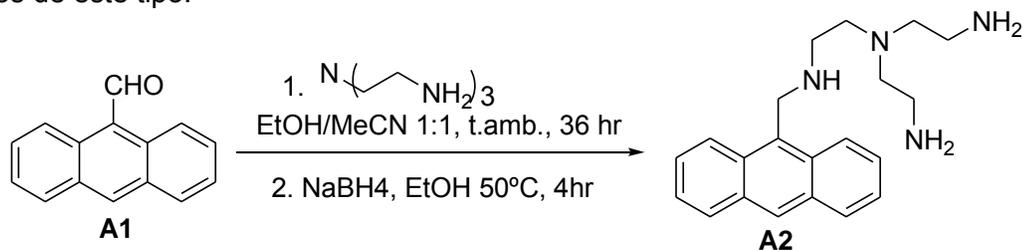
**Figura 1.** Estructura general de los compuestos a sintetizar

Estos compuestos son capaces de incorporar un catión metálico como se ilustra en la figura 2.

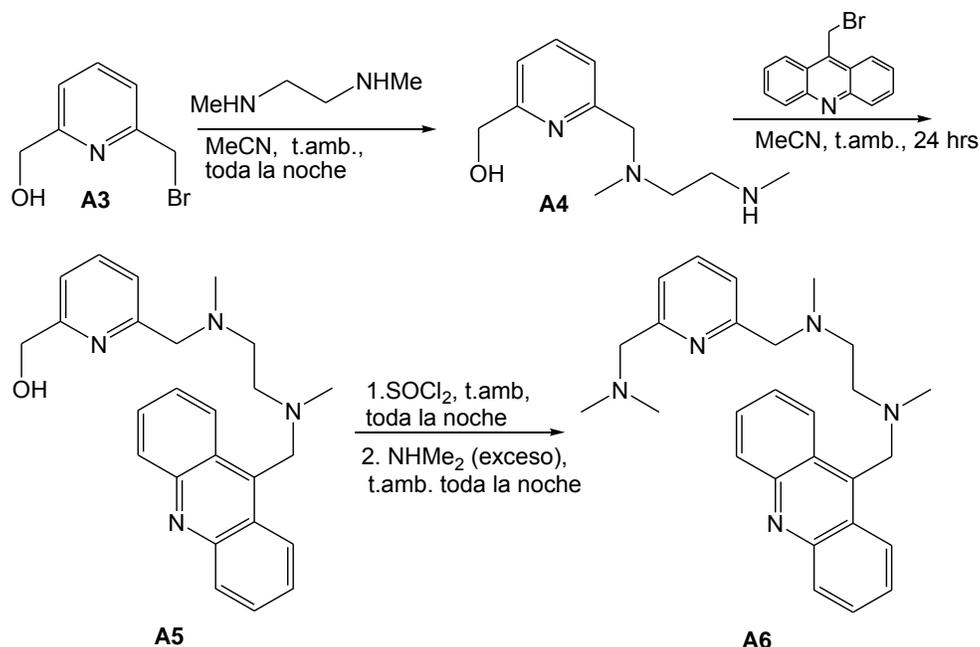


**Figura 2.** Posible modo de incorporación de cationes metálicos por parte de los compuestos a sintetizar

Se propusieron las rutas sintéticas descritas a continuación para la obtención de compuestos de este tipo.



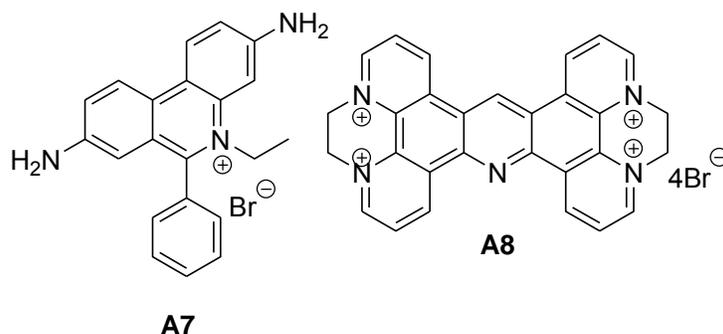
**Esquema 1.** Ruta de síntesis para la obtención del compuesto **A2**.<sup>199</sup>



**Esquema 2.** Ruta de síntesis para la obtención del compuesto **A6**.

#### 4.2 Evaluación de interacción con ADN.

Se propuso la evaluación de la interacción con el ADN de los siguientes compuestos **A7** y **A8**. Para ello se emplearía la metodología de diálisis en equilibrio.



**Figura 3.** Compuestos a evaluar por diálisis en equilibrio.

### 5. Resultados obtenidos

#### 5.1 Obtención del compuesto **A2**

En la síntesis del compuesto **A2** se encontraron dificultades, puesto con la técnica reportada<sup>199</sup> se obtuvieron mezclas del compuesto deseado y del compuesto que incorporaba dos moléculas de antraceno (compuesto **A2b**), por lo que se intentaron varias modificaciones, que incluyeron el aumento del número de equivalentes de la tris(2-aminoetil)amina (TREN), adición lenta del antraceno-9-carbaldehído, aumento del volumen de reacción y cambio del medio de reacción, que no tuvieron éxito. Ante esta situación se modificó la ruta sintética como

se ilustra en el esquema 3 mediante la protección dos de los grupos amino con grupos *tert*-butilo (TREN-diBoc, compuesto **A9**) mediante una técnica previamente reportada.<sup>200</sup>

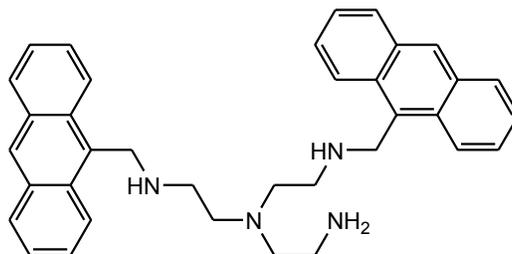
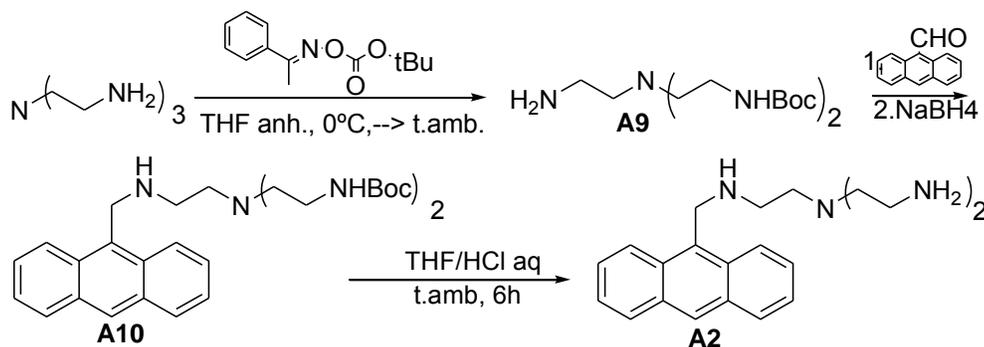


Figura 4. Compuesto **A2b**

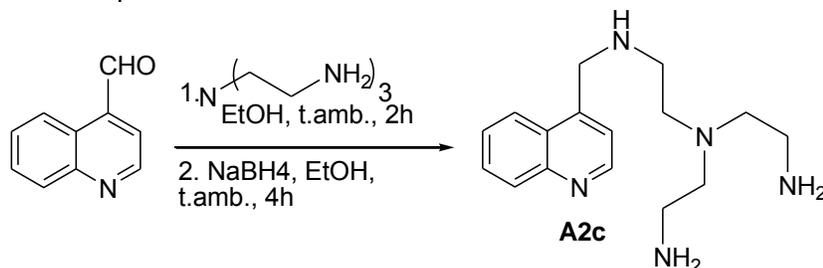


Esquema 3. Modificación de la ruta de síntesis para la obtención del compuesto **A2**

Mediante esta secuencia de síntesis se obtuvieron los compuestos **A9** y **A10** en rendimientos moderados. En el caso del compuesto **A10** se observó que la incorporación del grupo *tert*-butilo ocasionaba la aparición de señales que no se esperaban en RMN debido posiblemente a las distintas geometrías que puede adoptar el enlace N-C=O del grupo carbamato formado. Se observó que una de los isómeros está favorecido respecto al otro en proporción de 1.6:1.

Finalmente la desprotección de los grupos amino permitió obtener el compuesto **A2** como un aceite naranja en buen rendimiento.

Ante los resultados obtenidos, se decidió explorar la obtención del compuesto **A2c**. Se ensayó primero mediante el empleo del reactivo TREN sin proteger, obteniéndose en este caso el compuesto deseado aunque con algunas impurezas que dificultaron su purificación. De manera preliminar se plantea que este compuesto puede obtenerse sin necesidad de efectuar la reacción con el compuesto **A9**.

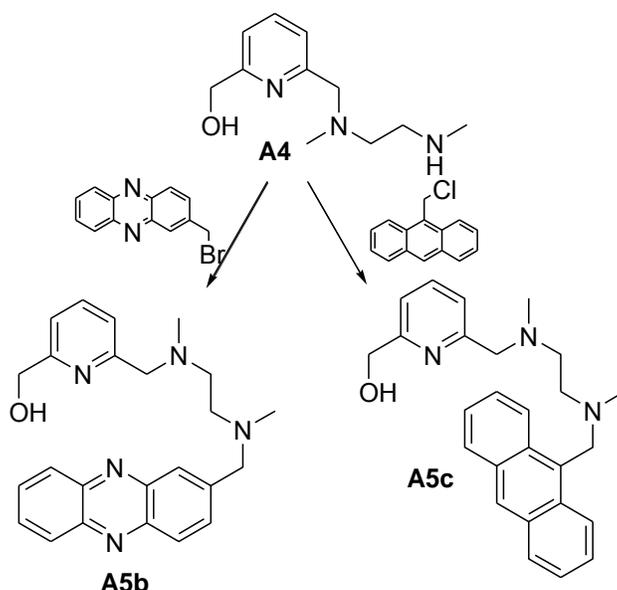


Esquema 4. Ruta de síntesis para la obtención del compuesto **A2c**.

## 5.2 Obtención del compuesto A6

En la preparación de los intermediarios para la obtención del compuesto **A6** se encontraron algunas dificultades. Para la obtención del compuesto IV, se encontró que era necesaria la adición lenta del compuesto **A3** a un exceso de la *N,N'*-dimetiletilendiamina (ver parte experimental), siendo ambos factores importantes para la obtención de este compuesto, ya que de lo contrario se obtiene la mezcla del compuesto deseado y del compuesto que incorpora dos moléculas de piridina.

En el siguiente paso se observó que el compuesto **A5** se formaba durante el curso de la reacción, sin embargo al aislarlo resultó ser inestable, oxidándose rápidamente según se pudo observar por espectrometría de masas y por RMN  $^1\text{H}$ . Ante esta situación se decidió explorar si la incorporación de otros núcleos tricíclicos permitía obtener compuestos estables. De esta manera se obtuvieron los compuestos **A5b** y **A5c** en buen rendimiento siendo ambos compuestos estables.



**Esquema 5.** Ruta de síntesis para la obtención de los compuestos **A5b** y **A5c**.

Se continuó la ruta sintética propuesta en el esquema 2, con el compuesto **A5c** en lugar del compuesto **A5**, obteniéndose el compuesto **A6c** como un aceite ligeramente ámbar. Los rendimientos obtenidos en esta secuencia de reacción son de moderados a buenos.

De esta forma se completó la obtención de estos derivados a los cuales solo restaría observar si pueden incorporar cationes metálicos y observar su comportamiento frente al ADN.

## 5.3. Ensayos de afinidad al ADN

Los ensayos de afinidad al ADN se realizaron por el método de diálisis de equilibrio. Este método permite tener información sobre la afinidad de cierto compuesto al ADN e incluso puede ser útil para determinar la selectividad por determinadas secuencias existiendo varios reportes en la literatura al respecto <sup>(3)</sup>. Una de las limitantes de este método es que no determina el modo de unión al ADN (por intercalación, unión a los surcos), pero permite discriminar de una manera relativamente rápida y sencilla si un compuesto se une al ADN.

Para ello se realizó primero la determinación del coeficiente de extinción de los compuestos a probar, en las condiciones a las cuales se efectuaría la cuantificación de los compuestos en el ensayo (tampón de fosfatos, 1% de SDS). Esto es importante realizarlo de esta forma, ya que la longitud de onda de máxima absorción y el coeficiente de extinción pueden variar según el medio en el que se encuentre el compuesto. Los coeficientes obtenidos se ilustran en la tabla 32.

**Tabla 32.** Datos espectroscópicos (UV) de los compuestos evaluados<sup>1</sup>

Compuesto	$\lambda$ max absorción (nm)	$\epsilon$ ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
<b>A7</b>	480	5680
<b>A7*</b>	513	5680
<b>A8</b>	367	8645
<b>A8*</b>	367	6750

<sup>1</sup> Las determinaciones se realizaron en tampón de fosfatos de fosfatos, excepto (\*) que se realizaron en tampón de fosfatos y 1% de SDS

Posteriormente se efectuó el ensayo de diálisis de equilibrio colocando en una bolsa de diálisis una solución de ADN (80 $\mu$ M) y dejando ésta en una solución 2.5  $\mu$ M del compuesto a evaluar (dializato) con agitación durante 24 hr y se determinó la concentración de los compuestos evaluados tanto en la bolsa de diálisis como en el dializato. Con estos datos se determinó la constante de unión aparente ( $K_{app}$ ) mediante la ecuación:

$$K_{app} = \frac{C_{bolsa} - C_{dializato}}{(C_{dializato})(C_{ADN})}, \text{ donde } C \text{ indica la concentración en } M$$

Los valores de la constante de unión aparente se ilustran en la tabla 33. Los experimentos se realizaron por triplicado. Como se puede apreciar el compuesto **A8** mostró tener menor afinidad por el ADN en comparación al bromuro de etidio (compuesto **A7**) sin embargo ambos valores son del orden de  $10^4$ , lo que de manera preliminar este compuesto se puede considerar para estudios más profundos para determinar la forma en que se une al ADN.

**Tabla 33.** Datos de afinidad al ADN de los compuestos **A7** y **A8**

Compuesto	$K_{app} \times 10^4$ ( $M^{-1}$ )
<b>A7</b>	5.52 ( $\pm 5\%$ )
<b>A8</b>	2.76 ( $\pm 3\%$ )

## 6. Conclusiones

Los objetivos planteados para la estancia se cumplieron dado que se obtuvieron dos compuestos con un núcleo tricíclico que incorporan una cadena que puede asociarse a cationes metálicos y se reconocieron algunas técnicas empleadas para la determinación de afinidad al ADN de compuestos de este tipo.

De los compuestos sintetizados, algunos de ellos novedosos, se realizó su elucidación estructural por métodos espectroscópicos y espectrométricos. El compuesto **A8** mostró tener afinidad por el ADN ligeramente menor al bromuro de etidio **A7** en el ensayo efectuado.

Por otra parte, las habilidades y conocimientos adquiridos durante la estancia me permiten reconocer nuevas estrategias en el diseño y síntesis de agentes intercalantes como potenciales fármacos antitumorales.

## 7. Parte experimental

### 7.1 Parte química

#### 7.1.1 Materiales y equipo

Todas las materias primas utilizadas en la síntesis se adquirieron comercialmente en grado reactivo.

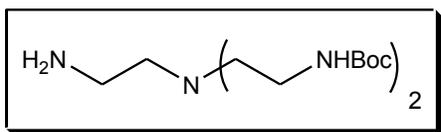
Los espectros de infrarrojo se determinaron en un aparato Perkin-Elmer FT-IR 1725X en solución de cloruro de metileno y sobre ventana de NaCl y se reportan en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizaron en un aparato Varian UNITY-300 y Varian-Mercury-V-X-300. Los desplazamientos químicos están dados en ppm ( $\delta$ ) y las constantes de acoplamiento (J) se reportan en Hertz (Hz). La multiplicidad de señales se expresa como s= señal simple, d= señal doble, t= señal triple, q= señal cuádruple, sa= señal simple ancha, dd= señal doble de doble, ddd= señal doble de doble de doble, m= señal múltiple. Se utilizó cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como disolvente a menos que se indique otra cosa y se usó su señal residual como referencia interna.

Los espectros de masas se determinaron por electrospray (ESI) en un espectrómetro Automass Multi GC/API/MS. El ion molecular se indica como  $\text{M}^+$ . La nomenclatura se indica como  $m/z$ = masa/carga con su respectiva abundancia relativa.

Para las cromatografías en columna se empleó gel de sílice Merck 60 malla 230-400. Los análisis cromatográficos se efectuaron en capa fina analítica siguiendo técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice Machery-Nagel  $\text{F}_{254}$  con un espesor de 0.2mm. Para la visualización de las placas se empleó una lámpara de luz UV y exposición a vapores de yodo.

#### 7.1.2 Descripción de las síntesis



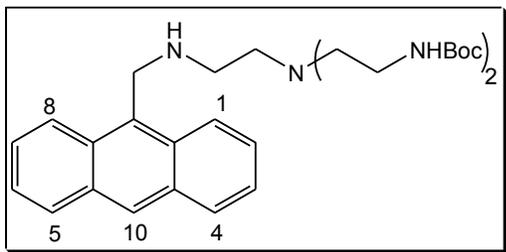
*Bis-[2-(tert-butoxycarbonylamino)etil]-(2-aminoetil)amina* (**A9**)<sup>200</sup> En un matraz de fondo redondo se añadieron 0.3 mL (1.92 mmol) de tris(2-aminoetil)amina y se disolvieron en 8 mL de THF anhidro. Esta solución se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  y se le añadió por goteo una solución de 1.00 g (4.06 mmol)

de Boc-ON en 10 mL de THF anhidro. La adición duró 45 minutos, posteriormente la mezcla de reacción se dejó a  $0^\circ\text{C}$  durante otros 15 minutos y se dejó en agitación a temperatura ambiente toda la noche formándose una solución ligeramente amarilla. Transcurrido el tiempo de reacción el disolvente se eliminó a presión reducida quedando un aceite amarillo, el cual se disolvió en 30 mL de acetato de etilo y se lavó con NaOH 0.5 N (2 x 10mL) y agua destilada (2 x 10 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio y se eliminó el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna flash ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  5/MeOH 1/TEA 0.25) para dar 350 mg (53 %) de un aceite incoloro.

IR (NaCl,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3400, 2976, 2918, 2849, 1688

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 1.43 (s, 18H, 2tBu), 2.67 (t, J= 5.8, 6H, 3CH<sub>2</sub>), 3.16 (q, J= 5.8, 6H, 3CH<sub>2</sub>), 5.02 (sa, 2H, 2CONH)

EM (ESI) 347( $\text{M}^+ +1$ , 100%), 210 ( $\text{M}^+ -136$ , 50%)



*Di-tert-butyl-2,2'-(2-(antracen-9-ilmetilamino)etilazanodii)bis(etano-2,1-diil)dicarbamato (A10)*. En un matraz de fondo redondo se colocaron 100 mg (0.5 mmol) de antracen-9-carbaldehído 173 mg (0.5 mmol) del compuesto **A9** y 10 mL de cloroformo. La solución ligeramente naranja se calentó a 40° C por 6h, observándose un cambio de coloración a amarillo, en este punto se eliminó el disolvente a

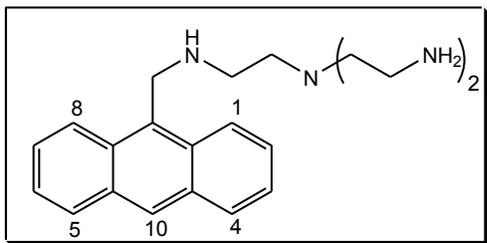
presión reducida y el aceite amarillo formado se disolvió en etanol y se añadió un exceso de NaBH<sub>4</sub> (200 mg, 5.4 mmol) y la reacción se dejó a temperatura ambiente toda la noche. Transcurrido el tiempo de reacción, se eliminó el disolvente a presión reducida y se añadieron 15 mL de agua destilada y se añadieron 5 mL de una solución saturada de NaCl. La suspensión blanca formada se extrajo con diclorometano (5 x 15 mL). Las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con agua destilada (2 x 10 mL) y se trataron con sulfato de magnesio. Se eliminó el disolvente quedando un aceite amarillo que se purificó por cromatografía en columna flash empleando como eluyente primero acetato de etilo hasta eliminar las impurezas de menor polaridad y después una mezcla AcOEt 95/ MeOH 10/ TEA 1 para obtener 174mg (65%) del producto deseado como un aceite ligeramente amarillo.

IR (NaCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2928, 2975, 1693, 1513, 1452, 1391, 1365, 1250, 1169

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ): 1.39, (s, 9H, tBu), 1.42 (s, 9H, tBu), 2.20 (t, J= 5.8, 1.45H N-CH<sub>2</sub>), 2.43 (t, J= 5.8, 2H, CH<sub>2</sub>-N), 2.62 (t, J= 5.8, 2H, AntCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>), 2.72 (t, J= 5.8, 2.72H, N-CH<sub>2</sub>), 2.76 (sa, 1.45H CH<sub>2</sub>NHCO), 3.20 (sa, 2.72H, CH<sub>2</sub>NHCO), 4.61 (s, 2H, AntCH<sub>2</sub>), 4.75 (sa, 0.6 H CONH), 5.38 (sa, 1.4H, CONH), 7.46 (ddd, J=8.7, 6.6, 0.9, 2H, H-3 y H-6), 7.53 (ddd, J=8.7, 6.6, 0.9, 2H, H-2 y H-7), 8.01 (d, J= 8.7, 2H, H-4 y H-5), 8.43 (sa, 1H, H-10), 8.44 (d, J= 8.7, H-1 y H-8)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ): 28.4, 38.7, 40.2, 47.1, 48.5, 51.4, 52.6, 53.6, 78.2, 124.5, 124.7, 125.9, 127.8, 129.2, 129.7, 131.1, 131.4, 156.0

EM (ESI) calculada para C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 537.3450, encontrada 537.3441



*N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>-bis(2-aminoetil)-N<sup>2</sup>-(antracen-9-ilmetil)etano-1,2-diamina (A2)*. En un matraz de fondo redondo se colocaron 100 mg (0.18 mmol) y se disolvieron en 3 mL de THF y se añadieron lentamente 1.0 mL de HCl concentrado y se dejó en agitación a temperatura ambiente por 6 hr. Transcurrido ese tiempo se eliminó el THF a presión reducida y la suspensión resultante se

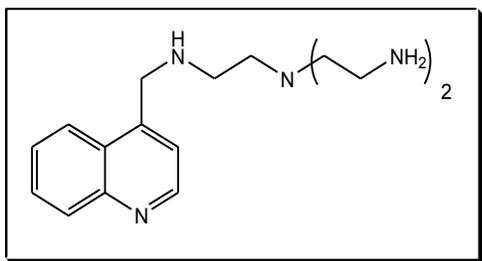
llevó a pH 10 con NaOH al 10%, se añadieron 5 mL de solución saturada de NaCl y la solución amarilla se extrajo con diclorometano (5 x 10 mL), las fases orgánicas se juntaron y se trataron con sulfato de magnesio y se eliminó el disolvente a presión reducida, el residuo resultante se disolvió en etanol absoluto y se concentró nuevamente para obtener 62 mg (89%) del producto deseado como un aceite naranja.

IR (NaCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>) 3368, 2917, 2849, 1579, 1445

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ): 2.08, (sa, 5H, 1NH y 2NH<sub>2</sub>), 1.42 (s, 9H, tBu), 2.09 (t, J= 5.8, 2H, AntNHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.48 (t, J= 5.8, 4H N-CH<sub>2</sub>), 2.72 (t, J= 5.8, 4H, CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 2.86 (t, J= 5.8, 2H, AntCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>), 4.64 (s, 2H, AntCH<sub>2</sub>), 7.48 (ddd, J=8.7, 6.6, 0.9, 2H, H-3 y H-6), 7.53 (ddd, J=8.7, 6.6, 0.9, 2H, H-2 y H-7), 8.01 (d, J= 8.7, 2H, H-4 y H-5), 8.45 (d, J= 8.4, H-1 y H-8), 8.47 (s, 1H, H-10)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ): 41.8, 45.1, 49.4, 49.8, 52.5, 124.2, 124.9, 126.0, 127.1, 129.1, 130.3, 131.5, 131.8

EM (ESI) calculada para  $C_{21}H_{28}N_4$  337.2386, encontrada 337.2419

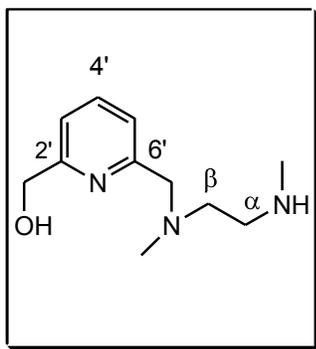


*N',N'-bis(2-aminoetil)-N²-(quinolin-4-ilmetil)etano-1,2-diamina (A2c)*. En un matraz de fondo redondo se colocaron 157 mg (1.0 mmol) de quinolin-4-carbaldehído, 0.7 mL (5.00 mmol) de tris(2-aminoetil) y 10 mL de etanol absoluto. La solución ligeramente naranja se dejó en agitación a temperatura ambiente por dos horas, observándose un cambio de coloración a amarillo, en este punto se añadió un exceso de

$NaBH_4$  (200 mg, 5.4 mmol) y la reacción se dejó a temperatura ambiente toda la noche. Transcurrido el tiempo de reacción, se eliminó el disolvente a presión reducida y se añadieron 15 mL de agua destilada y 5 mL de una solución saturada de NaCl. La suspensión blanca formada se extrajo con diclorometano (5 x 15 mL). Las fases orgánicas se juntaron y se lavaron con agua destilada (2 x 10 mL) y se trataron con sulfato de magnesio. Se eliminó el disolvente quedando 230 mg (80%) de un aceite amarillo. Se presentaron problemas de purificación del crudo de reacción, pero se pudieron identificar algunas constantes espectroscópicas y espectrométricas del producto deseado.

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 2.57-2.89 (m, 17H, 6 $CH_2$ , 2 $NH_2$ , 1 $NH$ ), 4.27 (s, 2H, Quin $CH_2NH$ ), 7.45 (d, 1H,  $J=4.1$  H-3), 7.55 (ddd,  $J=9.0, 6.6, 0.9$ , H-7), 7.71 (ddd,  $J=9.0, 6.6, 0.9$ , H-6), 8.85 (d,  $J=4.1$ , H-2)

MS (ESI) 288.00 ( $M^+ + 1$ , 100%)



*6-((metil(2-(metilamino)etil)amino)metil)piridin-2-il)metanol (A4)*. En un matraz de fondo redondo se colocaron 1.5 mL de *N,N'*-dimetiletilen-1,2-diamina (20 mmol), 400 mg de carbonato de potasio anhidro (2.9 mmol) y se suspendieron en 25 mL de acetonitrilo anhidro. A la suspensión formada se añadió lentamente y por goteo una solución de 300 mg (1.48 mmol) del compuesto **A3** disueltos en 20 mL de acetonitrilo anhidro. La adición a esta escala duró 3 hr. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 90 minutos tras los cuales se eliminó el acetonitrilo a presión reducida. Al residuo blanco se añadieron 10 mL de agua destilada y 5 mL de solución saturada de NaCl. La suspensión

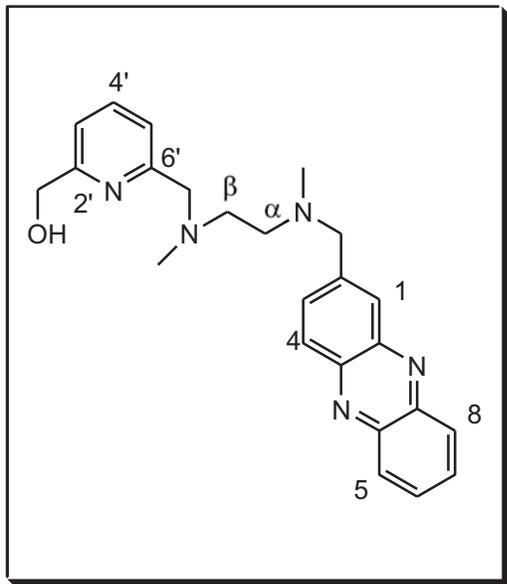
formada se extrajo con diclorometano (4 x 10 mL), las fases orgánicas se juntaron, se trataron con sulfato de magnesio y se eliminó el disolvente para dar 340 mg (90%) de un aceite ligeramente ámbar.

IR ( $NaCl$ ,  $CH_2Cl_2$ ,  $cm^{-1}$ ): 3330, 2849, 1595, 1457, 1071

RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 2.27 (s, 3H,  $NHCH_3$ ), 2.41 (s, 3H,  $NCH_3$ ), 2.57 (q,  $J=5.9$ , 2H,  $CH_2\alpha$ ), 2.67 (t,  $J=5.9$ , 2H,  $CH_2\beta$ ), 3.67 (s, 2H,  $PyCH_2N$ ), 4.71 (s, 2H,  $PyCH_2OH$ ), 7.10 (d,  $J=7.7$ , 1H, H-3'), 7.25 (d,  $J=7.7$ , 1H, H-5'), 7.63 (t,  $J=7.7$ , 1H, H-4')

RMN  $^{13}C$ . ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ ): 36.3, 42.6, 49.2, 56.6, 63.7, 64.0, 118.7, 121.4, 137.0, 158.3, 158.5

EM (ESI) 210 ( $M^+ + 1$ , 100%)



(6-((metil(2-(metil(fenazin-2-ilmetil)amino)etil)amino)metil)piridin-2-il)metanol (**A5b**). En un matraz de fondo redondo se colocaron 78 mg del compuesto IV (0.38 mmol), 100 mg (0.72 mmol) de carbonato de potasio anhidro y se suspendieron en 10 mL de acetonitrilo anhidro. A la suspensión formada se una solución de 100 mg (0.35 mmol) de 2-bromometilfenazina disueltos en 70 mL de acetonitrilo anhidro. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 48 horas tras las cuales se eliminó el acetonitrilo a presión reducida. Al residuo blanco se añadieron 10 mL de agua destilada y 5 mL de solución saturada de NaCl. La suspensión formada se extrajo con diclorometano (4 x 10 mL), las fases orgánicas se juntaron, se trataron con sulfato de magnesio y se eliminó el disolvente para dar un crudo de reacción que mostró dos manchas en cromatografía de capa fina. La purificación se realizó por cromatografía en columna flash empleando como

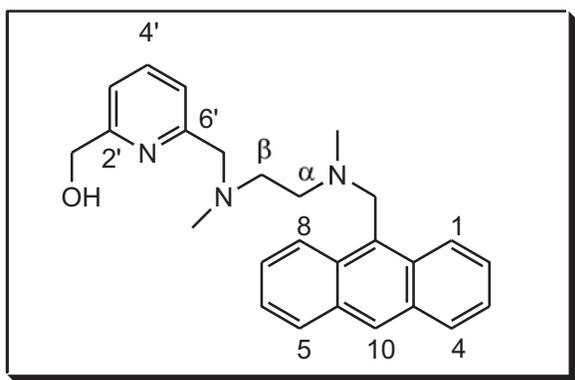
eluyente acetato de etilo para separar el producto de menor polaridad y una mezcla de AcOEt 10/ MeOH 2/ TEA 1 para eluir el producto de mayor polaridad. El producto minoritario de menor polaridad se identificó como fenazina-2-carbaldehído (por RMN  $^1\text{H}$  y EM) y el mayoritario (100 mg, 65 %) se aisló como un aceite ámbar y se identificó como el producto deseado.

IR (NaCl,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3465, 2918, 2849, 1658, 1594, 1513, 1458, 1363, 1069

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 2.30 (s, 6H,  $2\text{NCH}_3$ ), 2.68 (s, 4H,  $\text{CH}_2\alpha$  y  $\text{CH}_2\beta$ ), 3.71 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{Py}$ ), 3.78 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Fen}$ ), 4.72 (s, 2H,  $\text{PyCH}_2\text{OH}$ ), 7.07 (d,  $J=7.6$ , 1H, H-3'), 7.31 (d,  $J=7.6$ , 1H, H-5'), 7.60 (t,  $J=7.6$ , 1H, H-4'), 7.83 (m, 2H, H-6, H-7), 7.88 (dd,  $J=8.4, 1.8$ , 1H, H-3), 8.08 (sa, 1H, H-1), 8.16 (d,  $J=8.4$ , 1H, H-4), 8.24 (m, 2H, H-5 y H-8)

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 42.8, 55.4, 62.5, 63.5, 63.9, 118.6, 121.5, 128.1, 129.3, 129.5, 129.6, 130.1, 130.3, 132.6, 137.0, 140.5, 143.1, 158.1

EM (ESI) Calculada para  $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}$  402.2294, encontrada 402.2455



(6-(((2-((antracen-9-ilmetil)metil)amino)etil)metil)amino)metil)piridin-2-il)metanol (**A5c**). Se obtuvo de manera similar al compuesto **A5b** sustituyendo la 2-bromometilfenazina por 9-clorometilantraceno, aislándose como un aceite ámbar en un rendimiento de 75%.

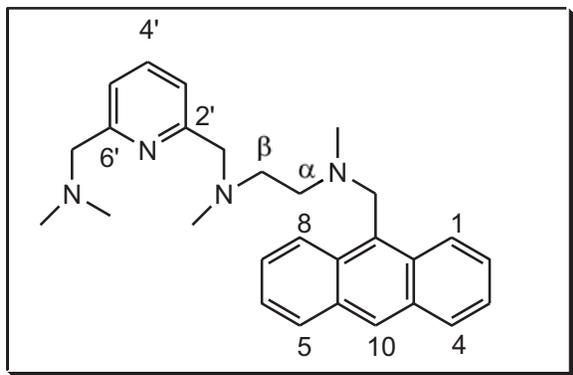
IR (NaCl,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2917, 2847, 2364, 1593, 1577, 1453, 1284, 1096

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 2.21 (s, 3H,  $\beta\text{NCH}_3$ ), 2.27 (s, 3H,  $\alpha\text{NCH}_3$ ), 2.70 (t,  $J=6.6$ , 2H,  $\text{CH}_2\beta$ ), 2.79 (t,  $J=6.6$ , 2H,  $\text{CH}_2\alpha$ ), 3.64 (s, 2H,  $\text{NCH}_2\text{Py}$ ), 4.46

(s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ant}$ ), 4.70 (s, 2H,  $\text{PyCH}_2\text{OH}$ ), 7.04 (d,  $J=7.6$ , 1H, H-3'), 7.14 (d,  $J=7.6$ , 1H, H-5'), 7.53 (t,  $J=7.6$ , 1H, H-4'), 7.45 (m, 4H, H-2, H-3, H-6 y H-7), 7.98 (d,  $J=7.6, 1.8$ , 2H, H-4 y H-5), 8.40 (sa, 1H, H-10), 8.50 (d,  $J=8.1$ , 2H, H-1 y H-8)

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 42.4, 42.8, 54.1, 55.5, 56.0, 63.5, 63.8, 118.4, 121.5, 124.7, 125.1, 125.5, 127.4, 128.9, 130.2, 131.3, 121.4, 136.9, 157.8, 158.4

EM (ESI) 400 ( $\text{M}^++1$ , 100%)



*N*<sup>1</sup>-(antracen-9-ilmetil)-*N*<sup>2</sup>-((6-((dimetil-amino)metil)piridin-2-il)metil)-*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>2</sup>-dimetil-etano-1,2-diamina (**A6c**). En un matraz de fondo redondo adaptado con una trampa de hidróxido de potasio, se colocaron 150 mg (0.375 mmol) del compuesto Vc y se agregaron 3 mL de cloruro de tionilo, la solución naranja formada se dejó en agitación por 12 hr. El cloruro de tionilo se eliminó obteniéndose un sólido cristalino de color naranja (se verificó la sustitución del grupo hidroxilo por el átomo de cloro por cromatografía en capa fina y RMN <sup>1</sup>H). El sólido obtenido se

disolvió en metanol y se añadieron por goteo 2.0 mL de una solución 2.0 M de dimetilamina en metanol (2.25 mmol) y se dejó en agitación durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de reacción se eliminó el metanol a presión reducida y el residuo aceitoso se purificó por cromatografía en columna flash empleando acetato de etilo hasta eliminar las impurezas de menor polaridad y el producto se eluyó con una mezcla AcOEt 95/TEA 5 para obtener 83 mg (70%) del producto deseado como un aceite ámbar.

IR (NaCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, cm<sup>-1</sup>): 2917, 2848, 2360, 2341, 1655, 1591, 1453

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ): 2.21 (s, 3H, βNCH<sub>3</sub>), 2.24 (s, 3H, αNCH<sub>3</sub>), 2.28 (s, 6H, NMe<sub>2</sub>), 2.69 (t, J= 6.6, 2H, CH<sub>2</sub>β), 2.80 (t, J= 6.6, 2H, CH<sub>2</sub>α), 3.56 (s, 2H, PyCH<sub>2</sub>NMe<sub>2</sub>), 3.67 (s, 2H, NCH<sub>2</sub>Py), 4.46 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ant), 7.18 (d, J= 7.6, 1H, H-3'), 7.23 (d, J= 7.6, 1H, H-5'), 7.54 (t, J=7,6, 1H, H-4'), 7.45 (m, 4H, H-2, H-3, H-6 y H-7), 7.98 (d, J= 7.6, 1.8, 2H, H-4 y H-5), 8.40 (sa, 1H, H-10), 8.50 (d, J= 8.1, 2H, H-1 y H-8)

RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ): 42.8, 42.3, 45.5, 54.1, 55.5, 56.0, 63.9, 65.7, 121.2, 124.7, 125.0, 125.6, 127.3, 128.9, 130.2, 131.4, 136.6, 158.3, 159.0

EM (ESI) Calculada para C<sub>28</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub> 427.2862, encontrada 427.2852

## 7.2 Ensayos de afinidad al ADN

### 7.2.1 Materiales y métodos

Las determinaciones de absorbancia en UV, se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer λ-18 y se emplearon celdas de cuarzo con capacidad de 0.6 mL y 3 mL. La composición del tampón de fosfatos fue 6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA sódico y 185 mM NaCl. Las bolsas de diálisis fueron adquiridas comercialmente (DispoDialyzer). Se empleó ADN de timo de ternera adquirido de la casa Sigma.

Para la realización de los ensayos de diálisis, se montó el sistema que se ilustra en la figura 5, colocándose 500 μL de una solución de ADN (80μM) en el interior de la bolsa de diálisis, la cual a su vez se colocó en la solución de dializato (solución 2.5 μM del compuesto a ensayar). Este sistema se dejó en agitación a temperatura ambiente y en oscuridad durante 24 horas, determinándose la concentración del compuesto ensayado en el interior de la bolsa de diálisis y en el dializato por espectrofotometría UV empleando los coeficientes de extinción y las longitudes de onda apropiados.

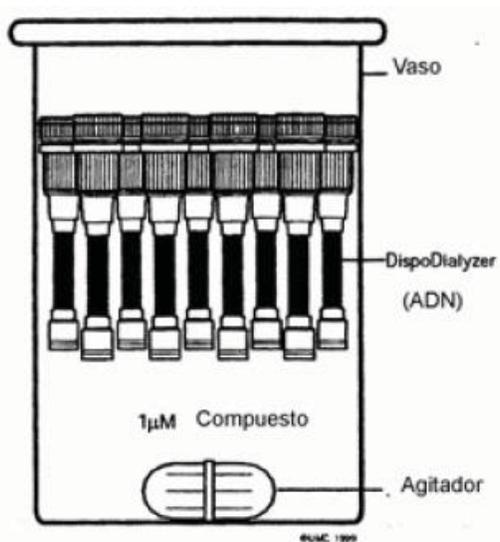


Figura 5. Disposición del sistema para los ensayos de diálisis

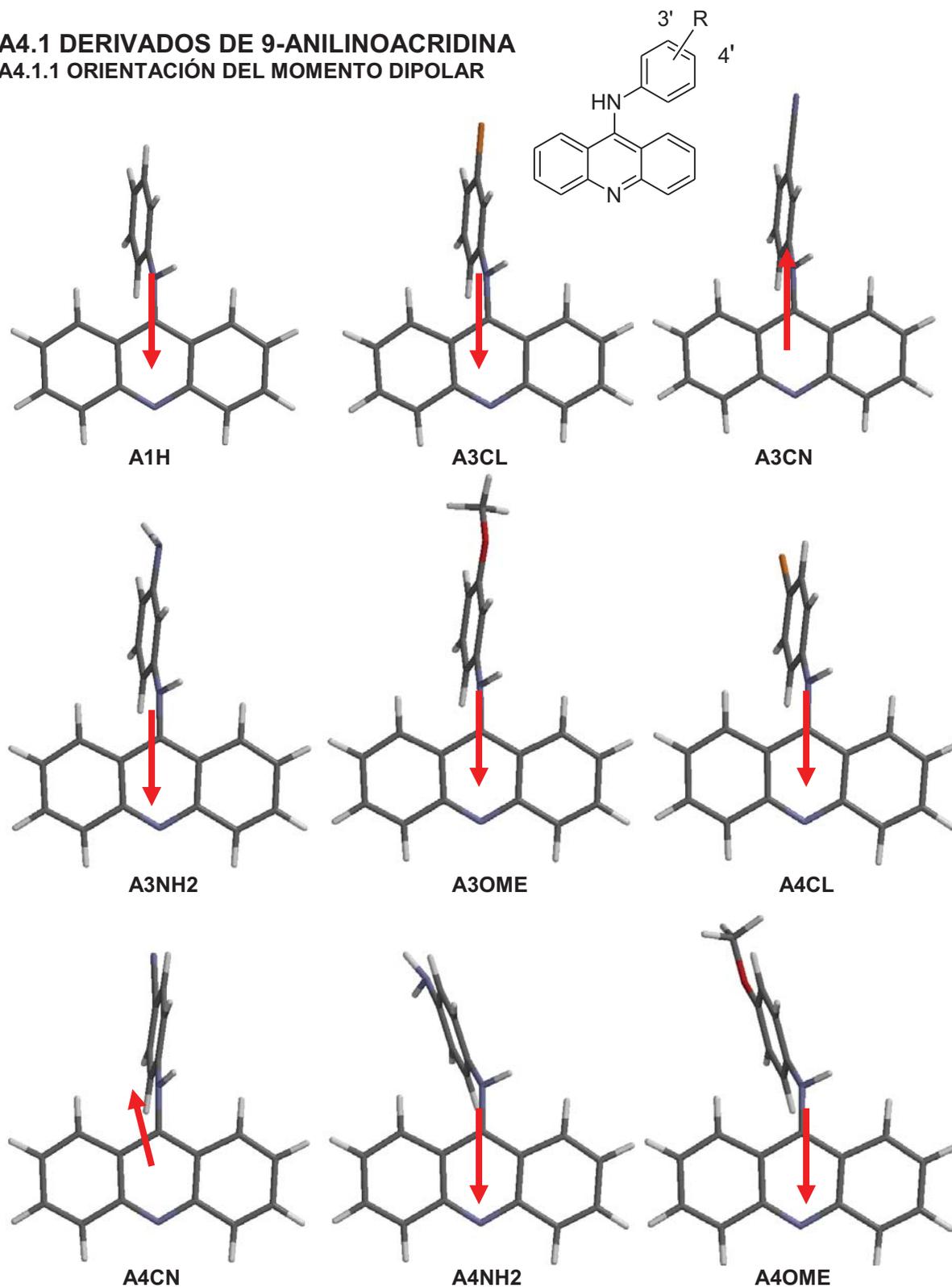
## 8. Bibliografía

199. Fabbrizzi, L., Licchelli, M., Rabaioli, G., Taglietti, A., *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, 205, 85
200. Scheffer, U., Strick, A., Ludwig, V., Peter, S., Kalden, E., Gobel, M.W., *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 211

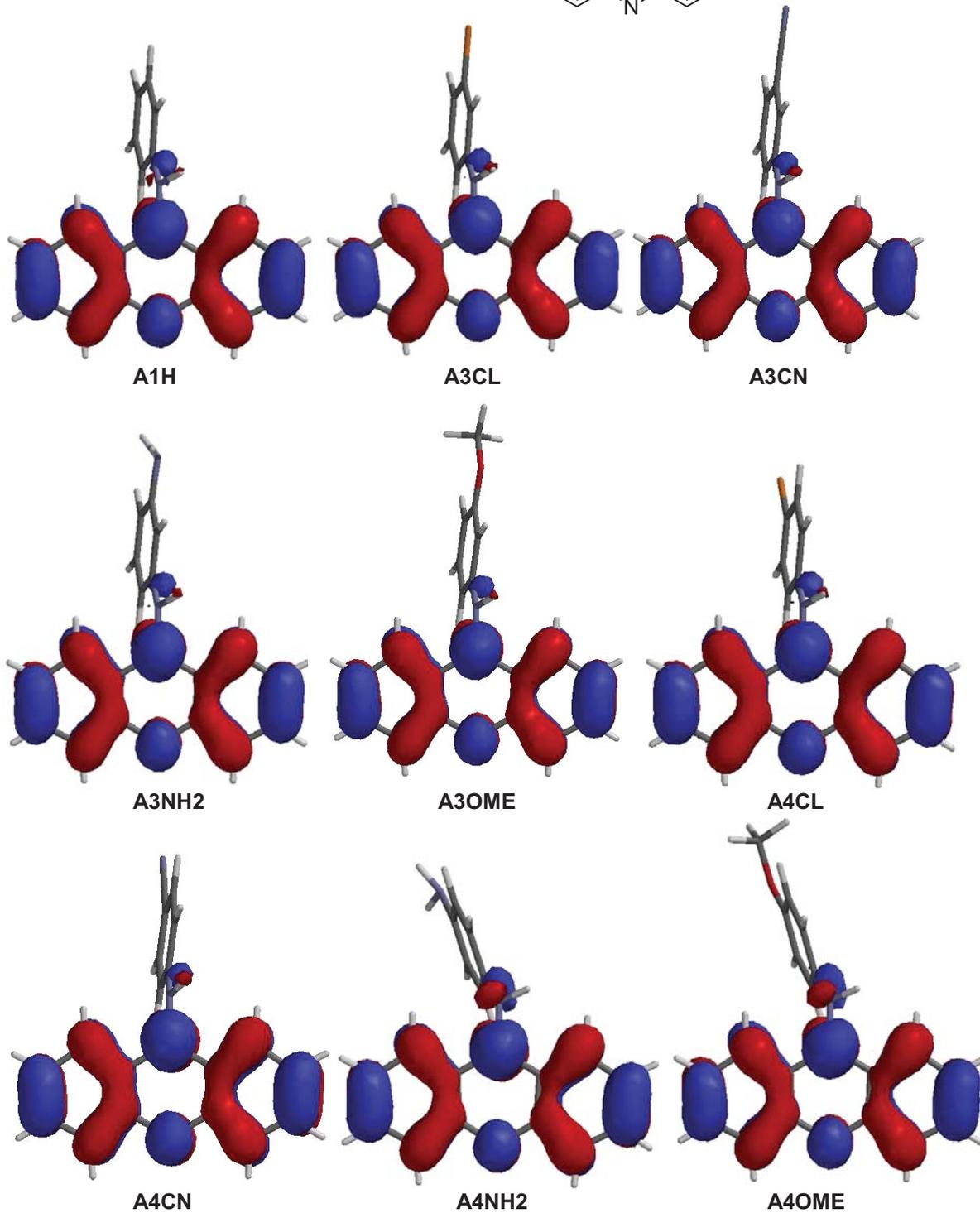
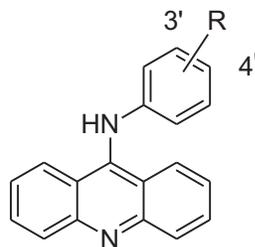
## ANEXO 4. IMÁGENES DE LOS COMPUESTOS ANALIZADOS COMO ENTIDADES AISLADAS

### A4.1 DERIVADOS DE 9-ANILINOACRIDINA

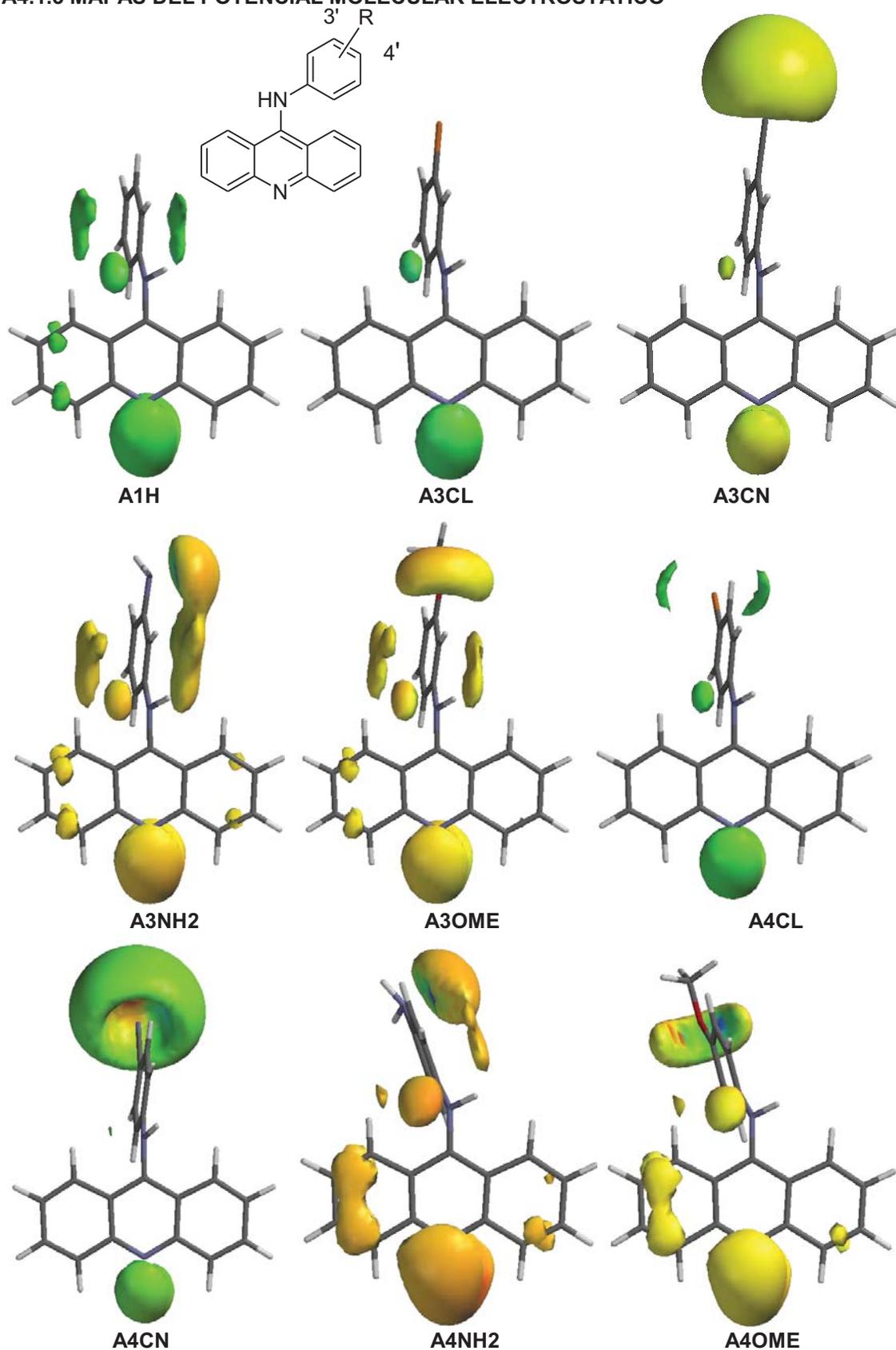
#### A4.1.1 ORIENTACIÓN DEL MOMENTO DIPOLAR



## A4.1.2 DISTRIBUCIÓN DE LOS ORBITALES LUMO

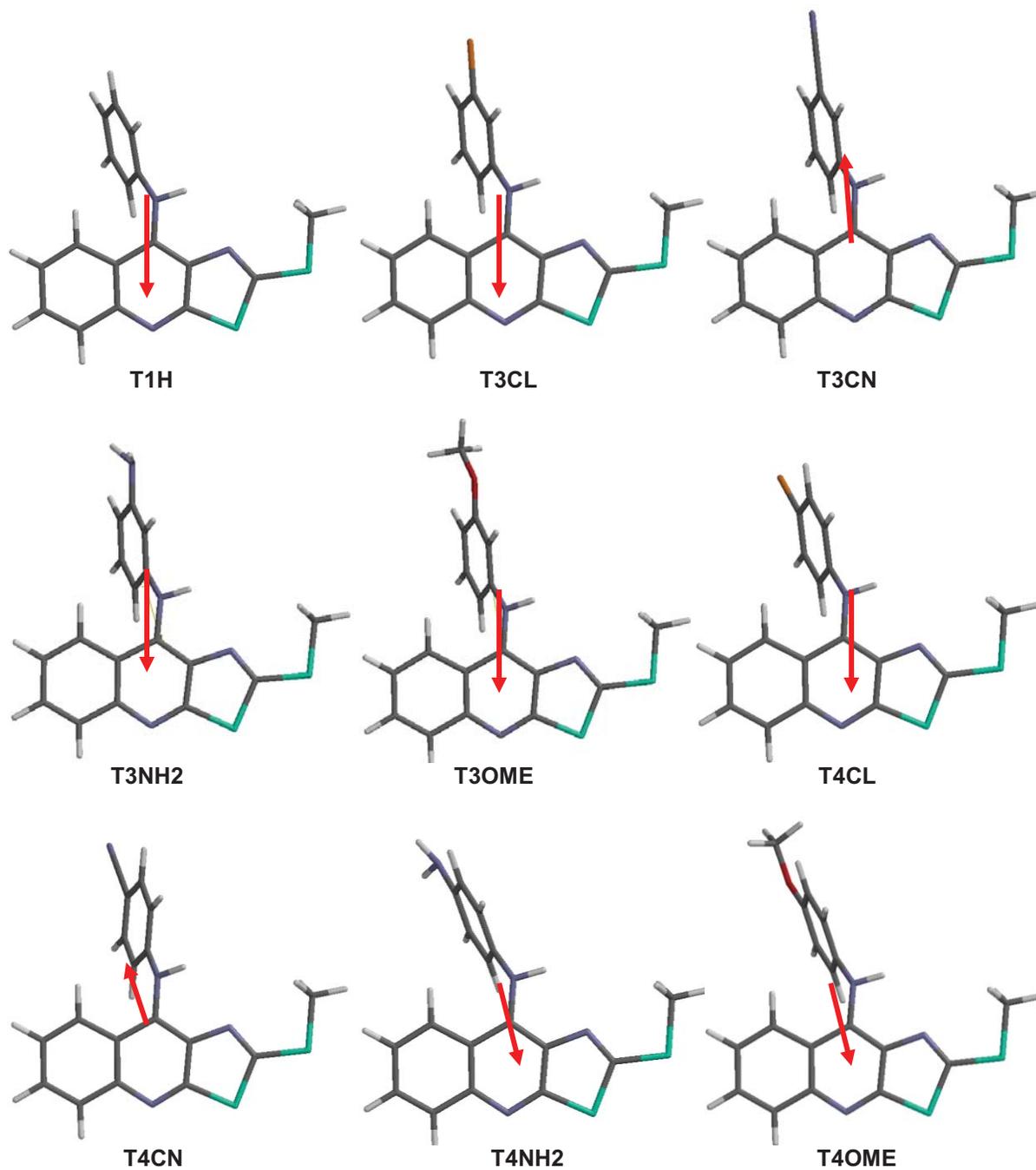
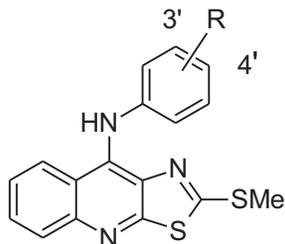


## A4.1.3 MAPAS DEL POTENCIAL MOLECULAR ELECTROSTÁTICO

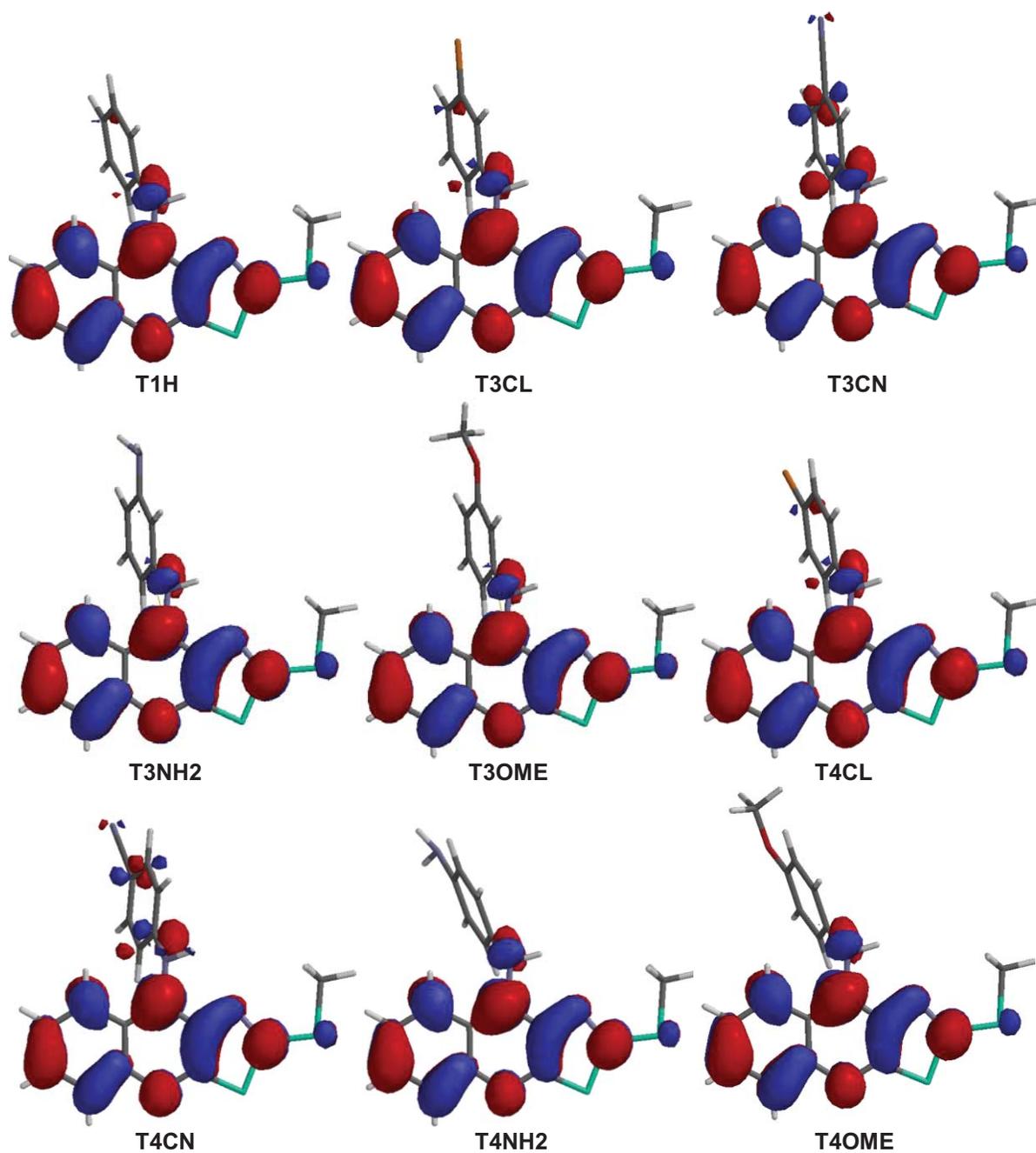
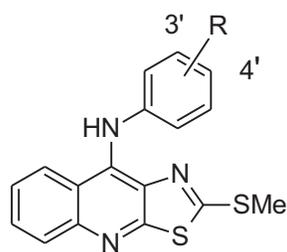


## A4.2 DERIVADOS DE 9-ANILINOTIAZOLO[5,4-B]QUINOLINAS

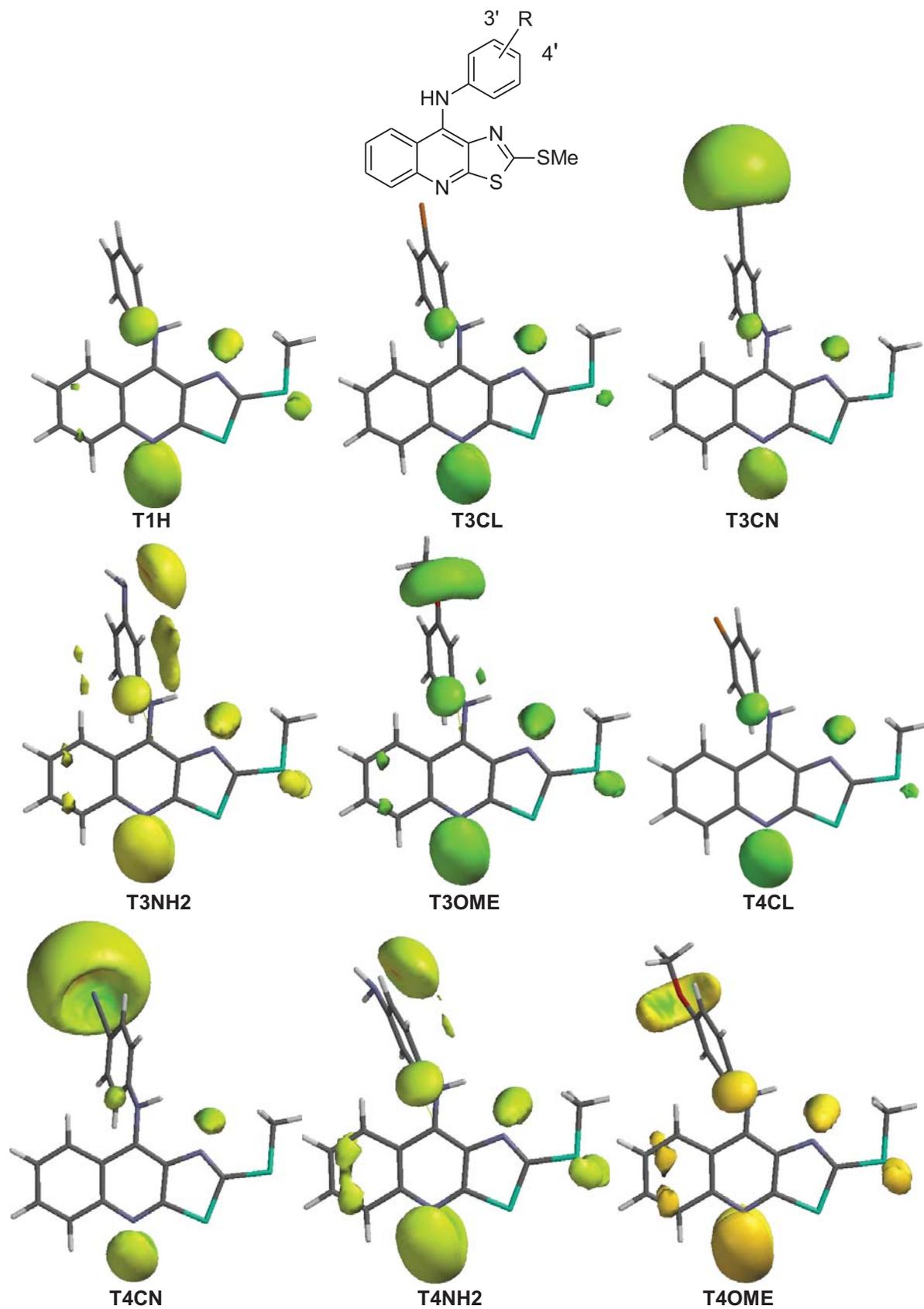
## A4.2.1 ORIENTACIÓN DEL MOMENTO DIPOLAR



## A4.2.2 DISTRIBUCIÓN DE LOS ORBITALES LUMO

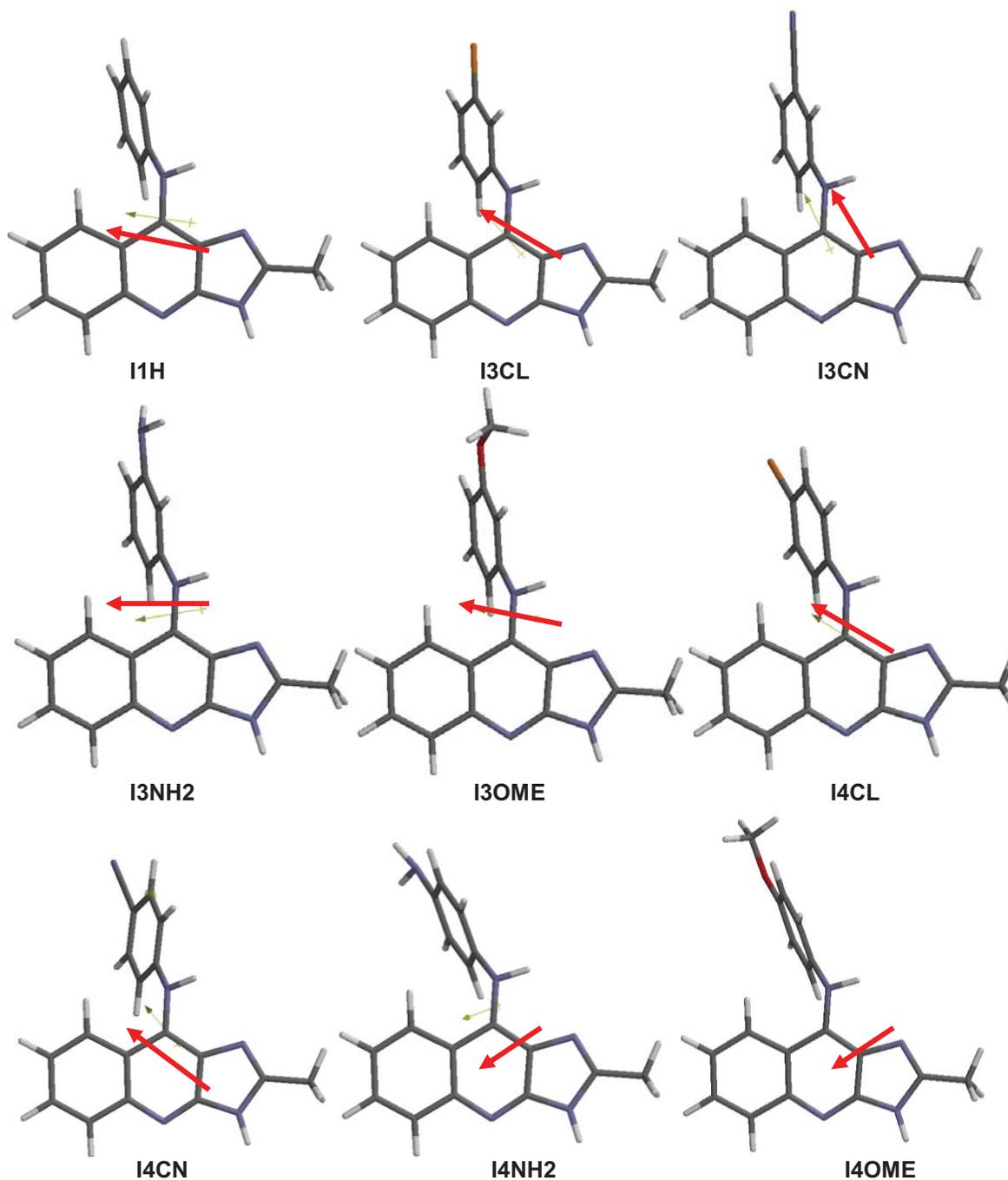
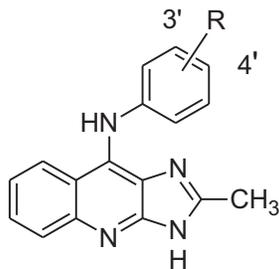


## A4.2.3 MAPAS DEL POTENCIAL MOLECULAR ELECTROSTÁTICO

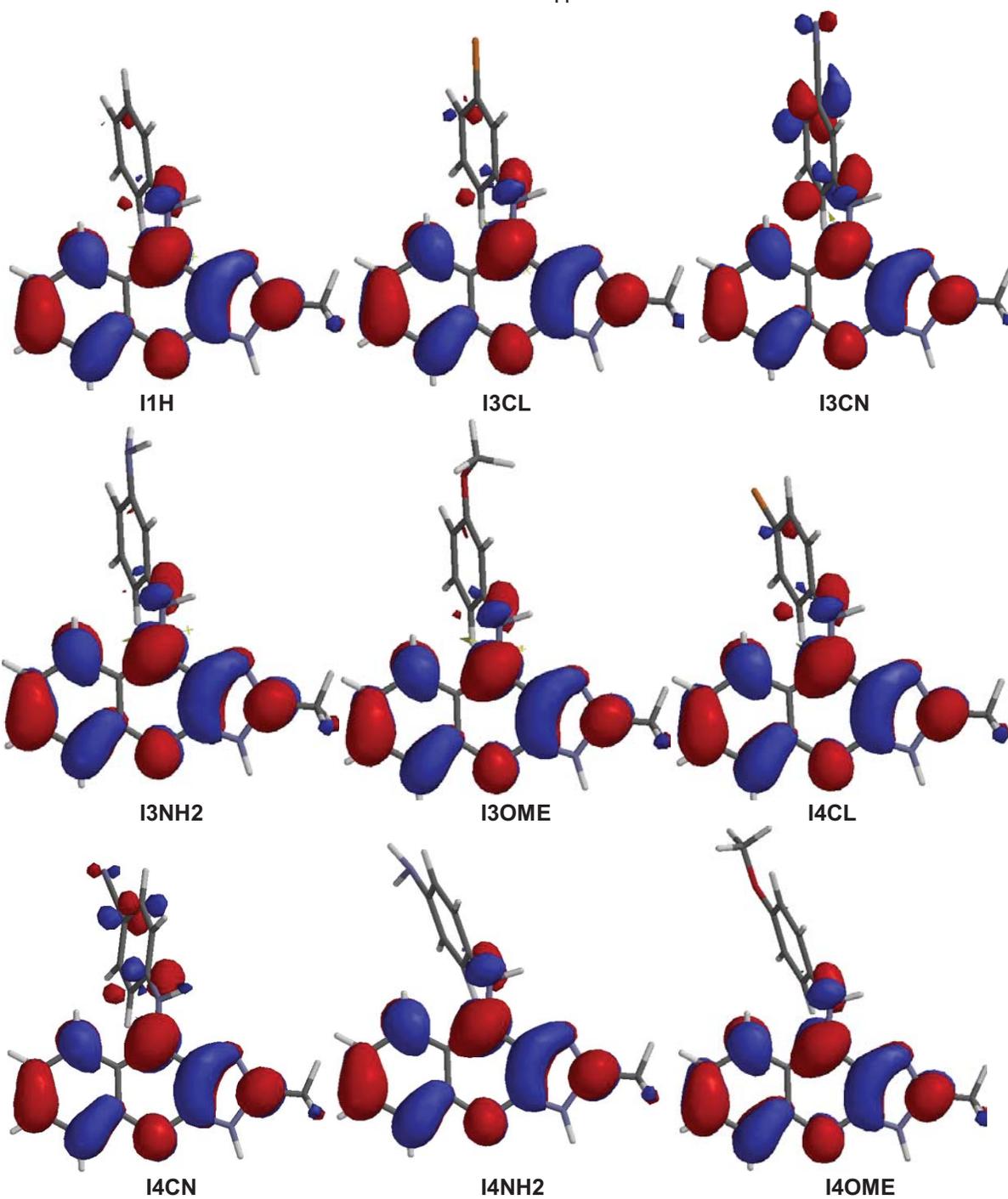
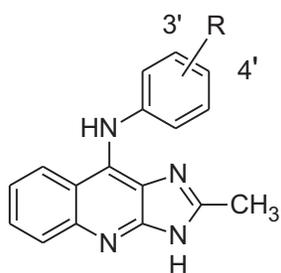


## A4.3 DERIVADOS DE 9-ANILINOIMIDAZO[4,5-B]QUINOLINA

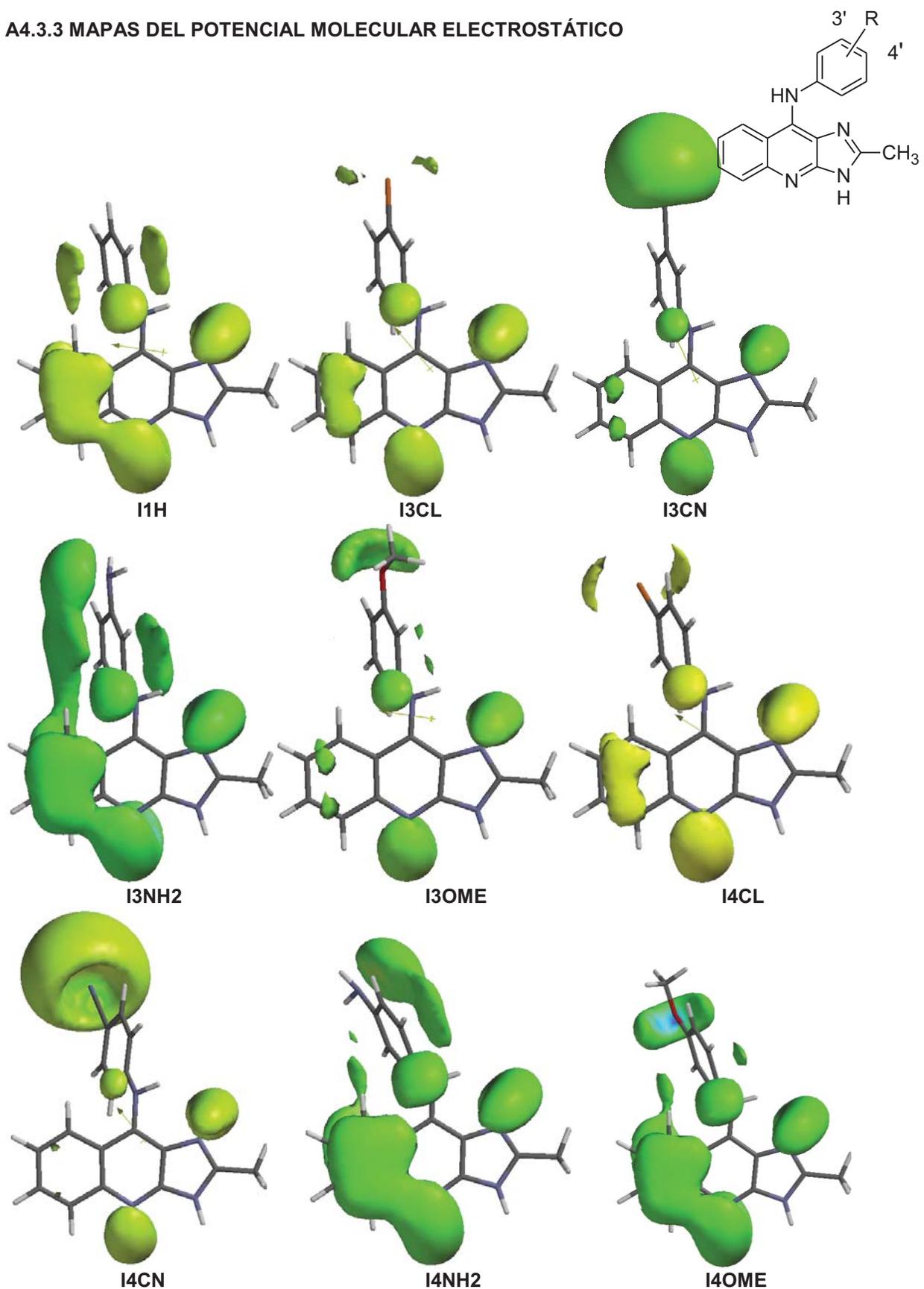
## A4.3.1 ORIENTACIÓN DEL MOMENTO DIPOLAR

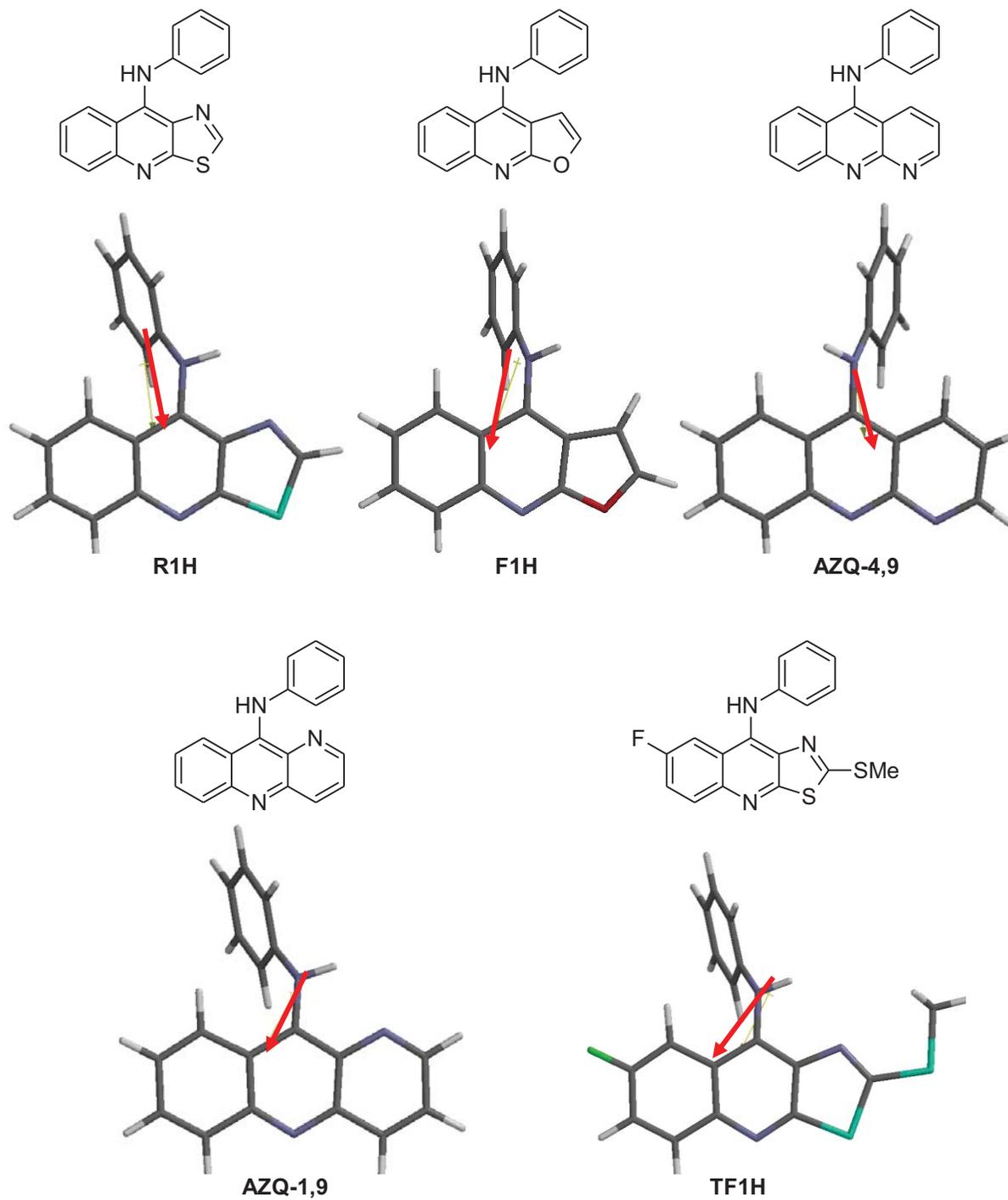


## A4.3.2 DISTRIBUCION DE LOS ORBITALES LUMO

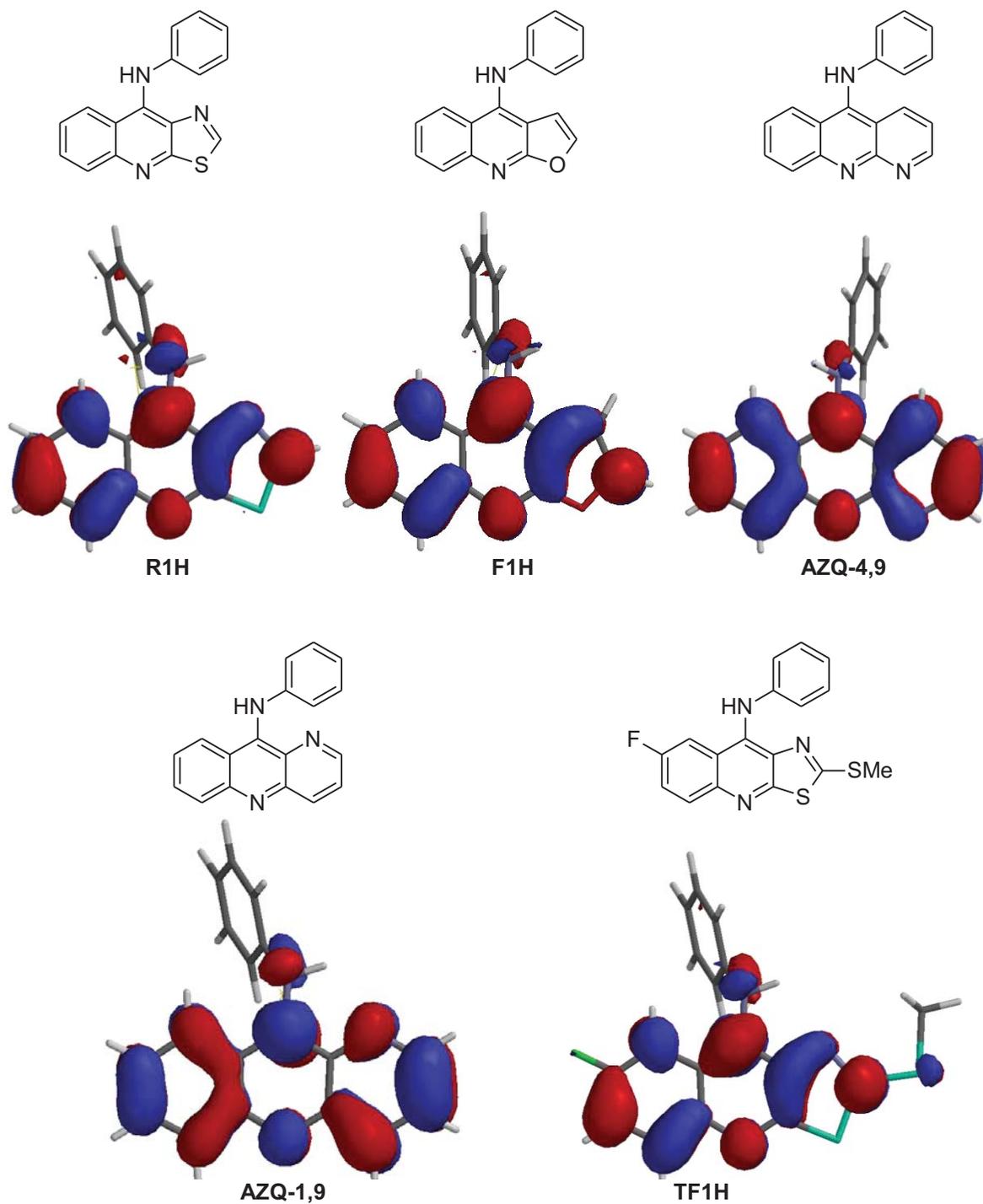


## A4.3.3 MAPAS DEL POTENCIAL MOLECULAR ELECTROSTÁTICO

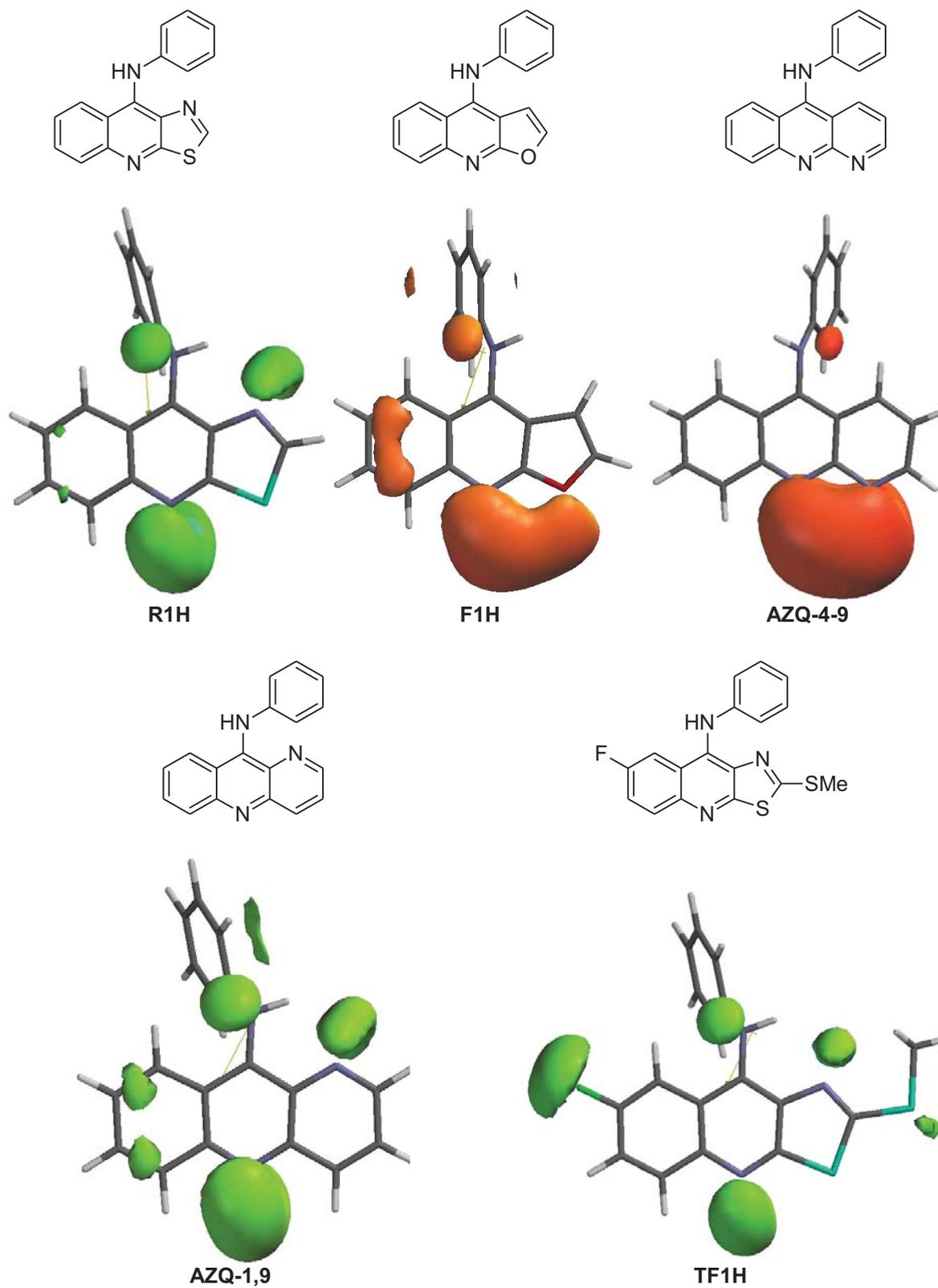


**A4.4 OTROS NÚCLEOS ESTUDIADOS****A4.4.1 ORIENTACIÓN DEL MOMENTO DIPOLAR**

## A4.4.2 DISTRIBUCIÓN DE LOS ORBITALES LUMO



## A4.4.3 MAPAS DEL POTENCIAL MOLECULAR ELECTROSTÁTICO

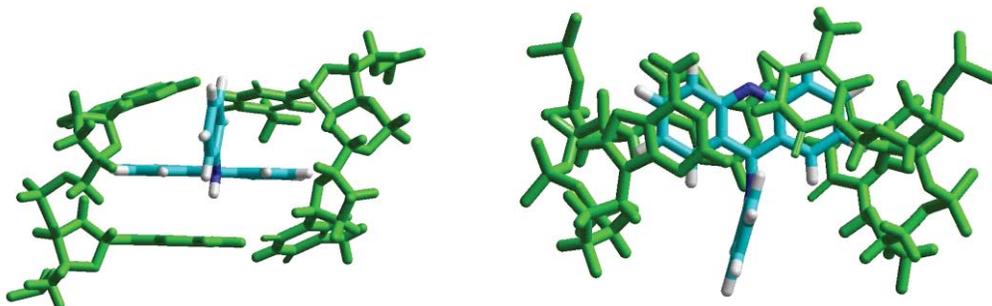


## ANEXO 5. IMÁGENES DE LOS COMPLEJOS DE INTERCALACIÓN

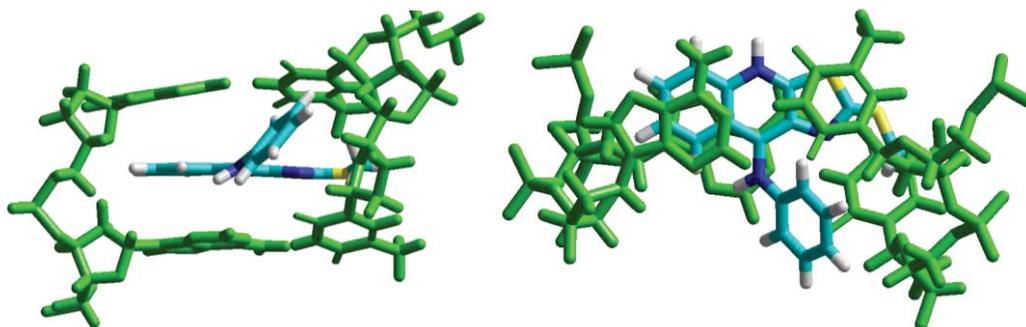
Se muestra únicamente la vista del agente tricíclico y las bases adyacentes a éste, desde el surco menor y desde la dirección 5'

### A5.1 SECUENCIA AA

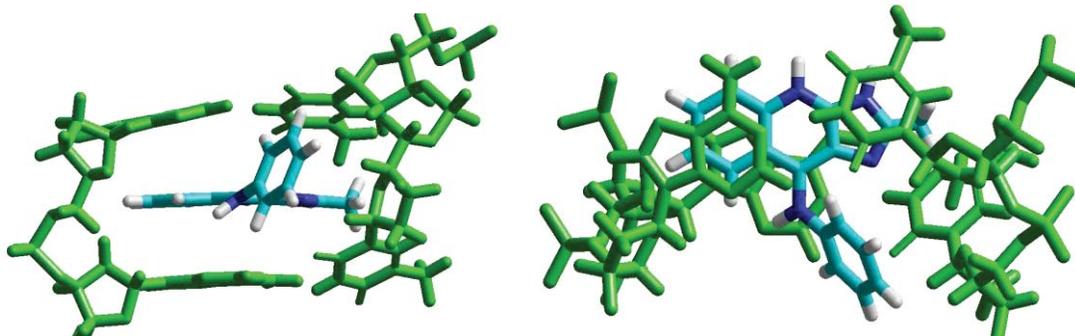
SERIE A



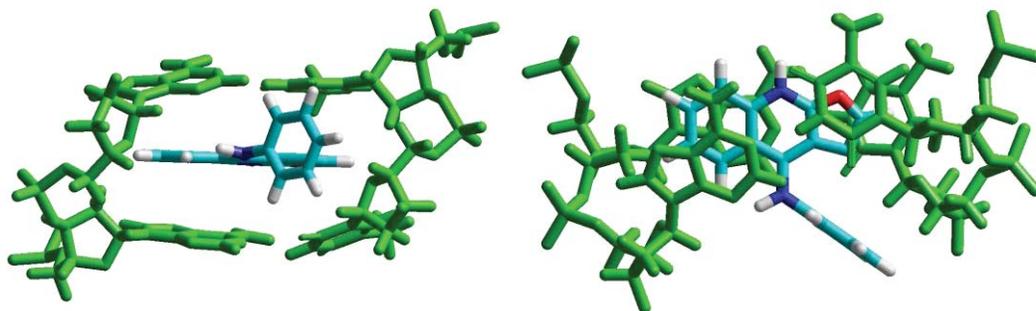
SERIE T



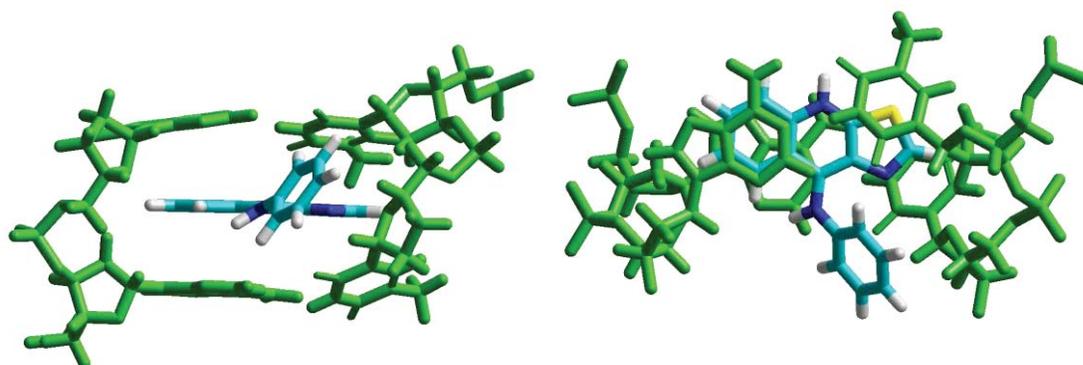
SERIE I



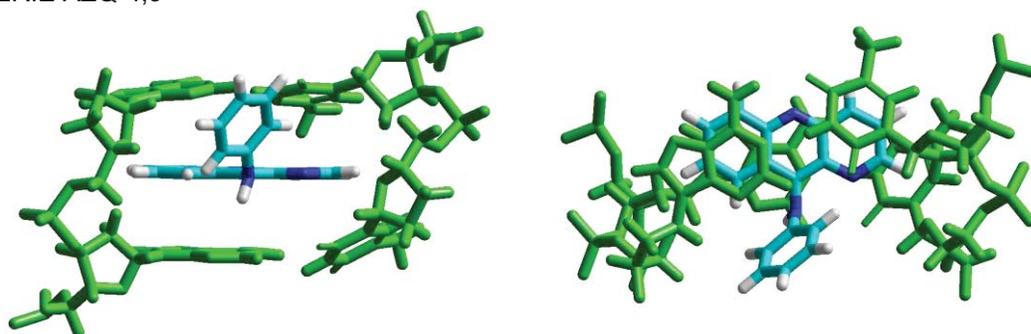
SERIE F



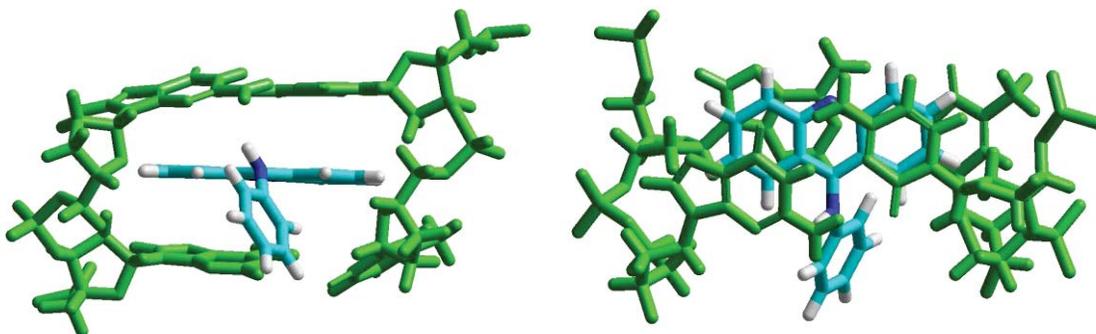
SERIE R



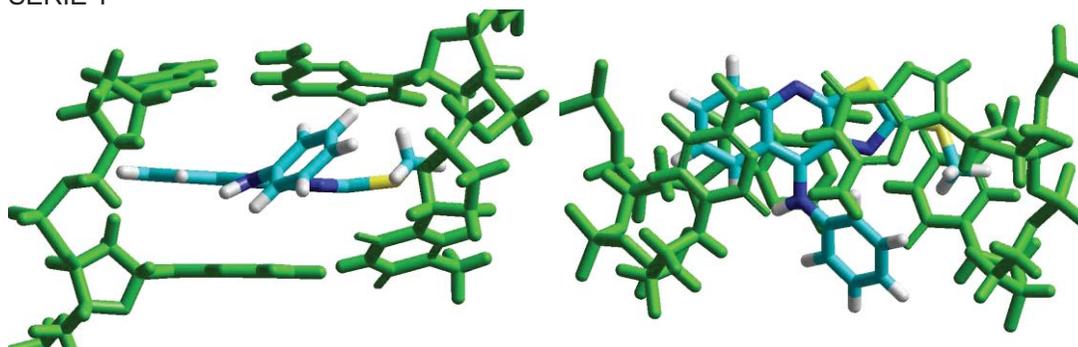
SERIE AZQ-4,9



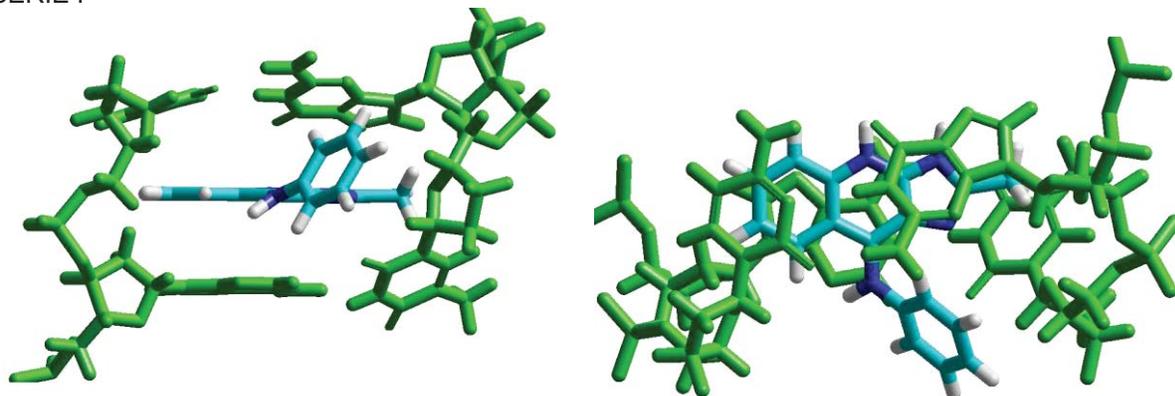
A5.2 SECUENCIA AC  
SERIE A



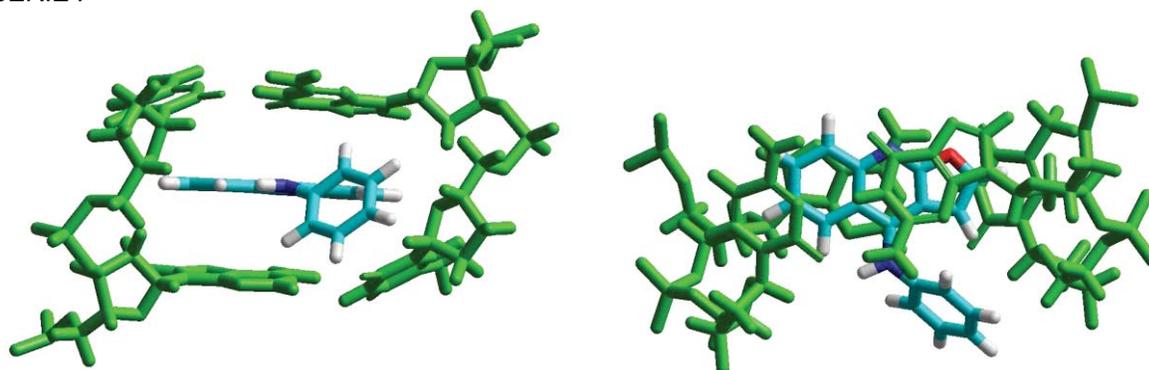
SERIE T



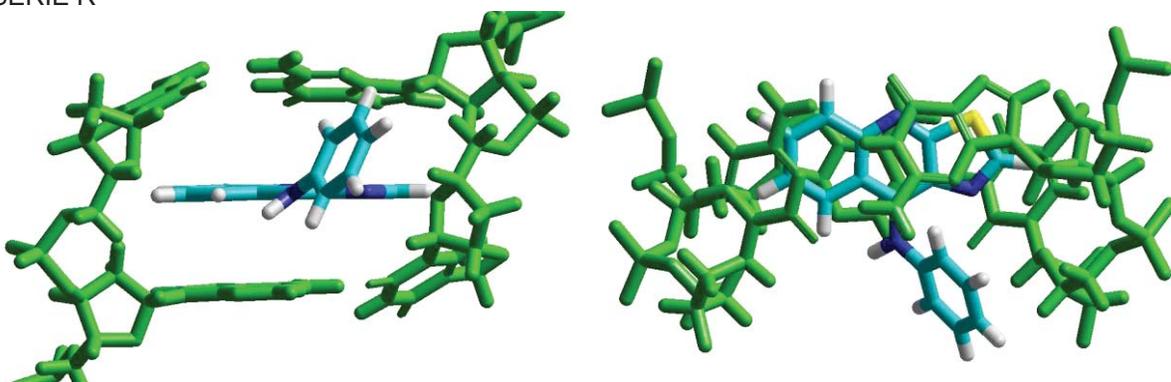
SERIE I



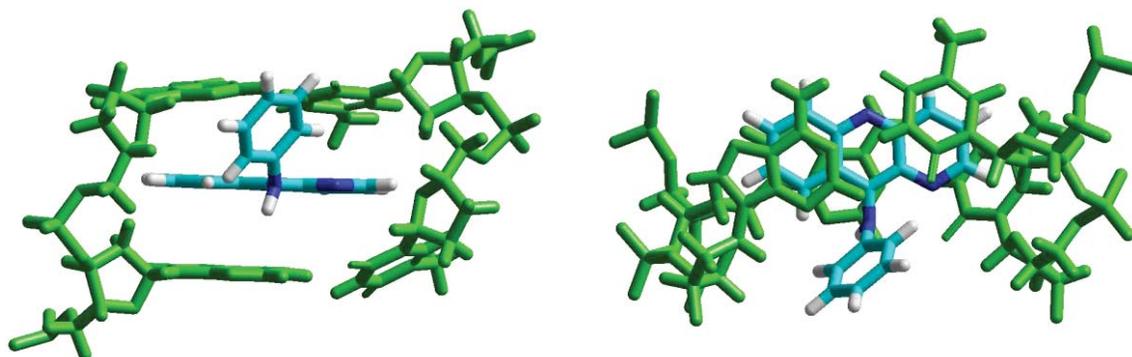
SERIE F



SERIE R

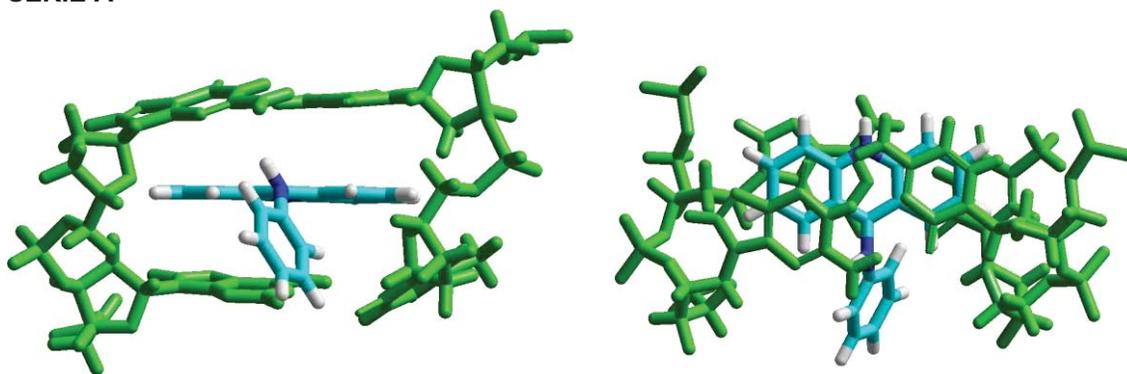


SERIE AZQ-4,9

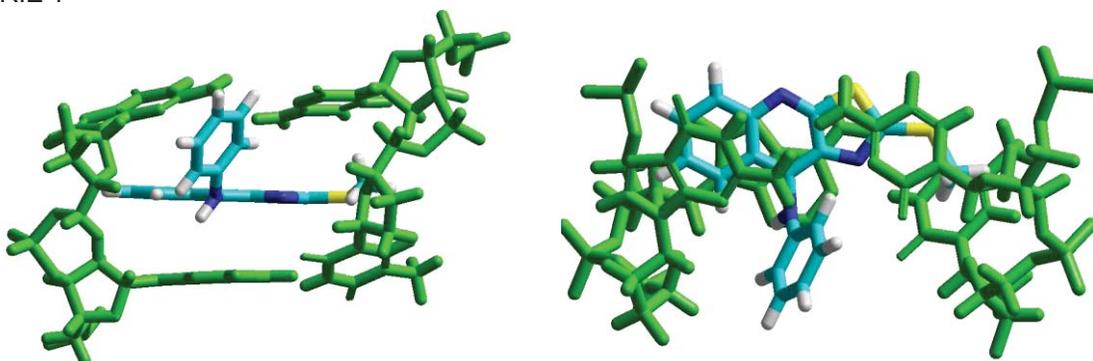


A5.3 SECUENCIA AG

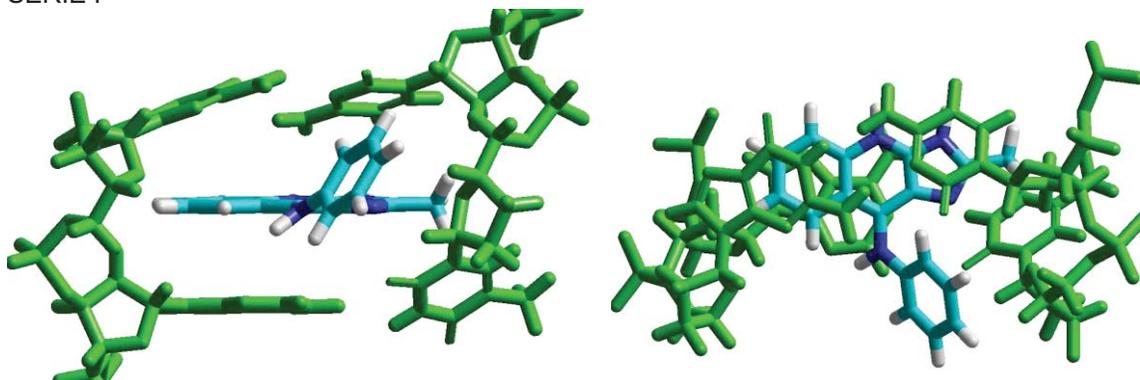
SERIE A



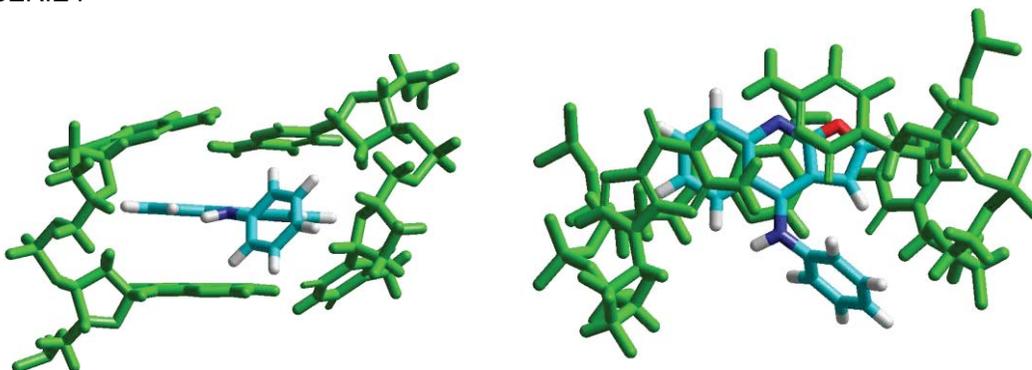
SERIE T



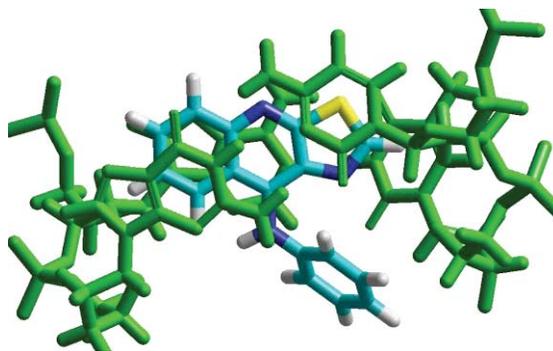
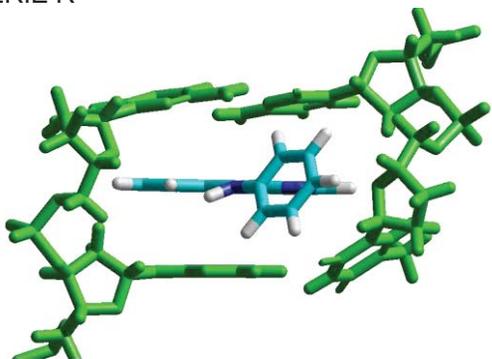
SERIE I



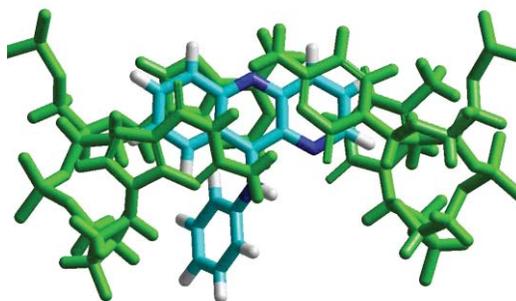
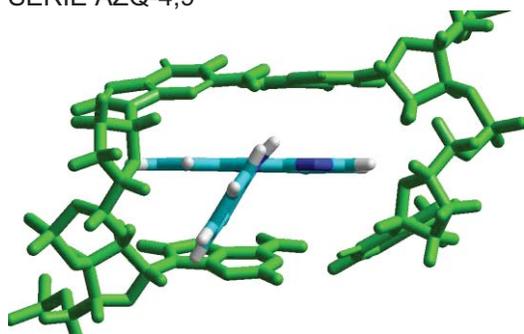
SERIE F



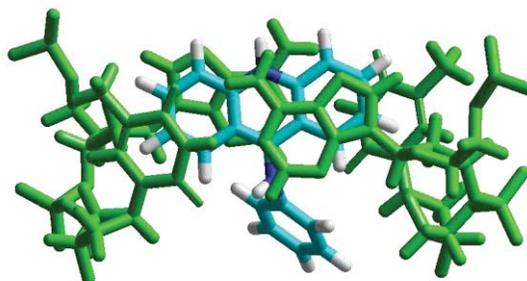
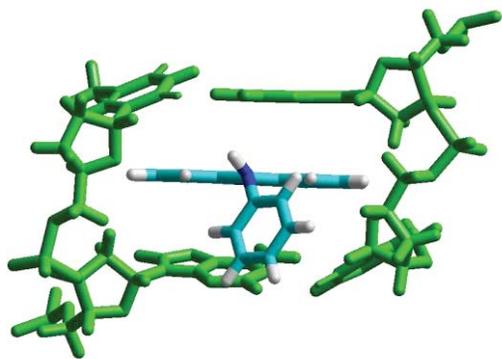
SERIE R



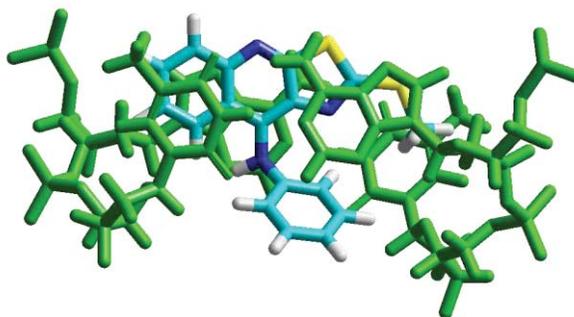
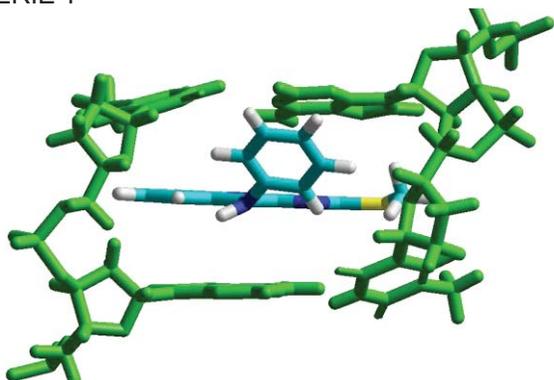
SERIE AZQ-4,9



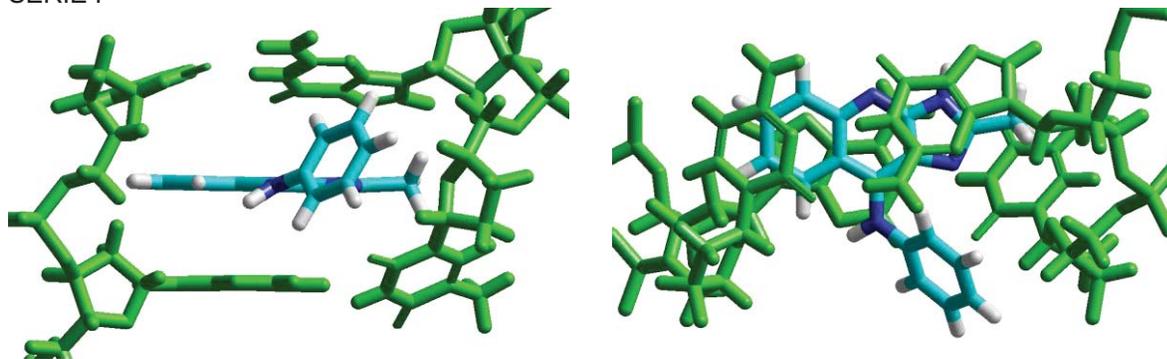
A5.4 SECUENCIA AT  
SERIE A



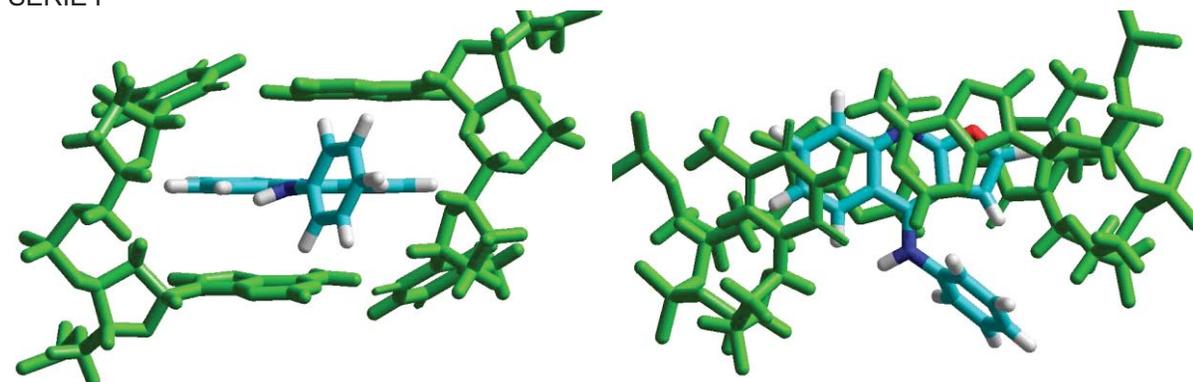
SERIE T



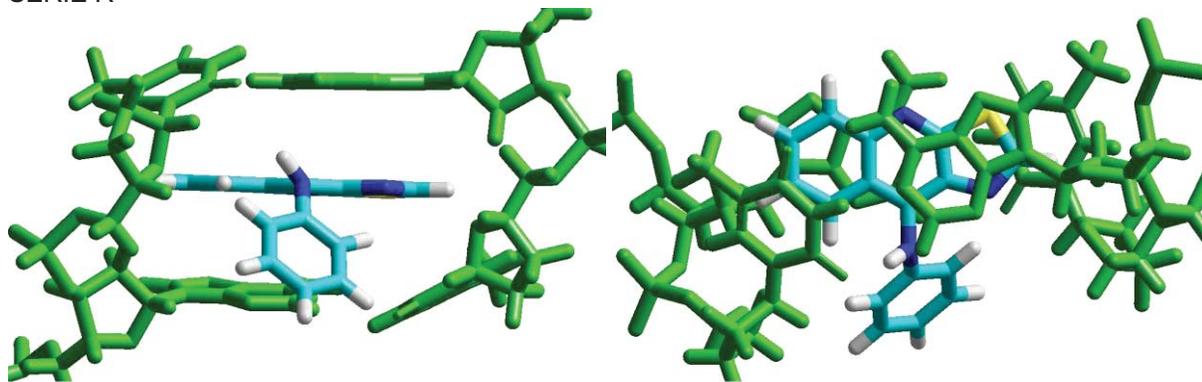
SERIE I



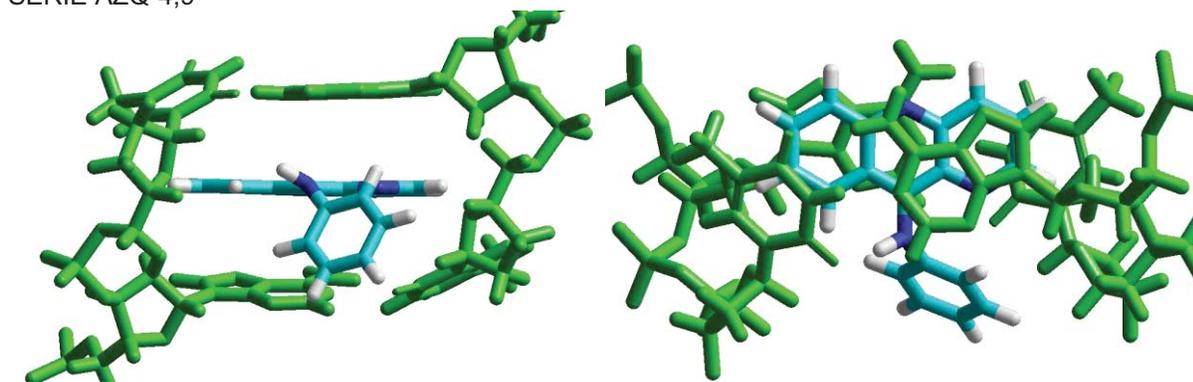
SERIE F



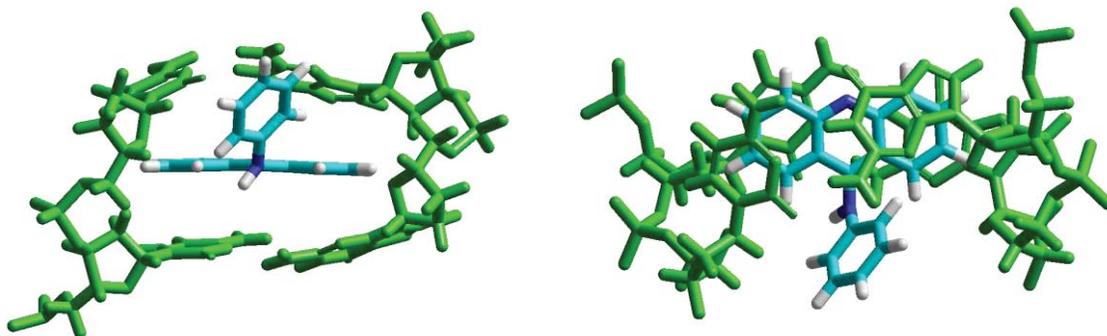
SERIE R



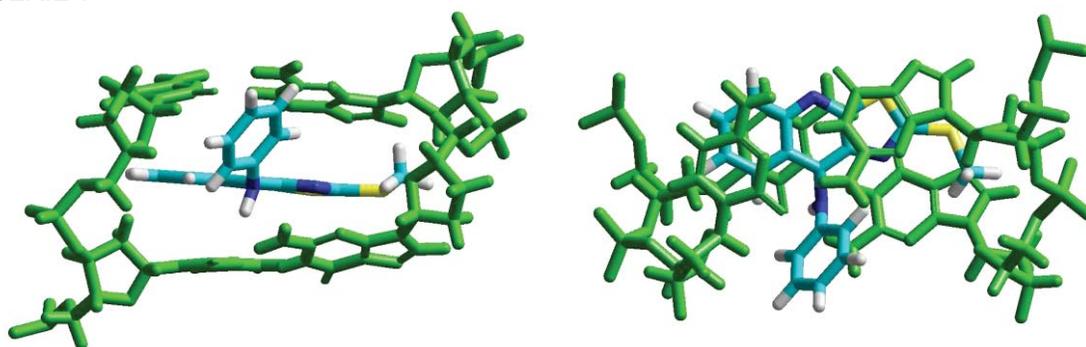
SERIE AZQ-4,9



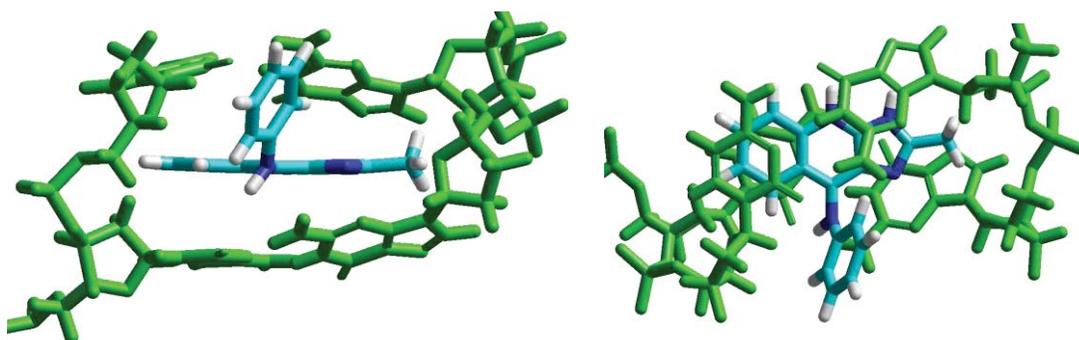
**A5.5 SECUENCIA CC**  
**SERIE A**



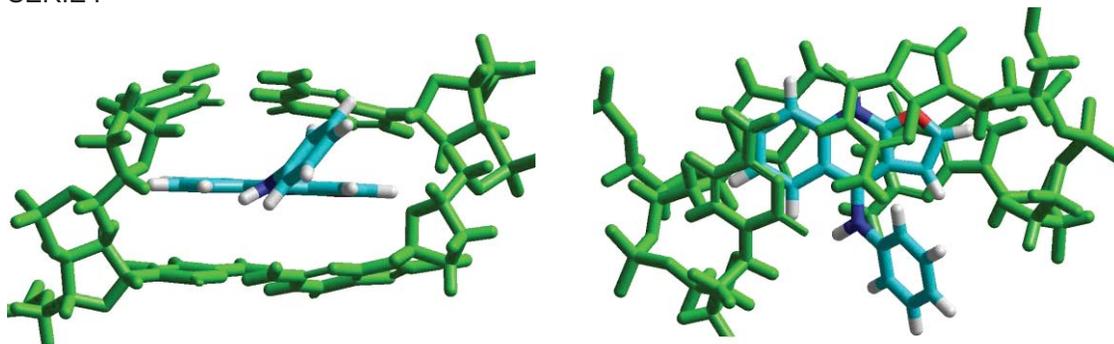
SERIE T



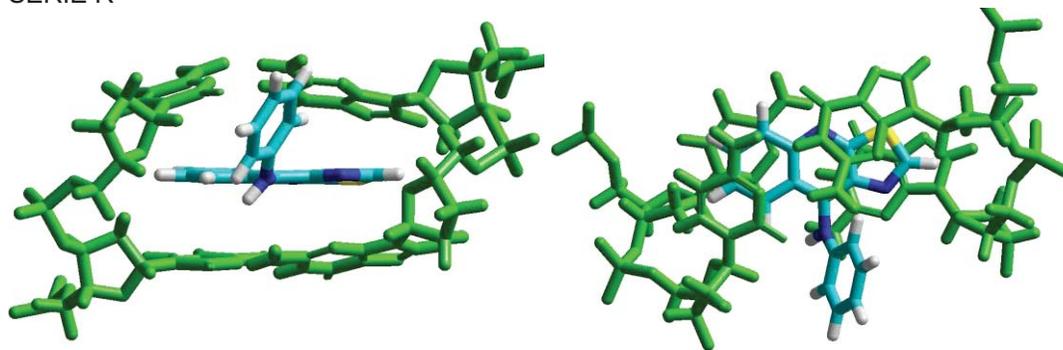
SERIE I



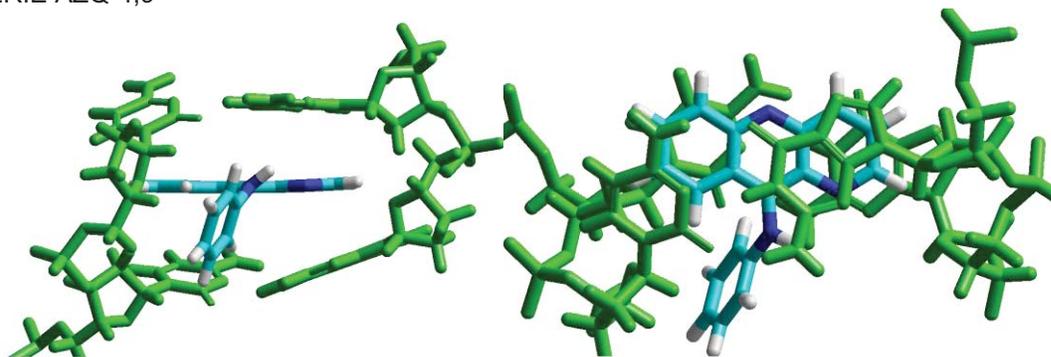
SERIE F



SERIE R

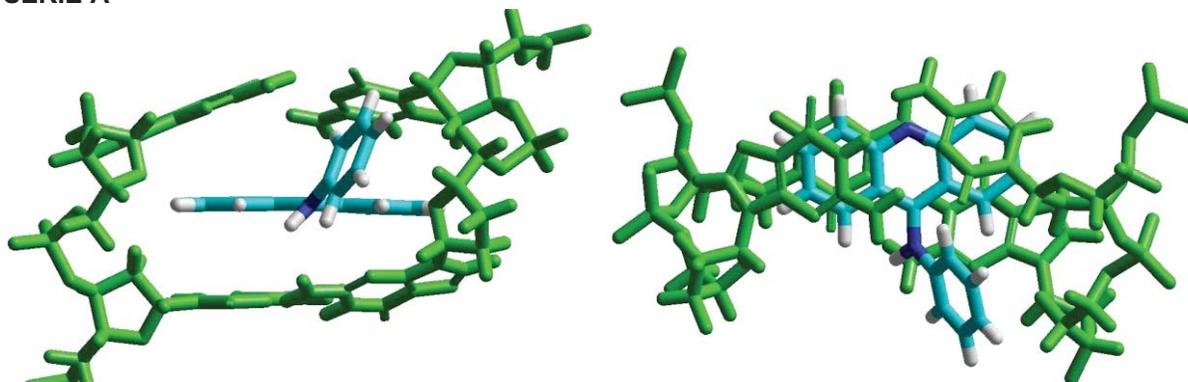


SERIE AZQ-4,9

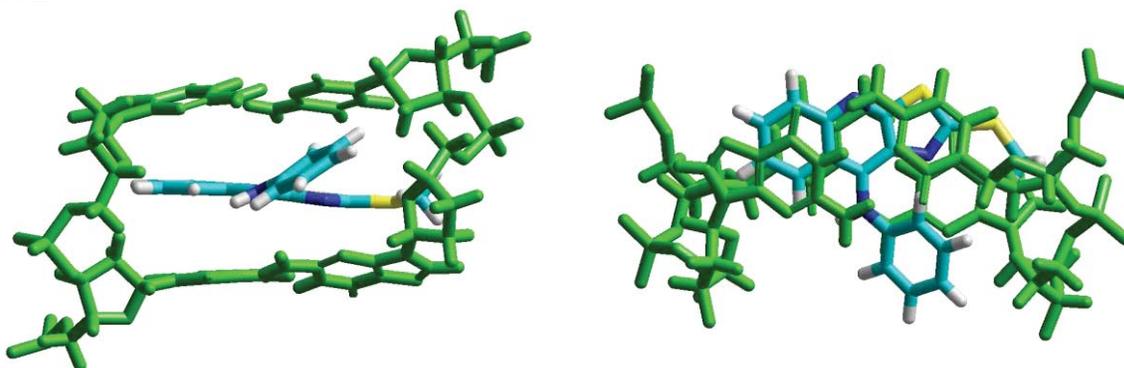


**A5.6 SECUENCIA CG**

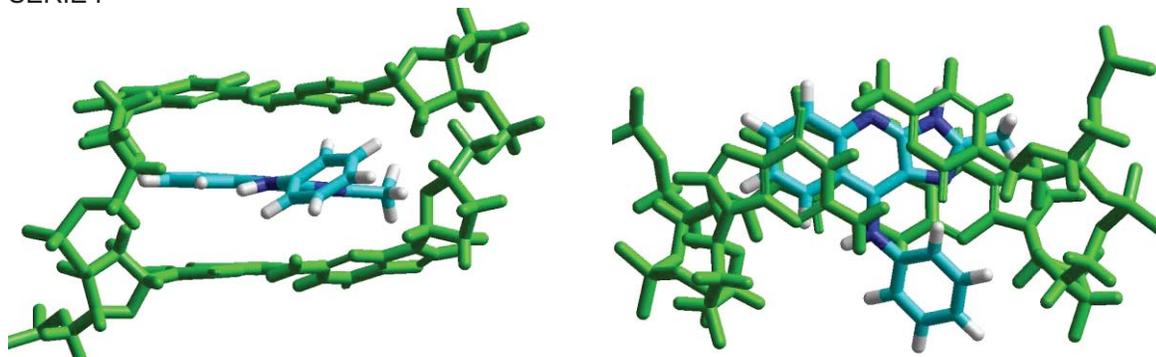
SERIE A



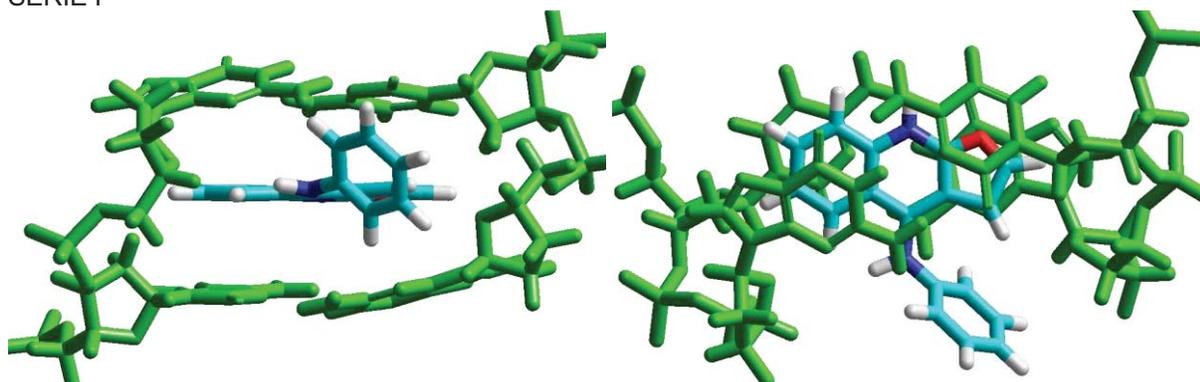
SERIE T



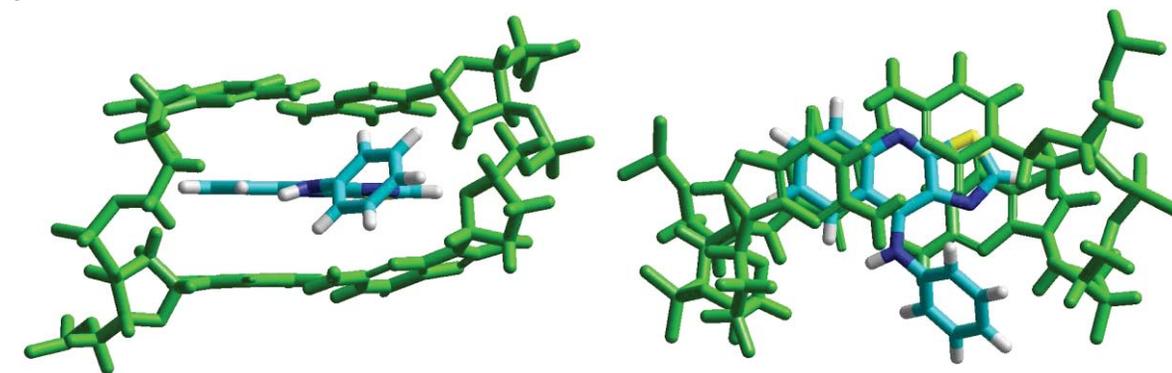
SERIE I



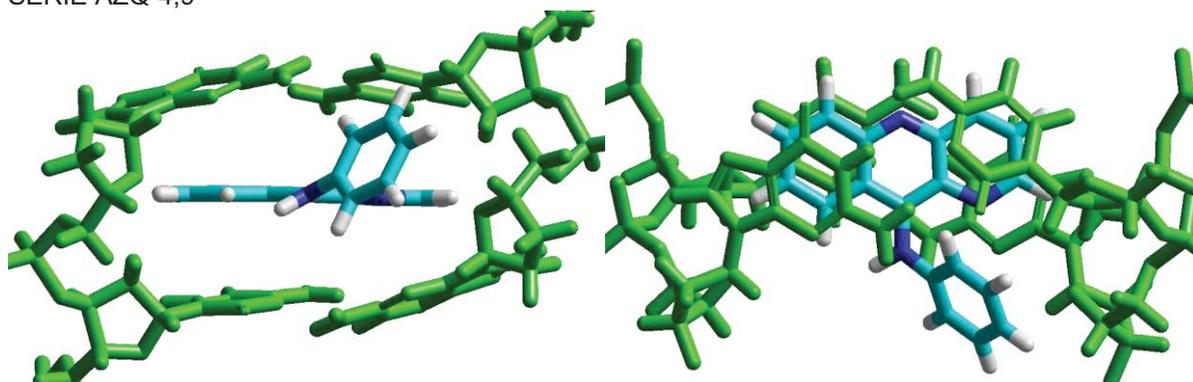
SERIE F



SERIE R

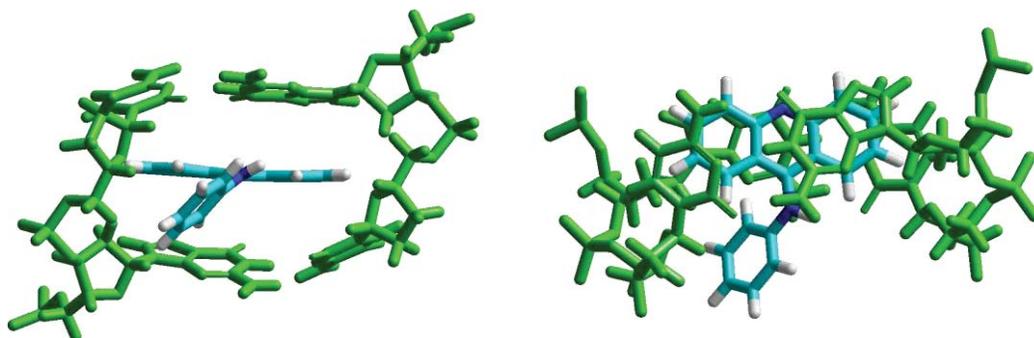


SERIE AZQ-4,9

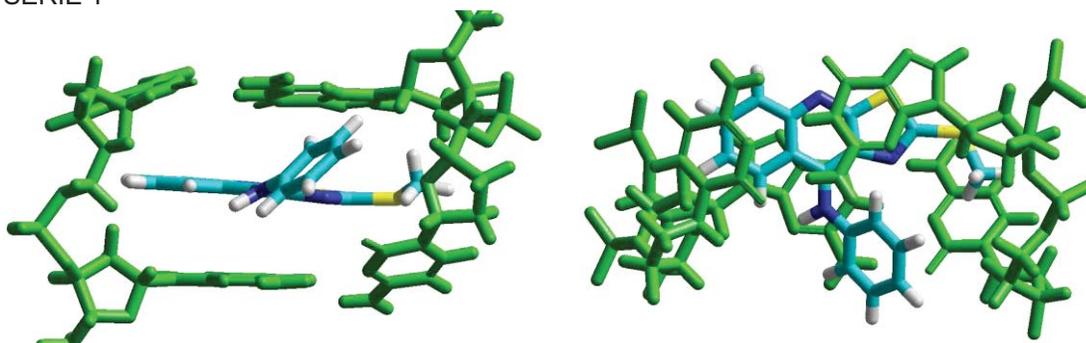


**A5.7 SECUENCIA GC**

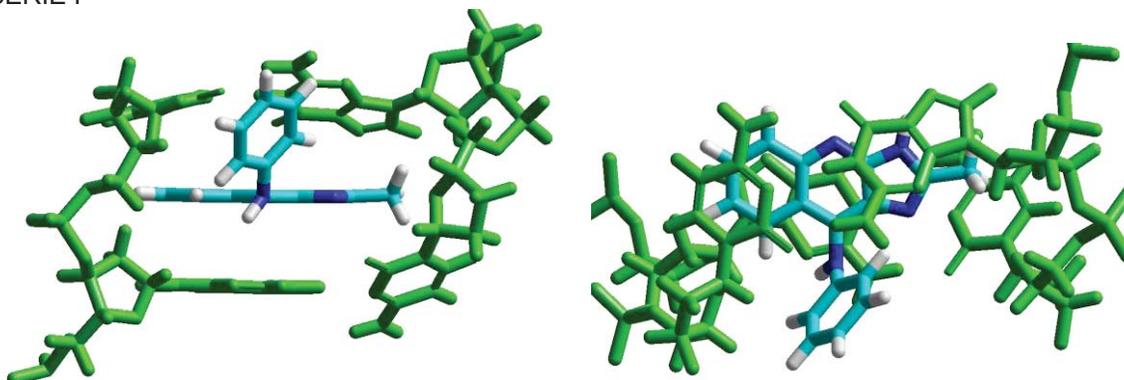
**SERIE A**



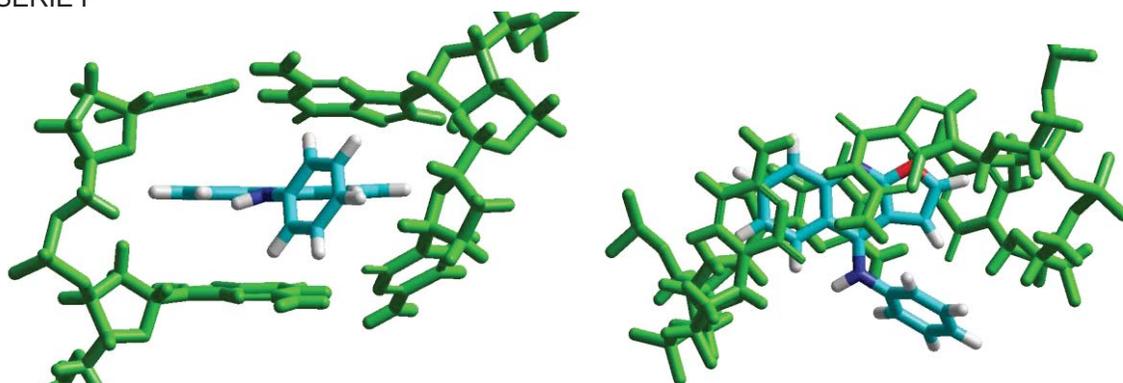
**SERIE T**



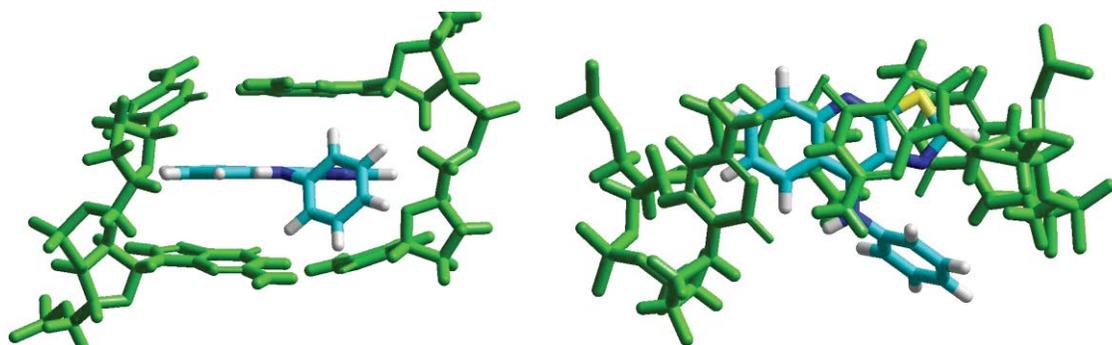
**SERIE I**



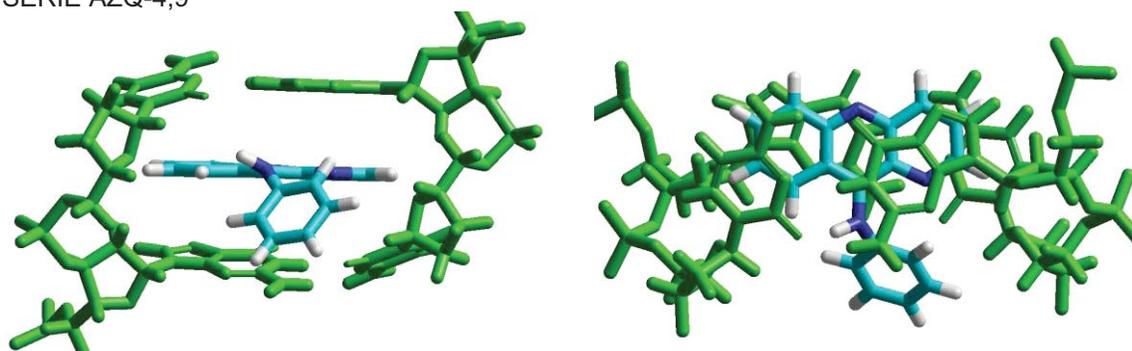
**SERIE F**



SERIE R

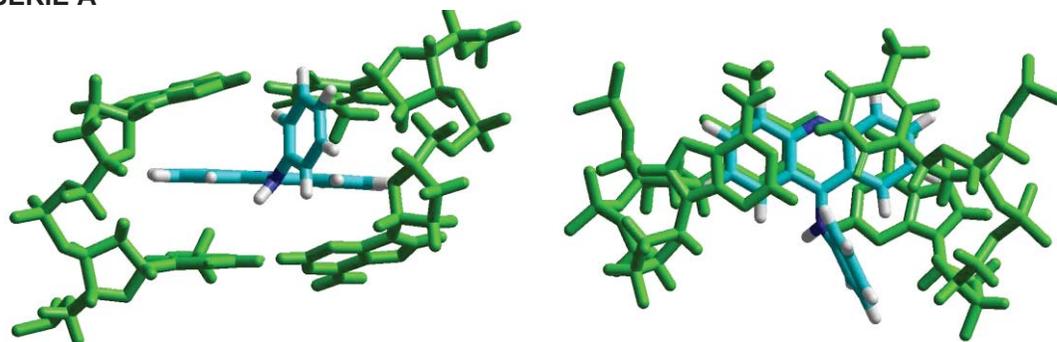


SERIE AZQ-4,9

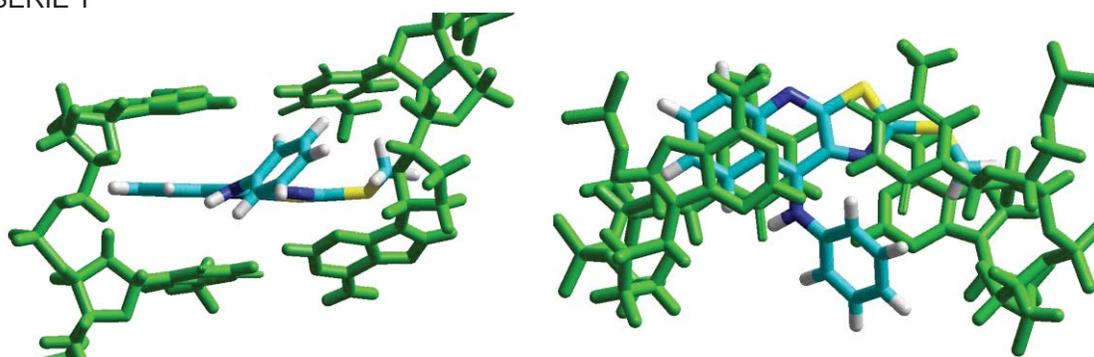


A5.8 SECUENCIA TA

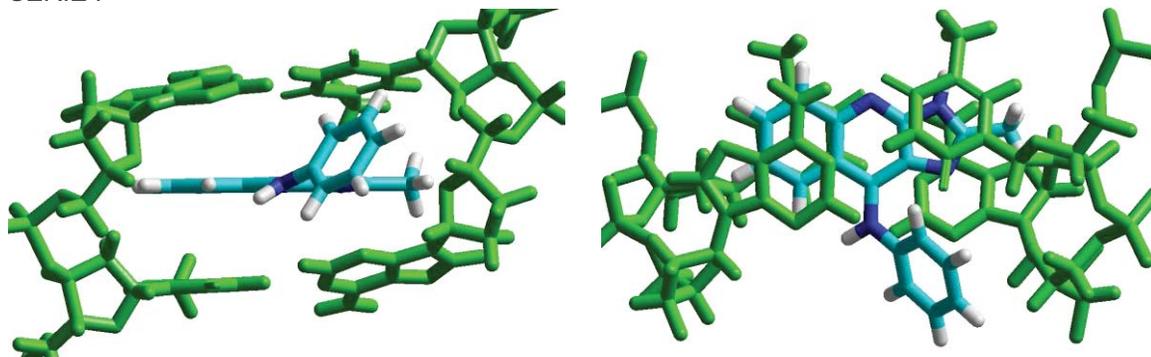
SERIE A



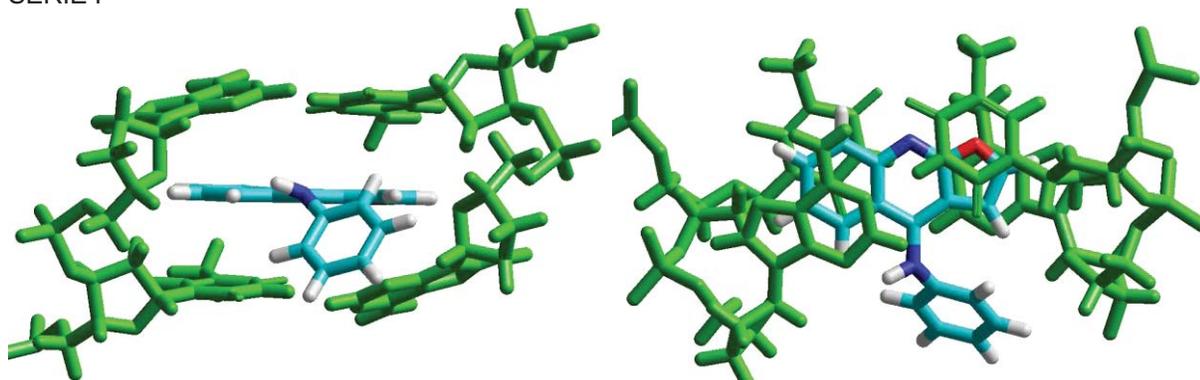
SERIE T



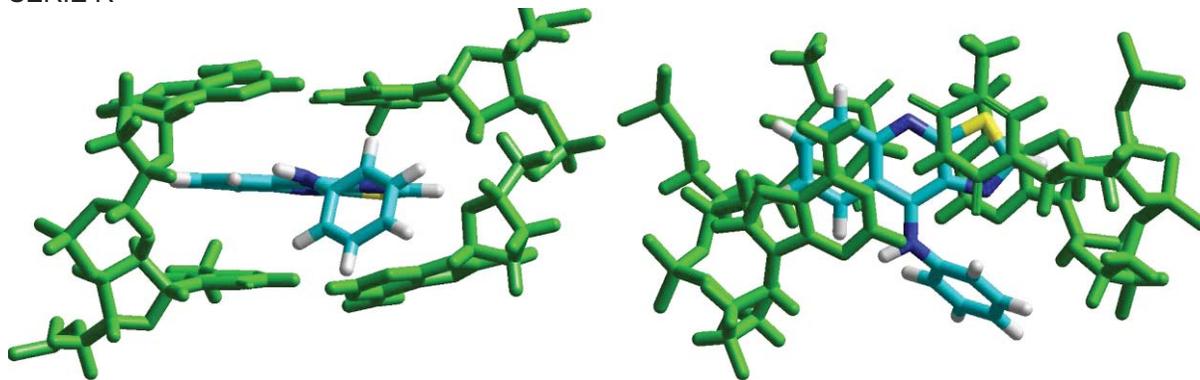
SERIE I



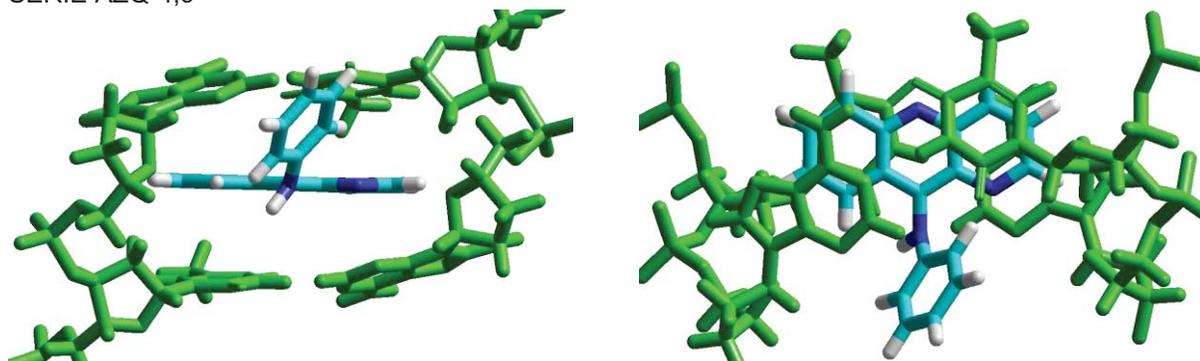
SERIE F



SERIE R

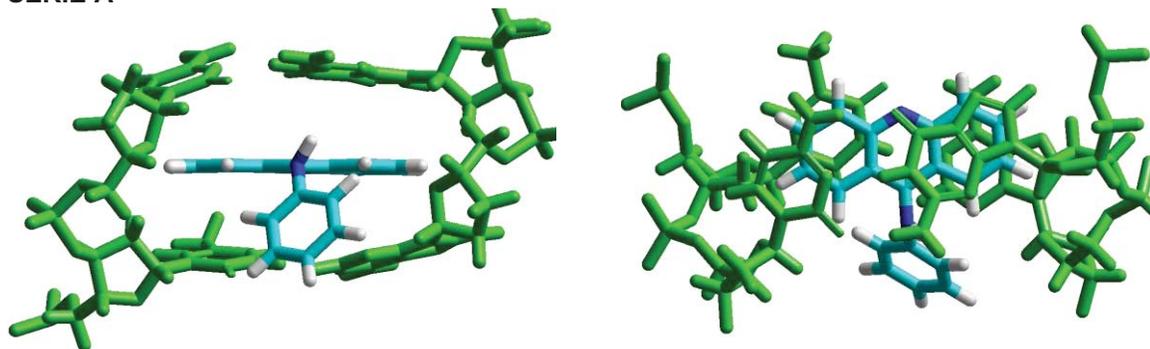


SERIE AZQ-4,9

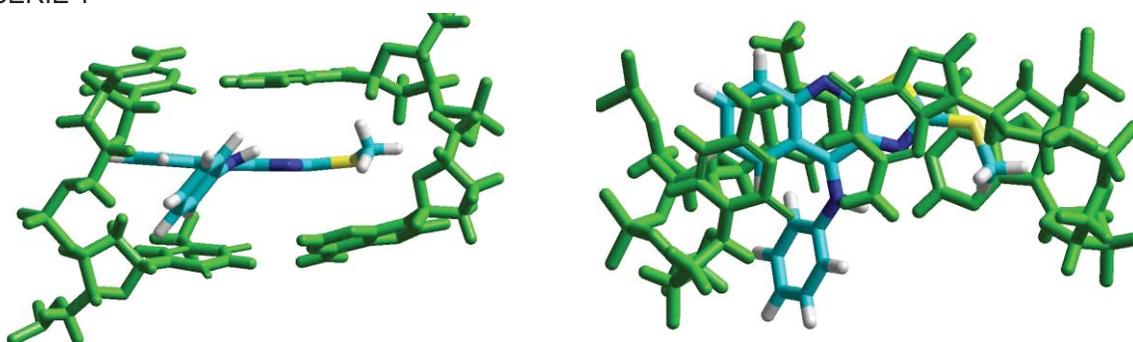


A5.9 SECUENCIA TC

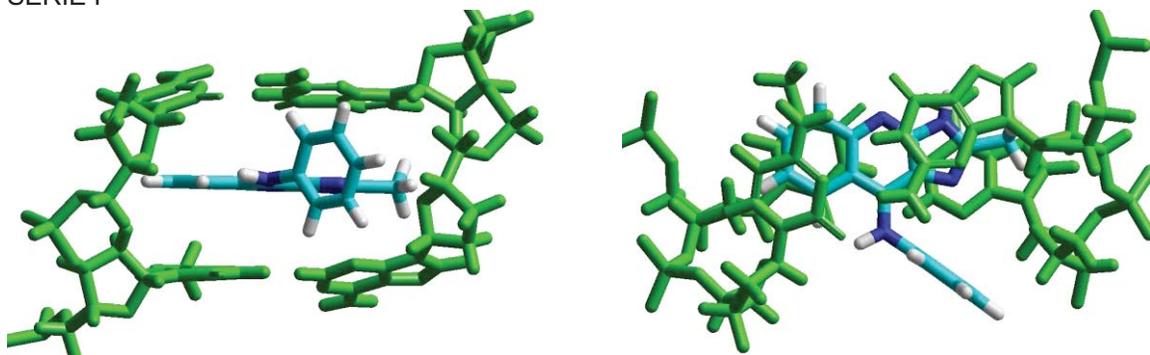
SERIE A



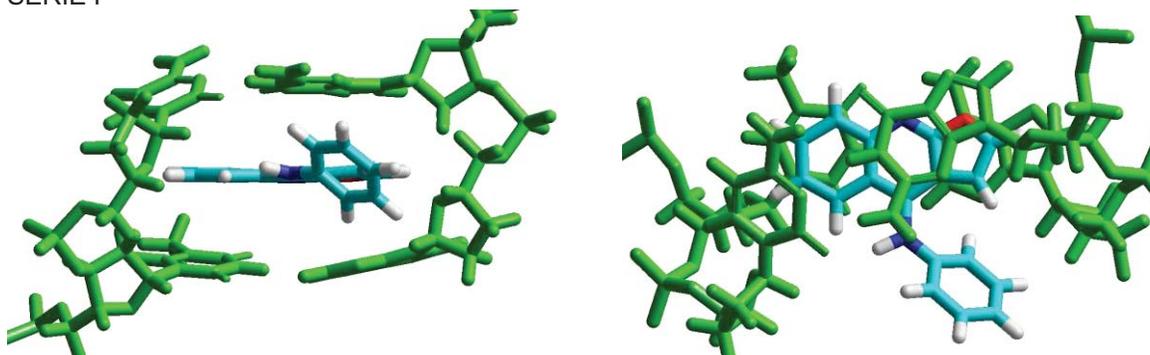
SERIE T



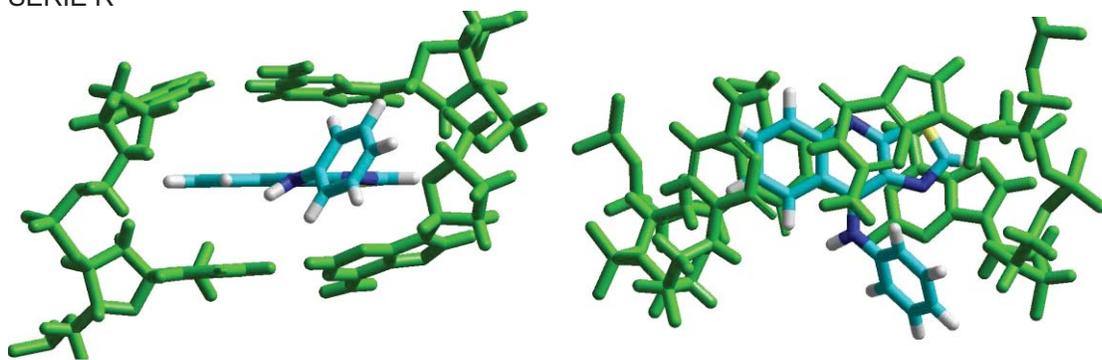
SERIE I



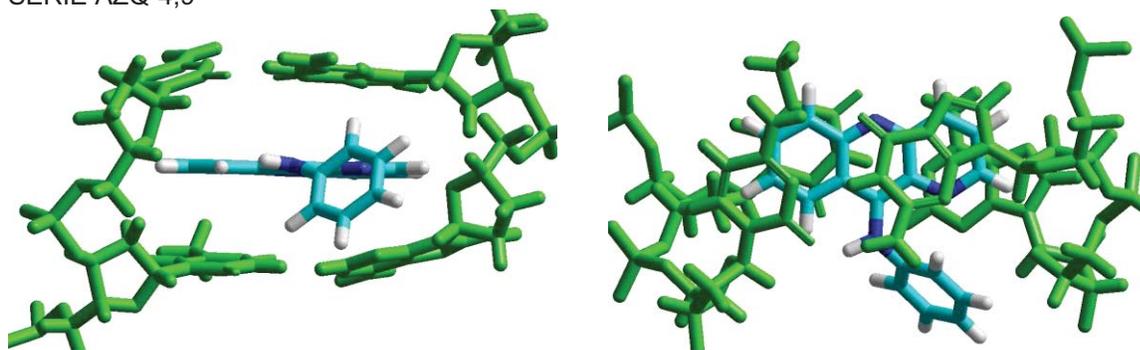
SERIE F



SERIE R

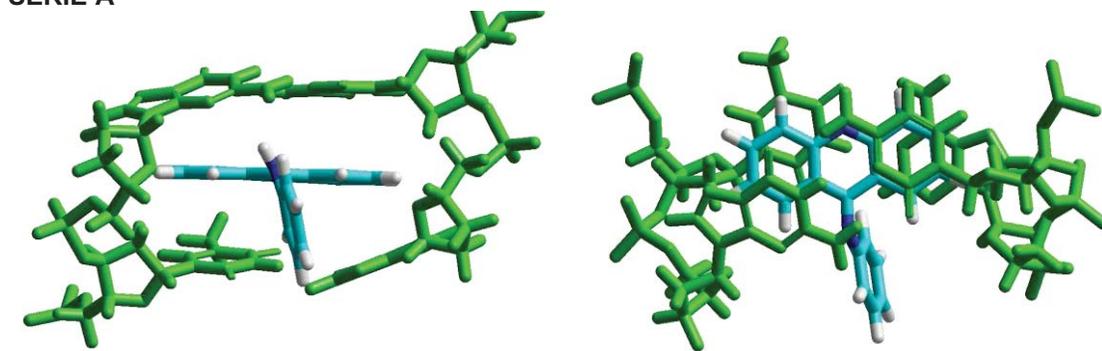


SERIE AZQ-4,9

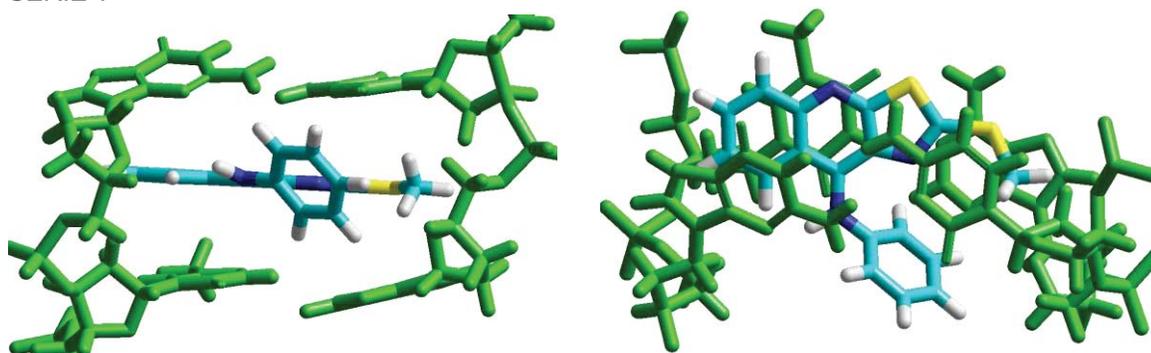


### A5.10 SECUENCIA TG

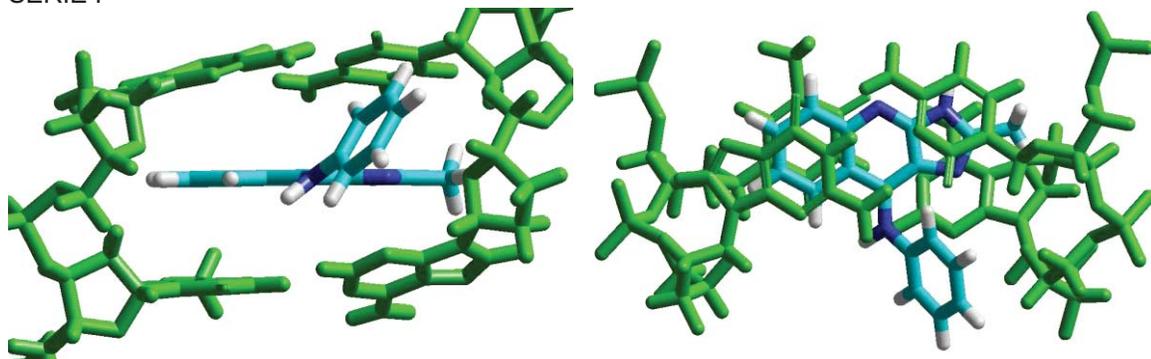
SERIE A



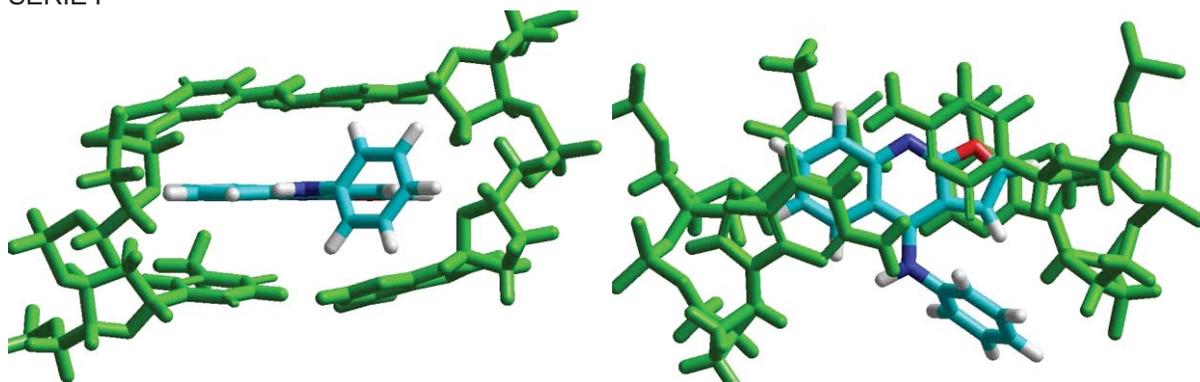
SERIE T



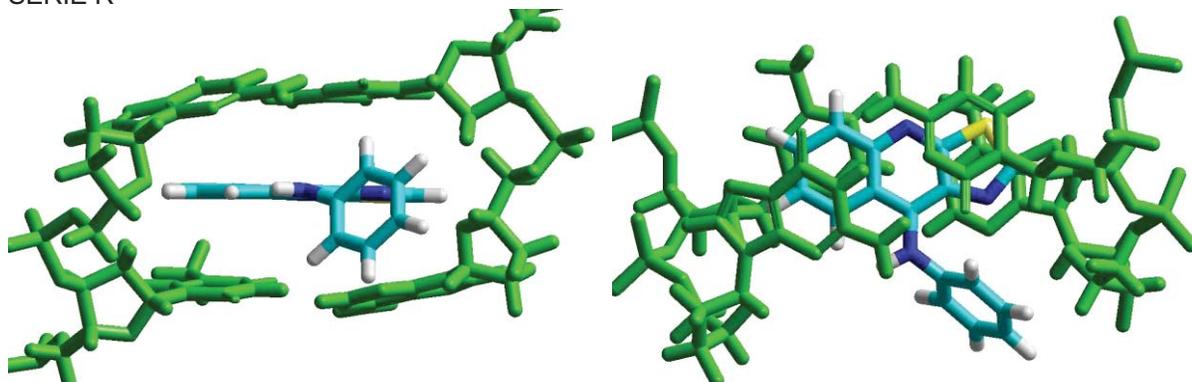
SERIE I



SERIE F



SERIE R



SERIE AZQ-4,9

