

Andrés José Luengo Baranguan

Diseño de compuestos heterometálicos de AU- RE/IR como agentes teragnósticos

Director/es

María Concepción Gimeno Floria
Vanessa Fernández Moreira

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

**DISEÑO DE COMPUESTOS HETEROMETÁLICOS
DE AU-RE/IR COMO AGENTES TERAGNÓSTICOS**

Autor

Andrés José Luengo Baranguan

Director/es

María Concepción Gimeno Floria
Vanesa Fernández Moreira

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Química Inorgánica

2020



**Universidad
Zaragoza**

Universidad de Zaragoza
Departamento de Química Inorgánica

DISEÑO DE COMPUESTOS HETEROMETÁLICOS DE Au-Re/Ir COMO AGENTES TERAGNÓSTICOS

Memoria presentada para acceder al título de Doctor por

Andrés José Luengo Baranguán

Zaragoza, 2020

María Concepción Gimeno Floría, Profesor de Investigación de Organismo Público de Investigación (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) en el Instituto Universitario de Investigación mixto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH), y

Vanesa Fernández Moreira, Investigadora de Organismo Público de Investigación (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) en el Instituto Universitario de Investigación mixto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH)

CERTIFICAN

Que la presenta memoria titulada “*Diseño de compuestos heterometálicos de Au-Re/Ir como agentes teragnósticos*” ha sido realizada en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Zaragoza, a 10 de Enero de 2020.

Fdo. Prof. M. Concepción Gimeno

Fdo. Dra. Vanesa Fernández Moreira

Quisiera, en primer lugar, agradecer a la Dra. M^a Concepción Gimeno por darme la oportunidad de realizar la tesis doctoral en su grupo de investigación así como por sus conocimientos, apoyo y amabilidad. A la Dra. Vanesa Fernández, su enorme dedicación, entrega, eficiencia y disposición, de la que me siento afortunado de haber sido su primer doctorando.

A los profesores del grupo de investigación Prof. Dr. Antonio Laguna, Dra. M^a Dolores Villacampa, Dra. Olga Crespo, Dra. Elena Cerrada, Dra. Raquel Pérez Herrera y Dra. Mamen Blanco por sus consejos y ayuda.

Al Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte, por aceptarme en su grupo de investigación durante mi estancia en Bochum.

A la Prof. Dra. Isabel Marzo por permitirme realizar las medidas de citotoxicidad en su grupo de investigación, y por enseñarme a realizar los diferentes experimentos bioquímicos presentados en la tesis.

A la DGA por la concesión de una beca para la realización de la tesis doctoral, y a la fundación CAI-Ibercaja por la concesión de una beca para la estancia doctoral.

A mis compañeros de laboratorio: Dani, Adrián (por sus silbidos), Mélanie, Marta Redrado, y a los que ya no están, Lourdiñas, Renso, Anabel, Raúl Vidal, Emmanuel, Braulio y especialmente a Alice. Mención especial a Dani, por los buenos y malos momentos que nos tocó vivir juntos, y sin cuya compañía no habrían existido o habrían sido mil veces peor.

A mis amigos de facultad y colegas de profesión, Dr. Gimeno, Dr. Mahía, Alejandro Leal y Adán Mateu por formar parte de esa selecta curia de doctorandos que decidieron quedarse en Unizar, y que tanta alegría me proporcionaron al comentar nuestras últimas miserias relacionadas con la química.

Al desterrado Dr. Marco, mi fiel lazarillo en el departamento de bioquímica, con el que siempre fue grato charlar mientras se descongelaba el MTT, o se disolvían los cristales de formazán.

A los demás grupos del departamento, especialmente al grupo de los Platineros y de Miguel Ángel Esteruelas, que en más de una ocasión me salvaron la vida al prestarme disolventes, mantas calefactoras o la columna HPLC. Por extensión, también a todos aquellos que pertenecen al departamento de bioquímica, cuyas indicaciones de dónde podía encontrar tal reactivo o tal consumible se aprecian mucho en un laboratorio que no conoces.

A Don Jacobo Ayensa Jiménez Dean Caballero, por su ayuda en el tratamiento de datos matemáticos.

A los técnicos de laboratorio, tanto del departamento de química inorgánica, como del departamento de química orgánica, que me prestaron equipos o consejos de manera desinteresada. Igualmente a Cristina Sierra por su eficaz gestión de los temas administrativos.

A mis compañeros de laboratorio en Alemania, Dr. Daniel Siegmund, Dr. Matthew Reback, Dr. Reece Miller, Isabelle Daubit, Tristan, Darek, con mención especial al Dr. Joan Josep Soldevila por su cálido acogimiento y los momentos vividos juntos. También al Dr. Moreno y Carlos Carretero por su increíble hospitalidad durante dicho período.

A mis padres, por haberme llevado a un colegio donde me enseñaron a pensar, y cuya manera de reflexionar forjó en mí un pensamiento crítico que sin duda me convirtió en un hombre de ciencia.

A Nina, por no haberme contagiado la sarna, a pesar de sus zarpazos.

Abreviaciones

Å	Angstrom
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
acac	Acetilacetato
ap	Aparente
APT	Attached Proton Test
AcOEt	Acetato de etilo
bipy	2,2'-bipiridina
d	Doblete
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRAQ5	1,5-bis-[2-(di-metilamino)etil]amino]-4,8-dihidroxiantraceno-9,10-diona
δ	Desplazamiento químico
ESI	Electrospray ionisation
Et	Etil
eq	equivalente
g	Gramos
h	Horas
H ₂ -DCFDA	diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOBT	Hidroxibenzotriazol
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
Hz	Hertzios
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular
ⁱ Pr	Isopropil
IPr	1,3-Bis(2,6-diisopropilfenil)imidazol-2-ilideno
IR	Infrarrojo
JohnPhos	2-(Di- <i>tert</i> -butilfosfino)bifenil
<i>m</i>	<i>meta</i>
m	Multiplete

MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
Me	Metil
min	Minutos
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
μ M	Micromoles
mmol	Milimoles
MS	Espectro de masas
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato
NHC	Carbeno <i>N</i> -heterocíclico
nm	Nanómetros
<i>o</i>	<i>orto</i>
OTf	Anión trifluorometilsulfonato o triflato
<i>p</i>	<i>para</i>
Ph	Fenilo
ppm	Partes por millón
PBS	Phosphate Buffer Saline
s	Singlete
s_{br}	Singlete, ancho
t	Triplete
TBTU	Tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol)-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio
t.a.	Temperatura ambiente
tht	Tetrahidrotiofeno
tmbn	2,4,6-Trimetoxibenzonitrilo
THF	tetrahidrofurano
TrxR	Tiorredoxina reductasa
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La presente tesis doctoral está enfocada hacia la síntesis de complejos heterometálicos para su uso como agentes teragnósticos. Mediante la conexión de un centro metálico basado en renio(I) o iridio(III) con marcadas propiedades luminiscentes, y un centro metálico de oro(I) responsable de la actividad biológica, se pretende profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción de los complejos de oro(I) sobre las células tumorales. La lectura de este trabajo permite hacerse una primera idea de los factores clave a tener en cuenta a la hora de diseñar un complejo teragnóstico plenamente funcional.

En el capítulo 2, se describe la síntesis de derivados trimetálicos conteniendo dos complejos octaédricos de renio(I) de la forma *fac*-[Re(CO)₃(bpy)(py)]⁺ enlazados a un complejo bisfosfina de oro(I). En este caso, la conexión entre oro y renio se ha efectuado a través del ligando piridina, que ocupa la posición axial en el complejo de renio, y que se ha funcionalizado con una amidofosfina para incorporar el oro. Los complejos obtenidos conservan las propiedades luminiscentes propias de sus precursores monometálicos de renio y también exhiben actividad antitumoral frente a la línea de células tumorales A549. Tras los experimentos de biodistribución se decidió estudiar la interacción con el ADN al observar acumulación en el núcleo.

En el capítulo 3, se describe la síntesis de numerosos complejos homometálicos de renio en donde se ha reemplazado una piridina del ligando bipyridina por un imidazol, obteniendo así un ligando quelato que contiene un carbeno NHC unido al renio. Adicionalmente, se han sintetizado tres derivados heterometálicos conectando complejos fosfina de oro al complejo de renio a través del ligando axial de tipo etinilpiridina o etinilimidazol. Los estudios de luminiscencia han confirmado el desplazamiento hipsocrómico de los perfiles de excitación y emisión por la presencia del ligando NHC además de observar que la modulación debida a la naturaleza del ligando axial es limitada. Tras evaluar la biodistribución de los complejos heterometálicos, se ha estudiado el tipo de muerte celular que causan dichos complejos así como su potencial para el uso en terapia fotodinámica.

El capítulo 4 se presenta como una continuación del trabajo realizado en el primer capítulo, conectando renio y oro por funcionalización del ligando quelato, fijando la posición axial en el renio por un ligando cloruro. En concreto se presentan tres tipos de familias en función de la naturaleza del ligando quelato: etinilbipiridinas, metiltiolbipiridinas, e imidazolfenantrolinas. La mayor conjugación en el ligando quelato implica un desplazamiento batocrómico en los perfiles de emisión y excitación haciendo más interesantes estos complejos para imagen celular. Los complejos sintetizados han mostrado peores resultados en términos de actividad biológica y la gran mayoría no han resultado aptos para ser observados bajo el microscopio confocal. El intercambio del cloruro en posición axial por una molécula de acetonitrilo en los derivados conectados por alquinilbipiridinas, ha permitido mejorar la captación de estos compuestos por las células como se confirmó por análisis mediante ICP-MS.

El último capítulo amplía la estrategia teragnóstica basada en dos metales diferentes al binomio iridio-oro. Se describe la síntesis de dos complejos heterometálicos que conectan la estructura típica de un compuesto luminiscente de iridio(III), enlazado a dos fenilpiridinas y una fenantrolina, con dos complejos de oro de naturaleza diferente. La conexión entre ambos metales se ha llevado a cabo por medio de dos cadenas peptídicas de corta longitud que se enlazan al iridio a través de la fenantrolina y al oro a través de un tiol o un triazol. Los complejos sintetizados han mostrado excelentes propiedades luminiscentes y su biodistribución ha podido ser estudiada comprobando que la internalización es sin embargo moderada y que sólo el heterometálico enlazado al oro por el grupo tiol es citotóxico frente a la cepa A549.

ABSTRACT

This PhD thesis is focused in the synthesis of heterometallic complexes as theranostic agents and the study of their properties. The followed strategy entails the combination of a luminescent Re(I) or Ir(III) fragment with a cytotoxic Au(I) species. The main objective is to assess the biodistribution and mechanism of action of the novel probes using, among other strategies, fluorescence microscopy. This work may serve as an initial approach to reveal those key factors when it comes to design a new generation of theranostic agents.

In Chapter 2, the synthesis of bimetallic or trimetallic derivatives containing either one or two octahedral rhenium *fac*-[Re(CO)₃(bpy)(py)]⁺ fragments coordinated to a gold(I) species is described. Both metallic fragments have been combined through a functionalized pyridine ligand, which is bonded to the rhenium metal centre at the axial position. The resulting compounds present both luminescent and cytotoxic properties, confirming the success of the strategy. Thereafter biodistribution experiments and interaction with DNA studies were carried out.

In Chapter 3, a series of rhenium compounds containing an NHC ligand as part of the chelating ligand were synthesized. Pyridines and imidazoles derivatives of different electronic nature, as well as triphenylphosphine were selected as the ligands for the axial position, in order to compare their effect into Re(I) luminescent properties. Moreover, the pyridines/imidazoles functionalised with alkynyl moieties were further coordinated with a gold phosphine fragment. Biological properties of selected compounds were evaluated followed by biodistribution experiments. Finally, the applicability for photodynamic therapy was studied, and a thorough analysis of the cellular death mechanisms was carried out.

Chapter 4 continues the work described in chapter 1 but this time connecting rhenium and gold by a functionalised chelating ligand instead of using the axial position. The axial position is now fixed by a chloride ligand. Thus, three families of compounds were synthesized, according to the chelating ligand: alkynylbipyridine, methylthiolbipyridine and imidazolphenanthroline. As a result of the increased

conjugation in the chelating ligand in comparison with previous chapters, a bathochromic shift was observed in the excitation/emission profile which is crucial for cellular probes. However, due to the poor solubility in aqueous media, no cytotoxicity was observed and a very poor internalization. Replacing the chloride axial ligand for an acetonitrile molecule led to an improvement of aqueous solubility and consequently to higher cellular internalisation, which was further confirmed by ICP-MS studies

In chapter 5, the concept of heterobimetallic theragnostic compounds was extended to the Ir(III)-Au(I) combination. The synthesis of two heterometallic bioconjugates, in which gold and iridium are connected by a phenanthroline containing a short peptidic sequence is described. The peptides selected were the Leu-enkephalin, and a four membered peptidic sequence containing a cysteine moiety. While excellent photophysical properties were observed for the synthesized bioconjugates, biological activity was only relevant for the cysteine containing bioconjugate against A549 cells. Cell biodistribution was also addressed by fluorescence microscopy, which seems to indicate lysosomal accumulation.

Indice

Agradecimientos

Abreviaciones

Resumen

Abstract

Capítulo 1 – Introducción	17
1.1 Introducción a la teragnosis	19
1.2 Cáncer	20
1.2.1 Estadísticas	20
1.2.2 Definición	21
1.2.3 Tratamiento	21
1.3 Metales en quimioterapia	22
1.3.1 Fármacos basados en platino	23
1.3.2 Oro en quimioterapia	24
1.3.2.1 Tiolatos de oro(I) y auranofin	24
1.3.2.2 Complejos de oro(I) con fosfinas	25
1.3.2.3 Complejos de oro(I) con carbenos NHC	26
1.3.2.4 Complejos de oro(III)	27
1.3.3 Otros metales	28
1.4 Terapia fotodinámica	32
1.5 Mecanismos de acción	34
1.5.1 Problemática	34
1.5.2 Elucidación del mecanismo de acción	35
1.6 Diagnóstico por imagen celular	36
1.6.1 Imagen celular por microscopía de fluorescencia	36
1.6.1.1 Introducción a la luminiscencia	36
1.6.1.2 Fluoróforos orgánicos de tamaño medio	42
1.6.1.3 Proteínas fluorescentes	42
1.6.1.4 Complejos de metales de transición	43
1.6.1.5 Nanopartículas poliméricas fluorescentes	46
1.6.1.6 Quantum dots	47
1.6.2 Imagen celular por Resonancia Magnética Nuclear (NMRI)	47
1.6.3 Imagen celular por tomografía de emisión de positrones (PET)	48
1.6.4 Imagen celular por microscopía electrónica	49
1.7 Agentes teragnósticos	50
1.7.1 Agentes teragnósticos con fluoróforos basados en metales	52

1.7.2	Estado del arte de complejos bimetálicos teragnósticos luminiscentes.....	54
1.7.2.1	Complejos d ⁶ -d ¹⁰	55
1.7.2.2	Complejos con lantánidos.....	57
1.8	Objetivos generales.....	58
1.9	Referencias.....	60
Capítulo 2	– Complejos de renio y oro conectados a través del ligando axial.....	67
2.1	Objetivos.....	69
2.2	Introducción.....	70
2.2.1	Complejos de renio <i>fac</i> -tricarbonil bipyridina.....	70
2.2.2	Trabajo previo.....	71
2.3	Síntesis de bisfosfinas de oro.....	72
2.4	Síntesis de complejos heterotrimetálicos.....	75
2.5	Síntesis de análogos de Auranofin.....	80
2.6	Propiedades fotofísicas.....	81
2.7	Actividad biológica sobre células tumorales humanas.....	84
2.7.1	Estudio de la actividad citotóxica. Método MTT.....	84
2.7.2	Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	89
2.7.3	Estudios de biodistribución. Medidas de microscopio confocal.....	91
2.7.4	Interacción con el ADN.....	94
2.8	Conclusiones.....	98
2.9	Experimental.....	98
2.9.1	Starting Materials.....	98
2.9.2	Instrumentation.....	99
2.9.3	Procedures.....	99
2.9.4	Syntheses.....	101
2.9.5	References.....	108
Capítulo 3	– Complejos de renio con carbenos NHC y oro conectados a través del ligando axial.....	111
3.1	Objetivos.....	113
3.2	Introducción.....	113
3.2.1	Complejos de renio en terapia fotodinámica.....	114
3.3	Síntesis del complejo de renio precursor.....	116
3.4	Síntesis del complejo activado de renio.....	117
3.5	Síntesis de complejos con derivados de piridina.....	119
3.6	Síntesis de complejos con derivados de imidazol.....	127
3.7	Síntesis de complejos con trifenilfosfina.....	129
3.8	Síntesis de complejos bimetálicos conectados por piridina.....	131

3.9	Comparación de las distancias de enlace.....	134
3.10	Propiedades fotofísicas.....	135
3.11	Actividad biológica sobre células tumorales humanas.....	141
3.11.1	Estudio de la actividad citotóxica. Método MTT.....	141
3.11.2	Estudios de biodistribución. Medidas de microscopio confocal.....	142
3.11.3	Estudio del tipo de muerte celular.....	145
3.12	Conclusiones.....	149
3.13	Experimental.....	150
3.13.1	Starting Materials.....	150
3.13.2	Instrumentation.....	150
3.13.3	Crystallography.....	151
3.13.4	Procedures.....	151
3.13.5	Syntheses.....	153
3.13.6	References.....	165
Capítulo 4 – Complejos de renio y oro conectados a través del ligando ecuatorial.....		169
4.1	Objetivos.....	171
4.2	Introducción.....	172
4.3	Síntesis de derivados conectados a través de tiolatos.....	172
4.3.1	Síntesis del complejo de renio precursor.....	172
4.3.2	Síntesis de los derivados heterometálicos.....	174
4.4	Síntesis de derivados neutros conectados a través de alquinos.....	175
4.4.1	Síntesis del complejo de renio precursor.....	175
4.4.2	Síntesis de los derivados heterometálicos.....	177
4.5	Síntesis de derivados conectados por carbenos.....	182
4.5.1	Síntesis del complejo de renio precursor.....	182
4.5.2	Síntesis de los derivados heterometálicos.....	184
4.6	Actividad biológica.....	192
4.7	Síntesis de derivados catiónicos.....	192
4.7.1	Síntesis de derivados catiónicos conectados por alquinos.....	193
4.7.2	Síntesis de derivados catiónicos conectados por tiolatos.....	198
4.8	Propiedades fotofísicas.....	200
4.8.1	Derivados heterometálicos conectados por tiolatos.....	200
4.8.2	Derivados heterometálicos conectados por alquinos.....	203
4.8.3	Derivados heterometálicos conectados por carbenos.....	206
4.9	Propiedades biológicas de los derivados catiónicos y comparación con los derivados neutros.....	208

4.9.1	Ensayos de citotoxicidad.....	208
4.9.2	Estudios de biodistribución. Medidas de microscopio confocal.....	210
4.9.3	Acumulación celular por ICP-MS.....	215
4.10	Conclusiones.....	216
4.11	Experimental.....	217
4.11.1	Starting materials.....	217
4.11.2	Instrumentation.....	218
4.11.3	Crystallography.....	218
4.11.4	Procedures.....	219
4.11.5	Syntheses.....	220
4.11.6	References.....	232
Capítulo 5 – Bioconjugados de iridio y oro.....		235
5.1	Objetivos.....	237
5.2	Introducción.....	238
5.2.1	Sistemas [Ir(C ^N) ₂ (N ^N)] luminiscentes.....	238
5.2.2	Complejos de iridio(III) en imagen celular.....	239
5.2.3	Bioconjugados de iridio(III) y oro(I).....	240
5.3	Síntesis de los bioconjugados	242
5.3.1	Síntesis del bioconjugado de iridio con el péptido encefalina.....	242
5.3.2	Síntesis del bioconjugado de iridio y oro conectados por encefalina.....	249
5.3.3	Síntesis del bioconjugado de iridio y oro conteniendo cisteína.....	256
5.4	Propiedades fotofísicas.....	260
5.5	Actividad biológica sobre células tumorales humanas.....	262
5.5.1	Estudio de la actividad citotóxica. Método MTT.....	262
5.5.2	Estudios de biodistribución. Medidas de microscopio confocal.....	263
5.6	Conclusiones.....	266
5.7	Experimental.....	267
5.7.1	Starting materials.....	267
5.7.2	Intrumentation.....	267
5.7.3	Crystallography.....	268
5.7.4	Procedures.....	268
5.7.5	Syntheses.....	270
5.7.6	References.....	274
Conclusiones generales.....		277
General conclusions.....		281

Capítulo 1

Introducción general

Capítulo 1

1.1 Introducción a la teragnosis

El término teragnóstico o “theranostic” en inglés se empleó por primera vez en 2002 por Funkhouser¹ y se define como el material que combina la terapia y la imagen diagnóstica. Una revisión rigurosa del concepto revela que ya existía desde el año 1940, con el uso del iodo-131 para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de tiroides por su fácil preparación y bajo coste. Este primer ejemplo de teragnosis ha quedado obsoleto tras el uso de fármacos basados en ^{99m}Tc más adecuados para la función de diagnóstico.

La terapia hace referencia al tratamiento de una enfermedad o desorden metabólico. Es un concepto muy amplio que puede parecer inabarcable, pero que se puede reducir a la inhibición/activación de una molécula por medio de un fármaco. Ahora bien, el diseño racional de un fármaco requiere conocer qué mecanismos son defectuosos y responsables de la enfermedad, y si es posible sintetizar un compuesto que de manera selectiva vaya al tejido u órgano responsable de la enfermedad para tratarlo.

En la actualidad el procedimiento habitual pasa por ensayar una biblioteca de compuestos sobre cepas de células tumorales o sobre determinadas dianas biológicas con la esperanza de encontrar qué estructuras resultan más activas para ese caso en particular. A partir de ahí, gracias a la información relativa a su mecanismo de acción se puede optimizar el diseño del fármaco.

El mecanismo de acción de un compuesto se entiende como el transporte y distribución, seguido de la interacción con su(s) diana(s) biológica(s). Muchas veces se obtienen resultados inesperados que conllevan el rediseño de la estructura del fármaco y su posterior estudio. Este proceso iterativo termina con la síntesis del fármaco específico para el proceso a tratar. Sin embargo, la urgencia con la que ciertas enfermedades como el cáncer asolan a la población, no concede el tiempo suficiente como para estudiar en profundidad el mecanismo de acción de candidatos con buenos resultados sobre células tumorales.

1.2 Cáncer

1.2.1 Estadísticas

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global, y fue responsable de 8,8 millones de muertes en el año 2015 (OMS). Atendiendo a predicciones poblacionales, se calcula que el número de muertes producidas por tumores aumentará a más de 14 millones en el año 2035. Los últimos datos globales disponibles a nivel mundial (proyectos EUCAN y GLOBOCAN, de la OMS) reflejan que en el año 2012 se detectaron 14 millones de casos nuevos, aunque se prevé un aumento del 70% para el año 2035 con aproximadamente 24 millones de casos.² La incidencia de este tipo de enfermedad es tan alta que se estima que uno de cada dos hombres y casi una de cada tres mujeres tendrá cáncer a lo largo de su vida (ver figura 1.1).

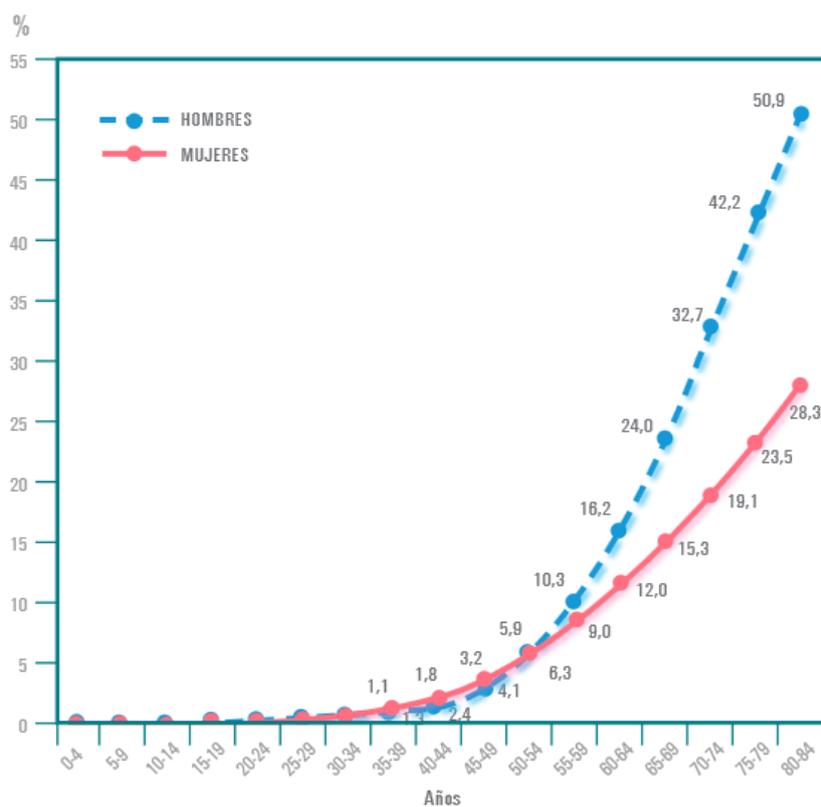


Figura 1.1 Probabilidad de padecer cáncer según sexo e intervalo de edad.

1.2.2 Definición

La palabra cáncer es un término muy amplio que abarca más de 200 tipos de enfermedades. Cada uno de estos tipos de enfermedades puede tener características

completamente diferentes pudiendo considerarse enfermedades independientes con tratamientos específicos. Sin embargo, todas ellas tienen un denominador común: las células cancerosas adquieren la capacidad de multiplicarse y diseminarse por todo el organismo sin control.

Las células que componen a los seres vivos se dividen periódicamente y van reemplazando a células envejecidas. Estos procesos están regulados por medio de unos mecanismos de control que dictan a las células cuándo deben dividirse y cuándo deben entrar en procesos de muerte celular. Cuando estos mecanismos fallan las células comienzan a dividirse sin control acumulándose en lo que se conoce como tumor o nódulo.

Se habla de cáncer cuando las células tumorales sufren alteraciones que les permiten invadir tejidos y órganos alrededor (infiltración) y de trasladarse y proliferar en otras partes del organismo (metástasis).

1.2.3 Tratamiento

Una de las grandes problemáticas actuales es la ausencia de una estrategia absoluta para el tratamiento del cáncer. Las pequeñas diferencias entre células tumorales y sanas no permiten emplear una terapia que esté exenta de efectos secundarios.

El procedimiento habitual pasa por eliminar el tumor por cirugía, seguido de otras terapias (radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal) cuyo objetivo es asegurar la total eliminación de las células tumorales que hayan podido quedar en el tejido afectado. Cuando la cirugía no es posible estas terapias representan la única manera de eliminar los tumores.

Mientras que la radioterapia emplea radiación generada por isótopos no estables, la quimioterapia se basa en fármacos que interactúan a nivel químico con las células cancerosas. Inmunoterapia y terapia hormonal se basan en procesos biológicos: mientras que la primera estimula el sistema inmune para que destruya a las células cancerosas marcándolas o mediante virus específicos, la segunda bloquea la producción de hormonas que favorecen el crecimiento de estas células.

En la actualidad la mayoría de los fármacos empleados en quimioterapia se basan en moléculas orgánicas. Muchas de ellas son análogos de biomoléculas cuya modificación permite inhibir enzimas o procesos celulares causando la muerte de las células tumorales o inhibiendo su proliferación. Hasta no hace mucho tiempo, ha existido la reticencia a emplear metales para la síntesis de fármacos por la toxicidad que se les asocia.

1.3 Metales en quimioterapia³

Con el avance en la química de la coordinación y una mayor comprensión de las reacciones de intercambio de ligandos, se han desarrollado complejos con menores reacciones paralelas, es decir, menos efectos secundarios. Los complejos metálicos resultan muy interesantes por las siguientes propiedades:

Carga: la carga de los complejos metálicos se puede modular según el estado de oxidación del metal y de los ligandos empleados. De esta forma se pueden diseñar complejos destinados a interactuar con su opuesto cargado. La carga además implica que el complejo se presenta en forma de sal lo que ayuda a su disolución en el medio acuoso biológico. Por último destacar que la membrana celular externa se encuentra cargada negativamente por la presencia de las cabezas hidrófilas de los lípidos que la componen (fosfatos y sulfatos). Los complejos cargados positivamente han mostrado una mayor facilidad para penetrar dicha membrana por la interacción favorable con estos grupos aniónicos.

Geometría: la variabilidad de geometrías de los complejos metálicos representa una de sus mayores ventajas frente a las moléculas orgánicas. En este caso se puede entender el metal como un soporte que permite orientar diferentes ligandos hacia diferentes puntos del espacio con una separación modulable para que interactúen a la vez con distintas partes de la diana biológica, o con varias moléculas a la vez.

Interacción metal-ligando: el dominio de la cinética y termodinámica en las reacciones de intercambio de ligandos permite entender en qué entorno y a qué biomoléculas se enlazarán el metal. Aunque lo más normal es que el efecto biológico sea fruto de la interacción del metal con su diana biológica, no hay que olvidar que puede

actuar como transportador de ligandos biológicamente activos y liberarlos en el punto adecuado.

Propiedades ácido-base de Lewis: la mayoría de los metales actúan como ácidos de Lewis y son capaces de activar grupos funcionales al coordinarse a alguno de sus átomos. En consecuencia pueden actuar como catalizadores para la hidrólisis, reacción con otras moléculas del entorno o sus propios ligandos, etc.

Actividad redox: la tendencia a experimentar procesos redox puede ser explotada como fuente de selectividad en la acción biológica (puede ser activo sólo en un determinado estado de oxidación), en la captación en las células (al cambiar el estado de oxidación el complejo es más permeable), en la liberación de ligandos, etc. También es posible que su mecanismo de acción se base en la reacción redox: reaccionando por ejemplo con una molécula distorsionando su función, o comportándose como catalizador para la creación de otras moléculas bioactivas.

1.3.1 Fármacos basados en Platino⁴

El fármaco más popular en la química organometálica en quimioterapia es el Cisplatino. Se viene empleando desde 1979 para el tratamiento de distintos cánceres destacando el de testículos y ovarios. Su facilidad de síntesis y efectividad le han valido el puesto en la lista de medicinas esenciales elaborada por la OMS.⁵ Este complejo plano cuadrado de platino(II) experimenta la sustitución de uno de sus ligandos cloruro por un ligando agua una vez entra en la célula debido a la baja concentración de iones cloruro en el citoplasma. El acuo-complejo resultante es un potente electrófilo y se coordina al N7 de las bases púricas del ADN. El otro ligando cloruro es desplazado a su vez por otro nitrógeno de las bases del ADN formando aductos intracatenarios 1,2 entre guaninas (aproximadamente 90 % de los aductos), 1,2 entre guanina y adenina (aproximadamente 10 % de los aductos) y el resto aductos 1,3 intracatenarios entre guaninas y otros aductos intercatenarios con menor importancia. La formación de estos aductos destruye la funcionalidad del ADN y si la reparación fracasa la célula entra en apoptosis.

Tras el éxito del cisplatino se sintetizaron una serie de derivados catalogados como fármacos de segunda generación con el objetivo de mejorar la nefrotoxicidad asociada (Carboplatino), para el tratamiento de tumores resistentes al cisplatino (Oxaliplatino) o

simplemente que fueran más activos frente a otros tipos de tumores (Nedaplatino, Heptaplatino, Lobaplatino) (figura 1.2).⁶

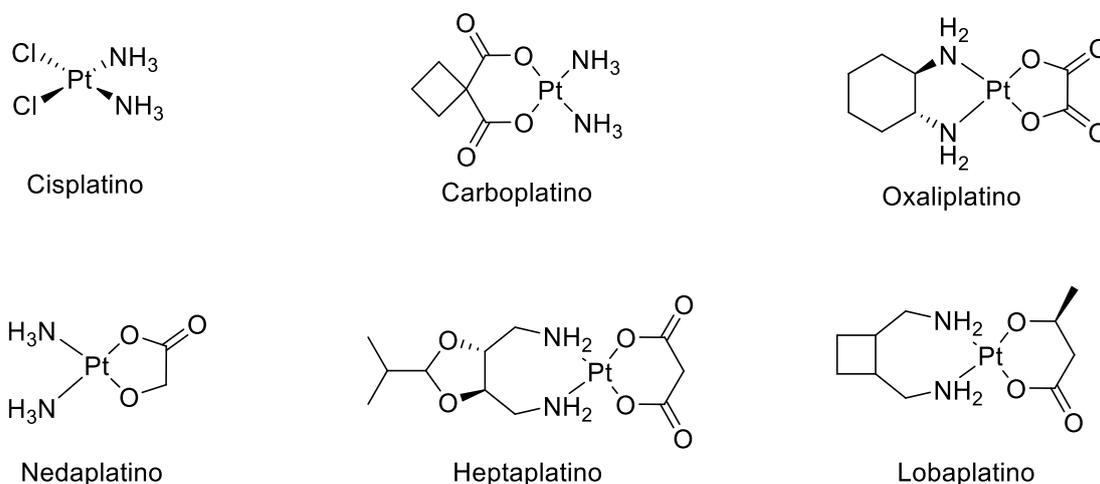


Figura 1.2 Fármacos antitumorales derivados del cisplatino.

1.3.2 Oro en quimioterapia

1.3.2.1 Tiolatos de oro(I) y auranofin

La historia del oro en la medicina es extensa y puede remontarse hasta 2500 años atrás cuando lo empleaban pueblos orientales en forma de sales o directamente como metal. No fue hasta 1890 cuando Koch empleó uno de sus complejos, $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ como antibacteriano para el tratamiento de la tuberculosis. En 1929 Forestier utilizó tiolatos de oro(I) para el tratamiento de la artritis reumatoide (ver figura 1.3).⁷ La importancia de estos complejos conllevó la aparición del término crisoterapia para hablar del uso de complejos de oro en medicina.

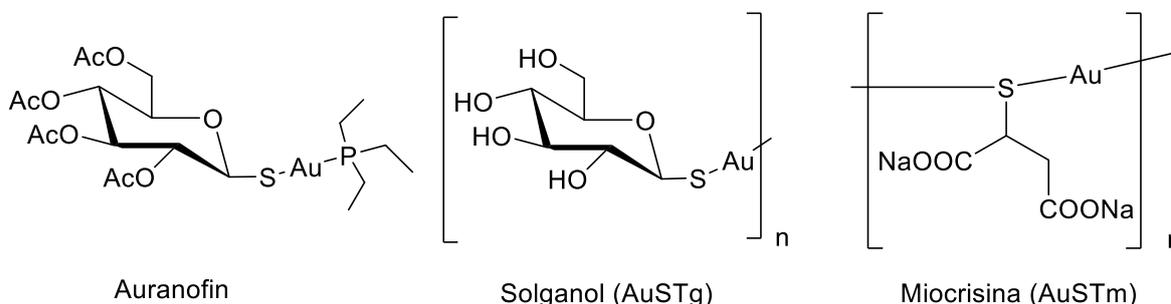


Figura 1.3 Complejos de oro(I) utilizados en crisoterapia.

Los estudios para comprender el mecanismo de acción de estos tiolatos de oro revelaron una espectacular preferencia por la enzima tioredoxina reductasa de unas 1000 veces⁸ respecto a otras biomoléculas. La presencia de una selenocisteína en el sitio activo de esta enzima ha demostrado ser la clave de la alta afinidad. El oro, por su carácter blando, se coordina preferencialmente a átomos dadores blandos como azufre y selenio. Es por ello que es capaz de inhibir a otras enzimas como la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y ciclooxigenasas. Todas estas enzimas participan en procesos de reducción y su inhibición genera un elevado estrés oxidativo en la célula pudiendo terminar con la muerte celular.⁹

Por otro lado, se ha observado la sobreexpresión de TrxR en células tumorales en concordancia con su mayor metabolismo. Diversos estudios han demostrado además que los altos niveles de TrxR están asociados con la resistencia al cisplatino.¹⁰

Así fue como el auranofin, un fármaco de oro de segunda generación para el tratamiento de la artritis reumatoide, fue ensayado sobre diferentes líneas tumorales encontrando actividad *in vitro* en la línea tumoral HeLa y en el melanoma B16¹¹ así como actividad *in vivo* para la de leucemia P3888.¹² Actualmente este compuesto se encuentra en fase I/II de ensayos sobre cáncer de pulmón, ovarios, peritoneo, tubo de Falopio y leucemia.¹³

1.3.2.2 Complejos de oro(I) con fosfinas

En esta categoría se clasifican los complejos de oro enlazados a más de un ligando fosfina, con todas las combinaciones posibles: metal unido a dos, tres o cuatro ligandos fosfina homo o heterolépticos, ligandos quelato, combinación de ligandos quelato y no quelato (figura 1.4). El compuesto más conocido dentro de esta categoría es el $[\text{Au}(\text{dppe})_2]^+$. Su elevada citotoxicidad era prometedora pero la toxicidad observada hacia células sanas truncó su escalada hacia el mercado farmacéutico. La longitud del quelato así como los sustituyentes aromáticos han demostrado ser cruciales para la actividad y captación del compuesto. $[\text{Au}(\text{dppe})_2]^+$ y sus análogos provocan roturas de las cadenas de ADN, entrecruzamiento entre ADN y proteínas, y afectan a la síntesis de las proteínas implicadas en la síntesis de ADN y ARN.¹⁴ Por otro lado, su naturaleza de catión lipídico deslocalizado (DLCs) les permite atravesar la membrana mitocondrial

y acumularse allí induciendo apoptosis por la vía mitocondrial: despolarización de su membrana, activación de las caspasas 3 y 9, así como inhibición de la TrxR y tioredoxina.¹⁵

En la actualidad el complejo tetraédrico $[\text{Au}(\text{P}(\text{CH}_2\text{OH})_3)_4]\text{Cl}$ ha sido propuesto para ensayos en fase I en cáncer de próstata, gastrointestinal y de colon por sus buenos resultados *in vivo* en perros y ratones (actividades en la escala nanomolar).¹⁶

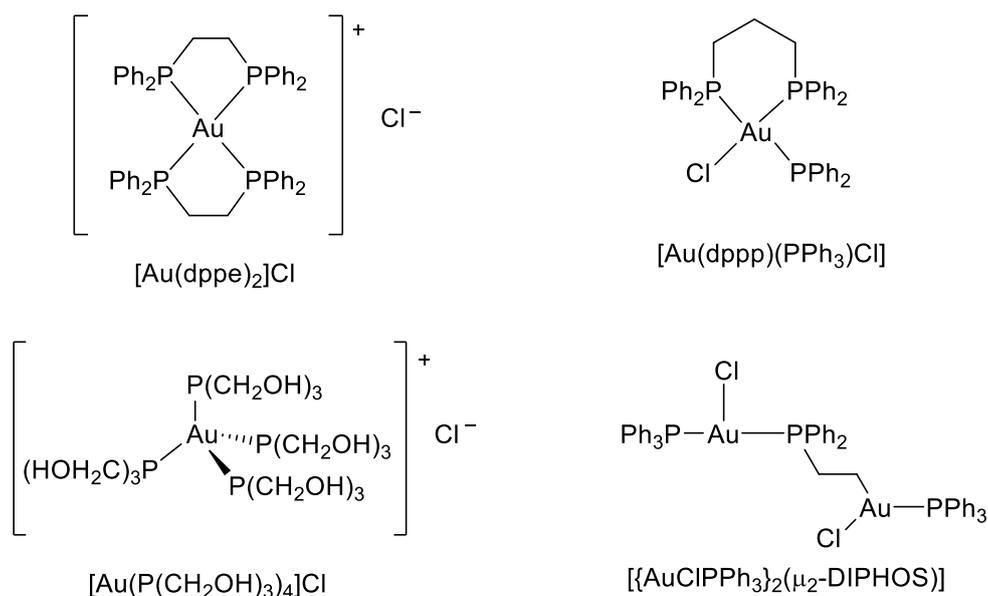


Figura 1.4 Complejos antitumorales de oro (I) con fosfinas

1.3.2.3 Complejos de oro(I) con carbenos NHC¹⁷

Los carbenos N-heterocíclicos son excelentes ligandos sigma dadores comparables a las fosfinas. La alta estabilidad del enlace C-Au los hace más robustos frente a la disociación y puede ser empleada para reducir los efectos secundarios. Además, la facilidad con que se pueden funcionalizar permite la modulación del carácter lipofílico, la incorporación de ligandos activos (citotóxicos, luminiscentes, grupos directores), o la síntesis de estructuras tridimensionales (figura 1.5). Por el momento ninguno de estos compuestos se encuentra en fase de ensayos clínicos pero muchos de ellos han mostrado muy buenos resultados *in vitro*. Su modo de acción se basa en general en la interacción con la mitocondria, donde tienden a acumularse por su carácter lipofílico. En cuanto a las dianas biológicas siguen el comportamiento de los complejos de oro e interaccionan con enzimas seleno o azufre dadoras como la TrxR o la tirosina fosfatasa,¹⁸ entre otras.

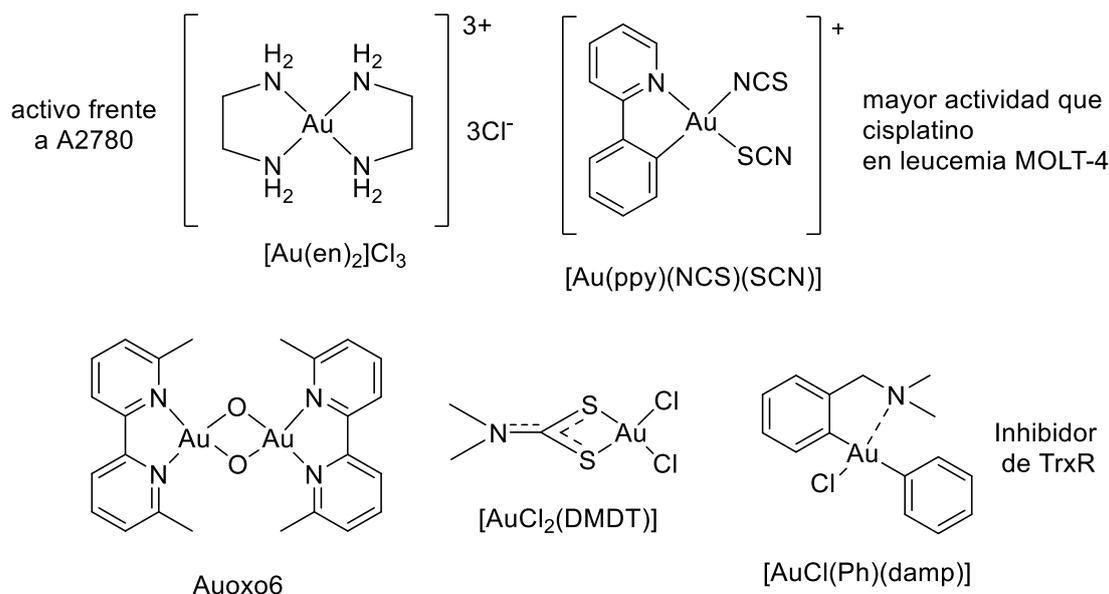


Figura 1.6 Complejos antitumorales de oro(III)

1.3.3 Otros metales

Rutenio

Los complejos de rutenio(III) tienen un gran potencial debido a su baja toxicidad. En efecto, son capaces de mimetizar al hierro y coordinarse a la transferrina²⁶, proteína de transporte del hierro del plasma. Las células cancerígenas presentan una mayor densidad de receptores de la transferrina por mayor demanda de hierro. Por su mayor tasa metabólica se encuentran en régimen de hipoxia y en consecuencia en un ambiente reductor. De este modo los complejos basados en Ru(III) son dirigidos preferencialmente a las células tumorales donde se reduce el metal a Ru(II) que es mucho más tóxico para la célula. Actualmente dos complejos de rutenio (III) se encuentran en ensayos clínicos para el tratamiento de tumores metastáticos (NAMI-A) y de cáncer colorrectal (KP1019) (figura 1.7). Su mecanismo de acción es aún muy difuso: los estudios revelan que NAMI-A no provoca citotoxicidad sino que es inhibidor de la metástasis, a través de la inhibición de la angiogénesis y otros procesos de proliferación.²⁷ KP1019 en cambio sí induce la apoptosis por la vía mitocondrial, que se relaciona con el aumento del estrés oxidativo.²⁸

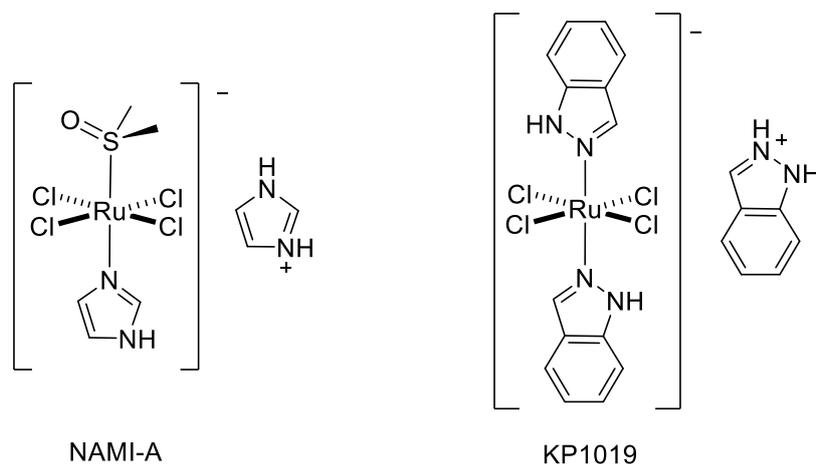


Figura 1.7 Complejos de Ru(III) en fase de ensayos clínicos.

Existen también complejos antitumorales que emplean directamente rutenio en su estado de oxidación +2 bajo la forma de compuestos Ru(II)-areno (figura 1.8). El metal va enlazado a alguna molécula de interés como el 5-fluorouracilo (inhibidor de la síntesis de la timidina y finalmente de la síntesis de ADN), inhibidores de la glicoproteína P (Pgp) o inhibidores de la glutatión S transferasa, ambas enzimas responsables de procesos de resistencia. Son de especial importancia aquellos complejos que están enlazados a una molécula de 1,3,5-triaza-fosfaadamantano (PTA) y que componen la familia de complejos RAPTA. Los derivados RAPTA presentan muy baja toxicidad así como inhibición de la metástasis.²⁹

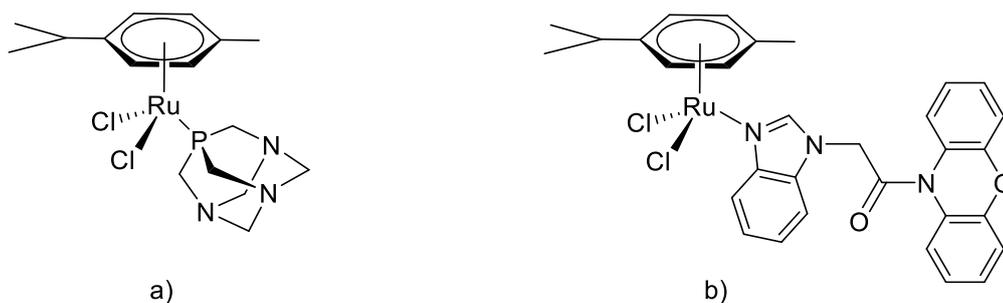


Figura 1.8 a) RAPTA-C (actualmente en ensayos pre-clínicos) y b) ejemplo de un complejo unido a una fenoxazina (inhibidor de Pgp).

Galio³⁰

El catión Ga^{3+} es capaz de mimetizar al Fe^{3+} no sólo en su unión a la transferrina como hacen los complejos de Ru^{3+} , sino que también se coordina a enzimas dependientes del hierro como la ribonucleótido reductasa cuya inhibición impide la síntesis de ADN. El complejo formado entre la transferrina y el Ga(III) compite con el complejo

transferrina-hierro por los receptores transferrina de las células disminuyendo su captación. Además también se ha observado que a nivel intracelular el complejo transferrina-galio es capaz de inhibir la liberación del hierro de su complejo transferrina disminuyendo aún más la cantidad efectiva de hierro en la célula. La disminución de los niveles de hierro afecta a la función mitocondrial y otros procesos dependientes de hierro e impide en última instancia la proliferación celular.

Los fármacos de primera generación vienen representados por sales inorgánicas de Ga como el nitrato de galio y el cloruro de galio. Presentan buena actividad frente a una serie de tumores, en especial para leucemia y linfomas, aunque su biodisponibilidad por administración oral es limitada. El nitrato de galio se aplica por vía intravenosa y se encuentra en fase II de ensayos clínicos en linfoma de no Hodgkin. Una correcta dosificación ha permitido reducir en gran medida su toxicidad. En cuanto al cloruro de galio se han realizado estudios de administración oral en pacientes observando una ligera respuesta en sujetos con cáncer de ovario.

La baja biodisponibilidad tras administración oral motivó el desarrollo de fármacos de segunda generación entre los que destacan el maltolato de galio y el KP46. Ambos responden a complejos organometálicos en donde los ligandos sirven para una mayor solubilidad en medio acuoso y facilitan la permeabilidad de membranas. Presentan mejores actividades que los fármacos de primera generación y en el caso del maltolato de galio permiten superar problemas de resistencia observados en el nitrato de galio como los asociados a la mutación de p53. El compuesto KP46 se encuentra en fase I/II de ensayos clínicos para tumores sólidos (renal, de estómago, ovarios, glándula parótida) y también ha sido evaluado en combinación con antitumorales basados en Pt (cánceres de ovario y colon) (figura 1.9).

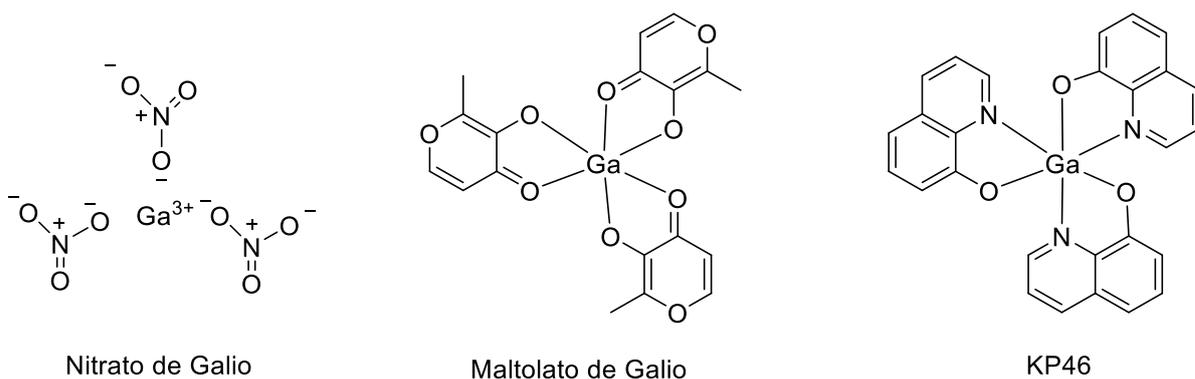


Figura 1.9 Complejos de galio antitumorales.

Metalocenos

En los años 80 Köpf y Köpf-Maier ensayaron una amplia variedad de metalocenos sobre líneas tumorales. De los compuestos testados destacó el diclorotitanoceno³¹ por su gran actividad. Se pensó originariamente que actuaría de manera análoga al cisplatino por los dos cloruros en posición *cis* pero esta teoría se ha ido descartando sin conocer exactamente cuál es el mecanismo de acción (muestra preferencia por ligandos oxígeno dadores de los grupos fosfonio como el ATP). Este complejo llegó hasta la fase II de ensayos clínicos pero su baja solubilidad y estabilidad en medio acuoso impidieron su formulación como fármaco.

Los metalocenos de hierro o ferrocenos también han mostrado buenas propiedades. Se piensa que estos complejos generan estrés oxidativo en las células por generación de radicales hidroxilo.³² La funcionalización del anillo ciclopentadienilo con ligandos activos o que conectan a otros metales activos como el Pt(II) ha permitido generar derivados con mayor actividad (figura 1.10).

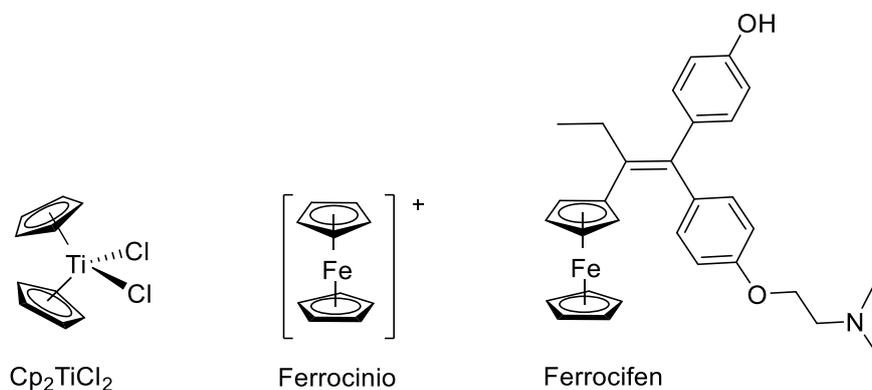


Figura 1.10 Ejemplos de metalocenos con actividad antitumoral

Iridio y rodio

Los complejos semi-sándwich de estos metales en su estado de oxidación +3 son capaces de comportarse como catalizadores dentro del medio celular y generar daño. Al ser deficientes en electrones aceptan fácilmente hidruros para a su vez catalizar la reducción de otras moléculas creando estrés oxidativo en el caso del iridio (figura 1.11, a)) por disminución del ratio NAD^+/NADH , y creando estrés reductivo en el caso del rodio (figura 1.11, b)) cuando se suministra formato como fuente inocua de hidruros.

Los complejos de iridio(III) ciclometalados también se pueden emplear en terapia fotodinámica. Al excitarlos mediante energía lumínica son capaces de transmitir esa energía al oxígeno excitándolo hasta su estado singlete $^1\text{O}_2$ altamente reactivo y responsable de las especies reactivas de oxígeno (ROS),³³ un conjunto de metabolitos derivados de la reducción parcial de oxígeno molecular. (figura 1.11, c)).

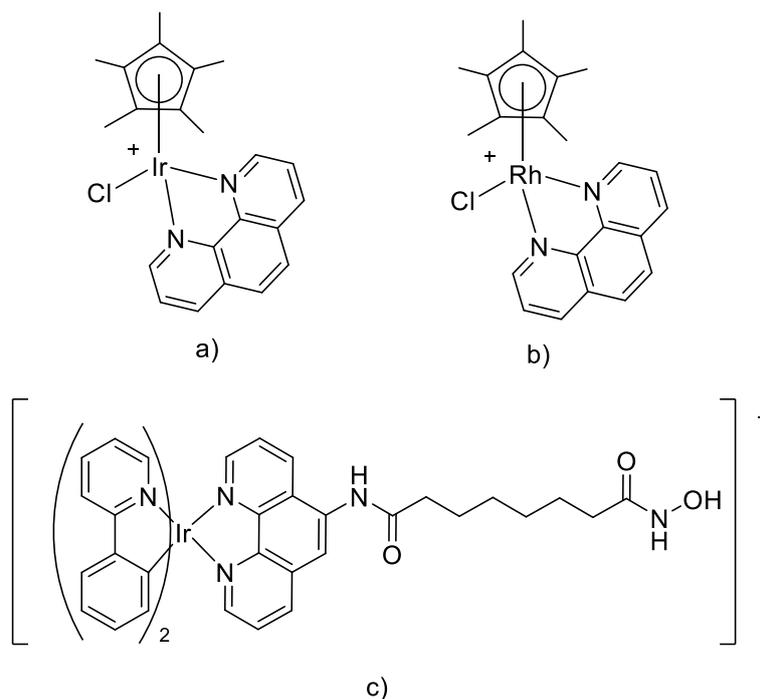


Figura 1.11 Complejos antitumorales basados en iridio y rodio.

1.4 Terapia fotodinámica

El origen de la terapia fotodinámica se remonta hasta el año 1900 cuando el estudiante de medicina Oscar Raab observó que una disolución de acridina expuesta a determinadas longitudes de onda causaba la muerte del organismo unicelular

Paramecium.³⁴ Habría que esperar hasta el año 1976 para encontrar el primer caso de uso en humanos para el tratamiento contra el cáncer, en concreto para el tratamiento de cáncer de vejiga.³⁵ En la actualidad la principal aplicación es el tratamiento de carcinomas a nivel cutáneo, aunque también se emplea para el tratamiento de ciertos cánceres de pulmón, esófago y cuello.³⁶

El concepto de terapia fotodinámica engloba a todos aquellos procesos en donde un profármaco inerte se activa por medio de radiación. La vertiente más popular se basa en la destrucción del tejido tumoral o enfermo a través la generación de radicales libres. Idealmente, los fármacos empleados se acumulan preferencialmente en las células cancerosas. Tras administrar al paciente el fármaco, habitualmente por vía intravenosa, se espera un tiempo (entre 24 y 72 horas) en el cual las células sanas habrán excretado la mayoría del fármaco mientras que las células tumorales aún lo conservarán en su interior. La irradiación con la longitud de onda adecuada permitirá de este modo que se destruyan únicamente las células tumorales. De manera adicional, al emplear este tratamiento también se producen daños en los vasos sanguíneos que irrigan al tumor, y se activa el sistema inmunológico creando así otros dos procesos sinérgicos que contribuyen a la eliminación del tumor. Sus limitaciones son la penetración de la radiación incidente, que decrece con la energía, y que implica que en la práctica esta terapia sólo se emplea para tumores superficiales. Es por ello que la principal aplicación son los carcinomas de origen cutáneo y no puede ser empleada para tumores de gran tamaño o que han producido metástasis. En la mayoría de los casos se emplea el porfímero de sodio como fármaco (figura 1.12).

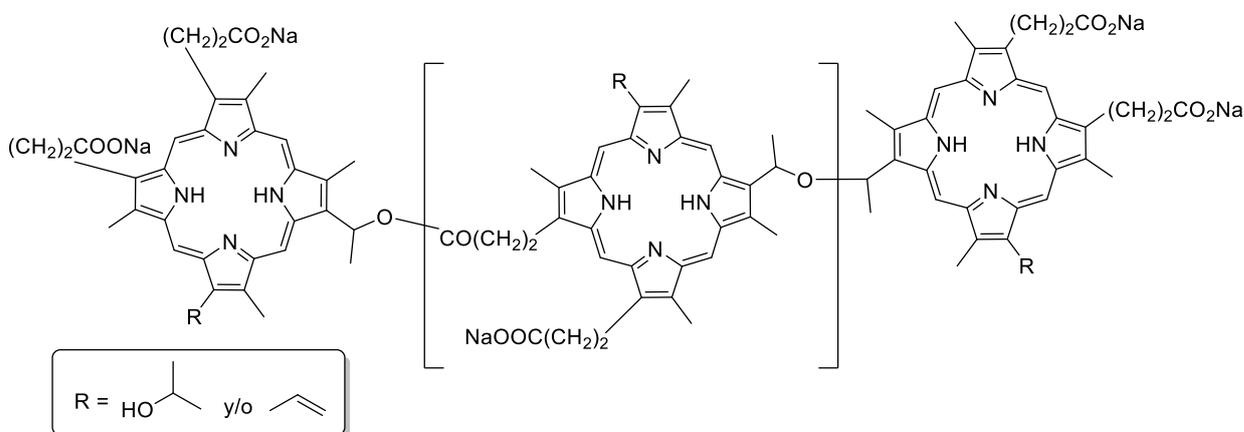


Figura 1.12 Estructura del porfímero de sodio.

Otras opciones que también se engloban dentro de la terapia fotodinámica responden a la liberación de moléculas activas. Como ejemplos encontramos la liberación de sustancias tóxicas por nanopartículas,³⁷ o las conocidas en inglés como CORMs (Carbon Monoxide Releasing Molecules) que liberan monóxido de carbono.³⁸

1.5 Mecanismos de acción

1.5.1 Problemática

En el apartado anterior se han citado ejemplos de fármacos o candidatos a fármacos basados en metales cuyo mecanismo de acción es aún incierto. En lo referente al oro, se han sucedido revisiones que recogen todas las vías de acción.³⁹ A modo de ejemplo, se detalla el caso del auranofin por su importancia como fármaco y candidato a agente antitumoral.

La acción terapéutica del auranofin para el tratamiento de la artritis reumatoide combina el efecto antiinflamatorio con la actividad inmunosupresora. Los ligandos tioglucosaperacetilada y trietilfosfina no son responsables de la actividad y su función consiste en mejorar la captación del metal por la célula. Se ha podido comprobar que el auranofin se une a una cisteína de la I κ B kinasa inhibiendo la liberación del factor de transcripción NF- κ B que codifica la expresión de genes relacionados con la inflamación.⁴⁰ Sin embargo, también son capaces de inhibir a las ciclooxigenasas, enzimas que se encargan de la formación de prostaglandinas que a su vez participan en los procesos inflamatorios. La actividad inmunosupresora se efectúa por inhibición de varios mecanismos: lisis dependiente de anticuerpos,⁴¹ liberación de enzimas lisosomales como la β -glucuronidasa y la lisozima (encargadas de la digestión de carbohidratos y de peptidoglucanos), función de las catepsinas (encargadas de la degradación de proteínas),⁴² función de la colagenasa dependiente de Zn de los neutrófilos,⁴³ activación de linfocitos T por inhibición de la proteína kinasa C,⁴⁴ activación de linfocitos B,⁴⁵ función fagocitaria mononuclear,⁴⁶ producción de superóxido,⁴⁷ quimotaxis y migración cutánea.

Se han enumerado la friolera de hasta 12 procesos diferentes para explicar el mecanismo de acción del auranofin en el tratamiento de la artritis reumatoide. Cabe

destacar que se han obviado otros procesos cuya influencia es menor o aún dudosa. Mientras se recopilaba esta información se ha podido constatar en las diferentes fuentes consultadas que otros complejos de oro unidos a tiolatos, como el tiomalato oro sodio, presentaban diferencias en su modo de acción (por ejemplo el tiomalato oro sodio hace aumentar la lisis dependiente de anticuerpos).¹⁶ Ante estos hechos parece que va a ser necesario establecer un estudio detallado de todas las interacciones posibles para cada fármaco o candidato a fármaco. Gracias a los conocimientos en metabolismo y biología molecular, se podrán clasificar por su influencia los procesos inhibidos para proponer un mecanismo de acción final.

El problema radica en que una vez identificado el tejido, células, mecanismos alterados, etc. que son responsables de la enfermedad, se evalúa por separado la influencia del fármaco sobre cada uno de los factores. Además, la forma de hacerlo consiste por ejemplo en medir si disminuye la cantidad de metabolitos generados por un glóbulo blanco (no se sabrá cuál es la diana sino que hay inhibición de la actividad de la célula en general),⁴⁸ si un orgánulo como la mitocondria experimenta hinchazón (hay ejemplos en los que no se correlaciona con la dosis suministrada indicando un mecanismo complejo)⁴⁹ o algo tan artificial como medir la inhibición del compuesto sobre una enzima aislada.⁵⁰

1.5.2 Elucidación del mecanismo de acción

La elucidación del mecanismo de acción de un compuesto se puede visualizar de manera esquemática como un recorrido que parte del estudio de la interacción con moléculas aisladas y acaba con el conocimiento completo del comportamiento desde que se suministra al paciente (figura 1.13).

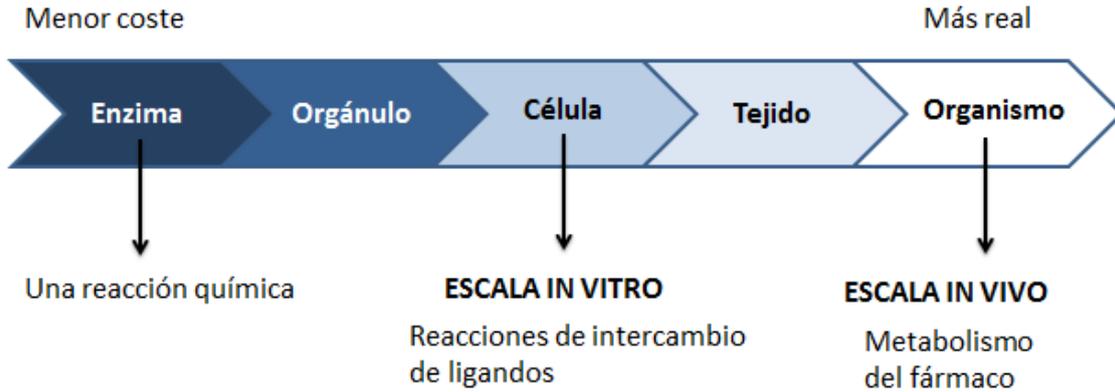


Figura 1.13 Etapas del proceso de elucidación de un mecanismo de acción.

Mientras que la interacción con posibles dianas biológicas se realiza con una molécula aislada, la comprensión del mecanismo *in vitro* y posteriormente *in vivo* se realiza gracias a las técnicas de diagnóstico a nivel celular o a escala macroscópica respectivamente.

1.6. Diagnóstico por imagen celular

Si se consulta el significado del término imagen celular la definición hace normalmente referencia a la obtención de imágenes de las células mediante la microscopía de fluorescencia. Los avances en resolución e imagen en 3D gracias al desarrollo de la microscopía confocal,⁵¹ la han situado como técnica a la vanguardia para la obtención de este tipo de imágenes. Se describe a continuación qué agentes diagnósticos se emplean para esta técnica así como un pequeño resumen de las otras técnicas empleadas en paralelo.

1.6.1 Imagen celular por microscopía de fluorescencia

1.6.1.1 Introducción a la luminiscencia

La luminiscencia es un proceso físico que consiste en la emisión de energía radiativa por parte de una molécula previamente excitada. El tipo de excitación permite catalogar el tipo de luminiscencia: fotoluminiscencia (por absorción de fotones), quimioluminiscencia (por el resultado de una reacción química), electroluminiscencia

(excitación por medio de energía eléctrica), triboluminiscencia (excitación por medio de una acción mecánica), etc.⁵²

Los procesos que tienen lugar en un sistema fotoluminiscente se pueden representar de manera esquemática gracias al diagrama de Jablonski (figura 1.14). En el diagrama se representan los estados electrónicos fundamental y excitados junto con sus diferentes estados vibracionales fundamental y excitados para cada estado electrónico dado. Las transiciones entre cada uno de los estados citados se representan por flechas.

El proceso luminiscente comienza con la molécula en su estado fundamental de tipo singlete S_0 . La absorción de un fotón ($<10^{-15}$ s) con la energía adecuada permite la excitación hasta otro estado excitado de tipo singlete S_n en un determinado estado vibracional ν_n . Si la radiación incidente no es monocromática, se absorberá un intervalo de energías cuyo mínimo es la energía entre $S_1\nu_0$ y $S_0\nu_0$. Tras la absorción de energía se obtendrá una distribución de estados $S_n\nu_n$.

A continuación se produce una relajación hasta el estado $S_1\nu_0$: las moléculas pierden el exceso de energía vibracional y rotacional por medio de choques con las moléculas colindantes (disolvente u otras moléculas del entorno) y de vibraciones internas cayendo al estado vibracional fundamental ν_0 (relajación vibracional, 10^{-12} s). Aquellas moléculas que se encontraban en un estado electrónico $S_n\nu_0$ donde $n>1$, experimentan previamente una relajación al estado $S_{n-1}\nu_n$ por solapamiento entre niveles vibracionales de ambos estados S , tras lo cual relajan al estado $S_{n-1}\nu_0$ y así sucesivamente hasta alcanzar el estado $S_1\nu_0$ (conversión interna, 10^{-12} s).

Una vez alcanzado el estado excitado $S_1\nu_0$, la molécula puede emitir radiación para alcanzar cualquiera de los estados vibracionales correspondientes al estado fundamental $S_0\nu_n$. Esta transición se denomina fluorescencia y tiene lugar en un intervalo de 10^{-9} – 10^{-6} s.

En sistemas fosforescentes, se produce un entrecruzamiento de sistemas del estado singlete excitado $S_1\nu_0$ a un estado triplete $T_n\nu_n$ (10^{-8} s). Tras alcanzar el estado $T_1\nu_0$ por relajación vibracional, ocurre la emisión al estado singlete fundamental $S_0\nu_n$ por un

proceso con un tiempo de vida media mucho más largo que cualquiera de los procesos anteriores (10^{-4} – 10^{-2} s).

Los estados electrónicos excitados pueden retornar al estado fundamental por otras vías que no dan lugar a emisión. Estas vías se catalogan como procesos no radiativos. Ejemplos de estos procesos son las relajaciones vibracionales y conversión interna ya citadas así como transferencia de energía a otras moléculas (quenchers), o las reacciones fotoquímicas.

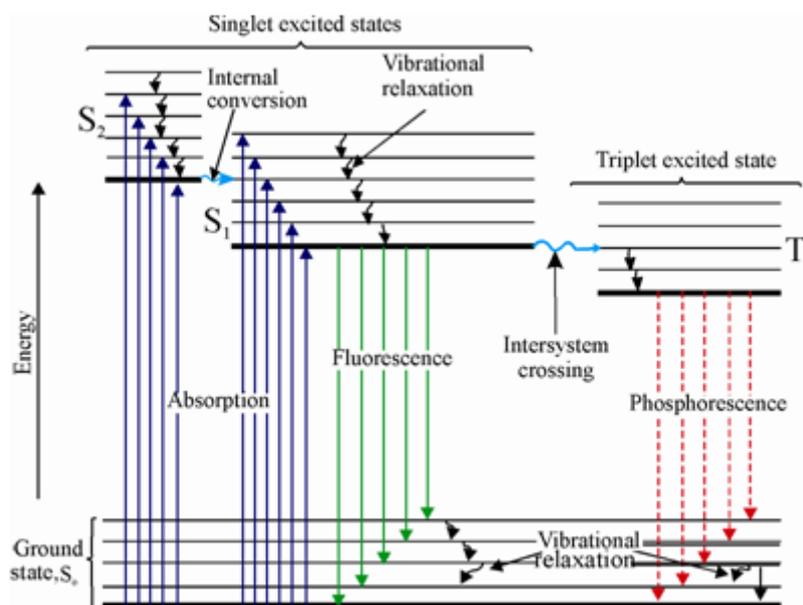


Figura 1.14 Diagrama de Jablonski de una sustancia fluorescente.

Cada estado electrónico viene representado por una función de onda dependiente del tiempo y de las coordenadas espaciales. La probabilidad de la transición entre dos estados se puede calcular de manera matemática y como resultado se obtienen unas soluciones o reglas de selección:

1. Sólo un electrón puede estar implicado en una transición.
2. Regla de espín: El momento de espín electrónico total debe mantenerse en la transición ($\Delta S = 0$). Como consecuencia las transiciones que impliquen un cambio de multiplicidad están prohibidas y son altamente improbables.
3. Regla de Laporte: En una molécula o ión centrosimétrico, las únicas transiciones permitidas son aquellas en las que hay cambio de paridad. ($g \leftrightarrow u$). De manera más simplificada, debe haber un cambio en el momento dipolar entre el estado

fundamental y excitado. Como consecuencia las transiciones entre orbitales d-d y f-f están prohibidas porque tienen la misma paridad ($\Delta l = \pm 1$).

Estas reglas de selección permiten comprender qué tipo de transiciones ocurrirán en los procesos de absorción y emisión. En sistemas atómicos se obtendrán líneas definidas, pero no es así para sistemas poliatómicos: la presencia de niveles vibracionales desdobra las líneas correspondientes a las transiciones electrónicas. Por último, la influencia del disolvente es capaz de crear más estados vibracionales de forma que aparece una sucesión de transiciones tan próximas que crean una banda.

La forma de las bandas se puede explicar mediante la combinación de dos postulados: la ley de Kasha y el principio de Franck Condon. El primero concluye que como los procesos de relajación vibracional son del orden de 1000 veces más rápidos que los procesos de emisión, la emisión tendrá lugar desde el estado vibracional fundamental. El principio de Franck Condon por su parte postula que las transiciones más probables son aquellas entre la que el acoplamiento vibracional es máximo. Dado que la transición es más rápida que los movimientos nucleares, las transiciones más probables tendrán lugar entre estados vibracionales con igual posición de sus átomos. La transición más probable no ocurrirá entre dos estados vibracionales iguales debido a la diferencia de energía potencial de ambos sistemas sino aquella en la que $v_0 \approx v_n + \text{desfase}$.

Supongamos que ocurre una excitación desde E_0v_0 hasta el estado E_1 y que el mayor solapamiento vibracional ocurre entre los estados v_0 y v_2 . En este caso se obtendrá una banda de absorción correspondiente a las transiciones $E_0v_0 \rightarrow E_1v_n$ cuyo máximo de intensidad vendrá representado por la transición $E_0v_0 \rightarrow E_1v_2$ (principio de Franck Condon). A continuación, atendiendo a la ley de Kasha, se alcanzará el estado E_1v_0 y de ahí tendrá lugar la emisión hasta E_0v_n . Como la naturaleza de los estados vibracionales no cambia al pasar de un estado electrónico a otro, si el mayor solapamiento ocurría entre v_0 y v_2 en el proceso de absorción, también ocurrirá en la emisión. Se obtendrá por tanto una banda de emisión correspondiente a las transiciones $E_1v_0 \rightarrow E_0v_n$ cuyo máximo de intensidad vendrá representado por la transición $E_1v_0 \rightarrow E_0v_2$. El resultado final serán dos bandas que son imágenes especulares entre sí (ver figura 1.15). La diferencia entre máximo de absorción y de emisión se llama diferencia de Stokes y es

un parámetro muy importante en el diseño de sistemas luminiscentes como se verá más adelante.

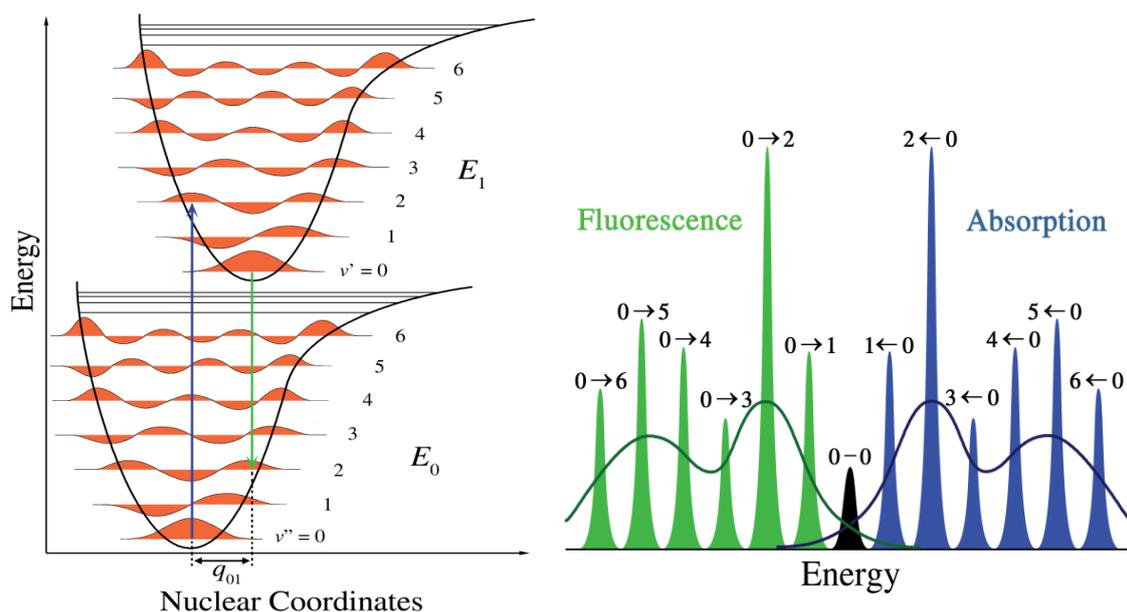


Figura 1.15 Representación de la energía de los estados E_0 y E_1 en función de las coordenadas nucleares (izquierda) y espectro de excitación y emisión resultante (derecha).

A efectos de poder comparar la intensidad, velocidad y naturaleza de las transiciones, éstas se caracterizan por una serie de parámetros:

- ✓ Rendimiento cuántico (ϕ): representa el cociente entre los fotones absorbidos y emitidos y es adimensional. Un elevado rendimiento cuántico se relaciona con una elevada intensidad de emisión.
- ✓ Tiempo de vida media (τ): representa el tiempo promedio en el que permanece la molécula en su estado excitado antes de emitir un fotón.
- ✓ Naturaleza de la transición: en función de los orbitales implicados en la transición se derivan varios tipos de transiciones (figura 1.16):
 - Transición intraligando (IL) o centrada en el ligando (LC): la transición electrónica tiene lugar entre orbitales de un mismo ligando, normalmente $\pi \rightarrow \pi^*$.

- Transición centrada en el metal (MC): la transición electrónica tiene lugar entre orbitales de un mismo metal. En general muy débiles por estar prohibidas por la regla de Laporte, son las transiciones que tienen lugar en complejos emisores basados en lantánidos (transiciones f-f).
- Transferencia de carga (CT): hace referencia a un conjunto de transiciones en donde hay transferencia de un electrón entre dos átomos diferentes. Puede ser entre metales MMCT, de metal a ligando MLCT, de ligando a metal LMCT, entre dos ligandos diferentes LLCT o entre el complejo excitado y el disolvente CTTS. Estas transiciones en la práctica pueden estar mezcladas dando lugar por ejemplo a transiciones MMLCT (transferencia de carga de los orbitales de un metal a un orbital molecular con contribución de otro metal y un ligando).

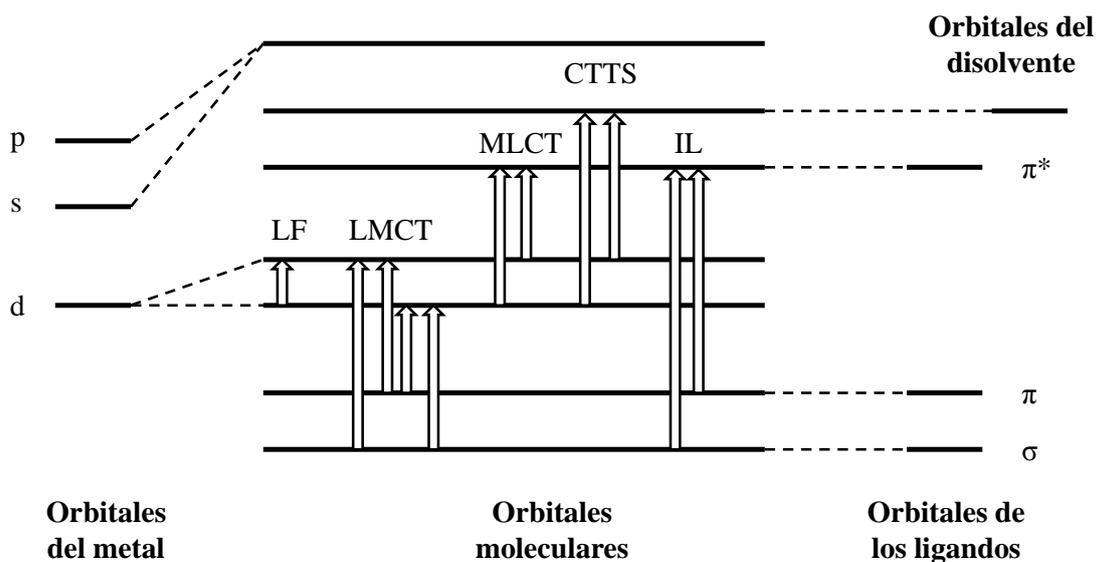


Figura 1.16 Diagrama de orbitales moleculares para un complejo de coordinación con geometría octaédrica con sus posibles transiciones electrónicas.

La fotoluminiscencia denotada habitualmente como luminiscencia, se basa en la excitación por absorción de un fotón y la posterior emisión de un fotón de menor energía para recuperar el estado fundamental. Las biomoléculas que componen las estructuras celulares y las propias biomoléculas de interés como el ADN o ciertas proteínas no presentan buenas propiedades luminiscentes. Para visualizarlas se utilizan moléculas emisoras o fluoróforos a las que se conjugan permitiendo visualizar su

biolocalización en la célula. Pueden combinarse con un fármaco para estudiar sus posibles dianas biológicas o bien anclarse a una biomolécula de manera muy específica, ejerciendo de tinte fluorescente del orgánulo en el que se localiza dicha biomolécula. Según la naturaleza química del fluoróforo se pueden establecer las categorías expuestas a continuación.

1.6.1.2 Fluoróforos orgánicos de tamaño medio

Las transiciones implicadas en la fluorescencia de estos compuestos son de tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ por lo que se componen de ciclos aromáticos conjugados entre sí (fig 1.17). Su principal ventaja es la disponibilidad comercial. A cambio presentan numerosas desventajas como bajos rendimientos cuánticos, excitaciones a altas energías que pueden dañar a la célula, elevada lipofilidad así como una mayor tendencia al photobleaching.⁵³

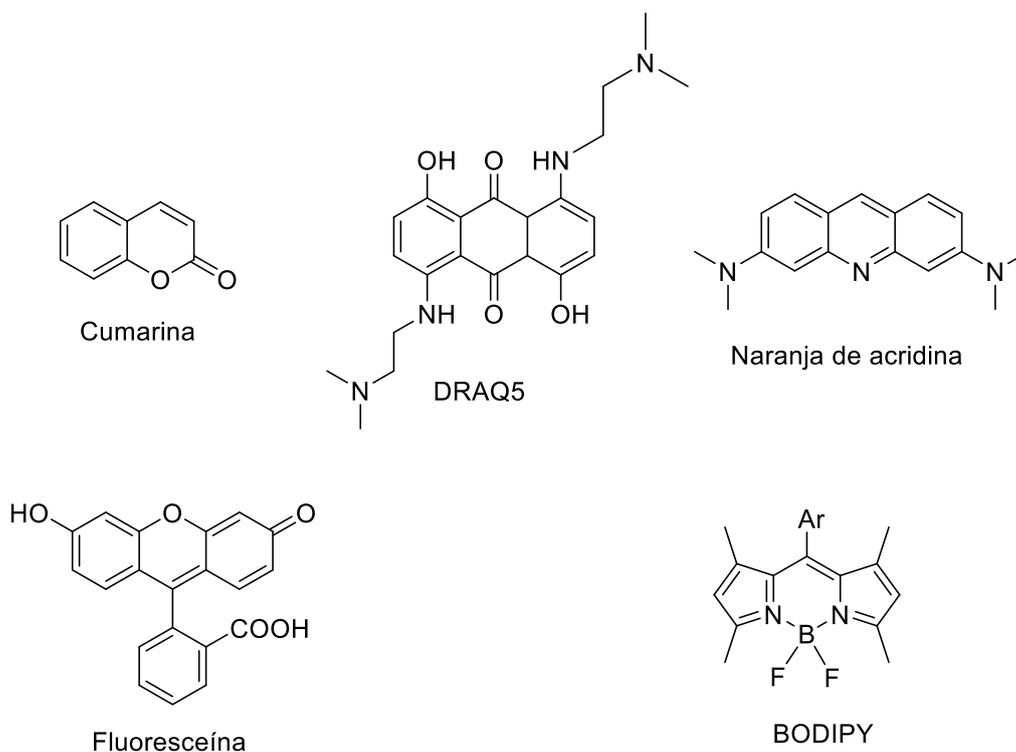


Figura 1.17 Ejemplos de fluoróforos orgánicos.

1.6.1.3 Proteínas fluorescentes

Descubrimiento que mereció el premio Nobel de 2008 en Química para Chalfie, Shimomura y Tsien, la proteína verde fluorescente (GFP) es una secuencia de 230 aminoácidos que forma una estructura terciaria de barril beta con una hélice alfa en su interior, y que emite luz verde ($\lambda_{em} = 509$ nm) al ser iluminada con luz azul ($\lambda_{exc} = 475$

nm). El gen que codifica esta proteína está aislado y en la actualidad se puede incorporar al gen que codifica otras proteínas para que el organismo sintetice por sí mismo la proteína a estudiar ya marcada con esta secuencia. Por modificación de la secuencia se ha logrado alcanzar otros colores como el amarillo (YFP) o el rojo (RFP).

La principal aplicación hasta la fecha de estas proteínas ha consistido en obtener información sobre la red neuronal en el sistema nervioso de ratones y posteriormente otros seres vivos. Merece destacar el experimento *brainbow*⁵⁴ en el que se combinaron de manera aleatoria fragmentos de ADN que codificaban la producción de estas proteínas fluorescentes de forma que cada neurona sintetizó una combinación de proteínas dando un color diferente y permitiendo diferenciarse de la contigua (figura 1.18).

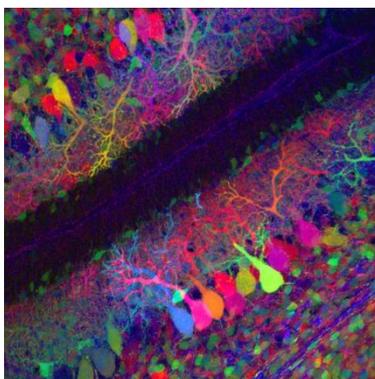


Figura 1.18 Neuronas con su árbol dendrítico (células de Purkinje) en cerebelo de ratón.

1.6.1.4 Complejos de metales de transición

Lantánidos⁵⁵

Los agentes de contraste basados en lantánidos emplean generalmente Eu(III) ó Tb(III) porque emiten en el visible (rojo y verde respectivamente). Las transiciones f-f propias de los lantánidos son características de cada átomo y están prohibidas por la regla de Laporte. Para acceder al estado emisor se recurre a la incorporación de un cromóforo que se excita y transfiere su energía (ligando antena) al lantánido. A cambio se obtienen compuestos emisores con elevados tiempos de vida (en torno a milisegundos). Dejando un lapso de tiempo entre excitación y detección, se consiguen descartar las interferencias causadas por la luz reflejada y la propia autofluorescencia del medio, cuyos tiempos de vida son muy inferiores (fluorescencia resuelta en el tiempo).

Como la luminiscencia se puede desactivar fácilmente gracias a relajaciones vibracionales por enlaces C-H, O-H y N-H, el ión lantánido se rodea de uno o varios ligandos polidentados que lo protegen del medio, mejoran su lipofilidad y reducen su citotoxicidad (los iones libres son altamente tóxicos) (figura 1.19). La influencia del entorno sobre su emisión ha situado estos compuestos como excelentes sensores de otros iones,⁵⁶ tejidos⁵⁷ o biomoléculas⁵⁸ destacando el trabajo de los Prof. D. Parker y J. C. Bünzli. Por último destacar que recientemente se han sumado complejos de yterbio, neodimio o praseodimio que emiten en el infrarrojo cercano a la librería de compuestos lantánidos empleados en bioimagen.⁵⁹

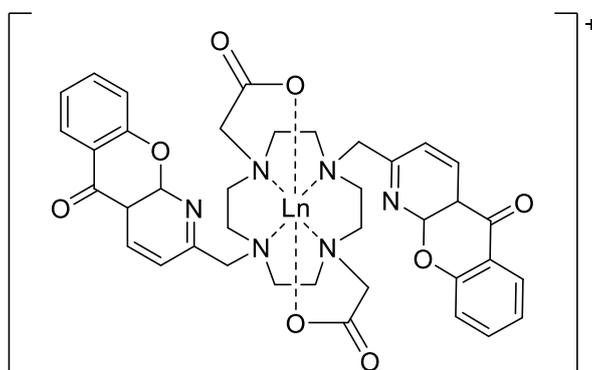


Figura 1.19 Estructura típica de un complejo lantánido emisor. La azaxantona ejerce el papel de ligando antena.⁶⁰

Metales d⁸

Existen pocos casos de complejos basados en metales d⁸ empleados en imagen celular. De entre ellos el metal más popular es el Pt(II) con reconocido comportamiento fosforescente y emisiones mixtas desde estados ³LC y ³MLCT. Sus complejos luminiscentes presentan ligandos quelato ciclometalados (N[^]C[^]N ó C[^]N[^]N) o bi o terpiridinas en combinación con ligandos de campo fuerte (alquinos) para asegurar que los orbitales d quedan por encima de los de los ligandos en el diagrama de energía. Al igual que se ha citado en los lantánidos, su elevado tiempo de vida se ha empleado para la discriminación de la emisión frente a tintes orgánicos nucleares. Por otro lado algunos complejos son aptos para la excitación por medio de dos fotones⁶¹ permitiendo una mayor penetración en el tejido de la radiación.⁶²

Metales d⁶

Agrupan a una serie de metales de la segunda (Ru(II)) y tercera serie de transición (Re(I) y Ir(III)) (figura 1.20) y constituyen el grueso de los ejemplos en imagen celular por luminiscencia con metales por sus excelentes propiedades físicas y químicas — fotoestabilidad, inercia química y perfiles de excitación/emisión adecuados. La emisión tiene lugar desde el estado emisor ³MLCT con contribución del estado ³LC para algunos casos (sobre todo Ir(III)). Se emplean ligandos de campo fuerte (CO, N dadores, C dadores,...) para asegurar que la energía de los orbitales d antienlazantes del metal es superior a la del estado emisor ya que estos orbitales d antienlazantes se desexcitan por procesos no radiativos.

Iridio: los complejos de la forma $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$ donde C[^]N representa un ligando ciclometalado como la fenilpiridina y N[^]N una diimina quelato como la 2,2'-bipiridina son los más empleados hasta la fecha (figura 1.20). Aunque estos compuestos son bien conocidos por sus propiedades ópticas (fácil modulación de la emisión, buenos rendimientos cuánticos, elevados tiempos de vida), no fue hasta 2008 cuando se emplearon por primera vez para imagen celular por el grupo de Huang.⁶³ Debido al gran número de ciclos aromáticos los complejos presentan una lipofilia considerable observando en algunos casos la acumulación en estructuras lipídicas en el citoplasma. Sin embargo, estos ciclos constituyen igualmente un soporte para introducir diferentes sustituyentes que modulen las propiedades, encontrando en la actualidad una biblioteca de compuestos para cada tipo de orgánulo.⁶⁴

Renio: sus compuestos luminiscentes son complejos octaédricos con tres ligandos carbonilo en disposición *fac*, un ligando diimina quelato y un ligando axial (halogenuros, ligandos N dadores) (figura 1.20). El primer ejemplo de imagen celular se publicó en 2004 por Zubietta en donde se quería comprobar que la incorporación del metal a un ligando con una secuencia peptídica no influía en su capacidad para interactuar con el receptor de péptidos formilados.⁶⁵ Es posible modular su biodistribución por incorporación de grupos directores en el ligando axial: de esta manera se han podido sintetizar agentes de contraste específicos de mitocondria,⁶⁶ núcleo,⁶⁷ aparato de Golgi, retículo endoplasmático⁶⁸ y membrana plasmática.⁶⁹

Rutenio: los complejos con estructura general $[\text{Ru}(\text{N}^{\wedge}\text{N})_3]^{2+}$ donde $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ representa una bipyridina o fenantrolina han sido los complejos tradicionales para imagen celular (figura 1.20). Su tendencia al quencheo por transferencia de la energía del estado $^3\text{MLCT}$ al estado triplete del oxígeno ha permitido su desarrollo como sensores de oxígeno.⁷⁰ El grupo del Prof. J. K. Barton ha sido uno de los mayores contribuyentes para su aplicación como sensores de ADN: los complejos de rutenio se intercalan entre el ADN experimentando un aumento de hasta 4 órdenes de magnitud en la intensidad de la emisión.⁷¹

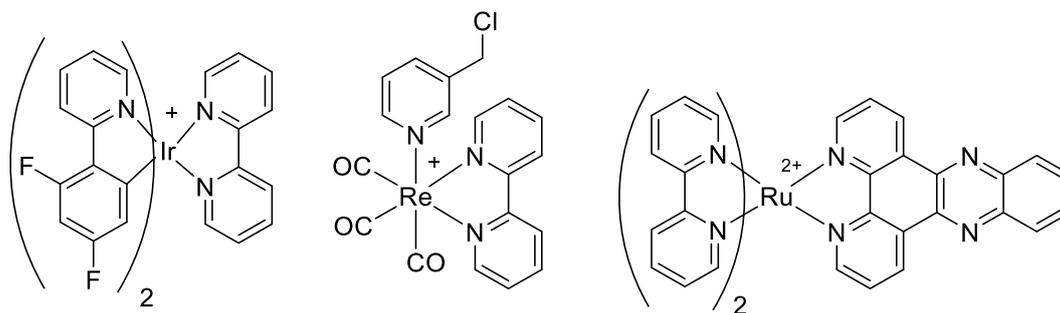
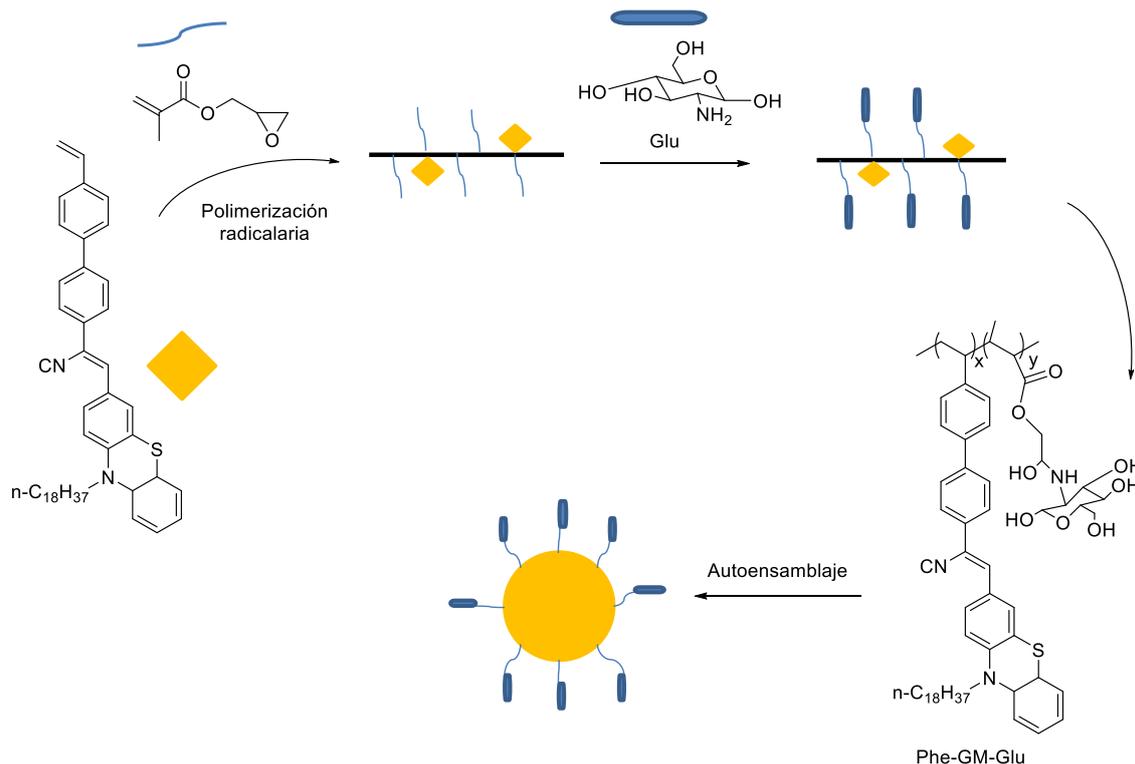


Figura 1.20 Agentes de contraste basados en Ir(III), Re(I) y Ru(II).

1.6.1.5 Nanopartículas poliméricas fluorescentes

Son nanopartículas con una matriz polimérica que presentan grupos fluoróforos en su interior. Su aplicación más habitual es como sensores de iones o biomoléculas. La interacción con estas moléculas queda por tanto registrada por un cambio en la luminiscencia, normalmente por un quencheo de ésta.⁷²

El diseño de estas nanopartículas ha evolucionado hacia las denominadas AIE (aggregation induced dyes) con mejores rendimientos cuánticos y menos sujetas al quencheo no deseado.⁷³ Las AIE presentan cromóforos que al agregarse en el seno de la nanopartícula crean un conjunto fuertemente emisor (ver esquema 1.1).

Esquema 1.1 Ejemplo de AIE.⁷⁴

1.6.1.6 Quantum dots⁷⁵

Son un tipo de nanopartículas que se pueden excitar por medio de energía lumínica o eléctrica y emiten luz con una anchura espectral muy reducida. Se componen de un núcleo que puede ser de CdS, CdSe, CdTe, InAs, PbS. El núcleo se protege por una capa de ZnS que a su vez se recubre de un polímero al que se le anclan moléculas para mejorar las propiedades en el medio biológico (anticuerpos, péptidos, agentes solubilizantes).

El interés de estas partículas reside en que la longitud de onda a la que emiten es dependiente del tamaño del quantum dot por lo que resulta muy modulable. Otras de sus ventajas frente a otros tintes fluorescentes son su elevado coeficiente de extinción molar y la mayor estabilidad frente a una excitación prolongada (menor photobleaching).

1.6.2 Imagen celular por Resonancia Magnética Nuclear (NMRI)

Es una técnica basada en los fundamentos de la resonancia magnética nuclear. Al igual que cuando se caracterizan los compuestos químicos por ^1H -RMN, ^{31}P -RMN, etc. se somete al paciente o a la muestra a un alto campo magnético para alinear los espines

nucleares en una dirección. Entonces se excita por medio de energía de radiofrecuencias el spín del protón y se recoge la emisión al volver al estado fundamental. En este caso los parámetros más importantes son los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y axial (T_2). El valor de T_1 y T_2 viene determinado por el tipo de molécula en que se encuentra el H, permitiendo diferenciar tejidos según su composición química (lipídica, proteica, fundamentalmente acuosa,...), creando de este modo imágenes (figura 1.21).

Es una técnica rápida, posee una gran resolución y capacidad de penetración que permite obtener imágenes en 3D. Sin embargo su reducida sensibilidad ($10^{-3} - 10^{-5}M$) requiere de agentes de contraste que mejoren el límite de detección propio del protón. Los agentes de contraste han permitido el seguimiento de biomoléculas.⁷⁶ Se denominan agentes positivos si aumentan la intensidad de la señal (acortan T_1) y negativos si disminuyen la intensidad (acortan T_2).

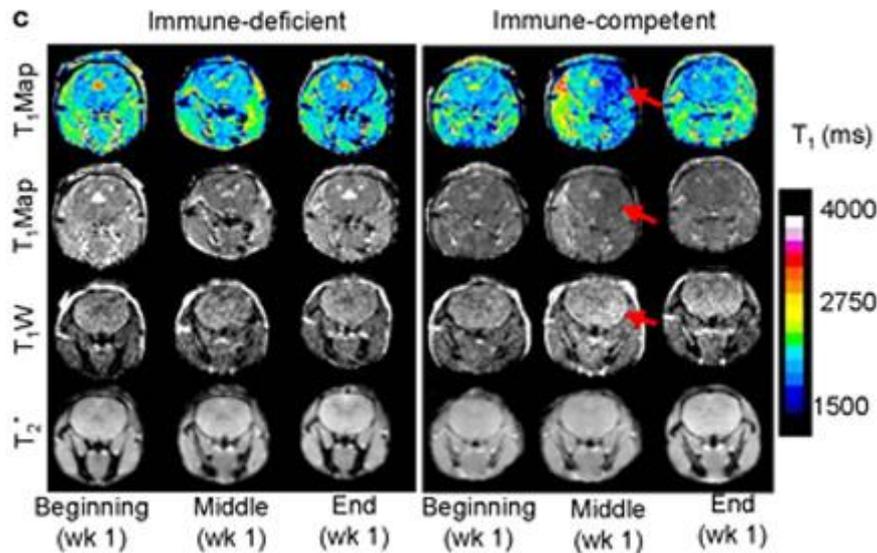


Figura 1.21 Seguimiento de la muerte celular por disminución de T_1 empleando agentes de contraste.⁷⁷

Como agentes positivos se emplean mayoritariamente compuestos paramagnéticos de gadolinio(III) y como agentes negativos óxidos superparamagnéticos de hierro o una combinación de hierro y platino en forma de partículas también superparamagnéticas.

1.6.3 Imagen celular por tomografía de emisión de positrones (PET)

Su fundamento se basa en la emisión de positrones por parte de una muestra radioactiva.⁷⁸ Los positrones emitidos colisionan con electrones cercanos para crear un positronio que se transforma en dos fotones de 511keV con direcciones opuestas. Un

detector circular que detecta y relaciona las parejas de fotones es capaz de reconstruir una imagen a partir del lugar en el que se han emitido dichos fotones. El principal atractivo de esta técnica es que se pueden incorporar radionúcleos emisores de positrones a cualquier tipo de fármaco o metabolito y rastrear su distribución sin alterar las propiedades físico-químicas de dicha molécula (figura 1.22). Sin embargo su mayor limitación a nivel de rastreo es la resolución que se sitúa en la escala milimétrica. Por estas razones se emplea para imagen *in vivo* en combinación con otras técnicas como la tomografía axial computarizada (obtiene imágenes anatómicas por rayos X) o la NMRI.

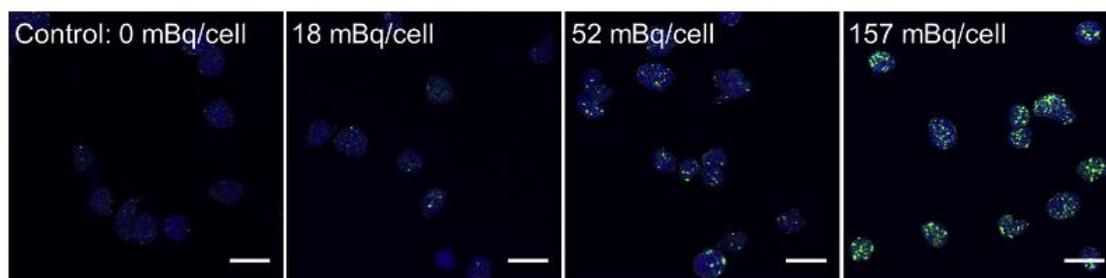


Figura 1.22 Células $\gamma\delta$ -T con crecientes concentraciones de radiomarcador para su posterior rastreo *in vivo*.⁷⁹

Desgraciadamente, los radionúcleos empleados deben ser generados en un ciclotrón⁸⁰ y tienen una vida media relativamente corta, lo que obliga a asentarse en las proximidades a los laboratorios que trabajan con estos agentes diagnósticos.

Existe otra versión de la PET denominada SPECT (single photon emission computed tomography) en donde el radionúcleo es emisor de rayos gamma. Es ligeramente más imprecisa que la PET porque no se detectan parejas de fotones por lo que es más difícil corregir las desviaciones. Mientras que en PET se emplea una variedad de radionúcleos según la molécula a marcar, en SPECT se emplea normalmente el mismo radionúcleo (^{99m}Tc) que se coordina a diferentes moléculas. Se pueden combinar las técnicas PET y SPECT para mapear dos tejidos diferentes a la vez o para mejorar la calidad de la imagen.

1.6.4 Imagen celular por microscopía electrónica

Esta técnica ampliamente conocida crea imágenes a partir de los electrones dispersados (SEM, Scanning Emission Microscopy) o transmitidos (TEM, Transmission Emission

Microscopy) por una muestra al incidir un haz de electrones sobre ella. Los electrones dispersados informan sobre la superficie de la muestra mientras que los electrones transmitidos informan sobre la estructura tridimensional. Las condiciones de la medida no permiten analizar las células vivas.⁸¹ Proporciona información similar a la microscopía de fluorescencia (figura 1.23) pero a cambio la instrumentación es más complicada y resulta menos selectiva ya que los diferentes tintes empleados en microscopía de fluorescencia permiten diferenciar los orgánulos entre sí.

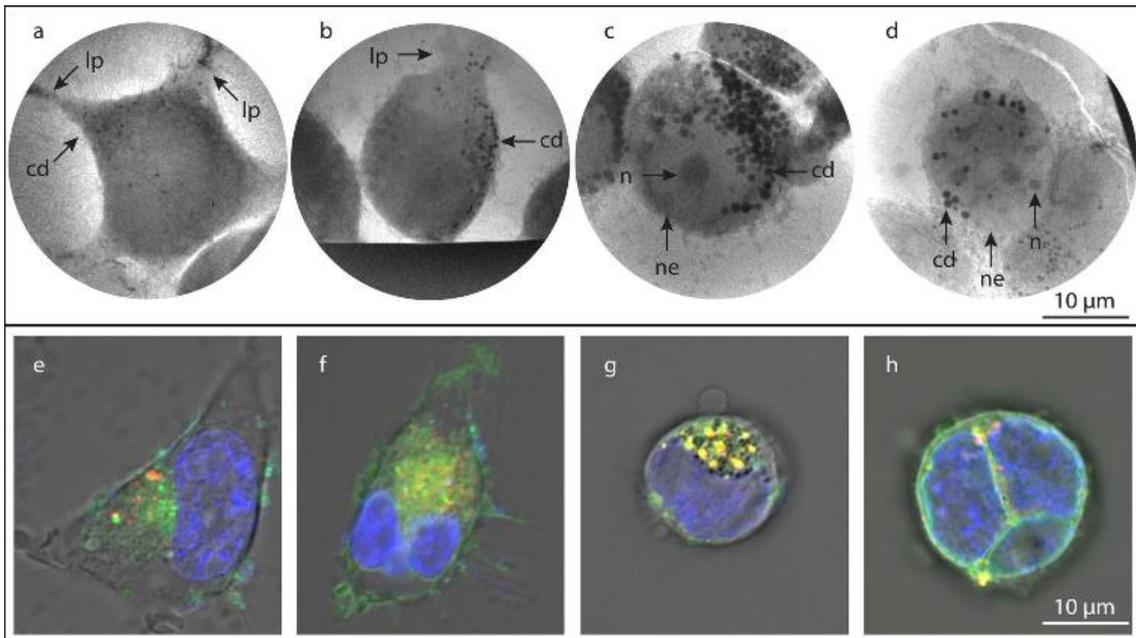


Figura 1.23 Seguimiento de inanición de HEK293T por microscopía electrónica (a-d) y confocal (e-f). Una inanición más pronunciada acarrea la formación de vesículas señaladas como “cd” y “ne”.⁸²

1.7 Agentes teragnósticos

La combinación de agentes terapéutico y diagnóstico en un mismo fármaco es necesaria cuando no es posible desarrollar eficazmente esta labor con dos fármacos separados. Cuanto menos se conoce sobre el mecanismo de acción de un compuesto, más necesaria es esta combinación. Tal y como se ha comentado previamente, el seguimiento a tiempo real del fármaco sólo es posible si posee propiedades que se puedan explotar para rastrearlo.

Resulta evidente la dificultad a nivel sintético de incorporar un fragmento detectable al agente terapéutico a estudio. Además, ambos agentes deben ejercer su función en el mismo rango de concentraciones. Sin embargo, la estrategia teragnóstica gana cada vez

más adeptos porque las ventajas que proporciona son capaces de superar sus limitaciones:

- ✓ Cuanto menor es el grado de conocimiento sobre el comportamiento del agente terapéutico más complicado es proponer un agente diagnóstico que informe adecuadamente de su efecto. Combinarlos en una molécula sirve para asegurarse de que el agente diagnóstico informa del efecto del agente terapéutico y se reducen etapas de ensayo-error en la búsqueda del agente óptimo.
- ✓ Si se utilizan por separado, el agente diagnóstico puede causar perturbaciones que se atribuyan erróneamente al efecto del agente terapéutico y falseen las conclusiones sobre su efecto.
- ✓ La acción de un agente terapéutico puede originar cambios estructurales en otras partes de la célula diferentes del lugar donde ha ejercido su efecto. Por ejemplo, se puede generar apoptosis por estrés oxidativo al interaccionar con enzimas mitocondriales y observar permeabilidad en la membrana nuclear dando a entender erróneamente que la acción tiene lugar en el núcleo.
- ✓ Un único compuesto ejerce dos funciones, de modo que tan sólo es necesario preparar una dosis de compuesto. A nivel *in vivo* esto recae en la comodidad para el paciente y a nivel *in vitro* en la facilidad para el investigador. Reduciendo el número de etapas se reducen también las posibles fuentes de error.
- ✓ Se puede establecer fácilmente la comparación entre cambios estructurales en el agente terapéutico y su actividad, lo que comúnmente se conoce con las siglas en inglés SAR (Structure-Activity-Relationship)
- ✓ En determinadas ocasiones se observa un comportamiento sinérgico entre ambos agentes. Esto puede ser a través de una mejor internalización, protección hasta la llegada a la diana, dirección a otro orgánulo, etc.

- ✓ En la escala *in vivo*, se puede obtener información adicional relacionada con la farmacocinética (vida media del fármaco en el organismo y vías de eliminación).

1.7.1 Agentes teragnósticos con fluoróforos basados en metales

La utilización de fluoróforos orgánicos unidos a fragmentos bioactivos representa la manera más común de diseñar un agente teragnóstico. La disponibilidad comercial de muchos de estos fluoróforos así como la relativa sencillez con que se pueden acoplar son su principal fuente de atractivo. Sin embargo, presentan una serie de limitaciones que explican la utilización en paralelo de complejos metálicos luminiscentes.

En primer lugar, los perfiles de excitación y emisión de estos fluoróforos orgánicos se localizan a bajas longitudes de onda. Por un lado, existe el riesgo de interferencia con otras biomoléculas que absorben a radiaciones similares (proteínas con aminoácidos aromáticos, ADN, etc.) y por otro lado, la radiación empleada es muy energética y corre el riesgo de generar daño celular. Además su capacidad de penetración en los tejidos es baja limitando su aplicación a tumores pequeños y superficiales. En cambio, los metales d^6 se excitan a energías más bajas gracias a la contribución del metal en el proceso de emisión. En efecto, estos metales presentan electrones menos estabilizados que los ligandos orgánicos por lo que su excitación requiere de menos energía.

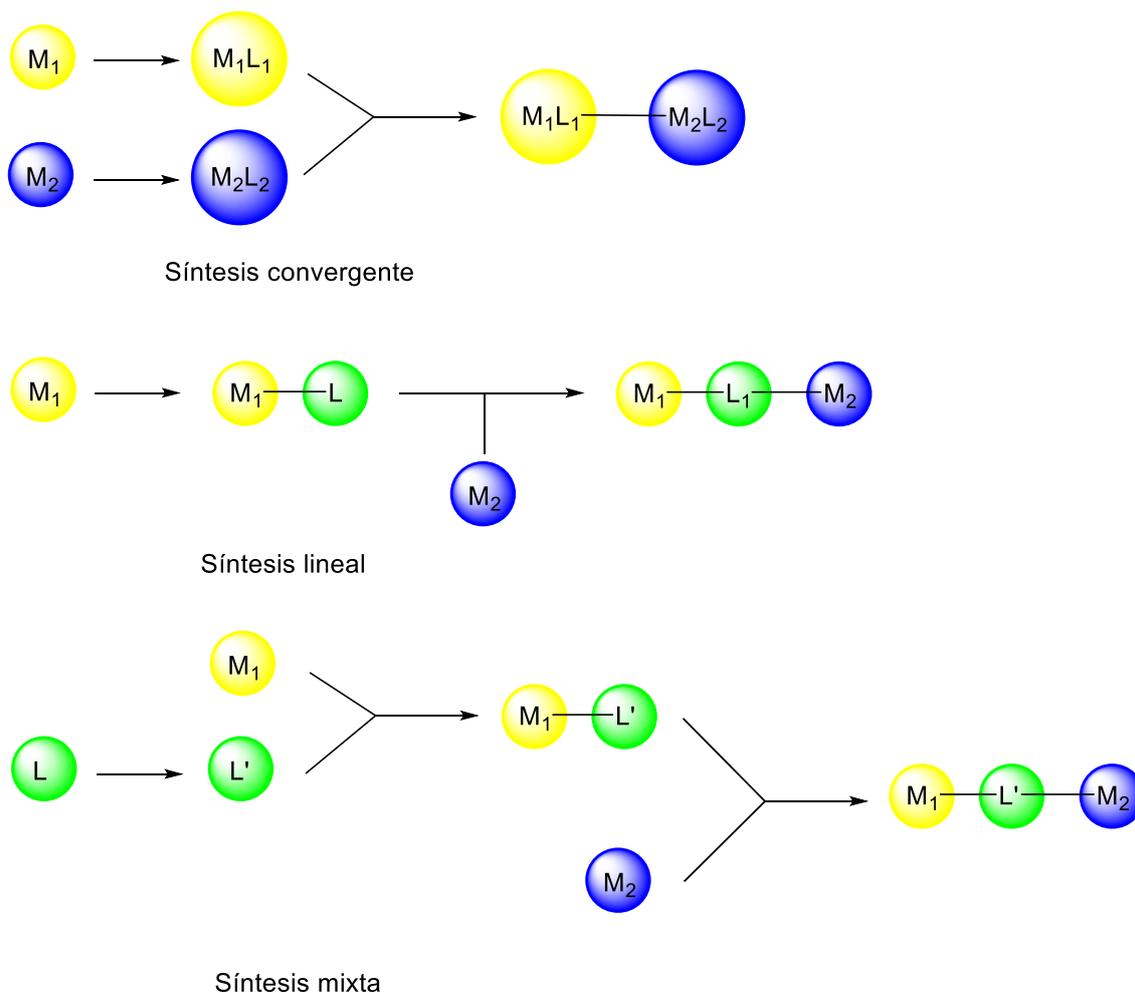
En segundo lugar, muchos de los fluoróforos basados en metales presentan emisiones con elevados tiempos de vida, respondiendo a comportamientos fosforescentes (10^{-6} – 10^{-3} s). Como los procesos de autofluorescencia del medio y reflexión tienen tiempos de vida mucho menores (10^{-12} s), se pueden eliminar estas interferencias recogiendo la emisión en instantes comprendidos entre el tiempo de vida de ambos procesos (aplicación de la microscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo).

En tercer lugar, las emisiones de estos metales presentan generalmente elevados desplazamientos de Stokes (diferencia entre el máximo de excitación y emisión). Se reduce de este modo la reabsorción de la emisión (debido a la existencia de niveles de energía vibracionales, cuando el desplazamiento de Stokes es bajo los espectros de excitación y emisión están parcialmente solapados) con un menor autoquencheo de la emisión que para los fluoróforos orgánicos.

En cuarto lugar, la modulación del color de la emisión resulta más sencilla en complejos metálicos ya que HOMO y LUMO se localizan por costumbre en diferentes partes de la molécula (diferentes ligandos o metal y ligando) haciéndolos más compatibles con los diferentes tintes de orgánulos comerciales que se utilizan como patrones internos en las técnicas de microscopía de fluorescencia.⁸³

Por último, hay que resaltar que los complejos de coordinación son mucho más flexibles en su síntesis para incorporar algún tipo de funcionalización. La progresiva incorporación de los ligandos etapa por etapa permite incluir biovectores que mejoran la solubilidad o permeabilidad celular. También es posible modular la carga del complejo final mejorando igualmente la internalización.⁶⁹

Por todo ello, el desarrollo de compuestos bimetálicos para ser utilizados como agentes teragnósticos se postula como una estrategia de gran interés para la obtención de complejos con mejores propiedades químicas y luminiscentes. El diseño de complejos bimetálicos combina normalmente metales early-late (primeros y últimos grupos de la serie de transición) pues suelen tener reactividades diferentes. Existen diferentes estrategias para sintetizar los complejos bimetálicos: sintetizarlos por separado y acoplarlos en la última etapa (síntesis convergente), funcionalizar un complejo metálico para en última instancia acoplar un segundo metal (síntesis lineal) o bien sintetizar un ligando que conecta ambos centros selectivamente (síntesis mixta) (ver esquema 1.2).



Esquema 1.2 Tipos de síntesis del complejo bimetalico.

La etapa crítica del proceso es la unión de ambos metales y requiere que la reacción tenga una alta conversión y selectividad, pues de otro modo la purificación se convierte en un desafío. Por otro lado, las síntesis de tipo lineal presentan el inconveniente del menor rendimiento global sumado a la exigencia de una gran estabilidad del metal sobre el que se van produciendo las modificaciones para más tarde incorporar el segundo metal. La vía escogida debe ser lo más convergente posible en la medida en que la naturaleza química de los fragmentos lo permita.

1.7.2 Estado del arte de complejos bimetalicos teragnósticos luminiscentes

En el momento de comenzar esta tesis doctoral el concepto de teragnosis empleando técnicas ópticas para la detección acababa de ser inaugurado por el grupo de investigación liderado por la profesora Gimeno en compuestos bimetalicos de

Re(I)/Au(I)⁸⁴. Durante el tiempo transcurrido hasta la fecha se han sumado otros investigadores al concepto explorando el uso de diferentes metales. Un resumen actualizado se ha publicado recientemente y se detallan a continuación los casos más relevantes.⁸⁵

1.7.2.1 Complejos d⁶-d¹⁰

El primer complejo bimetálico que combinaba imagen celular por microscopía de fluorescencia con actividad biológica data de 2014.⁸¹ En ese trabajo realizado por el grupo de investigación, se optó por combinar un fragmento luminiscente de Re(I)⁸⁶ con uno de oro en su estado de oxidación +1. (Fig 1.24).

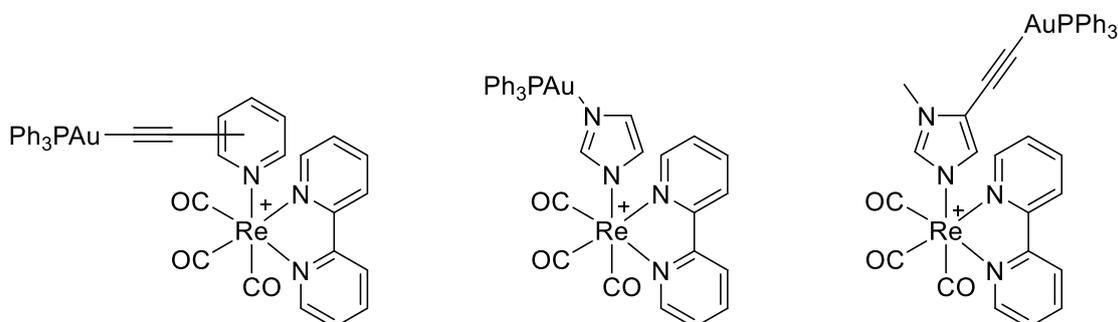


Figura 1.24 Primeros complejos bimetálicos teragnósticos.

La actividad biológica de estos complejos bimetálicos se incrementa entre 10 y 20 veces al pasar del complejo conteniendo sólo renio al complejo bimetálico demostrando la importancia del fragmento de Au(I). En cuanto a los resultados sobre el mecanismo de acción, los estudios por microscopía confocal revelaron una distribución en forma de gránulos a lo largo del citoplasma sin entrada al núcleo. Esta distribución se asocia a una acumulación mitocondrial mostrando en este caso la inercia del agente diagnóstico. Al aumentar la concentración hasta valores de 10 veces el valor de IC₅₀ se observó distribución en el núcleo que puede ser asociada a un comportamiento dependiente de la concentración.

Siguiendo con esta idea surgieron trabajos basados en rutenio como metal responsable de la luminiscencia. Casini⁸⁷ sintetizó análogos de Auranofín y RAPTA-T así como un complejo de Ru(III)/Os(III) (figura 1.25) y estudió su comportamiento en las cepas tumorales A549 (cáncer de pulmón) y A2780 (cáncer de ovario).

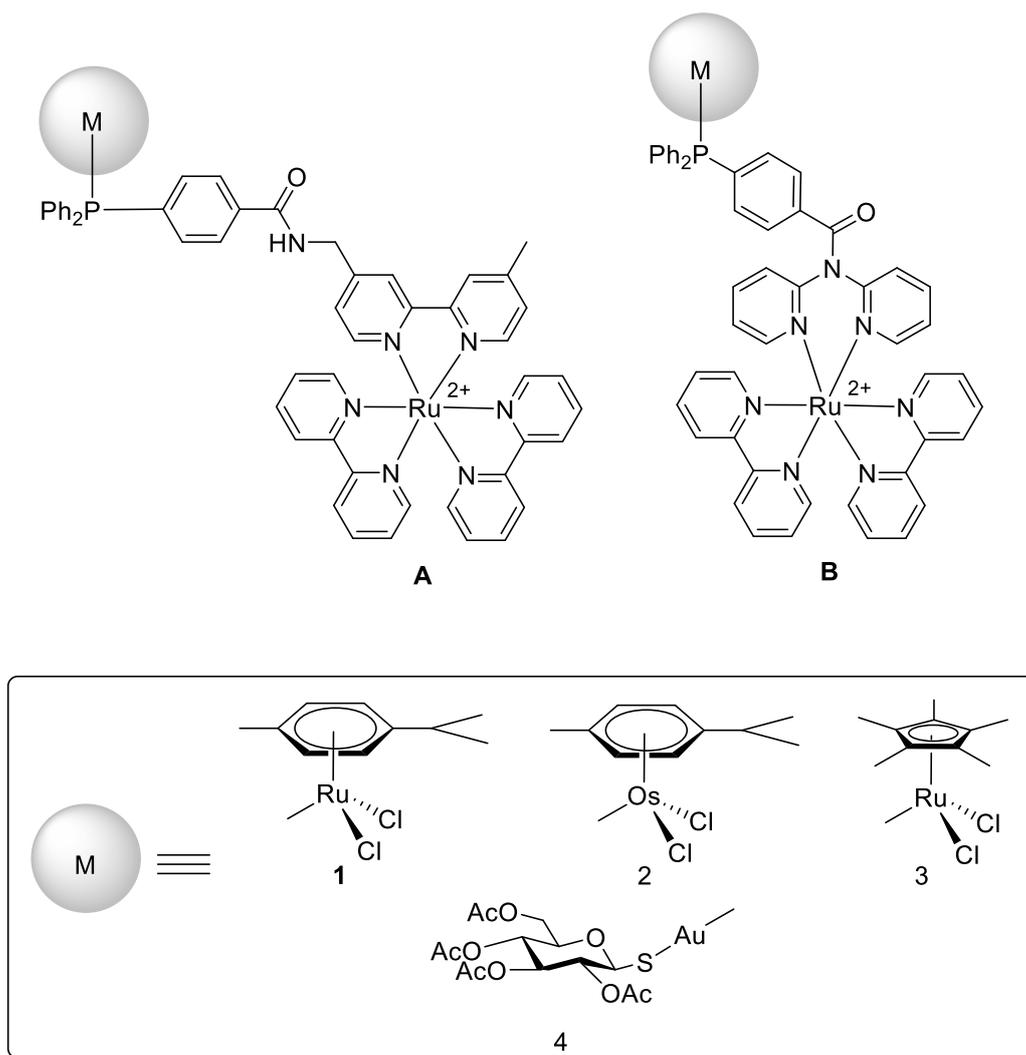
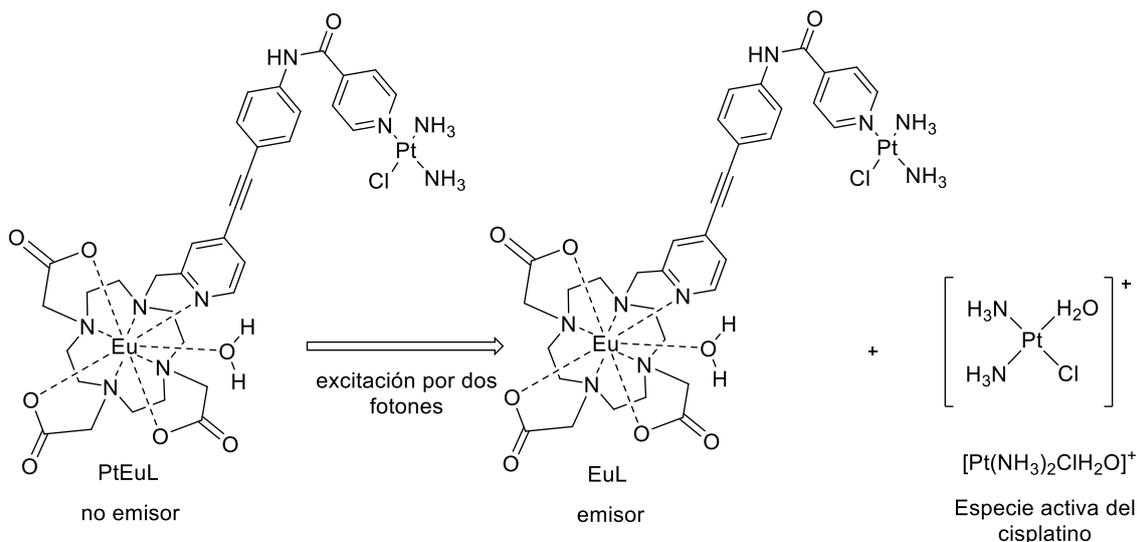


Figura 1.25 Agentes teranosticos sintetizados por Casini.

Empleando como ligando conector una bipyridina funcionalizada (A) se observa acumulación en el núcleo, pero cuando ese ligando es una dipiridilamina (B), se observa acumulación en el citoplasma. Los complejos con este ligando son unas 5 veces más citotóxicos mostrando un ejemplo de efecto sinérgico entre agente diagnóstico y terapéutico (el agente diagnóstico, por su lipofilidad ha condicionado la biodistribución y mejorado la actividad).

De manera simultánea aparece el trabajo de Gornitzka⁸⁸ donde se sintetizan heterometálicos de Ru(II) y Au(I) enlazado a carbenos NHC (figura 1.26). Los estudios de biodistribución demostraron que los complejos no penetraban inicialmente en las mitocondrias ni en el núcleo. Por otro lado, al analizar la evolución de la emisión con respecto al tiempo de incubación, se detectó la pérdida del oro por parte del agente diagnóstico demostrando que las especies activas de oro pierden el ligando NHC al



Esquema 1.3 Liberación de cisplatino por irradiación.

Un año más tarde Patra⁸⁹ se suma al uso de lantánidos como fluoróforos en complejos bimetalicos. Su contribución también emplea el binomio $\text{Eu}^{\text{III}}/\text{Pt}^{\text{II}}$ (figura 1.27) aunque en este caso la transferencia de energía sí se produce desde el estado excitado $^3\text{MLCT}$ que alcanza el complejo de platino al estado emisor $^5\text{D}_0$ característico de los lantánidos. Al no disociarse el complejo bimetalico en dos complejos monometalicos, se puede rastrear en todo momento el derivado de cisplatino confirmando una distribución preferiblemente en el núcleo.

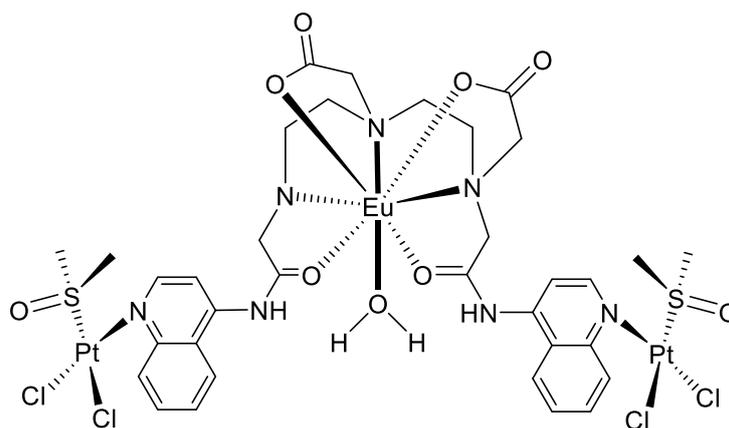


Figura 1.27 Bimetalico sintetizado por Patra basado en $\text{Eu}(\text{III})$ y $\text{Pt}(\text{II})$.

1.8 Objetivos generales

Los objetivos generales de esta tesis doctoral persiguen la síntesis de compuestos teragnósticos mediante la combinación de un fragmento luminiscente basado en renio o

iridio y un fragmento bioactivo basado en oro. Se plantea de este modo la obtención de complejos heterobimetálicos en donde cada metal ejerce su función bien definida y por separado, para estudiar la influencia sobre las propiedades tanto luminiscentes como antitumorales de los diferentes modos de conectar ambos metales. A la hora de diseñar un fármaco basado en metales, es necesario formular complejos estables a lo largo del tiempo, y que en buena medida permanezcan inalterados hasta que alcancen su diana biológica (se puede perder algún ligando en el proceso de absorción y transporte dentro del organismo siempre que no sea determinante para su función). En el caso del oro, esto limita el tipo de ligandos a tres tipos: azufre dadores, fósforo dadores, y carbono dadores. Los complejos conteniendo oro sintetizados en este trabajo se enlazarán a diferentes combinaciones de ligandos con alguno de los tres átomos dadores antes citados.

En el primer capítulo se plantea la unión del fragmento $fac-[Re(CO)_3(bpy)(py)]$ con un centro metálico de oro conectando ambos metales a través de un ligando piridina, coordinado axialmente al renio.

En el segundo capítulo, se plantea la unión de un fragmento $fac-[Re(CO)_3(N^{\wedge}C)]$, en donde ($N^{\wedge}C$) hace referencia a un ligando quelato compuesto por un carbeno y una piridina, con un centro metálico de oro. La conexión se realiza igualmente por ligandos de tipo piridina enlazados a renio en su posición axial.

En el tercer capítulo, se plantea la unión del fragmento $fac-[Re(CO)_3(bpy)(Cl)]$ con un centro metálico de oro conectando ambos metales por funcionalización de ligando bipyridina enlazado al renio en posición ecuatorial.

En el cuarto y último capítulo, se plantea la unión del fragmento $[Ir(ppy)_2(phen-COO^-)]$ con un centro metálico de oro, conectando ambos metales a través de una cadena peptídica de pequeña longitud (4-5 aminoácidos).

1.9 Referencias

- ¹ Funkhouser, J., *Current Drugs. Discov.*, **2002**, 2, 17 – 19.
- ² Las cifras del cáncer en España 2018, SEOM.
- ³ G. Jaouen, N. Metzler-Nolte, *Medicinal Organometallic Chemistry*, Springer, Heidelberg, 2010.
- ⁴ F. Arnesano, G. Natile, *Coord. Chem. Rev.*, **2009**, 253, 2070 – 2081.
- ⁵ World Health Organization, *WHO Model List of Essential Medicines (19th list)*, 2005.
- ⁶ T. C. Johnstone, K. Suntharalingam, S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, **2016**, 116, 3436 – 3486.
- ⁷ M. L. Healy, K. K. T. Lim, R. Travers, *Int. J. Rheumat. Dis.*, **2009**, 12, 145 – 148.
- ⁸ S. Gromer, L. D. Arscott, C. H. Williams, R. H. Schirmer, K. Becker, *J. Biol. Chem.*, **1998**, 32, 20096 – 20101.
- ⁹ M. P. Rigobello, A. Folda, M. C. Baldoin, G. Scutari, A. Bindoli, *Free Radic. Res.*, **2005**, 39, 687 – 695.
- ¹⁰ a) K. Becker, S. Gromer, R. H. Schirmer, S. Müller, *Eur. J. Biochem.*, **2000**, 267, 6118 – 6125. b) S. Gromer, S. Urig, K. Becker, *Med. Res. Rev.*, **2004**, 24, 40 – 89. c) J. D. Pennington, K. M. Jacobs, L. Sun, G. Bar-Sela, M. Mishra, D. Gius, *Curr. Pharm. Des.*, **2007**, 13, 3368 – 3377. d) S. Urig, K. Becker, *Semin. Cancer Biol.*, **2006**, 16, 452 – 465.
- ¹¹ C. K. Mirabelli, R. K. Johnson, C. M. Sung, L. F. Faucette, K. Muirhead, S. T. Crooke, *Cancer Res.*, **1985**, 45, 32 – 39.
- ¹² T. M. Simon, D. H. Kunishima, G. J. Vibert, A. Lorber, *Cancer Res.*, **1981**, 41, 94 – 97.
- ¹³ Datos proporcionados por el la web de ensayos clínicos del instituto nacional de salud (NIH) de Estados Unidos.
- ¹⁴ S. J. Berners-Price, C. K. Mirabelli, R. K. Johnson, M. R. Mattern, F. L. McCabe, L. F. Faucette, C. M. Sung, S. M. Mong, P. J. Sadler, S. T. Crooke, *Cancer Res.*, **1986**, 46, 5486 – 5493.
- ¹⁵ A. S. Humphreys, A. Filipovska, S. J. Berners-Price, G. A. Koutsantonis, B. W. Skelton, A. H. White, *Dalton Trans.* **2007**, 43, 4943 – 4950.
- ¹⁶ P. J. Barnard, M. V. Baker, S. J. Berners-Price, D. A. Day, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, 98, 1642 – 1647.

- ¹⁷ M. Mora, M. C. Gimeno, R. Visbal, *Chem. Soc. Rev.*, **2019**, *48*, 447 – 462.
- ¹⁸ D. Krishnamurthy, M. R. Karver, E. Fiorillo, V. Orru, S. M. Stanford, N. Bottini, A. M. Barrios, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 4790 – 4795.
- ¹⁹ R. Visbal, V. Fernández-Moreira, I. Marzo, A. Laguna, M. C. Gimeno, *Dalton Trans.*, **2016**, *45*, 15026 – 15033.
- ²⁰ J. K. Muenzner, B. Biersack, A. Albrecht, T. Rehm, U. Lacher, W. Milius, A. Casini, J.-J. Zhang, I. Ott, V. Brabec, O. Stuchilkova, I. C. Andronache, L. Kaps, D. Schuppan, R. Schobert, *Chem. Eur. J.*, **2016**, *22*, 18953 – 18962.
- ²¹ D. Krishnamurthy, M. R. Karver, E. Fiorillo, V. Orrú, S. M. Stanford, N. Bottini, A. M. Barrios, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 4790 – 4795.
- ²² P. J. Barnard, L. E. Wedlock, M. V. Baker, S. J. Berners-Price, D. A. Joyce, B. W. Skelton, J. H. Steer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 5966 – 5970.
- ²³ C. K. Li, R. W. Sun, S. C. Kui, N. Zhu, C. M. Che, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 5253 – 5266.
- ²⁴ L. Ronconi, C. Marzano, P. Zanello, M. Corsini, G. Miolo, C. Macca, A. Trevisan, D. Fregona, *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 1648 – 1657.
- ²⁵ D. Saggiaro, M. P. Rigobello, L. Paloschi, A. Folda, S. A. Moggach, S. Parsons, L. Roncoini, D. Fregona, A. Bindoli, *Chem. Biol.*, **2007**, *14*, 1128 – 1139.
- ²⁶ C. S. Allardyce, P. J. Dyson, *Dalton Trans.*, **2016**, *45*, 3201 – 3209.
- ²⁷ A. Vacca, M. Bruno, A. Boccarelli, M. Coluccia, D. Ribatti, A. Bergamo, S. Garbisa, L. Sartor, G. Sava, *Br. J. Cancer*, **2002**, *86*, 993 – 998.
- ²⁸ R. Trondl, P. Heffeter, C. R. Kowol, M. A. Jakupec, W. Berger, B. K. Keppler, *Chem. Sci*, **2014**, *5*, 2925 – 2932.
- ²⁹ C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurencyzy, T. J. Geldbach, G. Sava, P. J. Dyson, *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 4161 – 4171.
- ³⁰ a) C. R. Chitambar, *Future Med. Chem.*, **2012**, *4*, 1257 – 1272. b) P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2002**, *42*, 283 – 296.
- ³¹ P. Köpf-Maier, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **1994**, *47*, 1 – 16.
- ³² M. Salmain, N. Metzler-Nolte, en *The Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene*, ed. P. Štěpnička, Wiley, Chichester, U.K., 2008, cap. 13, 499 – 639.
- ³³ J. T. Hancock, R. Desikan, S. J. Neill, *Biochem. Soc. Trans.*, **2001**, *29*, 345 – 350.
- ³⁴ O. Raab, *Zeitung. Biol.*, **1900**, *39*, 524 – 526.
- ³⁵ J. F. Kelly, M. E. Snell, *J. Urol.*, **1976**, *115*, 150 – 151.

- ³⁶ D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, *3*, 380 – 387.
- ³⁷ L. Mahlert, J. Anderski, T. Schoppa, D. Mulac, J. Sun, D. Kucking, K. Langer, *Int. J. Pharm.*, **2019**, *565*, 199 – 208.
- ³⁸ a) M. Kourti, W. G. Jiang, J. Cai, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, *2017*, 9326454. b) S. García-Gallego, G. J. L. Bernnades, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 9712 – 9721.
- ³⁹ a) I. Ott, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1670 – 1681. b) W. F. Kean, L. Hart, W. W. Buchanan, *Br. J. Rheumatol.*, **1997**, *36*, 560 – 572.
- ⁴⁰ K.-I. Jeon, M.-S. Byun, D.-M. Jue, *Exp. Mol. Med.*, **2003**, *35*, 61 – 66.
- ⁴¹ E. T. Waltz, M. J. Dimartino, D. E. Griswold, A. P. Intoccia, T. L. Flanagan, *Am. J. Med.*, **1983**, *75*, 90 – 108.
- ⁴² S. S. Gunatilleke, A. M. Barrios, *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 3933 – 3937.
- ⁴³ S. K. Mallya, H. E. Van Hart, *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 1594 – 1601.
- ⁴⁴ K. Hashimoto, C. E. Whitehurst, T. Matsubara, K. Hirohata, P. E. Lipsky, *J. Clin. Invest.*, **1992**, *89*, 1839 – 1848.
- ⁴⁵ S. Hirohata, K. Nakanishi, T. Yanagida, M. Kawai, H. Kikuchi, K. Isshi, *Clin. Immunol.*, **1999**, *91*, 226 – 233.
- ⁴⁶ G. Salmerton, P. E. Lipsky, en *Modern aspects of gold therapy*, eds. M. Schattenkirchner, W. Muller, Basel, Karger, 1983, 63 – 74.
- ⁴⁷ E. J. Corey, M. M. Mehrota, A. U. Khan, *Science*, **1987**, *236*, 68 – 69.
- ⁴⁸ S. Hirohata, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **1996**, *81*, 175 – 181.
- ⁴⁹ P. J. Barnard, M. V. Baker, S. J. Berners-Price, D. A. Day, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, *98*, 1642 – 1647.
- ⁵⁰ M. P. Rigobello, L. Messori, G. Marcon, M. A. Cinellu, M. Bragadin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli, *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, *98*, 1634 – 1641.
- ⁵¹ S. Inoué, en *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, ed. J. Pawley, Springer, 2006, cap 1, 1 – 43.
- ⁵² K. V. R. Murthy, H. S. Virk, *Defect and Diffusion Forum*, **2013**, *347*, 1 – 34.
- ⁵³ Destrucción fotoquímica del fluoróforo por rotura de enlaces o quencheo con el medio.
- ⁵⁴ J. Livet, T. A. Weissman, H. Kang, R. W. Draft, J. Lu, R. A. Bennis, J. R. Sanes, J. W. Lichtman, *Nature*, **2007**, *450*, 56 – 62.
- ⁵⁵ S. Faulkner, B. P. Burton-Pye, S. J. A. Pope, *Appl. Spectrosc. Rev.*, **2005**, *40*, 1 – 31.

- ⁵⁶ T. Gunnlaugsson, J. P. Leonard, *Chem. Commun.*, **2005**, 3114 – 3131.
- ⁵⁷ V. Fernández-Moreira, B. Song, V. Sivagnanam, A.-S. Chauvin, C. D. B. Vandevyver, M. Gijs, I. Hemmilä, H.-A. Lehr, J.-C. G. Bünzli, *Analyst*, **2010**, *135*, 45 – 52.
- ⁵⁸ G.-L. Law, C. Man, D. Parker, J. W. Walton, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 2391 – 2393.
- ⁵⁹ A. Foucault-Collet, K. A. Gogick, K. A. White, S. Villette, A. Pallier, G. Collet, C. Kieda, T. Li, S. J. Geib, N. L. Rosi, S. Petoud, *PNAS*, **2013**, *110*, 17199 – 17204.
- ⁶⁰ G.-L. Law, C. Man, D. Parker, J. W. Walton, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 2391 – 2393.
- ⁶¹ La excitación por dos fotones se basa en un evento cuántico por el cual se absorben dos fotones a la vez. La probabilidad es muy baja por lo que la fuente de excitación debe ser muy intensa. A cambio la resolución es muy alta porque sólo ocurrirá allí donde se focalice el haz de fotones.
- ⁶² S. W. Botchway, M. Charnley, J. W. Haycock, A. W. Parker, D. L. Rochester, J. A. Weinstein, J. A. G. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2008**, *105*, 16071 – 16076.
- ⁶³ M. X. Yu, Q. Zhao, L. X. Shi, F. Y. Li, Z. G. Zhou, H. Yang, T. Yi, C. H. Huang, *Chem. Commun.*, **2005**, 2115 – 2117.
- ⁶⁴ C. Caporale, M. Massi, *Coord. Chem. Rev.*, **2018**, *363*, 71 – 91.
- ⁶⁵ K. A. Stephenson, S. R. Banerjee, T. Besenger, O. O. Sogbein, M. K. Levadala, N. McFarlane, J. A. Lemon, D. R. Boreham, K. P. Maresca, J. D. Brennan, J. W. Babich, J. Zubietta, J. F. Valliant, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 8598 – 8599.
- ⁶⁶ A. J. Amoroso, R. J. Arthur, M. P. Coogan, J. B. Court, V. Fernández-Moreira, A. J. Hayes, D. Lloyd, C. Millet, S. J. A. Pope, C. Williams, *New J. Chem.*, **2008**, *32*, 1097 – 1120.
- ⁶⁷ T. Esteves, C. Xavier, S. Gama, F. Mendes, P. D. Raposinho, F. Marques, A. Paulo, J. C. Pessoa, J. Rino, G. Viola, I. Santos, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 4104 – 4116.
- ⁶⁸ L. J. Raszeja, D. Siegmund, A. L. Cordes, J. Güldenhaupt, K. Gerwert, S. Hahn, N. Metzler-Nolte, *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 905 – 908.
- ⁶⁹ V. Fernández-Moreira, F. L. Thorp-Greenwood, A. J. Amoroso, J. Cable, J. B. Court, V. Gray, A. J. Hayes, R. L. Jenkins, B. M. Kariuki, D. Lloyd, C. O. Millet, C. F. Williams, M. P. Coogan, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 3888 – 3901.
- ⁷⁰ H. C. Gerritsen, R. Sanders, A. Draijer, C. Ince, Y. K. Levine, *J. Fluorescence*, **1997**, *7*, 11 – 15.

- ⁷¹ C. V. Kumar, J. K. Barton, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 5518 – 5523.
- ⁷² a) C. C. You, O. R. Miranda, B. Gider, P. S. Ghosh, I. B. Kim, B. Erdogan, S. A. Krovi, U. H. Bunz and V. M. Rotello, *Nat. Nanotechnol.*, **2007**, *2*, 318–323. b) O. R. Miranda, C.-C. You, R. Phillips, I.-B. Kim, P. S. Ghosh, U. H. F. Bunz, V. M. Rotello, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 9856 – 9857.
- ⁷³ W. Z. Yuan, P. Lu, S. Chen, J. W. Lam, Z. Wang, Y. Liu, H. S. Kwok, Y. Ma and B. Z. Tang, *Adv. Mater.*, **2010**, *22*, 2159 – 2163.
- ⁷⁴ K. Wang, X. Zhang, X. Zhang, C. Ma, Z. Li, Z. Huang, Q. Zhang, Y. Wei, *Pol. Chem.*, **2015**, *6*, 4455 – 4461.
- ⁷⁵ a) M. Dahan, S. Lévi, C. Luccardini, P. Rostaing, B. Riveau, A. Triller, *Science*, **2003**, *302*, 442 – 445. b) X. Michalet, F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu, S. S. Gambhir, S. Weiss, *Science*, **2005**, *307*, 538 – 544. c) A. Sharei, J. Zoldan, A. Adamo, W. Y. Sim, N. Cho, E. Jackson, S. Mao, S. Schneider, M.-J. Han, A. Lytton-Jean, P. A. Basto, S. Jhunjhunwala, J. Lee, D. A. Heller, J. W. Kang, G. C. Hartoularos, K.-S. Kim, D. G. Anderson, R. Langer, K. F. Jensen, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2013**, *110*, 2082 – 2087.
- ⁷⁶ a) S. Xue, J. Qiao, F. Pu, M. Cameron, J. J. Yang, *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, **2013**, *5*, 163–179. b) F. Ye, E.-K. Jeong, Z. Jia, T. Yang, D. Parker, Z.-R. Lu, *Bioconj. Chem.*, **2008**, *19*, 2300 – 2303.
- ⁷⁷ E. J. Ngen, L. Wang, Y. Kato, B. Krishnamachary, W. Zhu, N. Gandhi, B. Smith, M. Armour, J. Wong, K. Gabrielson, D. Artemov, *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 13628.
- ⁷⁸ J. Wang, L. Maurer, *Curr. Top. Med. Chem.* **2005**, *5*, 1053 – 1075.
- ⁷⁹ F. Man, L. Lim, A. Volpe, A. Gabizon, H. Shmeeda, B. Draper, A. C. Parente-Pereira, J. Maher, P. J. Blower, G. O. Fruhwirth, R. T. M. de Rosales, *Mol. Therapy*, **2019**, *27*, 219 – 229.
- ⁸⁰ Acelerador de partículas de trayectoria circular usado para el bombardeo del núcleo de los átomos para producir transmutaciones y radiactividad artificial.
- ⁸¹ N. de Jonge, D. B. Peckys, *ACS Nano*, **2016**, *10*, 9061 – 9063.
- ⁸² E. Fogelqvist, M. Kördel, V. Carannante, B. Önfelt, H. M. Hertz, *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 13433.
- ⁸³ T.-H. Kwon, H. S. Cho, M. K. Kim, J.-W. Kim, J.-J. Kim, K. H. Lee, S. J. Park, I.-S. Shin, H. Kim, D. M. Shin, Y. K. Chung, J. I. Hong *Organometallics*, **2005**, *24*, 1578 – 1585.

- ⁸⁴ V. Fernández-Moreira, I. Marzo, M. C. Gimeno, *Chem. Sci.*, **2014**, *5*, 4434 – 4446.
- ⁸⁵ V. Fernández-Moreira, M. C. Gimeno, *Chem. Eur. J.*, **2018**, *24*, 3345 – 3353.
- ⁸⁶ A. J. Amoroso, M. P. Coogan, J. E. Dunne, V. Fernández-Moreira, J. B. Hess, A. J. Hayes, D. Lloyd, C. Millet, S. J. A. Pope, C. Williams, *Chem. Commun.*, **2007**, 3066 – 3068.
- ⁸⁷ M. Wenzel, A. de Almeida, E. Bigaeva, P. Kavanagh, M. Picquet, P. Le Gendre, E. Bodio, A. Casini, *Inorg. Chem.*, **2016**, *55*, 2544 – 2557.
- ⁸⁸ L. Boselli, M. Carraz, S. Mazères, L. Paloque, G. González, F. Benoit-Vical, A. Valentin, C. Hemmert, H. Gornitzka, *Organometallics*, **2015**, *34*, 1046 – 1055.
- ⁸⁹ A. Chandra, K. Singh, S. Singh, S. Sivaukumar, A. K. Patra, *Dalton Trans.*, **2016**, *45*, 494 – 497.

Capítulo 2
Complejos de renio y oro conectados
a través del ligando axial

Capítulo 2

2.1 Objetivos

El objetivo de este capítulo se centra en evaluar cómo afecta a las propiedades biológicas el entorno de coordinación del oro, manteniendo constante un ligando de tipo fosfina y variando la naturaleza del otro ligando. Interesados no sólo por los valores de citotoxicidad, sino por comprobar si los ligandos enlazados al oro condicionan la bioacumulación y/o mecanismo de acción, se pretende conectar el complejo de oro a un complejo luminiscente típico de Re(I) por medio de una piridina funcionalizada con un grupo fosfina (figura 2.1). El ligando escogido cumple con la condición de poder coordinarse de manera selectiva a los diferentes metales: mientras que los ligandos N-dadores se coordinan con facilidad a los complejos de renio *fac*-tricarbonil bipiridina, el oro(I) prefiere los ligandos de tipo fosfina frente a los N-dadores. Los complejos sintetizados permitirán ampliar la biblioteca de compuestos teragnósticos basados en renio(I) y oro(I) ya iniciada por el grupo de investigación.¹

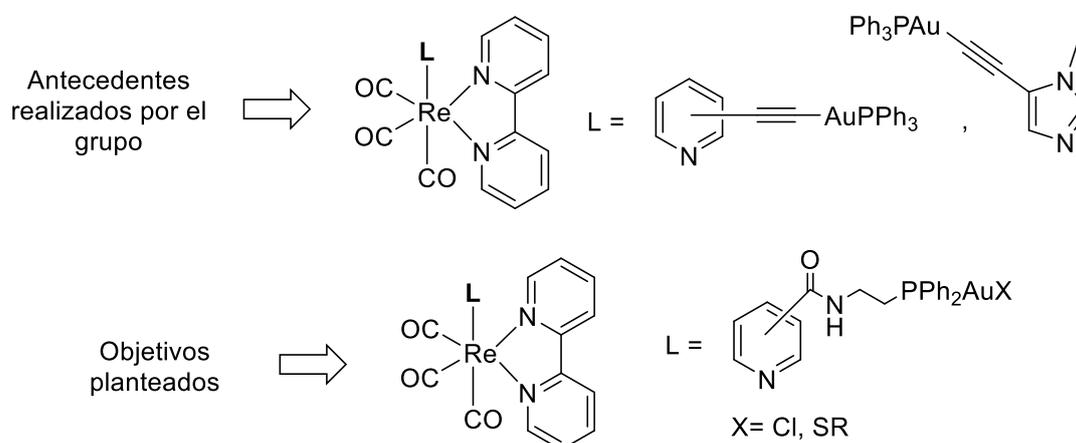


Figura 2.1 Antecedentes y objetivos

2.2 Introducción

2.2.1 Complejos de renio *fac*-tricarbonil bipyridina

Los complejos octaédricos de Re(I) enlazado a tres carbonilos en disposición *fac*, una bipyridina en el plano ecuatorial y un ligando piridina en posición axial son conocidos por sus buenas propiedades luminiscentes: rendimientos cuánticos aceptables, elevados tiempos de vida y desplazamientos de Stokes de 150 a 200 nm. El estudio por DFT de los orbitales implicados en el proceso luminiscente señala que el HOMO contiene al menos un 50% de carácter metálico y que el LUMO se centra en los orbitales antienlazantes del ligando bipyridina (al menos un 80% de contribución) (figura 2.2).² El ligando axial por tanto no ejerce apenas influencia sobre las propiedades luminiscentes. El proceso de excitación de este tipo de complejos se asemeja a un proceso de oxidación-reducción en donde el metal transfiere un electrón al ligando bipyridina, a través de una transición MLCT.

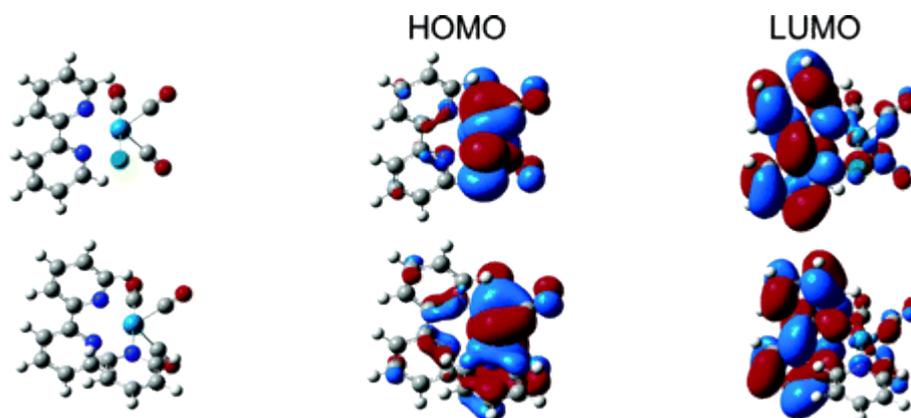
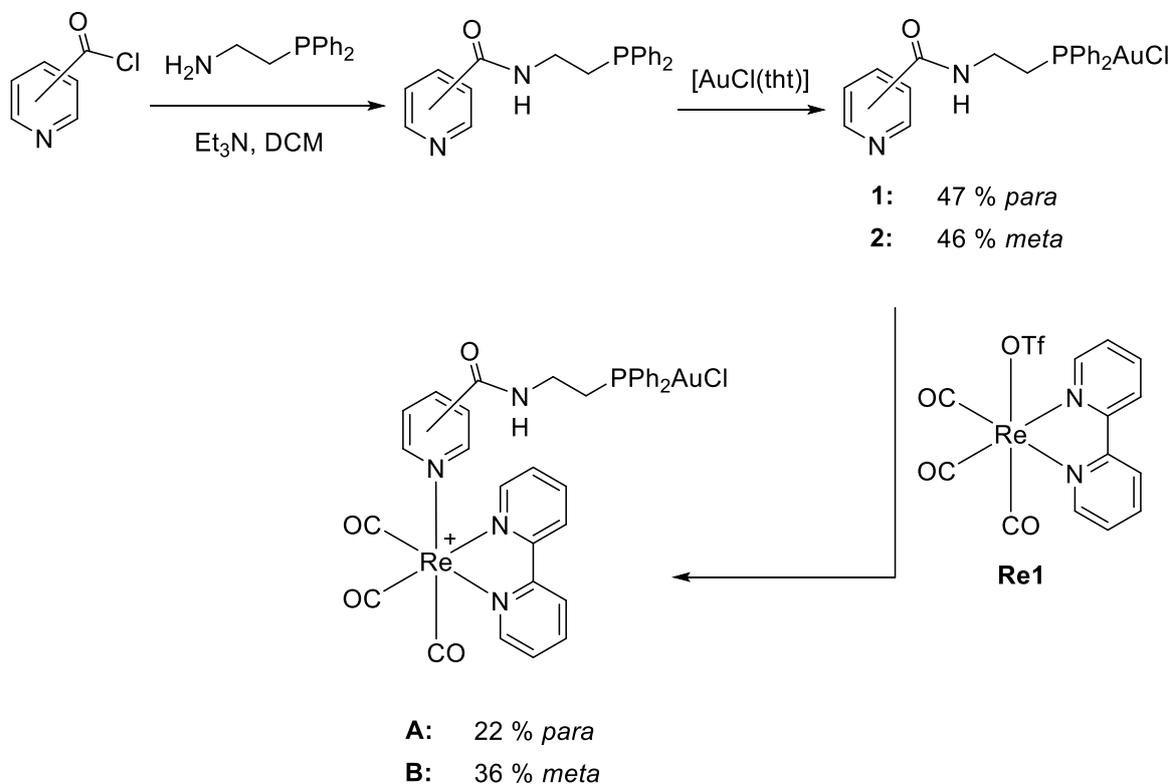


Figura 2.2 Representación de la densidad electrónica de HOMO y LUMO para los complejos *fac*-[Re(bpy)(CO)₃Cl] (arriba) y *fac*-[Re(bpy)(CO)₃(py)]⁺ (abajo).

La transferencia del electrón crea una especie zwitteriónica (con el metal cargado positivamente y la bipyridina cargada negativamente) altamente polar que se verá estabilizada en disolventes polares y la emisión será menos energética (solvatocromismo positivo). Por otro lado la pérdida de densidad electrónica en el metal tiene como efecto una disminución de la retrodonación del Re a los carbonilos, de forma que los enlaces CO se fortalecen como se puede comprobar por espectroscopía IR o Raman.³ Tras el entrecruzamiento de sistemas para pasar a un complejo excitado de multiplicidad triplete, la emisión tendrá lugar desde el estado ³MLCT.

2.2.2 Trabajo previo

Durante la realización del trabajo de fin de máster, se diseñó una ruta sintética por la cual se obtenía como intermedio un complejo bimetálico (**A** y **B**) en donde el oro está enlazado a la fosfina del ligando conector y a un cloruro (esquema 2.1). Este complejo, serviría como producto de partida para la síntesis de los derivados heterometálicos conteniendo las estructuras fosfina-oro-tiolato y oro-bisfosfina. Concretamente su obtención se realizó partiendo del cloruro de acilo de piridina en las posiciones 3 y 4 que se transformó en la amida correspondiente por reacción con la 2-difenilfosfinoetanoamina en presencia de base para más tarde hacerla reaccionar con [AuCl(tht)]. La fosfina del ligando piridina desplaza al ligando lábil tetrahidrofurano enlazado al oro permitiendo la síntesis de los complejos **1** y **2**. Los moderados rendimientos se explican por la tendencia de la fosfina libre a oxidarse. La posterior reacción de **1** y **2** con el complejo activado de renio **Re1** permite obtener los intermedios **A** y **B**.



Esquema 2.1 Complejos bimetálicos sintetizados previamente.

El bajo rendimiento obtenido en la síntesis de **A** y **B** motivó a estudiar los subproductos obtenidos para optimizar la síntesis. Los principales subproductos correspondían al producto de partida *fac*-[Re(bpy)(CO)₃Cl] y al complejo trimetálico simétrico (**3** y **4**) compuesto por dos unidades renio-piridina fosfina enlazadas a oro (figura 2.3).

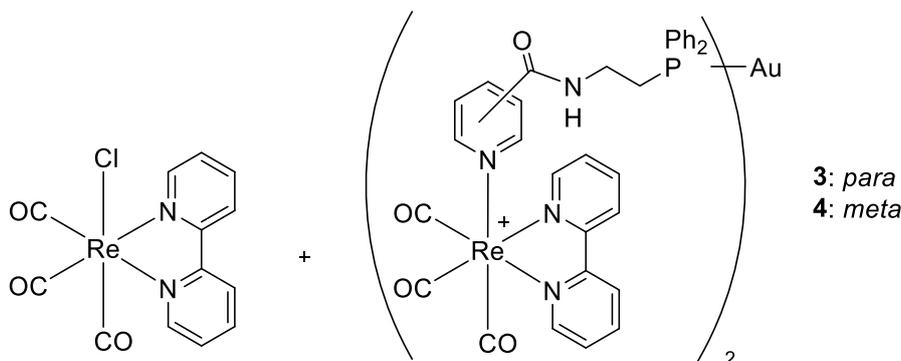


Figura 2.3 Subproductos aislados durante la preparación de los complejos bimetalicos.

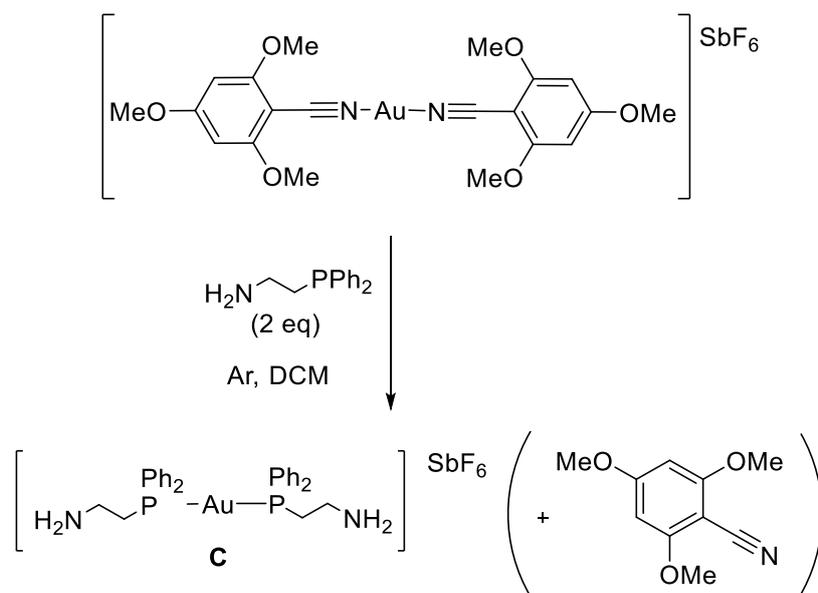
Al observar que la cantidad de producto de partida *fac*-[Re(bpy)(CO)₃Cl] se remontaba hasta los 0.3 equivalentes, se postuló que el cloruro enlazado al renio debía provenir de uno de los reactivos empleados en la reacción y no del disolvente. Así es como se dedujo que el renio enlazado a la molécula de triflato (**Re1**) era capaz de abstraer el cloruro unido al reactivo de oro, produciendo las especies bisfosfina (**3** y **4**) y *fac*-[Re(bpy)(CO)₃Cl], de forma que se obtenía como producto minoritario el compuesto bimetalico deseado (**A** ó **B**).

2.3 Síntesis de bisfosfinas de oro

Los resultados obtenidos durante la realización del trabajo de fin de máster apuntaban a que la obtención de los complejos **A** y **B** se caracterizaría por unos bajos rendimientos debido a la escasa compatibilidad de los reactivos de renio y oro empleados en la vía sintética propuesta. Sin embargo, la obtención de las especies trimetálicas **3** y **4** como subproducto abría la puerta al diseño de una nueva vía sintética cuyo objetivo se centrara en la obtención de estos dos compuestos como producto principal.

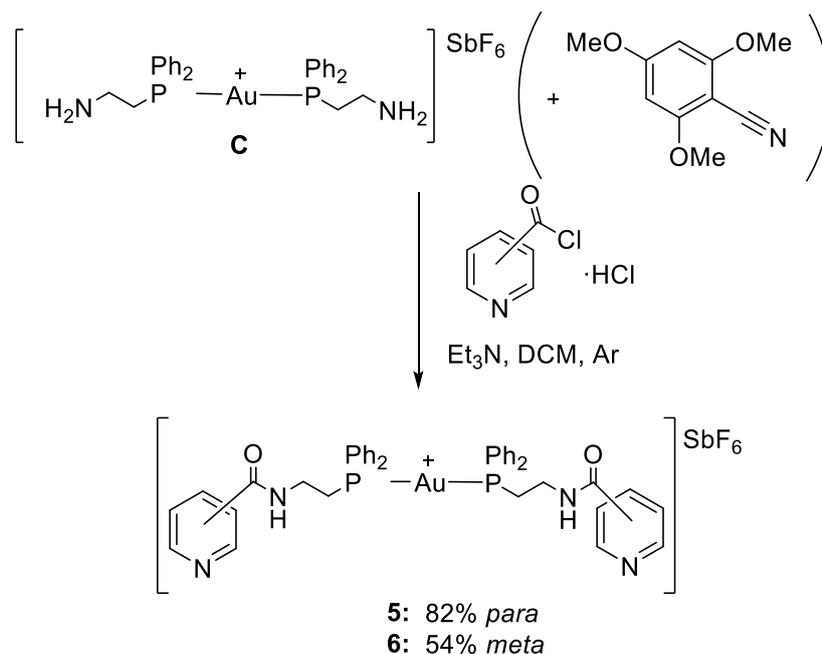
La nueva estrategia sintética comenzaba con la coordinación de dos ligandos 2-difenilfosfinitilamina al átomo de oro (esquema 2.2). Como producto de partida de oro

se utilizó $[\text{Au}(\text{tmbn})_2]\text{SbF}_6$, un complejo donde el átomo de oro se encuentra unido a dos moléculas de 2,4,6-trimetoxibenzonitrilo, y cuya síntesis está descrita en la bibliografía.⁴ Este ligando es lábil pero forma complejos relativamente estables con el oro(I) permitiendo aislarlo y usar cantidades estequiométricas. Es una alternativa a la generación *in situ* de $[\text{Au}(\text{tht})_2]\text{OTf}$ y posterior reacción con un ligero exceso de ligando. De este modo se evita la oxidación del exceso de fosfina no coordinada facilitando la purificación.



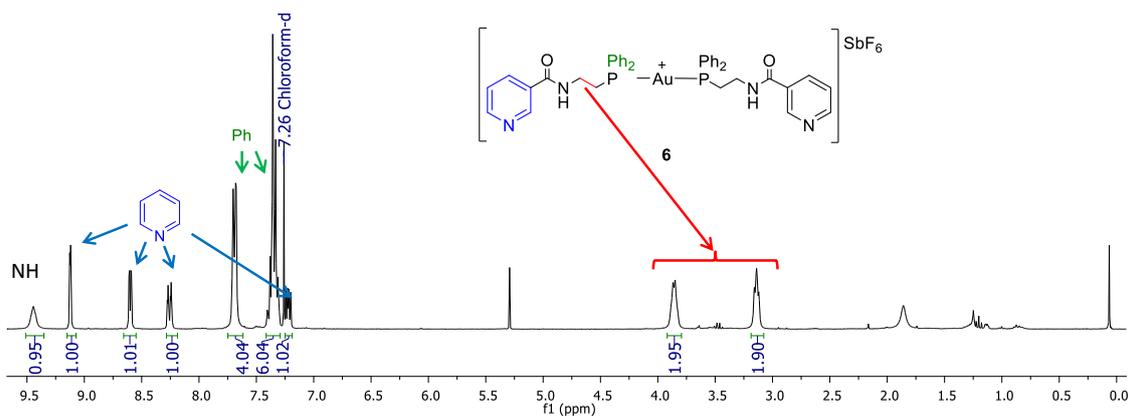
Esquema 2.2 Síntesis del intermedio bisfosfina **C**.

La formación del intermedio bisfosfina **C** se confirmó por ^{31}P -RMN por presencia de un solo pico a 35.65 ppm. Como la separación del ligando benzonitrilo no fue posible por recristalización, y con el fin de evitar al máximo el paso por cromatografía en columna del complejo de oro por el miedo a su descomposición, se utilizó el crudo de reacción directamente para la siguiente etapa de incorporación de la piridina. Ésta tiene lugar por reacción del residuo amina del intermedio **C** con exceso del cloruro de acilo de piridina y conduce al producto deseado puro (**5** y **6**) tras una necesaria cromatografía en columna (esquema 2.3). Aunque el cloruro de acilo se utiliza en exceso, se emplean condiciones estrictamente anhidras y trietilamina destilada bajo CaH_2 a modo de evitar su hidrólisis. La carga positiva del complejo obliga al uso de alúmina neutra como fase estacionaria para la columna en vez de gel de sílice.



Esquema 2.3 Reacción de formación de las amidas **5** y **6**.

La obtención del producto deseado **5** y **6** se puede comprobar fácilmente al obtener un compuesto que presenta una única señal de fósforo en el espectro de ^{31}P -RMN, a 32.39 ppm para el derivado **5** y 36.16 ppm para el derivado **6**, y una correcta integración de los hidrógenos aromáticos de la piridina en el espectro de RMN de protón, tal y como se aprecia en la figura 2.4 que recoge los espectros del compuesto **6**.



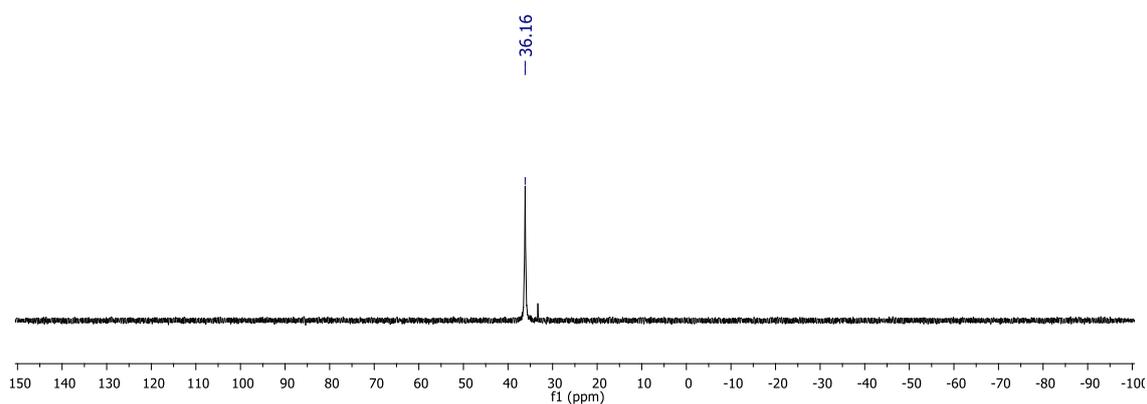
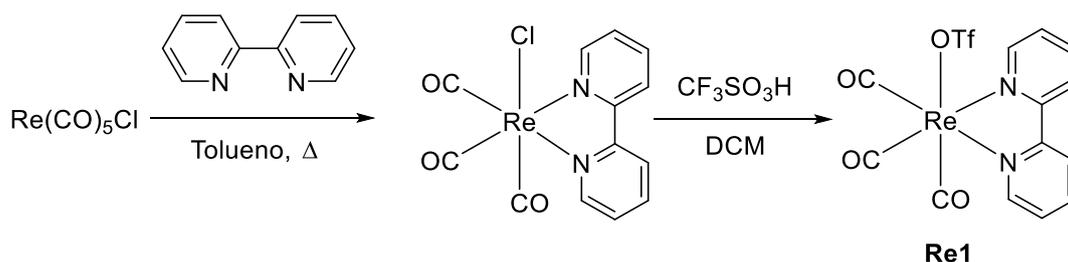


Figura 2.4 Espectros de RMN de protón y fósforo del complejo **6**.

2.4 Síntesis de complejos heterotrimetálicos

A continuación, la incorporación al fragmento luminiscente de renio tiene lugar por simple desplazamiento de un ligando lábil del renio en el compuesto **Re1**, en este caso la molécula de triflato. La síntesis del complejo de renio enlazado a triflato está descrita en la bibliografía⁵ y se obtiene previamente en dos etapas a partir de $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ (esquema 2.4). La primera, sustitución de los ligandos carbonilo en *cis* por una bipyridina que se situará en el plano ecuatorial y la segunda reacción con exceso de ácido triflúrico en condiciones anhidras, que llevará a la pérdida del ligando cloro e inserción del ligando triflato, quedando así un complejo de $\text{Re}(\text{I})$ donde los carbonilos adoptan una disposición facial.



Esquema 2.4 Formación del precursor **Re1**.

El intercambio de ligandos en el centro de renio procede lentamente en sintonía con la relativa inercia química de los complejos octaédricos d^6 de bajo espín. Sin embargo, existen dos factores que limitan el tiempo de reacción. Por un lado, la estabilidad de los complejos de oro(I) a elevada temperatura es a menudo reducida. Por otro lado, el diclorometano empleado como disolvente siempre viene acompañado de pequeñas

cantidades de HCl que son capaces de generar el subproducto *fac*-[Re(bpy)(CO)₃Cl]. Por todo ello en el primer intento de reacción llevado a cabo con el derivado sustituido en *meta* **6** el tiempo de reacción se fijó en 1 noche (figura 2.5). La similar retención de producto e impurezas hizo necesario purificar dos veces por cromatografía en columna de alúmina el crudo de reacción para obtener el complejo **4** con un rendimiento del 18%.

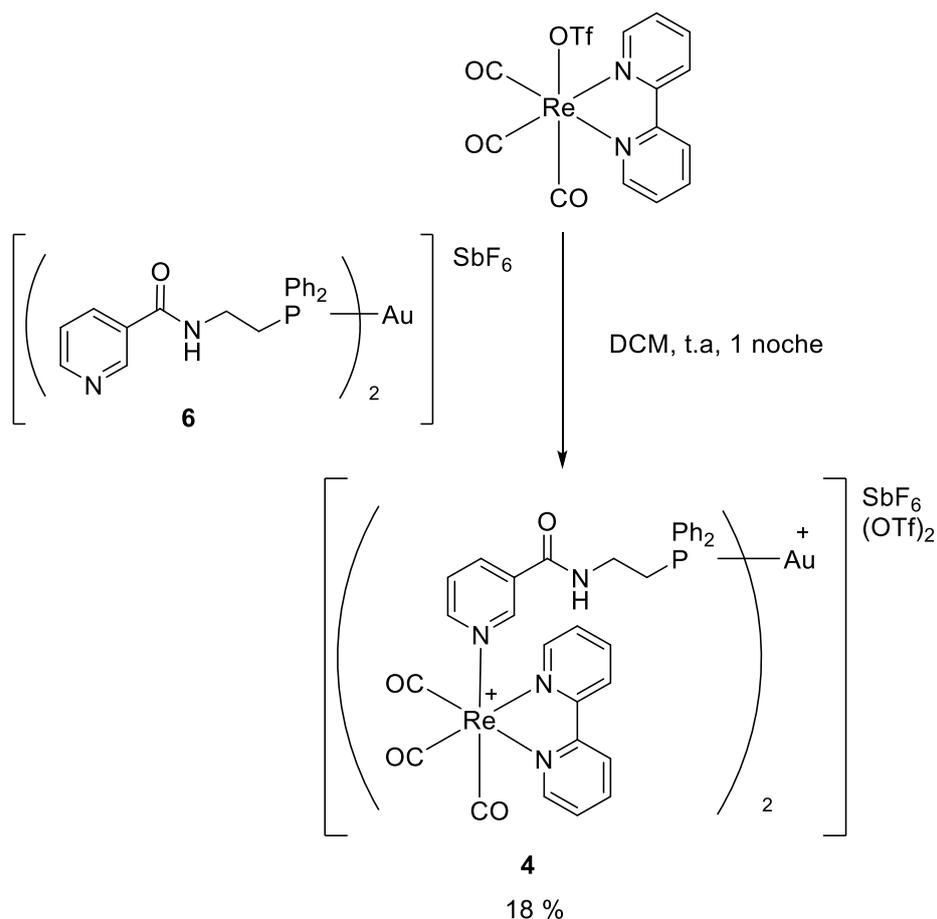


Figura 2.5 Formación de **4**.

El análisis por espectrometría de masas no permitió detectar el ión molecular de **4**, debido a la creciente dificultad para observar especies conforme aumenta su carga. En su lugar, se detectaron diferentes fragmentos fruto de la descomposición del tricatión molecular, de los cuales el más decisivo es el fragmento cuyo pico se encuentra a 646.1067 m/z y que se corresponde con el dicatión tras pérdida de uno de los dos centros de renio. Los fragmentos adicionales observados se corresponden con el ión molecular del análogo bimetálico **B** (761.1325 m/z) así como el ión molecular del complejo **6** (865.2140 m/z) (figura 2.6).

2.4 Síntesis de complejos heterotrimetálicos

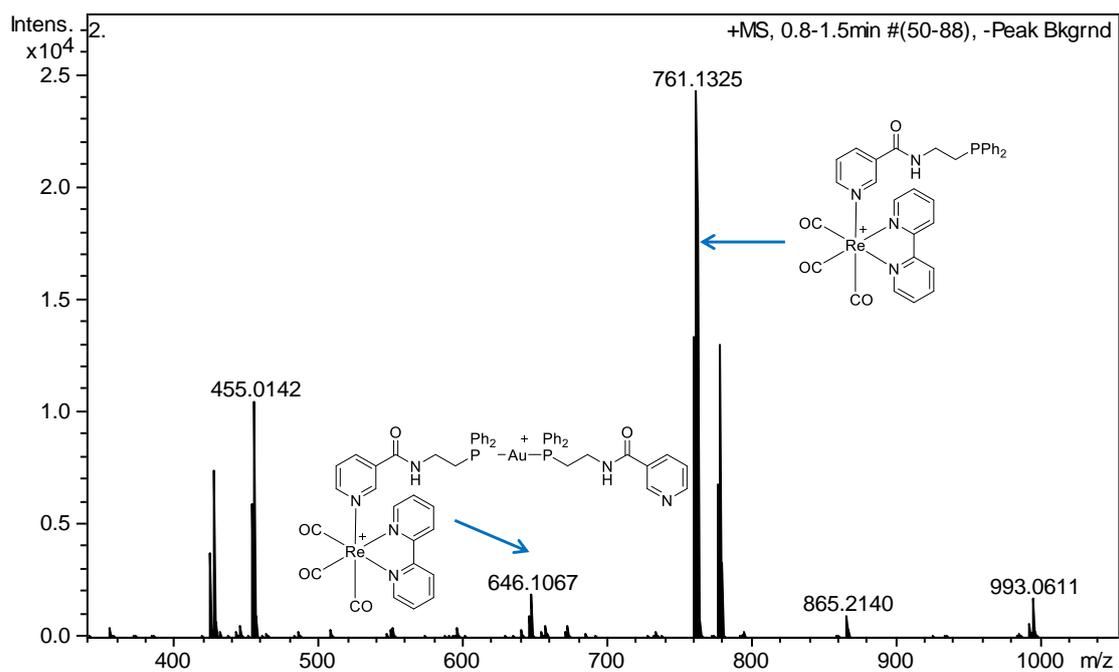


Figura 2.6 Espectro de masas ESI-QTOF del compuesto **6**.

Sin embargo, el espectro de ³¹P-RMN (figura 2.7) permite descartar la hipótesis de haber formado de nuevo el complejo **B** por la gran diferencia que existe entre ellos (36.84 ppm para **4** frente a 22.26 ppm para **B**) y la similitud con el desplazamiento observado para **6** (36.16 ppm, figura 2.4).

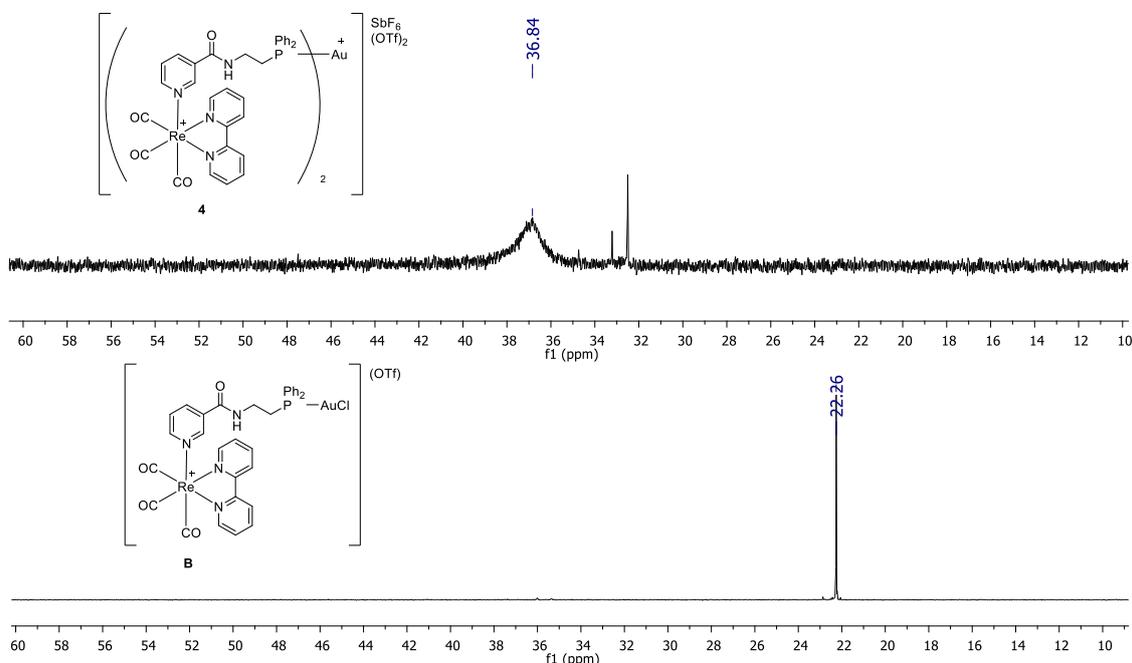


Figura 2.7 Comparación de espectros de RMN de fósforo de **4** y **B**.

El bajo rendimiento obtenido en la reacción (18%) sumado a no haber observado descomposición notable del oro, motivó a emplear tiempos de reacción mayores y hacer un seguimiento más exhaustivo de la reacción, basándonos en la espectroscopía RMN de fósforo, para la reacción con el complejo bisfosfina **5**.

Al cabo de 19 horas, se obtenían 3 señales a desplazamientos 38.25 ppm, 37.95 ppm y 37.14 ppm (señal mayoritaria) mientras que la señal del producto de partida era 35.01 ppm, pareciendo indicar que el producto de partida se había consumido y que se habían formado tres productos diferentes (figura 2.8).

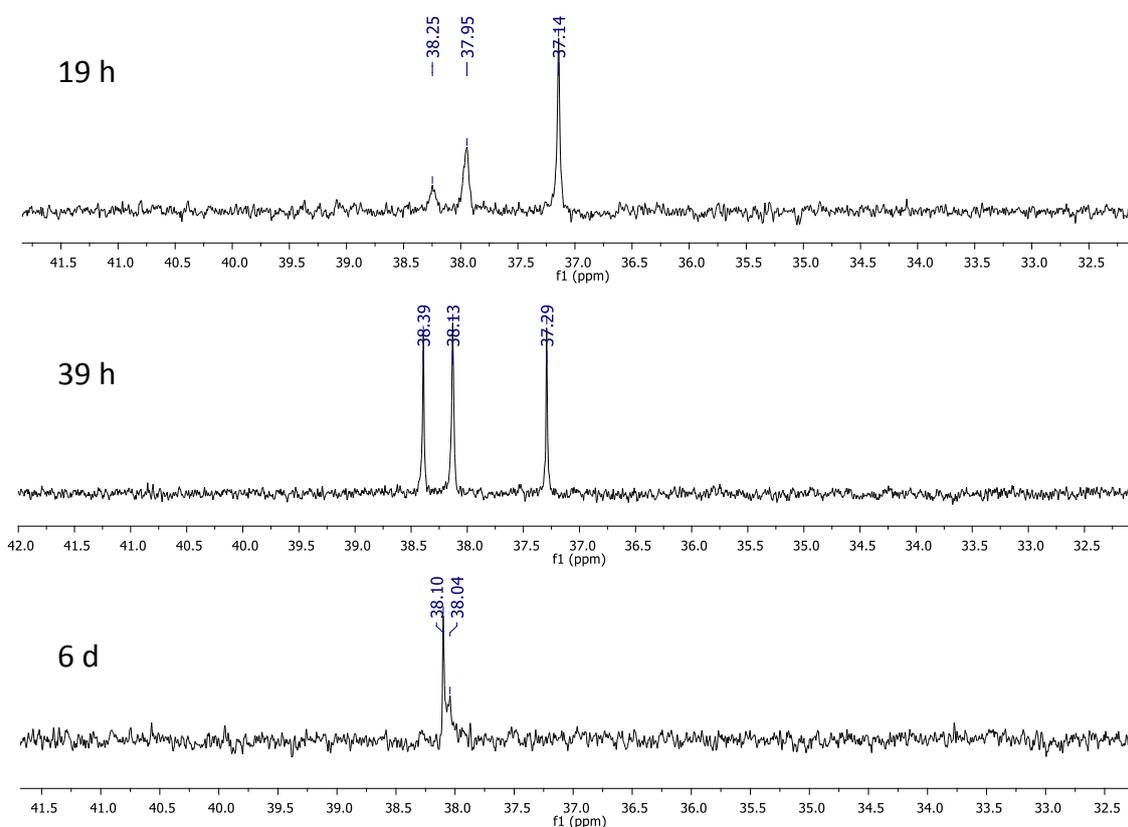


Figura 2.8 Evolución del espectro de RMN de fósforo con el tiempo.

Puesto que las dos piridinas del complejo bisfosfina **5** tienen que coordinarse cada una a un centro de renio, se puede obtener el producto final **3** pero también el intermedio resultante de la coordinación de una sola piridina **D** (figura 2.9). Por otro lado, la señal mayoritaria a 37.14 ppm puede deberse al complejo bisfosfina **5** que aún no se ha coordinado por ninguna de sus piridinas pero sí ha interactuado con el complejo de renio (por ejemplo intercambiando el contraión). Con el paso del tiempo, estos productos fueron evolucionando desapareciendo en primer lugar la señal a 37.14 ppm y más tarde la señal a 38.25 ppm (figura 2.9).

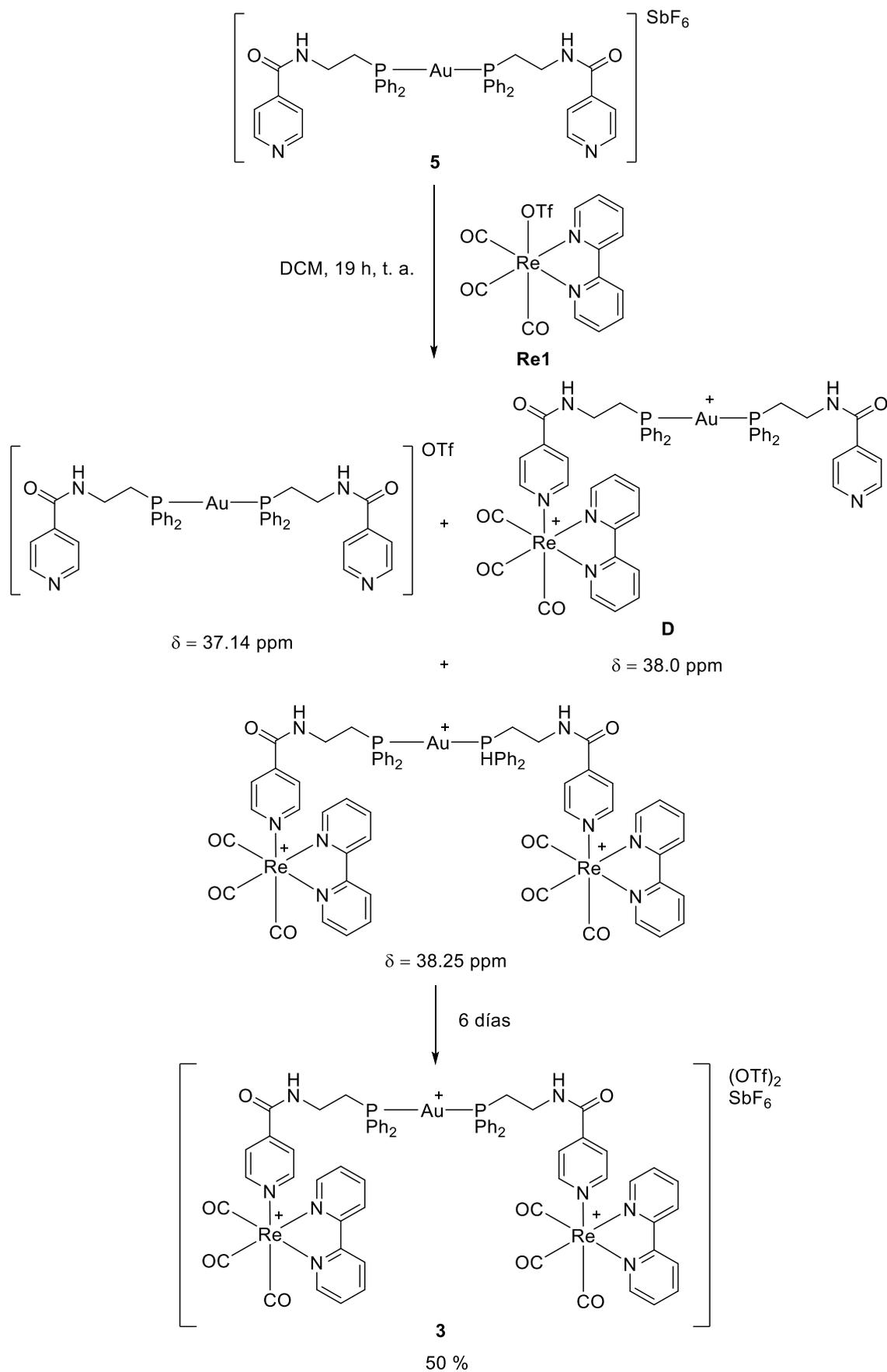


Figura 2.9 Propuesta de especies generadas durante la formación de **3**.

El crudo de reacción se purificó por columna de alúmina conduciendo a un rendimiento del 50% para el compuesto heterometálico **3**. Tal y como se ha descrito para el complejo **4**, se pudo confirmar la obtención del producto trimetálico deseado por comparación del espectro de ^{31}P -RMN con su análogo bimetálico (figura 2.10).

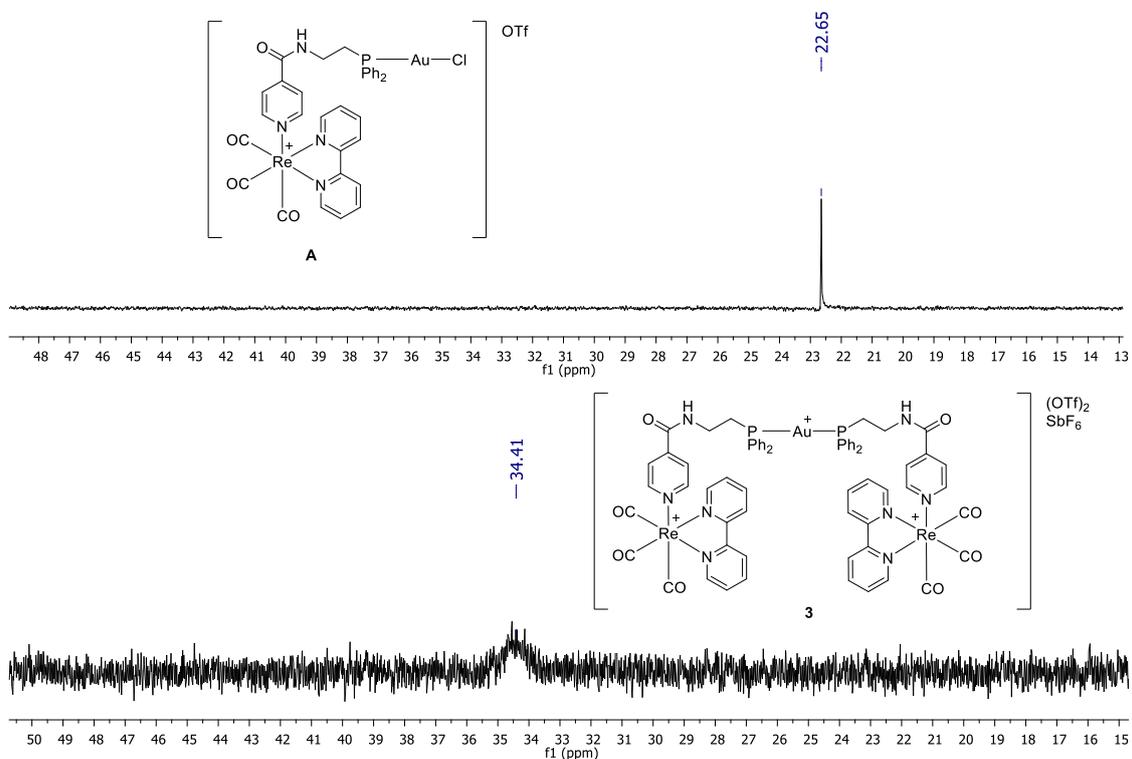
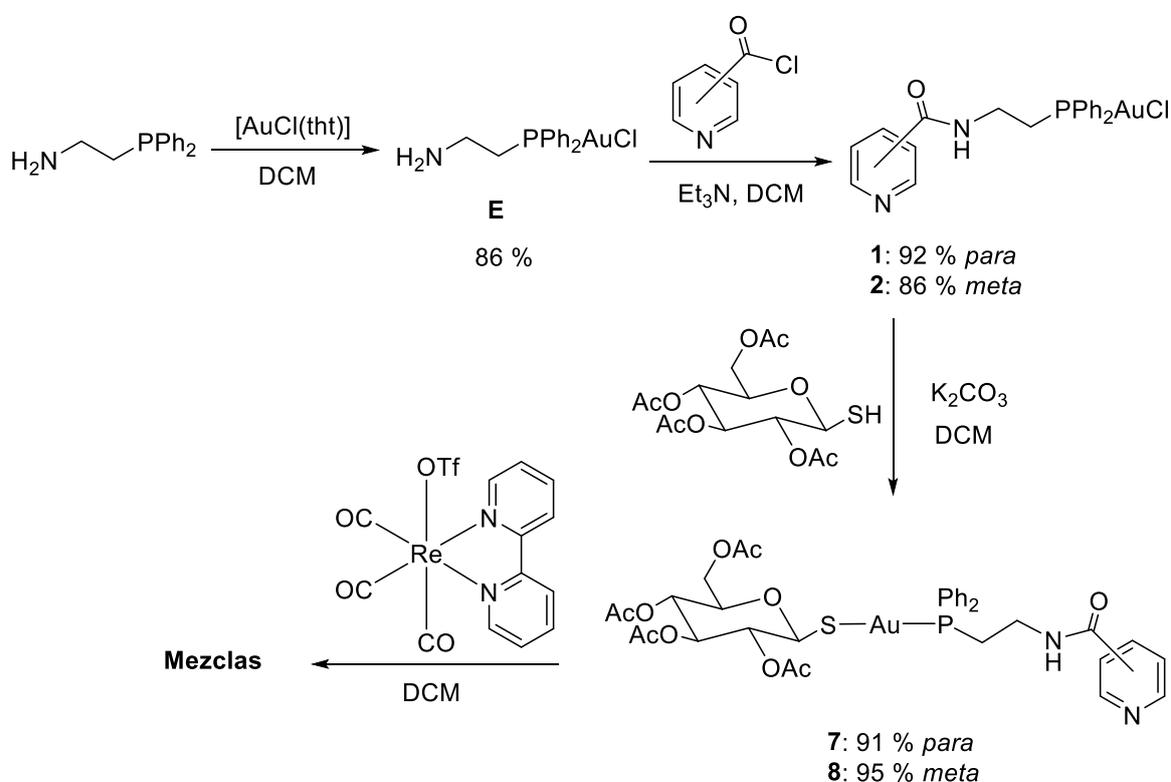


Figura 2.10 Comparación de espectros de RMN de fósforo de **3** y **A**.

2.5 Síntesis de análogos de Auranofin

La obtención de los derivados heterometálicos, en donde el oro se enlaza a la fosfina del ligando conector y a un tiolato a elección, debe realizarse mediante una estrategia de síntesis mediante la cual ambos metales se conectan en el último paso. Como ya se ha observado en trabajos anteriores del grupo,⁶ el renio ha mostrado más afinidad por los ligandos tiolato que por ligandos de tipo piridina, por lo que se pensó que la coordinación al oro del tiolato podría minimizar la competición entre ambos metales. La ruta sintética parte de la 2-difenilfosfinoetilamina que se coordinó al oro selectivamente por su extremo fosfina a través de su reacción con $[\text{AuCl}(\text{tht})]$ obteniendo el complejo **E** (esquema 2.5). La posterior reacción con los cloruros de acilo de piridina permitió obtener los complejos **1** y **2**. La protección de la fosfina por coordinación al oro en la

primera etapa permitió mejorar sustancialmente el rendimiento de la estrategia seguida en el esquema 2.5, incrementando el rendimiento en un 40 % respecto de la estrategia anterior (esquema 2.1). A continuación, se sustituyó el cloruro por la beta tioglucosa con el fin de emular el entorno del auranofín, utilizando un exceso de K_2CO_3 para asistir en la desprotonación del tiolato. Desgraciadamente, los posteriores intentos de coordinación del complejo de oro obtenido al complejo de renio activado **Re1** condujeron siempre a mezclas de productos que, no fue posible aislar por métodos de recristalización y tras su paso por columna de silicagel condujeron a mezclas en las que se identificaron los productos de partida *fac*-[Re(bpy)(CO)₃Cl] y los complejos de oro **7** y **8** respectivamente, prueba de que se estaba rompiendo el enlace renio-piridina.



Esquema 2.5 Síntesis de análogos de Auranofín.

La obtención de los compuestos **7** y **8** fue confirmada por espectroscopía RMN de protón y fósforo así como por espectrometría de masas de alta resolución.

2.6 Propiedades fotofísicas

El estudio de las propiedades fotofísicas de los compuestos sintetizados tiene una doble misión. Por un lado, forma parte de la caracterización requerida para todo compuesto no

publicado, y por otro lado, es necesario conocer los perfiles de excitación y emisión para más tarde valorar la posibilidad de poderlos usar en microscopía de fluorescencia como agentes de visualización celular. Aunque lo ideal para el uso de esta técnica es excitar al máximo de excitación y detectar al máximo de emisión de los agentes de imagen, es posible que en esos valores concretos haya interferencias con otras sustancias luminiscentes endógenos o exógenas como algunas bases de ADN o tintes comerciales de colocalización, respectivamente, y por ello resulta más interesante conocer un rango de trabajo frente a un valor aislado.

Se han registrado los espectros de absorción UV-vis a temperatura ambiente en disoluciones de diclorometano desgasificado (figura 2.11) y se presenta un resumen en la tabla 2.1. Los perfiles de absorción se pueden explicar como una combinación de la absorción típica para derivados bisimina de Re(I)^7 con la del fragmento AuClPPh_3 . A energías altas (≤ 320 nm) las transiciones observadas se deben a la suma de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ entre la bipyridina, la piridina y los fenilos del fragmento PPh_3 y se catalogan como transiciones centradas en el ligando ^1LC . A energías más bajas (de 375 nm en adelante) se observa la absorción correspondiente a la transferencia de carga del metal al ligando bipyridina $^1\text{MLCT Re}(d\pi) \rightarrow \text{L}(\pi^*)$.

Tabla 2.1 Bandas de absorción visible-UV y coeficientes de extinción molar de los complejos.

Compuesto	$^1\text{IL}, \lambda_{\text{abs}}/\text{nm} (\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1})$	$^1\text{MLCT}, \lambda_{\text{abs}}/\text{nm} (\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1})$
3	239 (61300), 267 (41600), 320 (20400)	360 (7200)
4	240 (52200), 273 (36600), 319 (22000)	371 (6700)

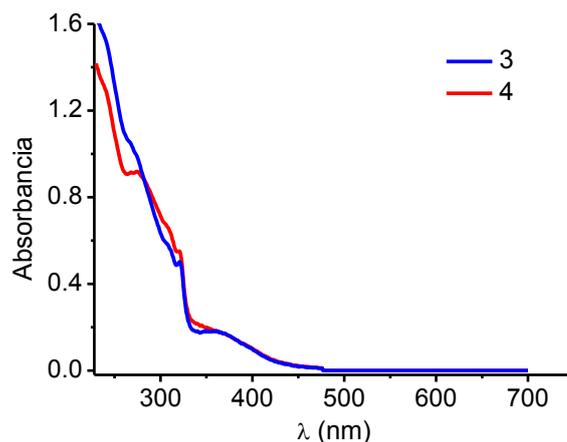


Figura 2.11 Espectros de absorción UV-visible de los compuestos 3 y 4.

Adicionalmente se han obtenido los espectros de excitación y emisión en DCM desgasificado y en DMSO. Ambos complejos presentan una emisión centrada en 560 nm (diclorometano) o 590 nm (DMSO) desde el estado emisor triplete $^3\text{MLCT}$, $\text{Re}(\text{d}\pi) \rightarrow \text{bpy}(\pi^*)$ por lo que se clasifican como compuestos fosforescentes. Puesto que el estado excitado es más polar (hay mayor separación de cargas) que el estado fundamental, se observa un desplazamiento al rojo en el máximo de emisión al pasar de DCM a DMSO: la mayor polaridad del DMSO estabiliza en mayor medida el estado excitado que el fundamental reduciendo así la diferencia de energía entre ambos niveles. La excitación se representa por una banda ancha centrada en 410-420 nm. Las propiedades luminiscentes se corresponden a las descritas en la bibliografía para los compuestos de renio que responden a la fórmula $\text{fac-}[\text{Re}(\text{bpy})(\text{CO})_3\text{Cl}]$.⁸

Los tiempos de vida obtenidos en torno a 200 ns están en sintonía con la naturaleza fosforescente de la emisión, medidos en DCM desgasificado. Al registrar estos tiempos de vida en disolución de DMSO, la presencia de oxígeno contribuye a la desactivación por procesos no radiativos (el estado excitado se quenchea excitando el oxígeno a su estado singlete $^1\text{O}_2$) y se observa en consecuencia una disminución del tiempo de vida de unos 100 ns. Los valores de rendimientos cuánticos coinciden para ambos complejos ($\phi = 4.2$) y se encuentran dentro del rango normal para este tipo de complejos de renio.⁵ Estos valores se recogen en la tabla 2.2, y en la figura 2.12 se representan los espectros combinados de excitación y emisión para ambos compuestos.

Tabla 2.2 Resumen del comportamiento luminiscente de los complejos **3** y **4**.

Compuesto	Excitación _{max} (λ/nm)	Emisión _{max} (λ/nm)	τ (ns)	Φ(%)
3	414 ^a , 408 ^b	564 ^a , 584 ^b	191 ^a , 118 ^b	4.2 ^a
4	426 ^a , 405 ^b	559 ^a , 590 ^b	213 ^a , 112 ^b	4.2 ^a

^a Medido en DCM. ^b Medido en DMSO.

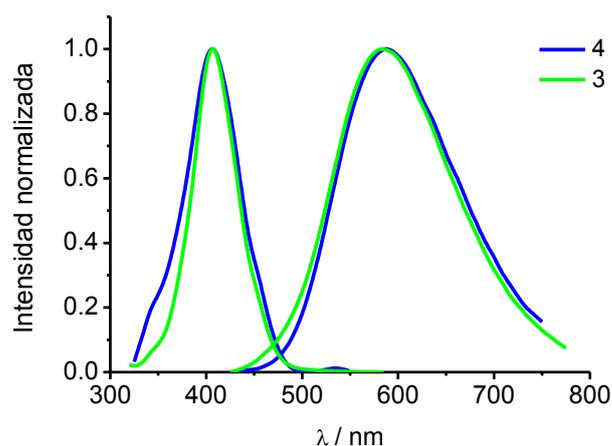


Figura 2.12 Espectros de emisión y excitación de los compuestos **4** (azul) y **3** (verde) en DMSO.

Como se puede observar en la tabla 2.2, ambos compuestos presentan desplazamientos de Stokes significativos de aproximadamente 180 nm, que permiten detectar la emisión sin interferencias debidas a la luz reflejada y a la propia autofluorescencia del medio biológico. La excitación a longitudes de onda en el visible (400 nm), sumada a unos tiempos de vida elevados y unos rendimientos cuánticos aceptables sugieren que los complejos son aptos para ser empleados en imagen celular.

2.7 Actividad biológica sobre células tumorales humanas

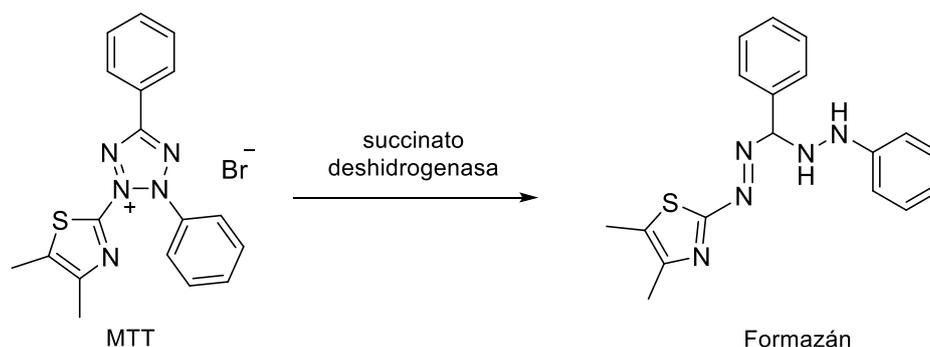
2.7.1 Estudio de la actividad citotóxica. Método MTT

La citotoxicidad es un concepto cuya definición es variable según el punto de vista del narrador. En el campo de la medicina se suele atribuir al daño provocado por la acción de anticuerpos o por células citotóxicas sobre otras células a menudo malignas como las tumorales o aquellas infectadas por virus. En un marco más farmacéutico, hace

referencia al daño provocado por una sustancia química sobre un tipo de células, queriendo evaluar su potencial como fármaco. Esta última definición es la más adecuada para explicar el concepto de citotoxicidad que se va a tratar a lo largo de la tesis.

Para cuantificar la citotoxicidad existen diversos ensayos como el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamientos al *azul de kenacid* o el ensayo de reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).⁹ Todos los resultados de citotoxicidad expuestos a lo largo del trabajo han sido evaluados empleando el método del MTT.

Este método desarrollado en 1983 por Mosmann y más tarde modificado por François Denizot y Rita Lang¹⁰ se trata de un método colorimétrico por el cual la supervivencia o viabilidad celular se relaciona con un valor de absorbancia. El MTT es un compuesto amarillo que se puede reducir a la molécula de formazán que tiene un fuerte color azul-violeta. La reducción del MTT a formazán está catalizada por la enzima succinato deshidrogenasa que se encuentra en las mitocondrias. La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias, y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular (la capacidad de las células para crecer y dividirse). Tras incubar las células con los compuestos a estudiar el período de tiempo seleccionado (24h, 48h, 72h, etc.) se añade el MTT y se deja incubar otras dos horas. Durante ese tiempo aquellas células que hayan sobrevivido a la acción del compuesto serán capaces de reducir el MTT a formazán que permanecerá bajo forma de cristales azules en el interior de dichas células (esquema 2.6). Al disolver estos cristales, se puede relacionar la cantidad de células vivas, es decir la viabilidad celular, con el valor de absorbancia a la longitud de onda a la que absorbe el formazán.



Esquema 2. 6 Reacción de formación del azul de formazán catalizada por la enzima succinato deshidrogenasa.

Los complejos **3** y **4** se estudiaron frente a la línea de células tumorales de cáncer de pulmón A549. En la parte experimental se describe con detalle el procedimiento seguido previo al ensayo MTT, los medios de cultivo empleados y la preparación de las células en las placas “multi-well” de 96 pocillos.

En primer lugar, se cultivaron las células sobre las placas “multi-well” de 96 pocillos. Después de 24 h, se adicionaron distintas concentraciones de los complejos a analizar. En la placa podemos distinguir tres zonas:

- Control (8 pocillos, 1ª columna): Se adicionaron 100 μL de medio conteniendo un 2% de DMSO.
- Blanco (8 pocillos, última columna): Se adicionaron 200 μL de medio conteniendo un 2% de DMSO.
- Adición de compuestos a distintas concentraciones (80 pocillos): Se adicionaron 100 μL de distintas concentraciones de nuestro complejo cubriendo un rango de 1 a 100 μM . Cada una de las distintas concentraciones se añade a cuatro pocillos para evaluarla por cuadruplicado.

Tras añadir los compuestos se dejó incubar la placa en una estufa a 37°C con un 5% de CO_2 y un % de humedad durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se adicionaron 10 μL de una disolución de MTT sobre cada uno de los pocillos, y se dejó incubar otras 2 horas más bajo las condiciones descritas previamente. Por último se retiró el medio de cultivo acuoso y se disolvieron los cristales de formazán por adición de 100 μL de DMSO en cada uno de los pocillos. La placa se llevó entonces a un espectrofotómetro

para medir la densidad óptica¹¹ a 550 nm que se corresponde con la longitud de onda a la que absorbe el formazán.

Una vez realizadas las medidas de densidad óptica de cada uno de los pocillos de la placa, es necesario procesar los datos. En primer lugar se calcula la media de la absorción del blanco y este valor se resta a cada uno de los valores de densidad óptica obtenidos en cada pocillo incluido los del control. De esta manera se resta la contribución de la propia placa, DMSO y el pequeño volumen de medio que haya podido quedar. Esta operación es especialmente importante en aquellos pocillos en donde los valores de densidad óptica son muy bajos o cuando el valor de la densidad óptica del control no es muy elevado pues de no hacerlo se obtienen valores de viabilidad celular erróneamente superiores. A continuación se realiza la media de los valores obtenidos para cada concentración así como el control y se calcula su desviación estándar. Como convenio se establece que el valor de densidad óptica del control representa una viabilidad celular del 100%, calculando este parámetro como el cociente entre un valor de densidad óptica dado y el valor correspondiente al control (ecuación 2.1).

$$\% VC(\text{concentración } x) = \frac{D.O.(\text{concentración } x)}{D.O.(\text{control})} \cdot 100 \quad (2.1)$$

Donde % VC hace referencia al porcentaje de viabilidad celular y D. O. a la densidad óptica medida en el espectrofotómetro.

Los valores de densidad óptica se representan frente a las distintas concentraciones de fármaco adicionadas. El software matemático Origin permite obtener las gráficas dosis-respuesta que deberían ajustarse a un comportamiento sigmoideal y calcular el valor de concentración correspondiente a una supervivencia celular del 50%. Este valor de concentración se denomina IC₅₀ y es un parámetro muy importante, utilizado habitualmente para expresar la citotoxicidad de los compuestos. Cuanto menor sea este parámetro, menor concentración de fármaco es necesaria para reducir la población de células cancerígenas a la mitad y, por tanto, más potente y citotóxico es el complejo. La forma de la curva también puede proporcionar información acerca de la resistencia que ofrece la célula ante el fármaco y si la inhibición es total (< 10% VC).

A modo de ejemplo, se presentan los valores de viabilidad celular calculados para el complejo **4** en una repetición del ensayo MTT así como la curva dosis-respuesta generada por representación de los valores (tabla 2.3).

Tabla 2.3 Resumen de los valores obtenidos en un ensayo MTT del complejo **4**.

Concentración (μM)	Abs ₅₇₀ (nm)	Desviación estándar	Viabilidad celular (%)
0	1.053	0.079	100
10	0.921	0.158	87
25	0.889	0.102	84
50	0.328	0.274	31
75	0.035	0.012	3
100	0.035	0.013	3

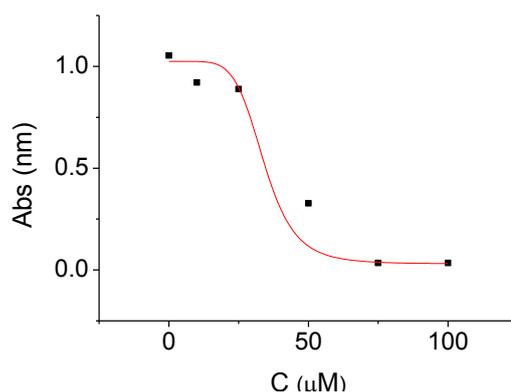


Figura 2.13 Representación de los valores de densidad óptica frente a concentración para el complejo **4**.

Por repetición del ensayo MTT tres veces en días diferentes, se obtienen los siguientes valores finales de IC₅₀ para ambos complejos **3** y **4** recogidos en la tabla 2.4. Con el fin de poder establecer hipótesis entre la relación estructura-actividad, se adjuntan también los valores de los análogos bimetálicos de los complejos **3** y **4** en donde el oro sólo se enlaza a un ligando fosfina y a un cloruro, compuestos **A** y **B** respectivamente.

Tabla 2.4 Resumen de los valores de citotoxicidad sobre la línea de cáncer de pulmón A549.

Complejo	IC50 (μM)
3	36.09 \pm 16.99 ^a
B	67.80 \pm 4.11 ^a
4	42.44 \pm 4.03 ^a
A	75.25 \pm 10.67 ^a
Cisplatino^b	114.2 \pm 11 ^b
Auranofín¹²	7.59

^a 24 h de incubación a 37 °C. La concentración final de DMSO fue del 0.5%

^b Medido en agua a las 24 h de incubación

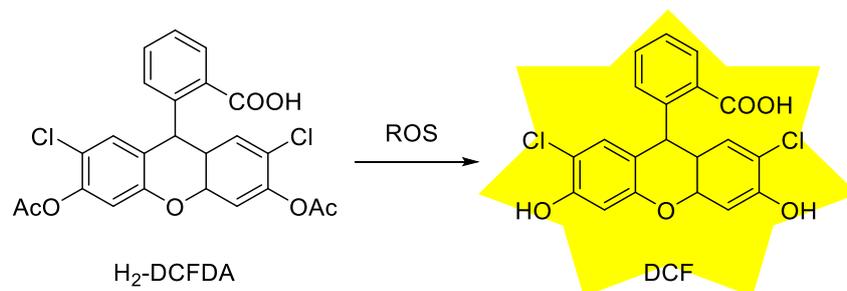
Los complejos **3** y **4** son del orden de 3 veces más activos que el cisplatino a 24 h frente a las células A549. Por otro lado, frente a la referencia de un complejo de oro como sería el Auranofín, resultan aproximadamente unas 4 veces menos activos. El fragmento de renio, responsable de las propiedades luminiscentes, es tradicionalmente inactivo frente a las células tumorales como demuestran estudios bibliográficos.¹³

Por tanto, la mayor actividad observada para los compuestos **3** y **4** trimetálicos frente a sus análogos bimetálicos se explica por la mayor permeabilidad celular del complejo al aumentar su carga positiva. Es conocido que los compuestos cargados positivamente son en general más activos que los neutros o aniónicos porque la interacción con los extremos fosfato y sulfonilo de los ácidos grasos que componen la membrana celular facilita su permeación.¹⁴ Adicionalmente, compuestos bisfosfina de oro cargados positivamente, presentan en general un mejor balance carga/lipofilicidad que los derivados fosfina-oro-cloro como se ha observado en trabajos de Casini y colaboradores.¹⁵

2.7.2 Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Una primera aproximación para conocer el mecanismo de acción es evaluar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La mitocondria genera de manera natural ROS durante los procesos de fosforilación oxidativa.¹⁶ Existen enzimas como la tioredoxina reductasa o la glutatona reductasa que se encargan de mantener unos niveles de ROS compatibles con la viabilidad celular. Si estas enzimas reductoras son inhibidas, por ejemplo debido a la acción de un fármaco, aumentará el nivel de ROS. La

determinación de los niveles de ROS se llevó a cabo por citometría de flujo para el complejo **4** y su análogo bimetálico, **A**. Se incubaron las células tumorales con los compuestos a estudio durante 18 h tras lo cual se añadió el indicador de estrés oxidativo diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂-DCFDA). Este reactivo evoluciona a la 2',7'-diclorofluoresceína bajo condiciones oxidativas marcando las células con fluorescencia, que más tarde son separadas por el analizador del citómetro de flujo.



Esquema 2.7 Generación de DCF a partir de su precursor H₂-DCFDA en el medio celular.

De acuerdo con el comportamiento habitual de los complejos de oro,¹⁷ tanto el compuesto **4** como su análogo bimetálico **A** generan un aumento significativo de la señal de fluorescencia confirmando un aumento de los niveles de ROS (figura 2.14). Esto implica que, o bien los compuestos generan ROS por sí mismos, o bien inhiben enzimas que se encargan de mantener un balance adecuado, provocando en ambos casos un efecto negativo sobre la viabilidad celular.

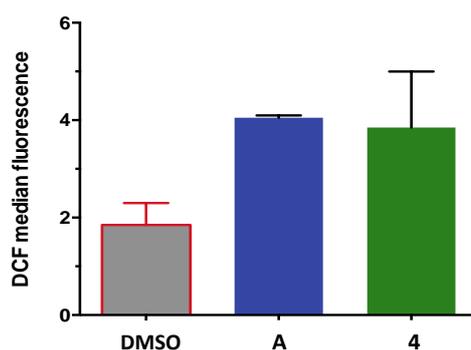


Figura 2.14 Histograma de fluorescencia de la DCF en células A549 incubadas con DMSO, **A** y **4** durante 18 h.

2.7.3 Estudios de biodistribución. Medidas de microscopio confocal

Los estudios de biodistribución de los compuestos **3** y **4** se llevaron a cabo por medio de un microscopio de fluorescencia confocal. Mientras que el microscopio de fluorescencia convencional no es más que un derivado del microscopio óptico en donde se incorpora un espejo dicróico para que sólo la luz emitida por la muestra llegue al detector, el microscopio confocal incorpora un par de diafragmas (pinholes) antes del detector y después de la fuente de excitación, que permiten enfocar la muestra por planos (ver figura 2.15). Este avance instrumental no sólo permite la obtención de imágenes en 3D, sino que al eliminar la fluorescencia de aquellas partes de la muestra que no estén en el plano de estudio, se reduce enormemente el ruido de fondo aumentando la resolución y la sensibilidad.

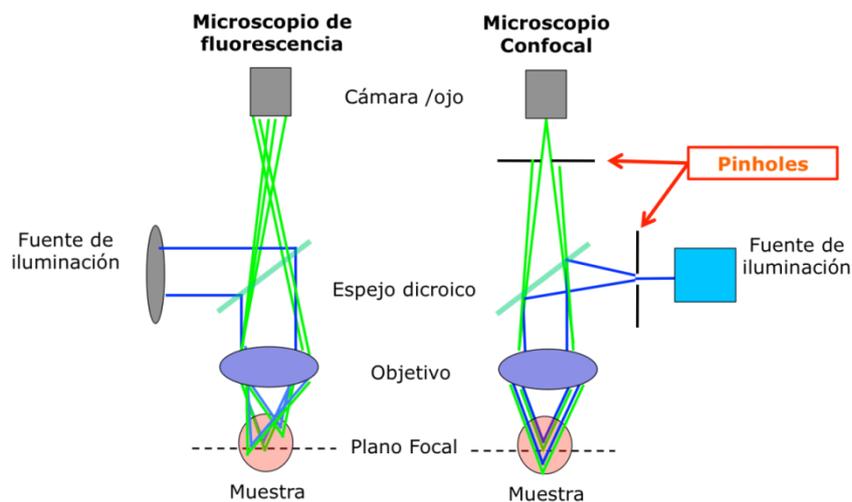


Figura 2.15 Comparativa entre microscopio de fluorescencia y confocal. Con el microscopio confocal sólo se obtiene señal proveniente del plano focal.

El procedimiento para determinar la biodistribución, detallado en la parte experimental, se asemeja al seguido para los estudios de actividad biológica: las células se incuban un tiempo variable con los compuestos a estudio, que se añaden en concentraciones inferiores al valor de su IC_{50} para evitar la muerte celular. El objetivo es que las células vivas capten los compuestos y observar en qué orgánulos se acumulan para así establecer hipótesis sobre sus posibles dianas biológicas y su mecanismo de acción. Si el estudio se lleva a cabo a baja temperatura ($4^{\circ}C$), los mecanismos de transporte activo de la célula se ven interrumpidos¹⁸ por lo que si se observa internalización de los compuestos significa que éstos entran también por mecanismos de transporte pasivo.

Debido a que la resolución del microscopio no permite distinguir los orgánulos de la célula entre sí más allá del núcleo por su elevado tamaño, se añaden en combinación con los complejos a estudio, tintes luminiscentes o fluoróforos que se acumulan específicamente en un orgánulo según el tinte. El tinte fluorescente debe tener unos perfiles de excitación y emisión diferentes a los de los compuestos utilizados como agentes de imagen. De este modo, incubando las células con el agente de imagen y con el tinte fluorescente a la vez, se pueden seleccionar diferentes láseres de excitación que excitarán selectivamente el compuesto o el tinte. En consecuencia, se obtienen dos imágenes diferentes de la misma célula: aquella que se corresponde con la excitación y posterior detección del tinte fluorescente y aquella que se corresponde con la excitación y emisión del compuesto candidato a agente de imagen celular. La superposición de ambas imágenes permite comprobar si ambas emisiones se superponen lo que implica la colocalización del tinte y el compuesto. En esta ocasión se empleó el tinte nuclear DRAQ5 cuya excitación se llevó a cabo empleando el láser de 647 nm, recogiendo su emisión a 665 nm. Los complejos **3** y **4**, se excitaron mediante el láser de 405 nm recogiendo su emisión a 590 nm. La figura 2.16 muestra como los complejos **3** y **4** siguen patrones de distribución similares con una acumulación en forma de gránulos tanto en el núcleo como en el citoplasma.

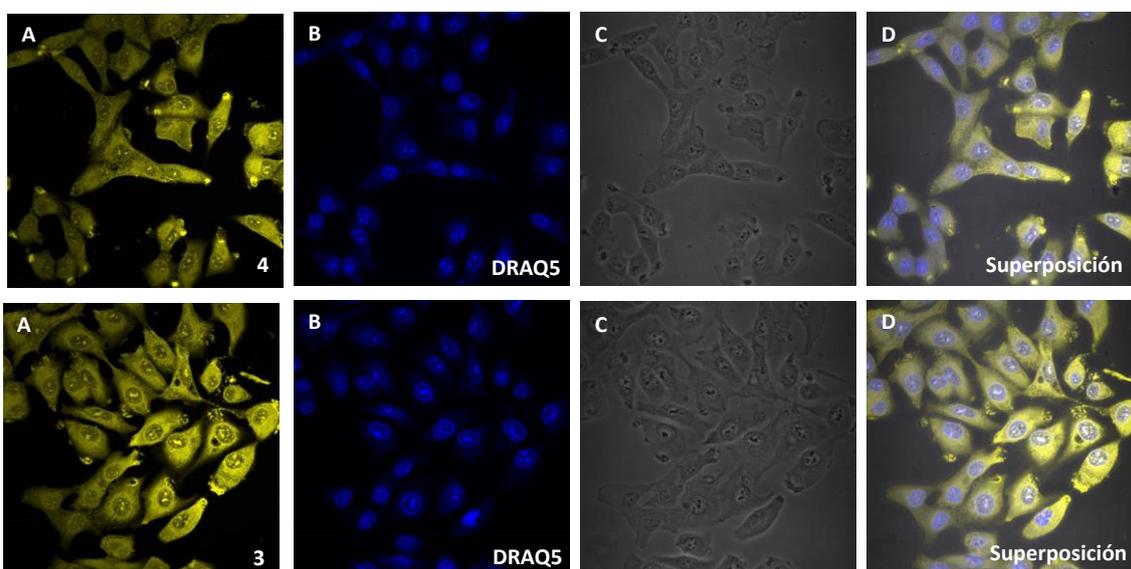


Figura 2.16 Imágenes de los complejos **3** y **4** incubados con células A549 de carcinoma de pulmón a 37°C durante 4 horas. (A) Excitación a 405 nm. (B) Excitación a 647 nm. (C) Imagen de contraste. (D) Superposición de imágenes.

La distribución en gránulos a lo largo del citoplasma se puede relacionar con la internalización en alguno de los orgánulos. Tal y como se ha explicado en el capítulo 1, los compuestos de oro tienen afinidad por enzimas seleno o azufre dadoras y en concreto tienden a acumularse en las mitocondrias por contener a la enzima tioredoxina reductasa¹⁹ por lo que se establece como hipótesis que los compuestos tienden a acumularse en las mitocondrias, explicando también así los niveles de ROS elevados caracterizados previamente. Adicionalmente, al observar en detalle las imágenes se aprecia una marcada acumulación en los límites internos de la membrana celular bajo la forma de esferas. Una acumulación con una geometría definida y próxima a la membrana celular puede implicar que los compuestos se encuentran encapsulados en endosomas y que por tanto han penetrado por un proceso de endocitosis. La endocitosis es un proceso dependiente de energía y no tiene lugar a bajas temperaturas pues el funcionamiento de los procesos celulares se ve interrumpido. Para comprobar si la captación tenía lugar por medio de procesos de transporte activo, el experimento se llevó a cabo incubando las células con el complejo **3** a 4 °C (figura 2.17).

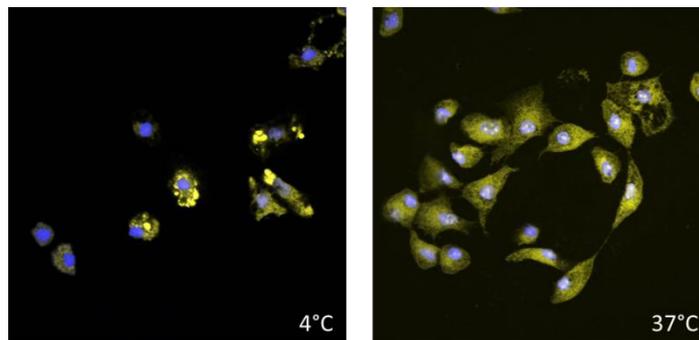


Figura 2.17 Complejo **3** incubado en células A549 a 4 °C y 37 °C durante 1 h.

El tiempo de incubación se redujo a 1 hora para evitar la muerte celular. Paralelamente se llevó a cabo la incubación de **3** a 37 °C como control para comprobar que reduciendo el tiempo de incubación se seguía produciendo la internalización de los compuestos. En contradicción con la hipótesis planteada anteriormente, la captación de los complejos también tiene lugar a baja temperatura descartando que el mecanismo sea debido al transporte activo. Sin embargo, tal y como se observa en la imagen, la acumulación en forma de esferas o gránulos es más pronunciada cuando las células han sido incubadas a 4 °C. Es conocida la tendencia de sustancias altamente hidrófobas como los ácidos grasos, a agruparse entre sí cuando se encuentran a altas concentraciones en el medio

celular. La disminución de la temperatura también contribuye a esta aglomeración porque las macromoléculas pierden energía y su rigidez aumenta, tendiendo a conformaciones donde se alcanza un máximo de estabilidad.

Ambos compuestos **3** y **4** se componen de una parte marcadamente hidrofóbica representada por los fenilos de las fosfinas, y una parte más hidrofílica representada por los tres centros metálicos cargados positivamente y la funcionalidad amida y con la posibilidad de establecer puentes de hidrógeno con el medio acuoso. Se ha propuesto que a bajas temperaturas, ambos complejos son capaces de reorganizarse en agregados que orientan su partes hidrofóbicas hacia el interior y sus partes hidrofílicas hacia el exterior, alcanzando una conformación de máxima estabilidad (figura 2.18). Los agregados formados pueden entenderse como un análogo de micelas y esto explicaría la forma observada en las imágenes del microscopio confocal.

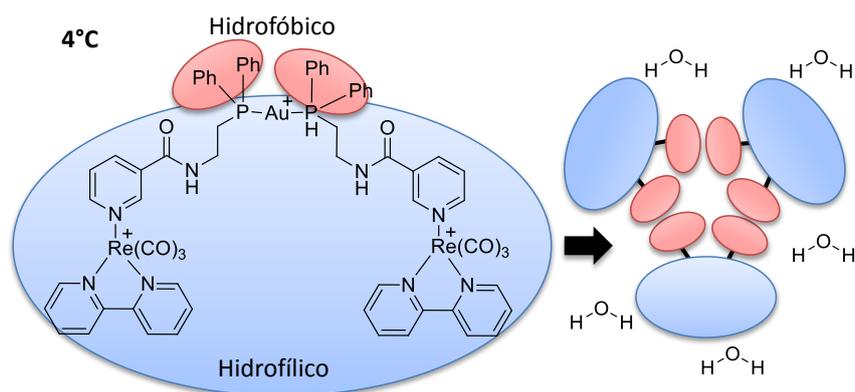


Figura 2.18 Conformación propuesta para los agregados del complejo **3** a bajas temperaturas.

Por último cabe señalar que mientras que sí se observan esos agregados tras una incubación a 4 h a 37 °C, no es así para una incubación durante tan sólo 1 h (figuras 2.16 y 2.17). La mayor energía térmica de las moléculas a 37 °C retrasa la formación de estos agregados y necesitan más tiempo y concentración (mayor tiempo de incubación implica más captación) para producirse.

2.7.4 Interacción con el ADN

La presencia de ambos compuestos **3** y **4** en el núcleo concuerda con la interacción con el ADN observada para otros ejemplos de bisfosfinas de oro como los descritos por

Mirabelli y colaboradores.²⁰ Una manera de confirmar la presencia de estas interacciones es realizar un experimento de electroforesis. La electroforesis en gel de agarosa permite estudiar si concentraciones crecientes de un metabolito interaccionan con un plásmido de ADN. El gel de agarosa actúa como fase estacionaria y una diferencia de potencial aplicada a la cubeta conteniendo el gel actúa como fuerza motriz de las moléculas añadidas en mitad de la cubeta. Según la carga de las moléculas, se dirigirán al electrodo cargado con el signo opuesto. La velocidad con que difunden hacia su polo opuesto depende del tamaño, de forma que a mayor tamaño, menor desplazamiento respecto del punto inicial que se encuentra en el medio de la cubeta (figura 2.19).

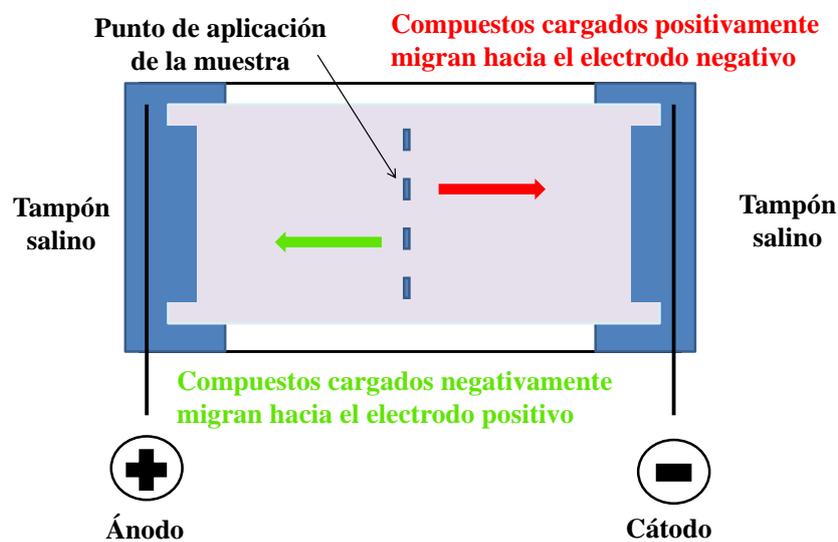


Figura 2.19 Funcionamiento de la electroforesis en gel.

El plásmido de ADN se siente atraído hacia el polo positivo debido a sus grupos fosfato cargados negativamente. Por otro lado, los complejos **B** y **3** son catiónicos por lo que se desplazarán hacia el polo negativo. Se estudió la interacción del plásmido pEYFP con un rango de concentraciones comprendido entre 0,125 y 4 nM. Tan sólo para el valor más bajo de concentración del complejo **3** se observó la banda correspondiente al ADN. Para concentraciones superiores la señal del ADN desaparece y únicamente se observa la del complejo. Una interacción con el ADN supondría la aparición de una nueva banda menos desplazada que la del ADN puro porque el agregado tendría una mayor masa. Aunque no se observa esta banda, la desaparición de la banda correspondiente al ADN puede sugerir que la cadena de ADN se ha roto por el efecto del complejo por lo que no es descartable que haya interacción (figura 2.20).

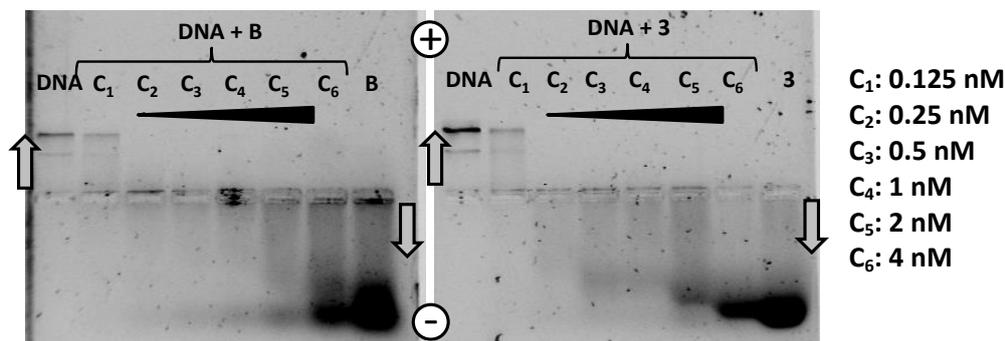


Figura 2.20 Electroforesis en gel de agarosa del plásmido de ADN pEYFP incubado con diferentes concentraciones de **B** y **3** durante 4 horas a 37 °C en PBS. En los pocillos **B** y **3** sólo se añadió el compuesto sin ADN en una concentración de 2 nM.

Otra forma de demostrar una posible interacción entre el ADN y un compuesto con grupos cromóforos es ver cómo afecta la presencia de esta macromolécula sobre sus propiedades ópticas, en concreto sobre las bandas asociadas a transiciones intraligando (transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$, MLCT).²¹ La intercalación del compuesto en la hélice de ADN puede hacer que la intensidad de la absorción de estas transiciones aumente o disminuya (hiper e hipocromismo) o que se desplace de su posición original (batocromismo hacia menores energías, hipsocromismo hacia mayores energías). Otras posibilidades de interacción son la unión directa por enlace covalente, la interacción con una determinada secuencia de bases nitrogenadas de la hendidura mayor o menor del ADN, y las interacciones electrostáticas. En función de las constantes de interacción se puede diferenciar entre los distintos tipos de interacción.

El estudio se llevó a cabo sobre el complejo **4**. Al registrar el espectro de absorción ultravioleta visible aumentando progresivamente la concentración de ADN, se observa que la absorbancia cada vez es menor (hipocromismo). Se seleccionó la banda de absorción más intensa del compuesto ($\lambda=237$ nm) y se calculó el coeficiente de extinción molar para cada concentración de ADN añadida por medio de la ley de Beer-Lambert. La constante de afinidad ADN-compuesto se puede calcular gracias a la siguiente ecuación (ecuación 2.2):

$$\frac{[ADN]}{\varepsilon_a - \varepsilon_f} = \frac{[ADN]}{\varepsilon_0 - \varepsilon_f} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_0 - \varepsilon_f)} \quad (2.2)$$

Donde [DNA] es la concentración de ADN, ε_a el coeficiente de extinción molar a 237 nm a una concentración de ADN dada, ε_f el coeficiente de extinción molar del complejo sin ADN, y ε_0 el coeficiente de extinción molar del complejo cuando está saturado de ADN.

La representación de los datos obtenidos siguiendo la ecuación # se ajusta a una línea recta de cuya pendiente se calcula K_b (figura 2.21).

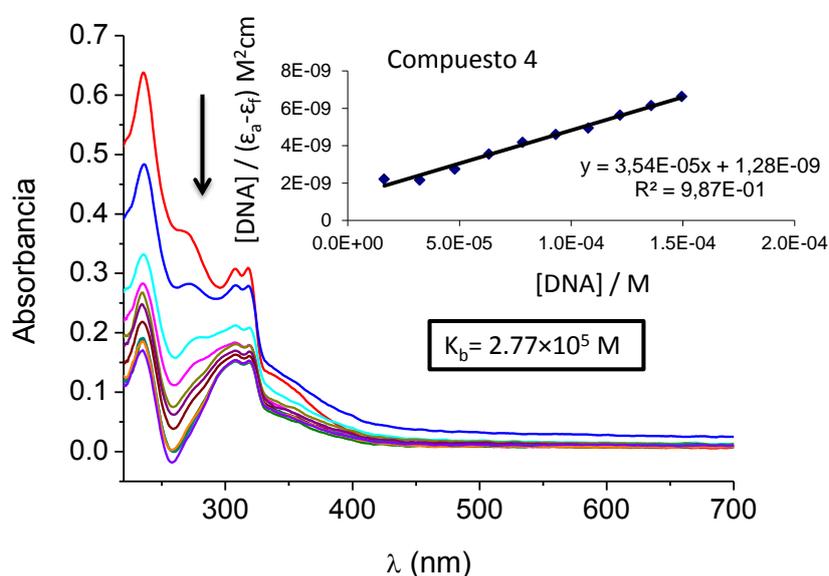


Figura 2.21 Espectros de absorción del complejo **4** en 0.05 M de tampón Tris-HCl (pH = 7.4) con concentraciones crecientes de CT-DNA (1.7 nM) a temperatura ambiente.

El valor de K_b es elevado y confirma que exista una interacción con el ADN. El valor numérico de esta constante no permite clasificar de forma inequívoca el tipo de interacción, aunque en la bibliografía se exponen teorías basadas en datos empíricos.¹⁸ En este caso, una constante de afinidad del orden de 10^5 M^{-1} , sumada a un hipocromismo de la banda de absorción, sería indicativo de interacción por intercalación con el ADN.

2.8 Conclusiones

Se han sintetizado dos complejos trimetálicos compuestos por dos entidades *fac*-[Re(bpy)(CO)₃X] y un átomo de oro. La conexión entre ambos metales se ha efectuado por un ligando piridina funcionalizado con una amidofosfina representado como X en la fórmula anterior. Como resultado, los complejos obtenidos son tricatiónicos y en donde el oro se enlaza a dos fosfinas equivalentes. Las propiedades ópticas de los complejos son adecuadas para su empleo en imagen celular gracias a una excitación centrada en 405 nm y 408 nm para **3** y **4** respectivamente, largos desplazamientos de Stokes (unos 180 nm) y tiempos de vida largos que permiten eliminar la señal de autofluorescencia del medio. Ambos complejos han mostrado actividad frente a la línea de células tumorales de pulmón A549 con unos valores de IC₅₀ que mejoran en tres veces el valor correspondiente para el cisplatino aunque son a su vez 4 veces inferiores al descrito para el Auranofin. La comparación con los análogos bimetálicos muestra la importancia del balance carga/lipofilicidad que aporta el entorno bisfosfina, con una carga positiva adicional que mejora la internalización en las células y en consecuencia la actividad. Gracias al fragmento luminiscente se pudieron llevar a cabo los estudios de biodistribución en un microscopio de fluorescencia confocal observando dos hechos destacables: aparte de la esperada distribución a lo largo del citoplasma que puede ser consecuente con la captación por las mitocondrias, se observó acumulación en el núcleo, y la formación de gránulos que más tarde se asociaron a la formación de agregados simulando pequeñas micelas. La acumulación en el núcleo motivó a estudiar la posible interacción con el ADN y por la combinación de experimentos basados en la espectroscopía UV-vis y la electroforesis en gel determinó que sí hay interacción proponiendo que existe intercalación sin conocer el modo concreto.

2.9 Experimental

2.9.1 Starting Materials

The starting materials [AuCl(tht)],²² [Au(tmbn)₂]SbF₆⁴ were prepared according to published procedures. [Re(CO)₅Cl] was purchased from TCI and used as received. All other reagents were commercially available and were used without further purification. Solvents were dried with a SPS solvent purification system.

2.9.2 Instrumentation

Mass spectra were recorded on a Bruker Esquire 3000 PLUS, with the electrospray (ESI) technique and on a Bruker Microflex (MALDI-TOF). ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ and $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ including 2D experiments, were recorded at room temperature on a Bruker Avance 400 spectrometer (^1H 400.0 MHz, ^{13}C 100.6 MHz, ^{31}P 162.0 MHz) or on a Bruker Avance II 300 spectrometer (^1H 300.0 MHz, ^{13}C 75.5 MHz, ^{31}P 121.5 MHz) with chemical shifts (δ , ppm) reported relative to the solvent peaks of the deuterated solvent. All J values are given in Hz. IR spectra were recorded in neat samples on a Perkin-Elmer Spectrum 100FT-IR spectrometer. Room temperature steady-state emission and excitation spectra were recorded with a Jobin-Yvon-Horiba Fluorolog FL3-11 spectrometer fitted with a JY TBX picosecond detection module. Nanosecond lifetimes were recorded with a Datastation HUB-B apparatus with a nanoLED controller and DAS6 software. The nanoLEDs employed for lifetime measurements had wavelengths of 370 and 390 nm. The lifetime data were fitted using the Jobin-Yvon software package and the Origin Pro 8 program. UV-vis spectra were recorded with 1 cm quartz cells on an Evolution 600 spectrophotometer. The quantum yields were measured in a Hamamatsu Photonics Quantaaurus-QY instrument at 300–950 nm.

2.9.3 Procedures

Antiproliferative Studies: MTT Assay.

Exponentially growing cells (A549) were seeded at a density of $\sim 1 \times 10^4$ cells per well in 96-well flat-bottomed microplates and allowed to attach for 24 h prior to addition of compounds. The complexes were dissolved in DMSO and added to cells in concentrations ranging from 10 to 200 μM in quadruplicate. Cells were incubated with the compounds for 24 h at 37 °C. MTT (10 μL , 5 mg mL^{-1}) was added to each well, and plates were incubated for 2 h at 37 °C. Finally, the growth media was eliminated, and DMSO (100 μL per well) was added to dissolve the formazan precipitates. The optical density was measured at 550 nm using a 96-well multiscanner autoreader (ELISA). The IC_{50} was calculated by nonlinear regression analysis.

Analysis of ROS by Flow Cytometry. A549 cells were seeded in 24-well plate at 5×10^5 cells/well and allowed to attach for 10 h. Then, compounds **4** and **7** were added at 25 μM in duplicate. The equivalent volume of DMSO was added to controls. After 18 h of incubation, cells were detached with a 0.25% trypsin solution, washed twice with PBS,

and resuspended in 500 μL of PBS containing 10 μM H₂- DCFDA. Samples were incubated with this probe for 30 min at 37 °C, washed with PBS, and analyzed in a flow cytometer (FacSCAN, Becton Dickinson). Data files were processed using the Weasel software.

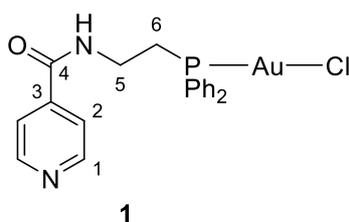
Cell Fluorescence Microscopy Study. European Collection of Cell Cultures were maintained in 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid (Hepes) modified minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin. A549 cells were detached from the plastic flask using trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution and suspended in an excess volume of growth medium. The homogeneous cell suspension was then distributed into 24-well flat-bottomed microplates over a coverslip placed inside each well, and they were allowed to attach for 24 h prior to addition of compounds. Complexes were added (10 μL) to the cells up to a final concentration of 25 μM . After incubation for 4 h at 37 °C, the growth medium was removed, and 0.5 mL of PBS was added for a washing step (three times). Thereafter, 0.5 mL of paraformaldehyde (4%) was added and allowed to stand for 15 min at room temperature. Eventually the paraformaldehyde was removed, and further washings with PBS were performed (3×0.5 mL). The coverslips were collected from the 24-well plate, immersed for 1 or 2 s in distilled water, and let them to drip the water. Then, they are placed over a microscope slide, where a drop of fluoromount with 2 μM DRAQ5 was previously placed. Preparations were viewed using an Olympus FV10-i oil-type compact confocal laser microscope using a 10 \times or 60 \times objective, with excitation wavelength at 405 and 650 nm.

DNA Interaction Assay. First, aliquots (20 μL) of pEYFP plasmid DNA (5 ng/mL) in buffer Tris-acetate/EDTA buffer (TAE) were incubated with different concentrations of the compounds 5 and 8 (4.45–142 μM) at 37 °C for 4 h in the dark. Samples of free DNA were prepared as controls. After the incubation period, the samples were loaded onto 0.8% agarose gel containing SyBr-SAFE stain. The samples were separated by electrophoresis for 30 min at 90 V in TAE. Afterward, the gel was visualized in a GelDoc (BioRad).

Absorption Spectral Studies. DNA binding experiments were performed in Tris-HCl buffer (0.05 M pH 7.4) using a DMSO solution of the complex. The concentration of CT-DNA was determined from its absorbance intensity at 260 nm and its known molar absorption coefficient value of 6600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.³⁶ Absorption spectral titration experiments were performed by varying the concentration of CT-DNA while keeping

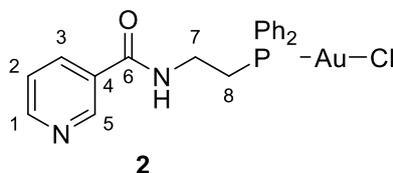
the complex concentration constant. Before each measurement samples were equilibrated with CT-DNA for 10 min. The absorbance of the complex was measured after each successive addition of CT-DNA. The intrinsic DNA binding constant (K_b) was obtained using the equation $[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f) = [\text{DNA}]/(\varepsilon_b - \varepsilon_f) + 1/K_b(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$, where $[\text{DNA}]$ is the concentration of DNA in the base pairs, ε_a is the apparent extinction coefficient observed for the complex, ε_f corresponds to the extinction coefficient of the complex in its free form, and ε_b refers to the extinction coefficient of the complex when fully bound to DNA.³⁷ $[\text{DNA}]/(\varepsilon_a - \varepsilon_f)$ versus $[\text{DNA}]$ was plotted, and the ratio of the slope to intercept from the linear fit gives the value of the intrinsic binding constant (K_b).

2.9.4 Syntheses



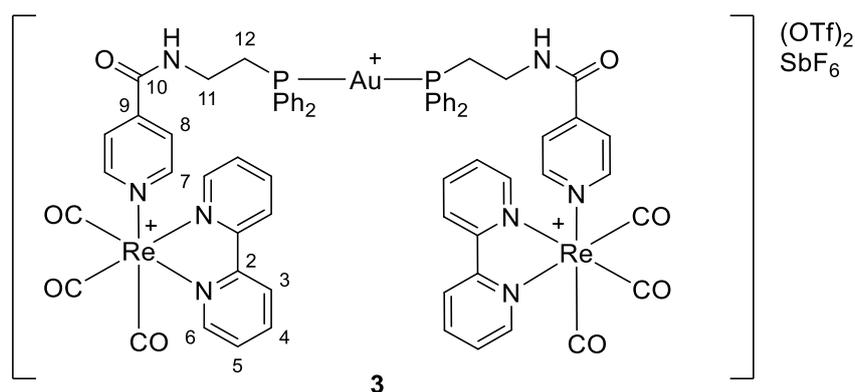
To a stirred solution of **E** (200 mg, 0.433 mmol) in DCM (10 mL) was added isonicotinoyl chloride hydrochloride (324.8 mg, 1.73 mmol) followed by Et₃N (722 μ L, 5.20 mmol), and the resulting solution was allowed to react overnight. The reaction was quenched by the addition of water (20 mL), and the organic layer was separated and further washed with a saturated aqueous solution of NaHCO₃ (2 \times 20 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, filtrated, and evaporated. The crude product was purified by alumina column chromatography using MeOH/CH₂Cl₂ (2:98). The desired compound was obtained as a white solid (226.8 mg, 92%).

¹H NMR (CD₂Cl₂, 400 MHz): δ 8.67 (d, J = 5.0 Hz, 2H, H₁), 7.79 – 7.70 (m, 4H, *o*-H, Ph), 7.53 – 7.45 (m, 8H, *m*-H + *p*-H + H₂), 6.68 (s_{br}, 1H, NH), 3.85 – 3.73 (m, 2H, H₅), 2.93 (dt, J = 10.7, 6.5 Hz, 2H, H₆). **³¹P NMR (CD₂Cl₂, 162 MHz):** δ 24.8 (s, 1P). **¹³C NMR (CD₂Cl₂, 101 MHz):** δ 166.1 (s, C₄), 151.02 (s, C₁), 133.8 (d, ² $J_{\text{P-C}}$ = 13.3 Hz, *o*-C, Ph), 132.8 (d, ⁴ $J_{\text{P-C}}$ = 2.6 Hz, *p*-C, Ph), 130.0 (d, ³ $J_{\text{P-C}}$ = 11.7 Hz, *m*-C, Ph), 129.4 (d, ¹ $J_{\text{P-C}}$ = 61.2 Hz, *ipso*-C, Ph), 121.4 (s, C₂), 37.4 (d, ² $J_{\text{P-C}}$ = 5.2 Hz, C₅), 28.5 (d, ¹ $J_{\text{P-C}}$ = 38.2 Hz, C₆). **IR (cm⁻¹):** 3313 ν (NH), 3054 ν (C_{Ar}-H), 1663 ν (N-C=O), 1553 ν (NH δ), 325 ν (Au-Cl). **HRMS (m/z):** 589.0458 (M⁺) C₂₀H₁₉AuClN₂O₂P₂ (589.0481).



This compound was prepared similarly to **1** but using nicotinoyl chloride hydrochloride (159 mg, 0.867 mmol) instead of isonicotinoyl chloride hydrochloride. Starting from **E** (200 mg, 0.433 mmol), compound **2** was obtained as a white solid (212 mg, 86%).

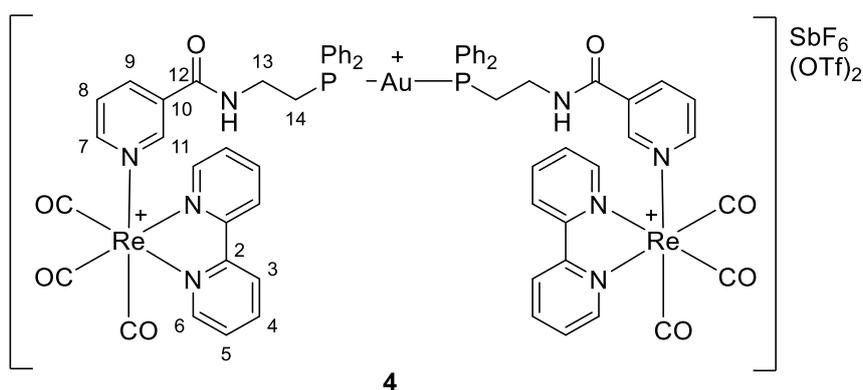
^1H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.82 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H₅), 8.67 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1H, H₁), 7.96 (ddd, J = 8.0, 2.2, 1.8 Hz, 1H, H₃), 7.69–7.61 (m, 4H, *o*-H, Ph), 7.46–7.36 (m, 6H, *m*-H + *p*-H), 7.34 (ddd, J = 7.9, 4.8, 0.8 Hz, 1H, H₂), 6.70 (t, J = 5.0 Hz, 1H, NH), 3.79 (dc, J = 15.5, 6.7 Hz, 2H, H₈), 2.95 (dt, J = 10.9, 6.8 Hz, 2H, H₇). **^{31}P NMR (CDCl₃, 162 MHz):** δ 24.8 (s, 1P). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃):** δ 166.09 (s, C₆), 152.34 (s, C₅), 148.5 (s, C₁), 135.2 (s, C₃), 133.3 (d, $^2J_{\text{P-C}}$ = 13.3 Hz, *o*-C, Ph), 132.2 (d, $^4J_{\text{P-C}}$ = 2.6 Hz, *p*-C, Ph), 129.5 (d, $^3J_{\text{P-C}}$ = 11.8 Hz, *m*-C, Ph), 128.4 (s, C₄), 128.8 (d, $^1J_{\text{P-C}}$ = 61.3 Hz, *ipso*-C, Ph), 123.5 (s, C₂), 37.1 (d, $^2J_{\text{P-C}}$ = 5.1 Hz, C₇), 28.1 (d, $^1J_{\text{P-C}}$ = 38.0 Hz, C₈). **IR (cm⁻¹):** 3316 ν (NH), 3049 ν (C_{Ar}-H), 1643 ν (N-C=O), 1529 ν (NH δ), 689 ν (P-C), 318 ν (Au-Cl). **HRMS (m/z):** 567.0697 [M+H⁺] C₂₀H₂₀AuClN₂O₂P (567.0662).



To a stirred solution of **1** (0.67 mg, 0.06 mmol) in DCM was added *fac*-[Re(CO)₃(bpy)OTf] (0.68 mg, 0.12 mmol). The reaction was followed by ^1H NMR and stopped when no evolution was observed. The crude mixture was evaporated and

purified by alumina column chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (98:2 to 96:4). Complex **4** was obtained as a yellow solid (51.5 mg, 50%).

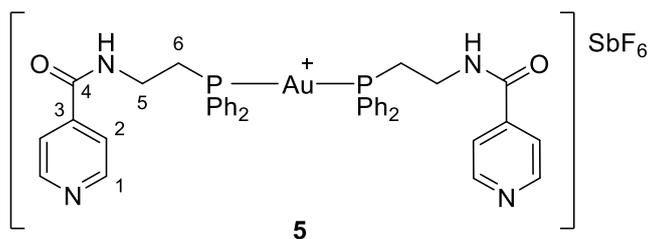
^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ 10.06 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H, NH), 9.19 (dd, $J = 5.5, 0.9$ Hz, 2H, H_6), 8.74 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_3), 8.30 (td, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 2H, H_4), 8.18 (m, 2H, H_7), 7.93 (m, 2H, H_8), 7.82 (ddd, $J = 7.8, 5.6, 0.9$ Hz, 2H, H_5), 7.75–7.68 (m, 4H, *o*-H, Ph), 7.35–7.28 (m, 6H, *m*-H + *p*-H, Ph), 3.76–3.65 (m, 2H, H_{11}), 3.08 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H). **^{31}P NMR (CDCl_3 , 162 MHz):** δ 34.5 (s, 1P). **^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3):** δ 195.5 (s, 2CO), 190.9 (s, CO), 162.8 (s, C_{10}), 155.8 (s, C_2), 152.9 (s, C_6), 151.8 (s, C_7), 143.8 (s, C_9), 141.9 (s, C_4), 133.4 (s, *o*-C, Ph), 131.5 (s, *p*-C, Ph), 129.9 (s, *ipso*-C, Ph), 129.3 (s, *m*-C, Ph), 129.2 (s, C_5), 126.4 (s, C_3), 125.3 (s, C_8), 37.0 (s, C_{11}), 27.6 (s, C_{12}). **IR (cm^{-1}):** 3054 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H})$, 2027, 1902 $\nu(\text{CO})$, 1660 $\nu(\text{N-C=O})$, 1602 $\nu(\text{C}\equiv\text{N})$, 1542 $\nu(\text{NH } \delta)$. **HRMS (m/z):** 761.1339 [M-Au]/2, $\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_4\text{PRe}$ (761.1323), 993.0698 [M-Au]/2 + AuCl, $\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{AuClN}_4\text{O}_4\text{PRe}$ (993.0668).



To a stirred solution of **2** (130.3 mg, 0.12 mmol) in DCM was added *fac*-[Re(CO)₃(bpy)OTf] (135.7 mg, 0.24 mmol) and the solution was stirred for 1 night. The crude mixture was evaporated and purified twice by alumina column chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99:1 to 96:4). Complex **4** was obtained as a yellow solid (35.7 mg, 18%).

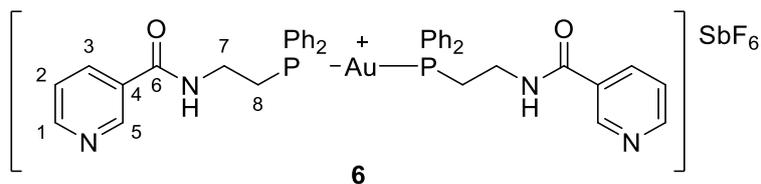
^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2) δ 9.89 (s, 1H, NH), 9.38 (s, 2H, H_6), 8.75 (s, 2H, H_3), 8.57–8.41 (m, 3H, $\text{H}_3 + \text{H}_7$), 8.30–8.12 (m, 3H, $\text{H}_4 + \text{H}_9$), 7.83–7.68 (m, 6H, $\text{H}_3 + o\text{-H}(\text{Ph})$), 7.35–7.27 (m, 6H, *m*-H + *p*-H), 7.23 (s, 1H, H_8), 3.91–3.74 (m, 2H, H_{13}), 3.22–3.03 (m, 2H, H_{14}). **^{31}P NMR (CD_2Cl_2 , 400 MHz):** δ 34.54 (s). **^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2)** δ 195.2 (s, 2CO), 190.9 (s, CO), 162.6 (s, C_{12}), 155.7 (s, C_2), 153.4 (s,

C_6), 153.0 (s, C_9), 151.6 (s, C_{11}), 141.7 (s, C_4), 138.9 (s, C_7), 133.4 (s, *o*-C, Ph), 132.0 (s, C_{10}), 131.6 (s, *ipso*-C, Ph), 129.4 (s, *m*-C, Ph), 129.2 (s, C_5), 126.4 (s, C_8), 125.8 (s, C_3), 37.2 (s, C_{13}), 27.7 (s, C_{14}). J_{P-C} not observed. **IR** (cm^{-1}): 3187 $\nu(\text{NH})$, 3049 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H})$, 2028, 1904 $\nu(\text{CO})$, 1659 $\nu(\text{N}-\text{C}=\text{O})$, 1603 $\nu(\text{C}=\text{N})$, 1538 $\nu(\text{NH } \delta)$. **HRMS** (m/z): 646.1067 $[\text{M}-(\text{Re}(\text{CO})_3(\text{bpy}))]^{2+}$, $\text{C}_{53}\text{H}_{46}\text{AuN}_6\text{O}_5\text{P}_2\text{Re}^{2+}$, 761.1325 $[\text{M}-\text{Au}]/2$, $\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_4\text{PRe}$ (761.1323), 993.0611 $[\text{M}-\text{Au}]/2 + \text{AuCl}$, $\text{C}_{33}\text{H}_{27}\text{AuClN}_4\text{O}_4\text{PRe}$ (993.0668).



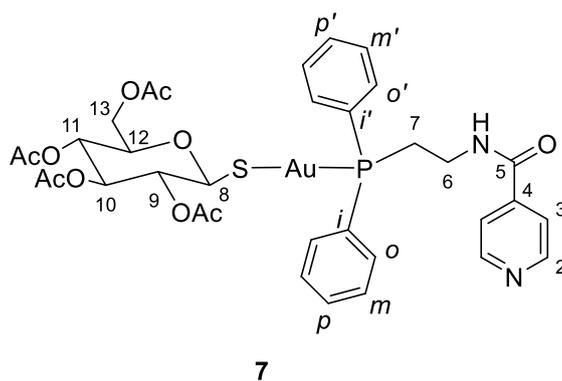
To a stirred solution of bis-2-(diphenylphosphino)ethylamine gold hexafluoroantimony (0.101 mmol) in DCM (20 mL) was added isonicotinoyl chloride hydrochloride (151.5 mg, 0.809 mmol) followed by Et_3N (1.214 mmol, 1.69 μL). The reaction was quenched after one night by the addition of a saturated aqueous solution of NaHCO_3 (30 mL). The organic layer was separated and washed again with NaHCO_3 (aq) (30 mL) and water (20 mL), dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtrated, and evaporated. The crude mixture was purified by alumina column chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97:3) as eluent. Compound **5** was obtained as a white solid (90.8 mg, 82%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.21 (s, 1H, NH), 8.61 (dd_{ap} , $J = 4.5, 1.6$ Hz, 2H, H_1), 7.73 (dd_{ap} , $J = 4.4, 1.6$ Hz, 2H, H_2), 7.68–7.60 (m, 4H, *o*-H, Ph), 7.41–7.30 (m, 6H, *m*-H + *p*-H, Ph), 3.93–3.77 (m, 2H, H_5), 3.11–2.98 (m, 2H, H_6). **^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3)** δ 32.39 (s_{br}). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 165.6 (s, C_4) 150.2 (s, C_1), 140.3 (s, C_3), 133.0 (d, $^3J_{P-C} = 13.0$ Hz, *m*-C, Ph) 131.5 (s, C_{10}), 130.4 (d, $^1J_{P-C} = 47.7$ Hz, *ipso*-C, Ph), 129.2 (d, $^4J_{P-C} = 9.8$ Hz, *p*-C, Ph), 121.4 (s, C_2), 36.9 (s, C_5), 27.9 (d, $^2J_{P-C} = 28.0$ Hz, *o*-C, Ph). **IR** (cm^{-1}): 3222 $\nu(\text{NH})$, 3043 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H})$, 1660 $\nu(\text{N}-\text{C}=\text{O})$, 1529 $\nu(\text{NH } \delta)$. **HRMS** (m/z): 865.2123 $[\text{M}-\text{SbF}_6]$, $\text{C}_{40}\text{H}_{38}\text{AuN}_4\text{O}_2\text{P}_2$ (865.2130).



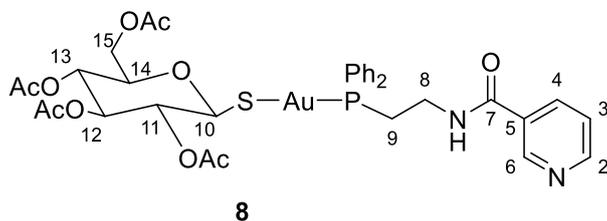
Compound **6** was synthesized following the procedure described for compound **5** using nicotinoyl chloride hydrochloride (38.9 mg, 0.212 mmol) instead of isonicotinoyl chloride. Starting from a solution of bis-2-(diphenylphosphino)ethylamine gold hexafluoroantimony (0.026 mmol) in DCM (3 mL), compound **6** was obtained as a white solid (15.5 mg, 54%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.45 (s_{br}, 1H, NH), 9.05 (dd, *J* = 2.3, 0.7 Hz, 1H, H₅), 8.58 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H, H₁), 8.19 (ddd, *J* = 7.9, 2.3, 1.7 Hz, 1H, H₃), 7.72 (d, *J* = 6.2 Hz, 4H, *o*-H, Ph), 7.41–7.31 (m, 6H, *m*-H + *p*-H, Ph), 7.22 (ddd, *J* = 7.9, 4.8, 0.9 Hz, 1H, H₂), 3.83 (s_{br}, 2H, H₇), 3.13 (t_{ap}, *J* = 6.0 Hz, 2H, H₈). **³¹P NMR (162 MHz, CD₂Cl₂)** δ 36.17. **¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃)** δ 166.1 (s, C₆), 151.9 (s, C₅), 149.6 (s, C₁), 135.3 (s, C₃), 133.3 (s, *o*-C, Ph), 131.7 (s, *p*-C, Ph), 130.0 (s, *ipso*-C, Ph), 129.4 (s, *m*-C, Ph), 129.1 (s, C₄), 123.0 (s, C₂), 36.7 (s, C₇), 28.1 (s, C₈). **IR (cm⁻¹):** 3220 ν(NH), 3050 ν(C_{Ar}-H), 1646 ν(N-C=O), 1590 ν(C=N), 1534 ν(NH δ). **HRMS (m/z):** 865.2208 [M-SbF₆], C₄₀H₃₈AuN₄O₂P₂ (865.2130).



To a stirred solution of **1** (1eq, 25 mg, 0.044 mmol) and β-D-thioglucose tetraacetate sodium salt (1 eq, 16.6 mg, 0.044 mmol) in DCM (5 mL) was added K₂CO₃ in excess. After 1 night at r.t. the suspension was filtered, and concentrated to afford compound **7** as a white powder (35.8 mg, 91%).

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂) δ 8.58 (dd, *J* = 4.4, 1.7 Hz, 2H, H₂), 7.87 – 7.76 (m, 2H, *o*-H, Ph), 7.75 – 7.63 (m, 3H, NH + *o*-H, Ph'), 7.49 – 7.35 (m, 10H, *m*-H + *p*-H(Ph + Ph') + H₃), 5.27 – 5.10 (m, 4H, H₈ + H₉ + H₁₀ + H₁₁), 4.23 – 4.08 (m, 2H, H₁₃), 3.96 – 3.74 (m, 3H, H₆ + H₁₂), 3.26 – 3.10 (m, 1H, H₇), 2.90 – 2.74 (m, 1H, H_{7'}), 2.06 (s, 3H, CH₃OAc), 2.03 (s, 3H, CH₃OAc), 1.93 (s, 3H, CH₃OAc), 1.90 (s, 3H, CH₃OAc). **³¹P NMR (121 MHz, CD₂Cl₂)** δ 32.42 (s). **¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂)** δ 171.45 (s, CO_{Ac}), 171.06 (s, CO_{Ac}), 170.41 (s, CO_{Ac}), 170.19 (s, CO_{Ac}), 166.13 (s, C₅), 150.70 (s, 2C, C₂), 141.14 (s, C₄), 133.81 (d, ²*J*_{P-C} = 31.5 Hz, *o*-C, Ph), 133.63 (d, ²*J*_{P-C} = 31.5 Hz, *o*-C, Ph'), 132.31 (d, ⁴*J*_{P-C} = 2.2 Hz, *p*-C, Ph), 132.11 (d, ⁴*J*_{P-C} = 2.2 Hz, *p*-C, Ph'), 131.03 (d, ¹*J*_{P-C} = 54.9 Hz, *ipso*-C, Ph), 130.83 (d, ¹*J*_{P-C} = 54.9 Hz, *ipso*-C, Ph'), 129.87 (d, ³*J*_{P-C} = 10.9 Hz, *m*-C, Ph), 129.73 (d, ³*J*_{P-C} = 10.9 Hz, *m*-C, Ph') 121.36 (s, 2C, C₃), 84.14 (s, C₈ or C₉ or C₁₀ or C₁₁), 79.14 (s, C₈ or C₉ or C₁₀ or C₁₁), 76.39 (s, C₁₂), 74.42 (s, C₈ or C₉ or C₁₀ or C₁₁), 69.45 (s, C₈ or C₉ or C₁₀ or C₁₁), 63.33 (s, C₁₃), 38.24 (d, ²*J*_{P-C} = 3.8 Hz, C₆), 27.99 (d, ¹*J*_{P-C} = 35.1 Hz, C₇), 21.66 (s, CH₃OAc), 21.14 (s, CH₃OAc), 21.07 (s, CH₃OAc), 21.04 (s, CH₃OAc). **IR (cm⁻¹):** 3220 ν(NH), 3050 ν(C_{Ar}-H), 1743 ν(O-C=O), 1646 ν(N-C=O), 1528 ν(NH δ). **HRMS (m/z):** 917.1561 [M+Na]⁺, C₃₄H₃₈AuN₂NaO₁₀PS (917.1548).



Compound **8** was synthesized following procedure described for compound **7**. Compound **2** (1 eq, 85.3 mg, 0.15 mmol), β-D-thioglucose tetraacetate sodium salt (1 eq, 56.5 mg, 0.15 mmol) and K₂CO₃ in excess were reacted in DCM (3 mL) to afford compound **8** (127 mg, 95 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂) δ 8.75 (dd, *J* = 2.3, 0.7 Hz, 1H, H₆), 8.61 (dd, *J* = 4.8, 1.7 Hz, 1H, H₂), 7.87 (ddd, *J* = 8.0, 2.2, 1.8 Hz, 1H, H₄), 7.85 – 7.78 (m, 2H, *o*-H, Ph), 7.74 – 7.66 (m, 2H, *o*-H, Ph'), 7.61 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, NH), 7.48 – 7.36 (m, 6H, *m*-H + *p*-H), 7.25 (ddd, *J* = 8.0, 4.8, 0.8 Hz, 1H, H₃), 5.26 – 5.07 (m, 4H, H₁₀ + H₁₁ + H₁₂ + H₁₃), 4.19 – 4.11 (m, 2H, H₁₅), 3.94 – 3.82 (m, 2H, H₈), 3.82 – 3.76 (m, 1H, H₁₂), 3.23 – 3.09 (m, 1H, H₉), 2.90 – 2.79 (m, 1H, H_{9'}), 2.06 (s, 3H, CH₃OAc), 2.01 (s, 3H, CH₃OAc), 1.93 (s, 3H, CH₃OAc), 1.93 (s, 2H, CH₃OAc). **³¹P NMR (121 MHz, CD₂Cl₂)** δ 32.30 (s).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_2Cl_2) δ 171.35 (s, CO_{Ac}), 171.11 (s, CO_{Ac}), 170.56 (s, CO_{Ac}), 170.18 (s, CO_{Ac}), 166.32 (s, C_7), 152.57 (s, C_2), 148.93 (s, C_6), 135.10 (s, C_4), 133.82 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 36.8$ Hz, *o*-C, Ph), 133.69 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 36.6$ Hz, *o*-C, Ph'), 132.21 (d, $^4J_{\text{P-C}} = 2.4$ Hz, *p*-C, Ph'), 132.05 (d, $^4J_{\text{P-C}} = 2.5$ Hz, *p*-C, Ph'), 131.20 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 54.2$ Hz, *ipso*-C, Ph), 131.01 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 54.2$ Hz, *ipso*-C, Ph'), 129.84 (d, $^3J_{\text{P-C}} = 11.7$ Hz, *m*-C, Ph), 129.83 (s, C_5), 129.72 (d, $^3J_{\text{P-C}} = 11.5$ Hz, *m*-C, Ph'), 84.13 (s, C_{10} or C_{11} or C_{12} or C_{13}), 79.04 (s, C_{10} or C_{11} or C_{12} or C_{13}), 76.41 (s, C_{10} or C_{11} or C_{12} or C_{13}), 74.49 (s, C_{10} or C_{11} or C_{12} or C_{13}), 68.77, (s, C_{10} or C_{11} or C_{12} or C_{13}), 63.34 (s, C_{15}), 38.15 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 4.4$ Hz, C_8), 28.21 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 34.4$ Hz, C_9), 21.66 (s, $\text{CH}_{3\text{OAc}}$), 21.13 (s, $\text{CH}_{3\text{OAc}}$), 21.05 (s, $\text{CH}_{3\text{OAc}}$), 21.04 (s, $\text{CH}_{3\text{OAc}}$). **IR** (cm^{-1}): 3377 $\nu(\text{NH})$, 3050 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H})$, 1743 $\nu(\text{O}-\text{C}=\text{O})$, 1660 $\nu(\text{N}-\text{C}=\text{O})$, 1531 $\nu(\text{NH } \delta)$. **HRMS** (m/z): 917.1532 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{AuN}_2\text{NaO}_{10}\text{PS}$ (917.1548).

2.9.5 References

- ¹ V. Fernández-Moreira, I. Marzo, M. C. Gimeno, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 4434 – 4446.
- ² S. R. Stoyanov, J. M. Villegas, A. J. Cruz, L. L. Lockyear, J. H. Reibenspies, D. P. Rillema, *J. Chem. Theory Comput.*, **2005**, *1*, 95 – 106.
- ³ J. R. Schoonover, C. A. Bignozzi, T. J. Meyer, *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, *165*, 239 – 266.
- ⁴ M. Raducan, C. Rodriguez-Esrich, X. C. Cambeiro, E. C. Escudero-Adán, M. A. Pericàs, A. M. Echavarren, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 4893 – 4895.
- ⁵ J. K. Hino, L. D. Ciana, W. J. Dressick, B. P. Sullivan, *Inorg. Chem.*, **1992**, *31*, 1072 – 1080.
- ⁶ V. Fernández-Moreira, H. Sastre-Martín, *Inorg. Chim. Acta*, **2017**, *460*, 127 – 133.
- ⁷ R. A. Kirgan, B. P. Sullivan, D. P. Rillema, en *Topics in Current Chemistry*, eds. B. Balzani, S. Campagna, Springer, Heidelberg, 2007, cap. 2, 45 – 100.
- ⁸ M. Wrighton, D. L. Morse, *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96*, 998 – 1003.
- ⁹ T. Mossmann, *J. Immunol. Methods*, **1985**, *65*, 55 – 63.
- ¹⁰ F. Denizot, R. Lang, *J. Immunol. Methods*, **1986**, *89*, 271 – 277.
- ¹¹ Es la absorbancia por unidad de distancia. El cociente entre densidades ópticas es igual en este caso al cociente entre absorbancias.
- ¹² E. Hatem, S. Azzi, N. El Banna, T. He, A. Héneman-Masurel, L. Vernis, D. Baille, V. Masson, F. Dingli, D. Loew, B. Azzarone, P. Eid, G. Baldacci, M. Er-Huang, *J. Natl. Cancer Inst.*, **2019**, *111*, 1 – 12.
- ¹³ V. Fernández-Moreira, I. Marzo, M. C. Gimeno *Chem. Sci.*, **2014**, *5*, 4434 – 4446.
- ¹⁴ N. Schmidt, A. Mishra, G. H. Lai, G. C. L. Wong, *FEBS Lett.*, **2010**, *584*, 1806 – 1813.
- ¹⁵ M. Wenzel, B. Bertrand, M.-J. Eymin, V. Comte, J. A. Harvey, P. Richard, M. Groessl, O. Zava, H. Amrouche, P. D. Harvey, P. Le Gendre, M. Picquet, A. Casini, *Inorg. Chem.*, **2011**, *50*, 9472 – 9480.
- ¹⁶ P. D. Ray, B.-W. Huang, Y. Tsuji, *Cell Signal.*, **2012**, *24*, 981 – 990.
- ¹⁷ I. Mármol, M. Virumbrales-Muñoz, J. Quero, C. Sánchez-de-Diego, L. Fernández, I. Ochoa, E. Cerrada, M. J. R. Yoldi, *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, *176*, 123 – 133.
- ¹⁸ S. C. Silverstein, R. M. Steinman, Z. A. Cohn, *Ann. Rev. Biochem.*, **1977**, *46*, 669 – 722.

¹⁹ A. S. Humphreys, A. Filipovska, S. J. Berners-Price, G. A. Koutsantonis, B. W. Skelton, A. H. White, *Dalton Trans.*, **2007**, 43, 4943 – 4950.

²⁰ S. J. Berners-Price, C. K. Mirabelli, R. K. Johnson, M. R. Mattern, F. L. McCabe, L. F. Faucette, C. M. Sung, S. M. Mong, P. J. Sadler, S. T. Crooke, *Cancer Res.*, **1986**, 46, 5486 – 5493.

²¹ M. Sirajuddin, S. Ali, A. Badshah, *J. Photochem. Photobiol B.*, **2013**, 124, 1 – 19.

²² a) R. Usón, A. Laguna, M. Laguna, D. A. Briggs, H. H. Murray, J. P. Fackler Jr. in *Inorganic Syntheses*, ed. H. D. Kaesz, 1989, 85 – 90. b) G. Brauer, *Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1978, p. 1014.

Capítulo 3
Complejos de renio con carbenos
NHC y oro conectados a través
del ligando axial

Capítulo 3

3.1 Objetivos

El principal objetivo de este capítulo es ampliar el espectro de los complejos teragnósticos basados en renio y oro sustituyendo el ligando diimina del plano ecuatorial (N^N) por uno de tipo piridina-carbeno NHC (C^N). Conocidos pocos ejemplos de complejos luminiscentes de renio(I) conectados a carbenos NHC, se plantea además el estudio de la influencia del ligando axial sobre las propiedades luminiscentes. La naturaleza del ligando axial será de tipo piridina, imidazol o fosfina, con diferentes sustituyentes (figura 3.1). Adicionalmente, se pretende evaluar el potencial de estos complejos para la terapia fotodinámica.

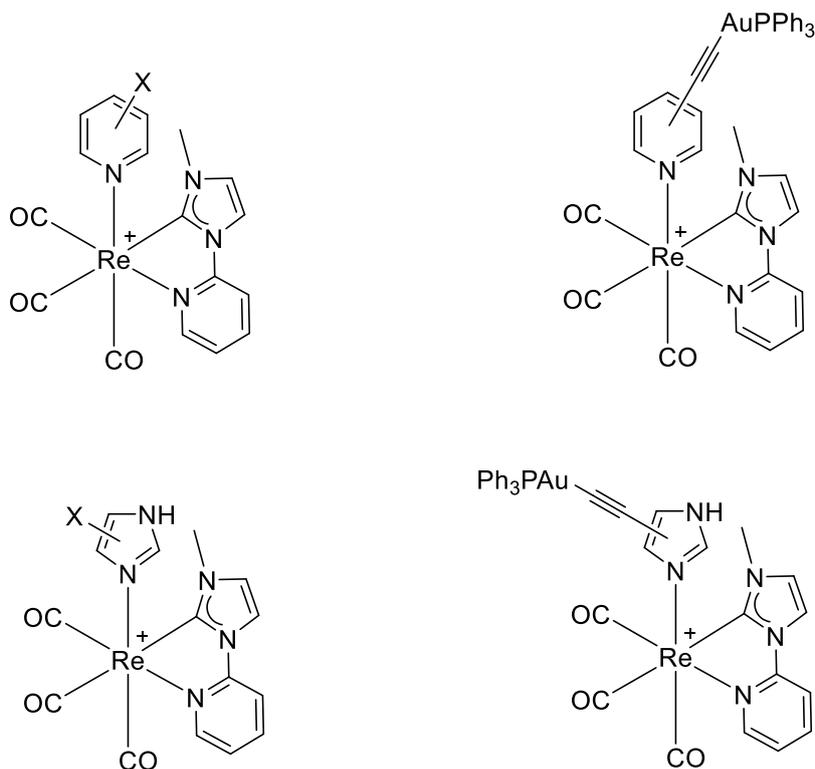


Figura 3.1 Compuestos a sintetizar en el capítulo.

3.2 Introducción

Los complejos de renio unidos a carbenos NHC son menos frecuentes frente a otros metales de transición como rodio, rutenio o iridio, y están centrados fundamentalmente

en catálisis, a destacar reacciones de transferencia de hidrógeno (hidrogenación de alquenos, dehidroacoplamiento (figura 3.2, (a)),¹ reducción de CO₂,² inserción de alquinos en beta ceto-ésteres (figura 3.2, (b y c)).³

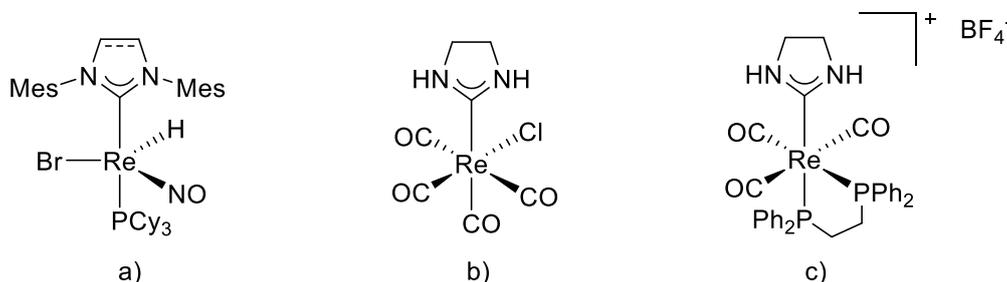


Figura 3.2 Ejemplos de catalizadores basados en carbenos de renio(I).

Son contados los ejemplos de complejos de renio(I) unidos a carbenos NHC que posean propiedades luminiscentes. La mayoría conservan el esqueleto *fac*-[Re(bpy/phen)(CO)₃Cl] y el ligando carbeno se enlaza en posición axial por lo que no es el principal responsable de la luminiscencia. Otros autores como Zheng⁴ y Brown⁵ han sintetizado complejos de renio unidos a un ligando quelato compuesto por una piridina y un carbeno NHC en sustitución al ligando diimina habitual. Al igual que ocurre con los complejos de renio enlazados a una bipyridina, el LUMO está centrado en ese ligando ecuatorial. El carbeno NHC es peor π aceptor que el ciclo de piridina (o mayor sigma dador, por lo que desdobra más el gap entre orbitales del metal y orbitales antienlazantes debido al ligando), provocando un aumento de la energía del LUMO, y en consecuencia la emisión aparece a longitudes de onda inusualmente bajas respecto al caso de los complejos unidos a diiminas (figura 3. 3).⁶

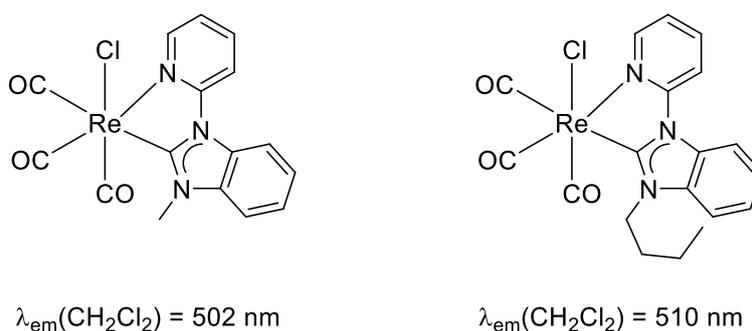


Figura 3.3 Complejos de renio unidos a carbenos NHC con su máximo de emisión.

3.2.1 Complejos de renio en terapia fotodinámica

La terapia fotodinámica⁷ necesita de agentes que sean capaces de liberar o generar *in situ* de manera controlada la molécula bioactiva en la que se basa la acción terapéutica.⁸

No es de extrañar que aquellas moléculas cuyo estado excitado cuenta con tiempos de vida elevados sean las más apreciadas para este cometido, y entre ellas se encuentran los complejos de renio(I) por su marcado carácter fosforescente. Además, la posibilidad de localizar el complejo de renio gracias a su luminiscencia, que es inocuo hasta su excitación prolongada, permite afinar en términos de selectividad frente a tejidos sanos. Los ejemplos que conciernen al renio están fundamentados en complejos luminiscentes en donde el renio se enlaza a un ligando bisimina en posición ecuatorial. La principal vía de acción de estos complejos corresponde a la generación de especies reactivas de oxígeno por medio del estado singlete del oxígeno (figura 3.4, ejemplos a, b y c).⁹ Sin embargo, recientemente, se han publicado trabajos en donde la acción terapéutica se ejerce por liberación de CO (figura 3.4, ejemplos d y e).¹⁰ En estos últimos casos la presencia de un ligando fuertemente σ -dador parece ser el causante de la liberación de la molécula de monóxido de carbono que se encuentra en posición *trans* cuando se alcanza el estado excitado.

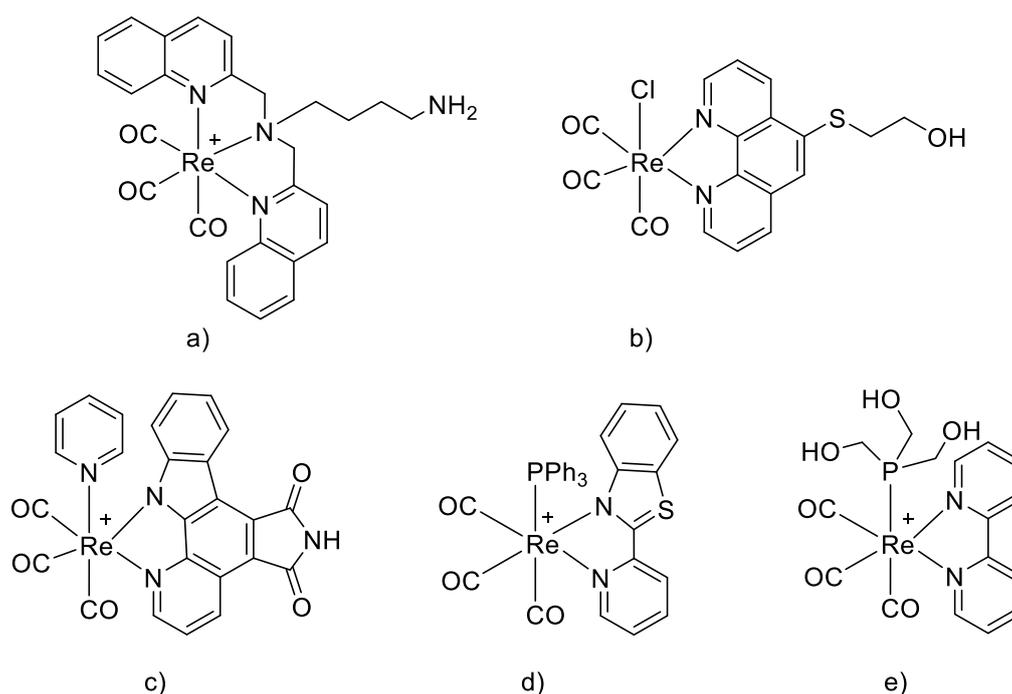


Figura 3.4 Ejemplos de complejos de renio para terapia fotodinámica por liberación de CO (a) y (b) o por generación de $^1\text{O}_2$ (c), d) y e)).

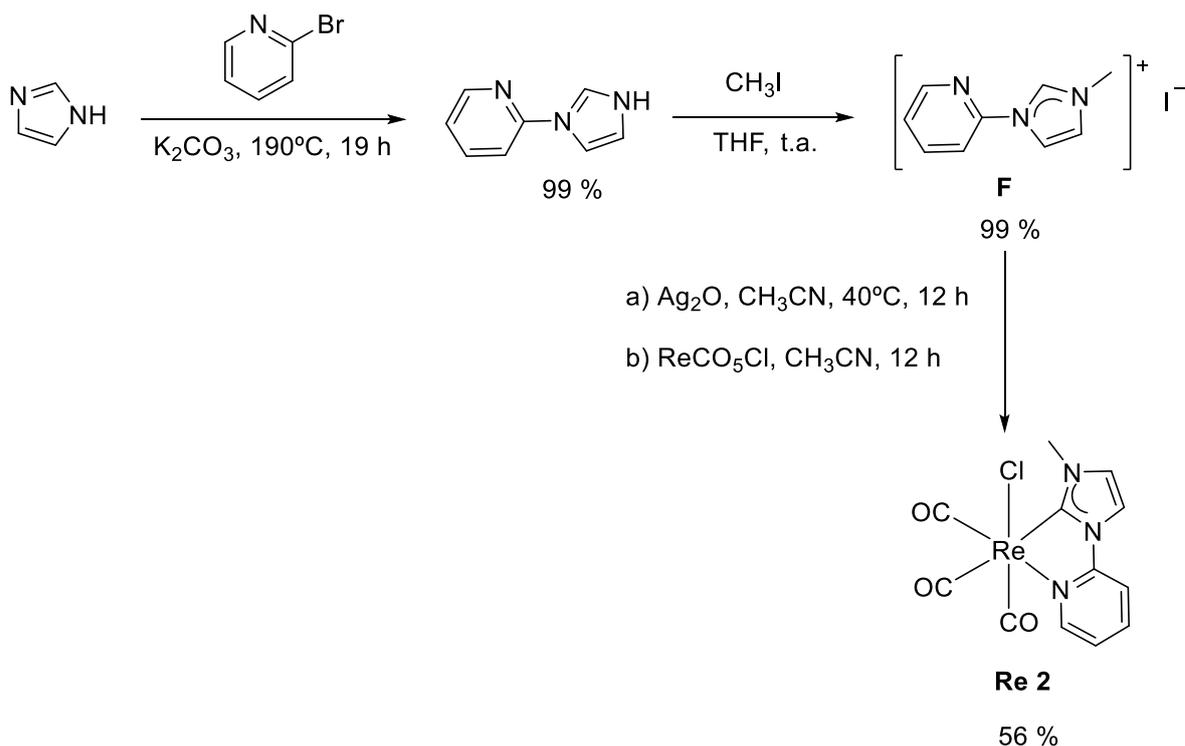
En lo que refiere a los complejos de renio unidos a carbenos NHC, no existen estudios sobre su potencial uso como agentes en terapia fotodinámica. Sin embargo, las investigaciones acerca de sus propiedades fotofísicas han revelado su tendencia a liberar la molécula en posición *trans* al carbeno por un mecanismo en donde estaría implicado

el disolvente.¹¹ Se espera por tanto observar este comportamiento en los compuestos que se sintetizarán en este capítulo.

3.3 Síntesis del complejo de renio precursor

Hasta el momento de la realización de esta tesis doctoral, los ejemplos de complejos de renio unidos a carbenos NHC bidentados en sustitución a un ligando bisimina se basan en modificaciones en el esqueleto quelato. Mientras que se ha puesto el foco sobre su potencial uso como catalizadores, la aplicación como agentes de imagen celular o para su uso como terapia es bastante reducida. La sustitución del halogenuro en posición axial por un ligando neutro abre la puerta a mejorar las propiedades para este cometido, pues empíricamente se ha demostrado que los mejores agentes de imagen celular se corresponden con complejos catiónicos.¹² Además, las derivatizaciones del ligando axial permiten obtener distintos patrones de bioacumulación respondiendo a su lipofilidad,¹³ o abren la puerta a la detección de biomoléculas como por ejemplo enzimas.¹⁴ Por último, la funcionalización de piridinas o imidazoles resulta mucho más sencilla que las modificaciones en el esqueleto bidentado, que a veces no pueden efectuarse por simple sustitución y obligan a sintetizar el imidazol a través de sintones que contienen el grupo funcional deseado.

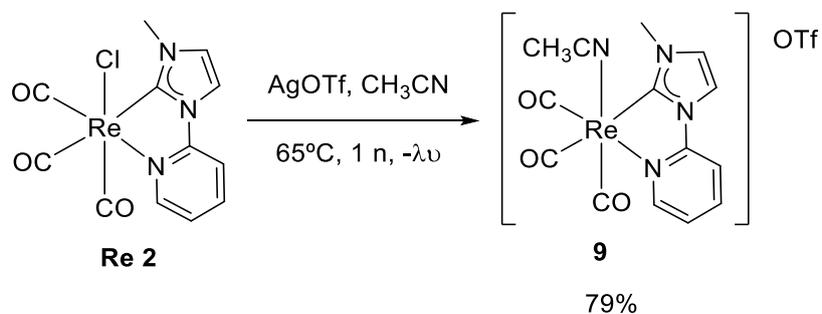
Como compuesto precursor de renio se escogió aquel cuyo esqueleto bidentado se compone por un imidazol sustituido por una piridina y un metilo. Esta elección se basa en la relativa facilidad de síntesis del complejo frente a otros derivados, y a la voluntad de evaluar de la manera más clara posible la influencia del ligando axial sobre el complejo. La obtención del complejo precursor de Re(I) se llevó a cabo siguiendo la ruta sintética que se muestra en el esquema 3.1. En primer lugar, se procedió a la arilación del imidazol con 2-bromopiridina. La reacción procede a 190 °C, temperatura a la cual el imidazol es líquido y permite evitar el uso de disolvente. La posterior alquilación con ioduro de metilo procede de manera suave en un día permitiendo obtener la sal de imidazolio precursora **F**. A continuación se formó el carbeno de plata por reacción con Ag₂O, y se produjo la transmetalación al renio sin aislar el intermedio de plata, obteniendo así **Re2** con un rendimiento de 56 %.



Esquema 3.1 Síntesis del precursor de renio Re 2.¹⁵

3.4 Síntesis del complejo activado de renio

El enlace carbeno-renio no es compatible con condiciones excesivamente ácidas. Es por ello que el empleo de ácido triflico para sustituir el cloruro por un ión triflato no es posible. La alternativa cuando esta vía de activación está descartada es el empleo de una sal de plata como abstractor de cloruros. Como disolvente se emplea acetonitrilo por ser compatible con todos los reactivos y por su fácil desplazamiento frente a otros ligandos más coordinantes como la piridina. La reacción procede en ausencia de luz para evitar la descomposición de la sal de plata y se completa en una noche con calentamiento suave (esquema 3.2).



Esquema 3.2 Síntesis del complejo activado de renio 9.

Los complejos sintetizados en este capítulo han sido caracterizados por espectroscopia RMN de protón, carbono (y fósforo cuando fuera posible), así como por espectroscopia de infrarrojo, ultravioleta visible y masas de alta resolución. En concreto, la formación del producto deseado **9** se puede confirmar fácilmente por ^1H -RMN al aparecer la señal correspondiente al metilo del acetonitrilo a 2.08 ppm. La presencia de una única señal confirma la conversión total del producto de partida (figura 3.5).

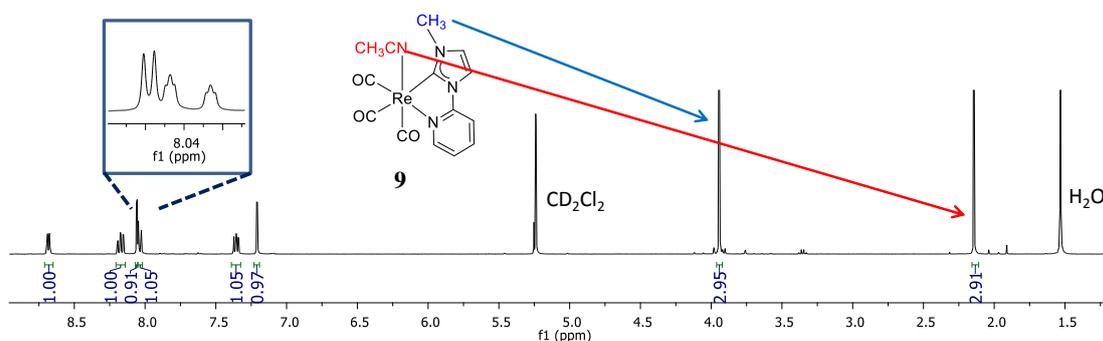


Figura 3.5 Espectro ^1H -RMN del compuesto **9**.

Adicionalmente, se obtuvieron cristales adecuados para su análisis por difracción de rayos X (ver figura 3.6). La unidad asimétrica está compuesta por una sola molécula que cristaliza en el grupo espacial Pn , acéntrico. En la celdilla se encuentran los dos enantiómeros. La estructura por rayos X permite confirmar que el complejo tiene una geometría octaédrica, ligeramente distorsionada, en donde los tres carbonilos se encuentran en disposición facial, con el ligando quelato conteniendo el carbeno NHC en el plano ecuatorial. La distancia $\text{Re}-\text{C}_{\text{carbeno}}$ es 2.125(5) Å y concuerda con los valores ya descritos para compuestos similares.⁴ La distancia de enlace entre el átomo de renio y el carbono del carbonilo que se encuentra en posición *trans* al carbeno (1.972(6) Å) es netamente superior a la distancia entre el renio y los otros dos carbonilos (1.910 Å aproximadamente) como prueba empírica del efecto *trans*. La distancia encontrada entre el carbono *sp* y el nitrógeno del ligando acetonitrilo presenta un valor muy similar al valor medio publicado en la bibliografía,¹⁶ sugiriendo que el ligando apenas se ve afectado por la coordinación al metal. Por último, el ángulo de mordedura del quelato (74.6(2)°), presenta un valor similar al que se observa para los análogos conteniendo bipyridinas¹⁷ o fenantrolinas¹⁸ como ligando quelato.

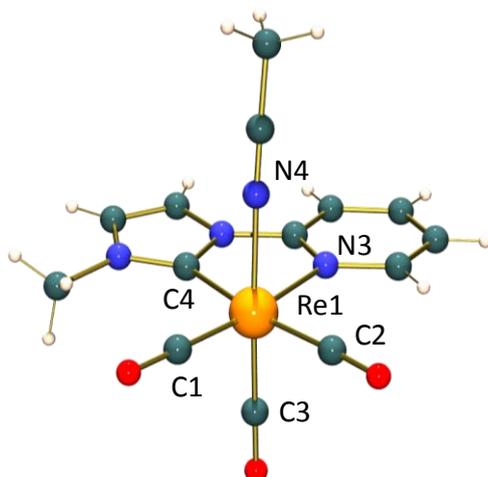
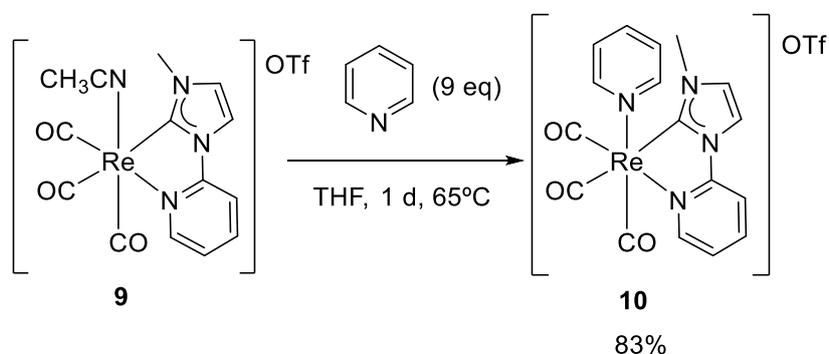


Figura 3. 6 Estructura del catión del complejo 9.

3.5 Síntesis de complejos con derivados de piridina

El ligando acetonitrilo es lábil pero no se desplaza por otros ligandos si actúa como disolvente por su elevadísima concentración. Según se vio en el capítulo anterior, la presencia de cloruros en el medio debe evitarse para no retornar al complejo que está unido a un cloruro en posición axial. En consecuencia se escogió THF como disolvente para las siguientes reacciones de sustitución. Como primer intento de funcionalización en axial se apostó por la sencillez del ligando piridina. Las reacciones en este tipo de complejos de renio, metales d^6 octaédricos de bajo espín, proceden lentamente. Por ello se emplearon condiciones para acelerar la sustitución: la temperatura se mantuvo a 65 °C sabiendo que el producto de partida **9** no se descomponía, y un exceso de ligando fijado en 9 equivalentes (esquema 3.3).



Esquema 3.3 Síntesis del complejo 10.

La reacción procede con una conversión elevada y **10** puede ser purificado por recristalización en diclorometano/éter, validando la estrategia de síntesis a partir del complejo precursor **9**. Además, se obtuvieron cristales adecuados para su estudio por difracción de rayos X (ver figura 3.7). El complejo **10** cristaliza en el sistema monoclinico $P2_1/c$ cuya celdilla unidad está compuesta por 4 moléculas en donde se encuentran ambos enantiómeros y con una molécula por unidad asimétrica. Las distancias de enlace y ángulos más característicos se encuentran recogidos en la tabla 3.1 del apartado 3.9.

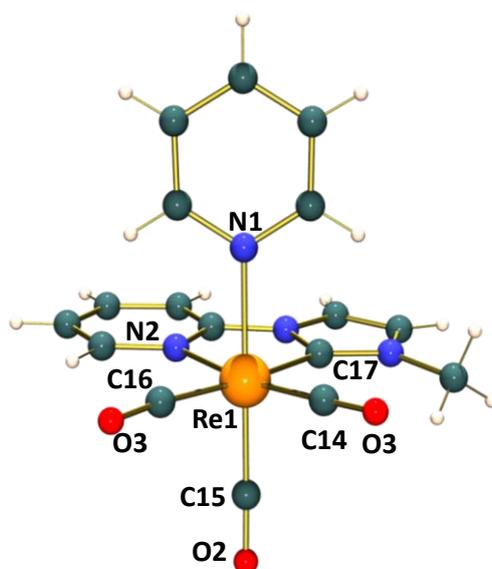
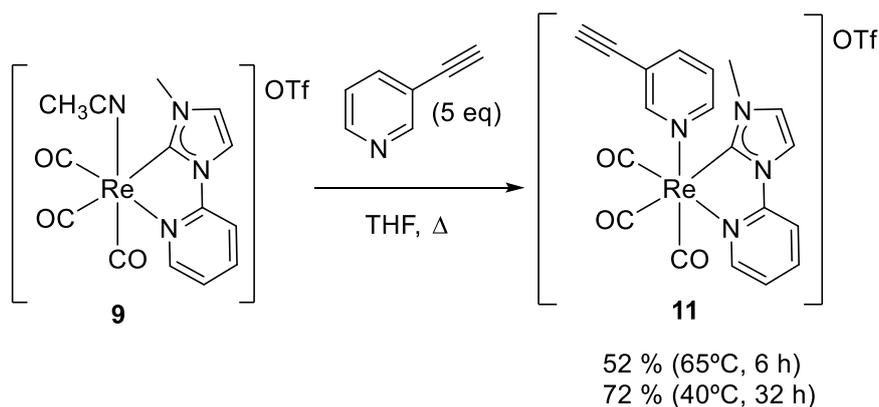


Figura 3.7 Estructura del catión del complejo **10**.

La conjugación de un grupo alquino con la piridina puede afectar al HOMO y LUMO del complejo metálico resultante y modificar sus propiedades luminiscentes. Reproduciendo las condiciones fijadas en la reacción con la piridina, la sustitución del acetonitrilo por la 3-etinilpiridina condujo al producto deseado **11** con un 55 % de rendimiento. Al constatar la notable bajada de rendimiento, se repitió la reacción a temperatura ambiente y a 40 °C. Se observó que mientras que tras 1 día de reacción a temperatura ambiente no había cambio aparente, sí que había evolución en ese tiempo para la reacción a 40 °C. Finalmente se completó tras 32 horas de reacción y el producto deseado **11** se obtuvo con un 72 % de rendimiento quedando así optimizada la temperatura de reacción para la coordinación de alquini-piridinas (esquema 3.4).



Esquema 3.4 Optimización de la temperatura mediante la síntesis de **11**.

En este caso también se obtuvieron cristales adecuados para su estudio por difracción de rayos X (ver figura 3.8). El compuesto **11** cristaliza en el sistema monoclinico $P2_1/n$ cuya celdilla unidad está compuesta por 4 moléculas en donde se encuentran ambos enantiómeros y con una molécula por unidad asimétrica. Las distancias de enlace y ángulos más característicos se encuentran recogidos en la tabla 3.1 del apartado 3.9.

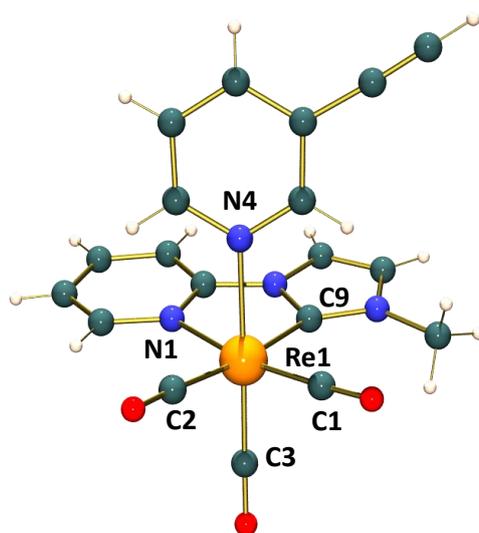
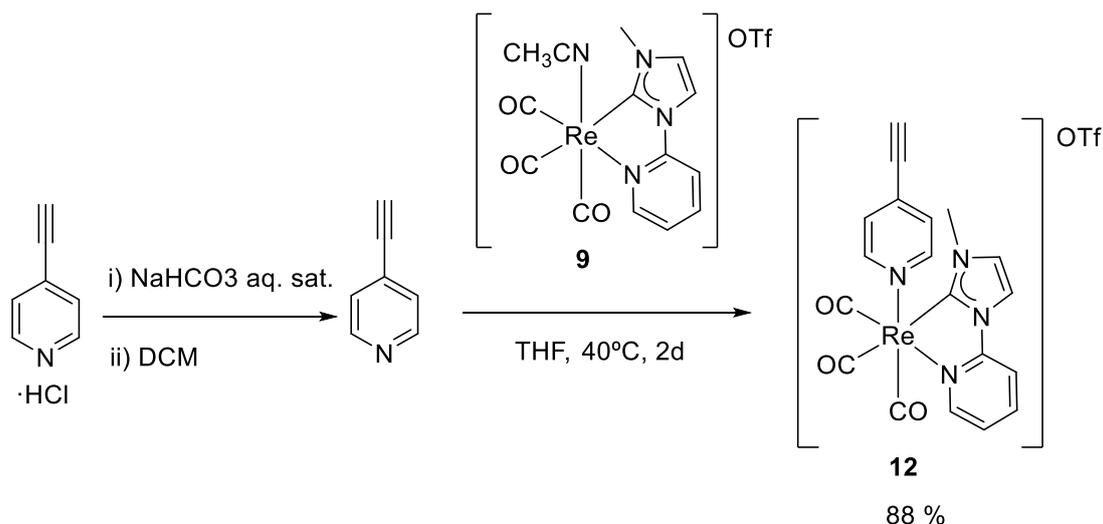
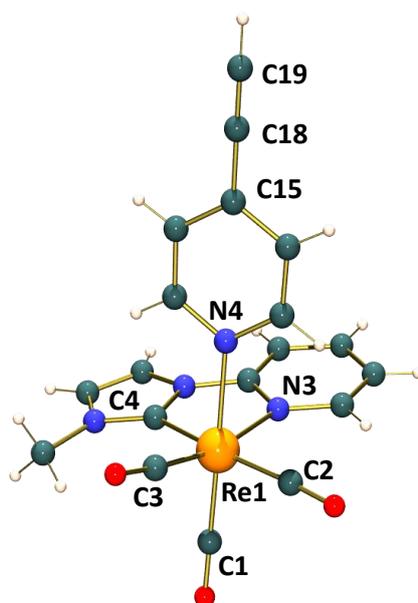


Figura 3.8 Estructura correspondiente al catión del complejo **11**.

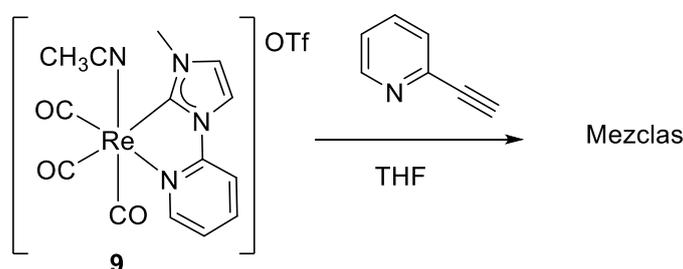
La reacción con la 4-etinilpiridina procede de manera análoga, pero necesita de un etapa previa de neutralización del HCl que acompaña al ligando. El hidrocloreuro de 4-etinilpiridina, se disolvió en una disolución acuosa saturada en NaHCO_3 y se extrajo con DCM. Tras secado y evaporación de la fase orgánica se obtiene el derivado de piridina que se hizo reaccionar en THF con el complejo activado de renio **9** (esquema 3.5).

Esquema 3.5 Síntesis de **12**.

Se obtuvieron cristales adecuados para su estudio por difracción de rayos X (ver figura 3.9). El compuesto **12** cristaliza en el sistema monoclinico $P2_1/n$ cuya celdilla unidad está compuesta por 8 moléculas en donde se encuentran ambos enantiómeros y con dos moléculas por unidad asimétrica. Cabe resaltar la geometría de octaedro distorsionado, por desviación del plano del ciclo de piridina perteneciente al ligando quelato ($\text{C}(1)\text{-Re}(1)\text{-N}(3) = 99.4(2)^\circ$), así como del ligando carbonilo en *trans* a dicho ciclo ($\text{C}(1)\text{-Re}(1)\text{-C}(3) = 91.1(2)^\circ$). Las distancias de enlace y ángulos más característicos se encuentran recogidos en la tabla 3.1 del apartado 3.9.

Figura 3.9 Estructura del catión del complejo **12**.

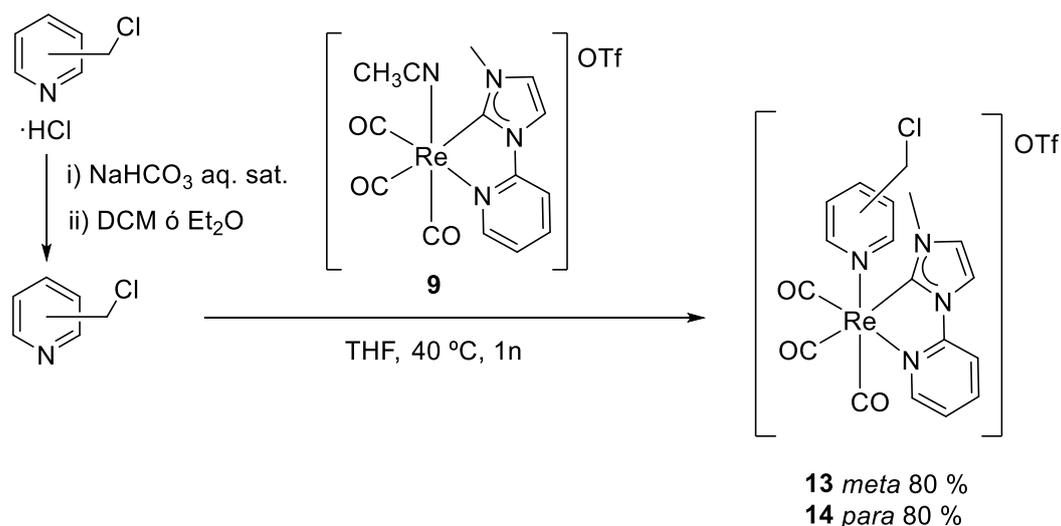
Mientras que la reacción con la etinilpiridina sustituida en *para* o *meta* (productos **11** y **12**) procede de manera similar a la descrita para la piridina (producto **10**), la coordinación del ligando 2-etinilpiridina no fue posible: aunque se observó desaparición del producto de partida por RMN, la recristalización no condujo a un producto puro. La purificación por cromatografía en columna de alúmina no permitió la obtención de un compuesto puro descartando su síntesis. Al igual que se había observado para las piridinas que ocupaban la posición axial en los complejos del capítulo 1, aquellas que están sustituidas en posición *orto* ejercen demasiado impedimento estérico como para coordinarse total o parcialmente con el centro de Re(I) (esquema 3.6).



Esquema 3.6 Síntesis fallida de derivados sustituidos en *orto*.

El grupo clorometilo ha sido empleado en complejos de renio como grupo director hacia las mitocondrias. Se cree que los grupos tiolato presentes en ciertas enzimas de las mitocondrias reaccionan con el grupo clorometilo atrapando la molécula a la que está unido favoreciendo su acumulación en dicho orgánulo.¹⁹

La síntesis de ambos derivados de renio conteniendo *para*- o *meta*-clorometilpiridina como ligando axial (**13**, **14**) procede de manera análoga a como se ha expuesto para el derivado de 4-etinilpiridina: tras la neutralización del HCl que acompaña al ligando pirídínico, la coordinación al centro metálico tiene lugar en una noche a 40 °C en THF (esquema 3.7).



Esquema 3.7 Síntesis de los derivados **13** y **14** con 3- y 4- clorometilpiridina, respectivamente.

Se obtuvieron cristales adecuados para su estudio por difracción de rayos X (ver figura 3.10). Ambos complejos cristalizan en el sistema triclínico P-1 cuya celdilla unidad está compuesta por dos moléculas en donde se encuentran ambos enantiómeros y con una molécula por unidad asimétrica. El átomo de azufre del ión triflato aparece desordenado, impidiendo un refinamiento correcto de la estructura, por lo que no se comentan las distancias de enlace.

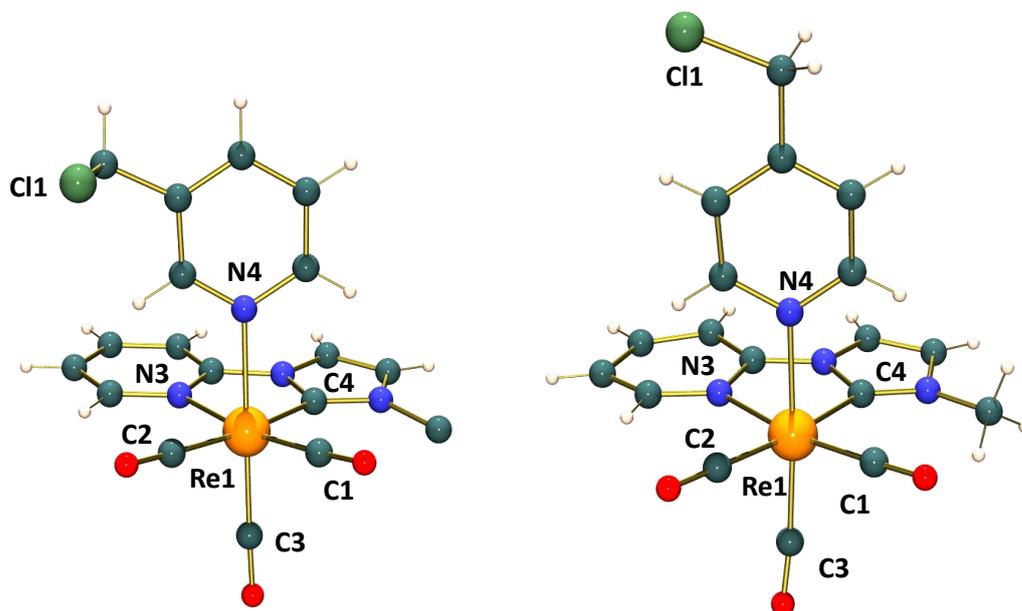
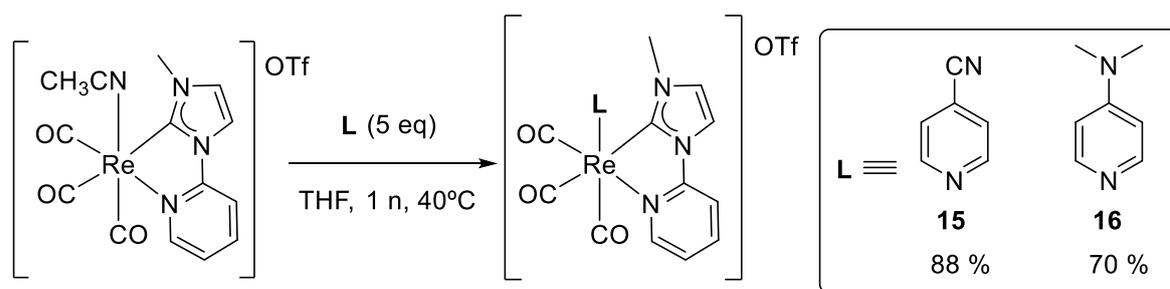


Figura 3.10 Estructuras correspondientes a los cationes de los complejos **13** (izquierda) y **14** (derecha).

Con el fin de comparar la influencia de la piridina sobre las propiedades luminiscentes, se sintetizaron los complejos de Re(I) con 4-cianopiridina (**15**) y 4-dimetilaminopiridina (**16**) en posición axial. Aunque los estudios de orbitales moleculares realizados sobre el

sistema $fac-[Re(CO)_3(bpy)(py)]^+/fac-[Re(CO)_3(phen)(py)]^+$ muestran que el ligando axial apenas ejerce influencia en la luminiscencia al no participar en el HOMO y LUMO,²⁰ otros trabajos publicados demuestran que no se puede generalizar en este aspecto.²¹ El conocimiento sobre el sistema $fac-[Re(CO)_3(N^{\wedge}C)(L)]^+$ es más limitado por la escasez de ejemplos y tan sólo se han publicado estudios en donde el ligando axial es un halogenuro.²² En estos trabajos el bromuro en posición axial sí que participa claramente en el HOMO y de manera menos acusada en el LUMO, lo que estaría en línea con su carácter pi-dador. Se espera que mientras que la 4-cianopiridina, por su carácter pi-aceptor ejerza una mayor influencia en el LUMO, probablemente estabilizándolo, la 4-dimetilaminopiridina, con un carácter más dador, actúe en mayor medida sobre el nivel del HOMO.

La coordinación de ambos ligandos obedece al procedimiento habitual y tiene lugar con buenos rendimientos, 88 % y 70 % para **15** y **16** respectivamente (esquema 3.8).



Esquema 3.8 Síntesis de **15** y **16**.

Se observa para el compuesto **15** la banda a 2239 cm⁻¹ correspondiente al triple enlace C≡N confirmando que el ligando se ha unido al centro metálico. Así mismo se obtuvieron cristales adecuados para su estudio por difracción por rayos X de ambos complejos. El compuesto **15** cristaliza en el sistema triclínico P-1 cuya celdilla unidad está compuesta por 2 moléculas en donde se encuentran ambos enantiómeros y con una molécula por unidad asimétrica (figura 3.11). Las distancias de enlace y ángulos más característicos se encuentran recogidos en la tabla 3.1 del apartado 3.9.

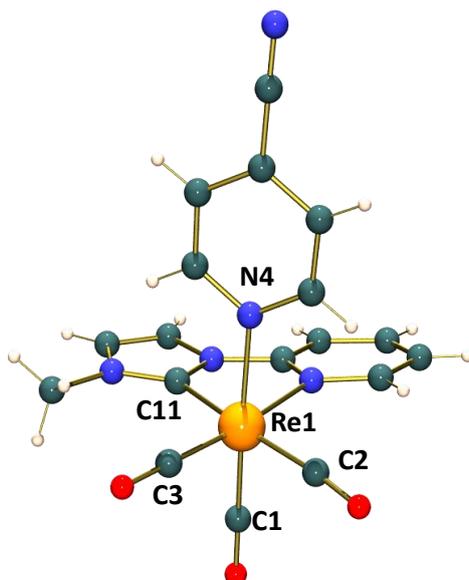


Figura 3.11 Estructura del catión del complejo **15**.

En lo referido a **16**, el factor R obtenido tras la resolución de la estructura cristalina supera el valor máximo aceptado del 10%, por lo que no se detallan los parámetros de enlace y ángulos debido a la incertidumbre con que estos se obtienen. No obstante, la estructura obtenida (figura 3.12) es una prueba válida para justificar la obtención del producto deseado, junto con el espectro de protón.

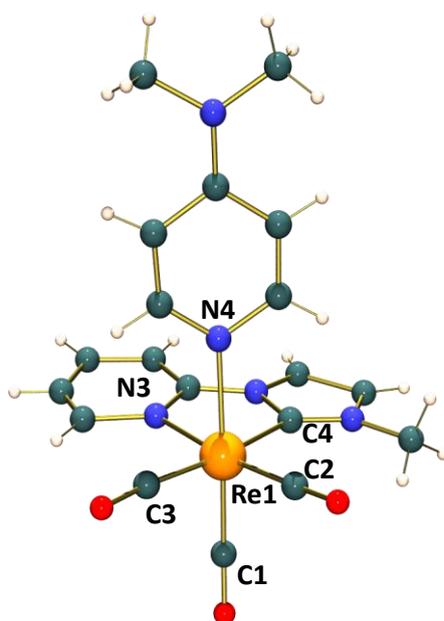
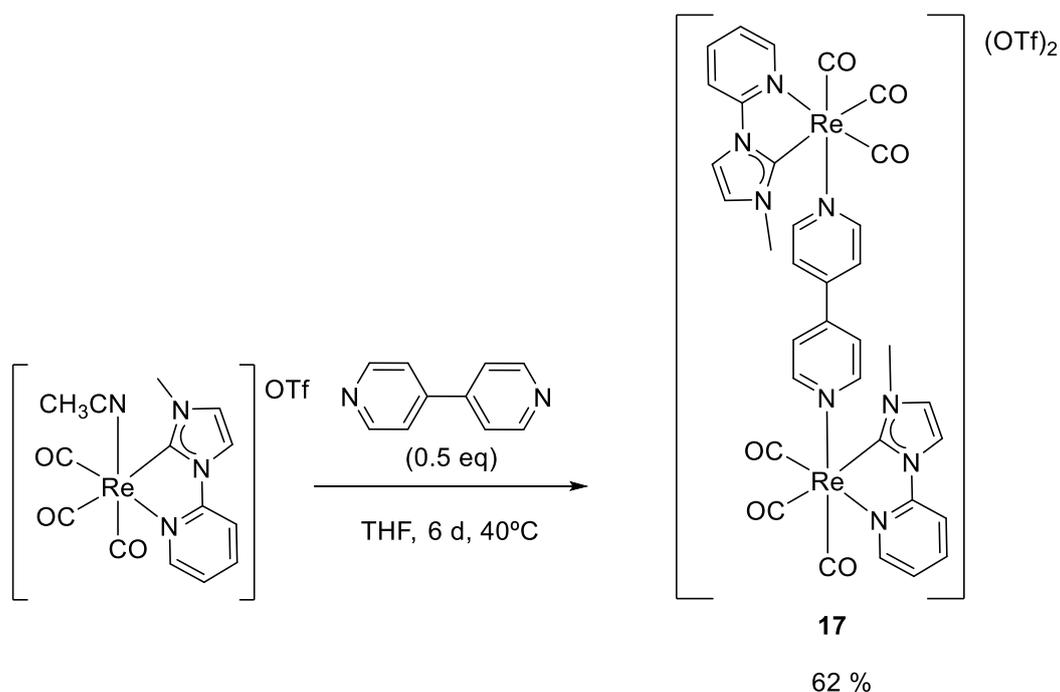


Figura 3.12 Estructura del catión del complejo **16**.

La 4,4'-bipiridina es capaz de coordinarse a dos centros de renio y conectarlos entre sí por resonancia. Constituye así una variante más para analizar la influencia del ligando axial en las propiedades no sólo luminiscentes, sino también biológicas al generar un complejo dicatiónico. La síntesis del complejo bimetalico **17** no puede proceder con exceso de ligando por lo que el tiempo de reacción aumentó hasta los 6 días (esquema 3.9).



Esquema 3. 9 Síntesis del complejo bimetalico **17**.

La obtención del producto deseado, en donde ambos centros de renio están enlazados al ligando bipiridina se confirmó por RMN de protón obteniendo un solo juego de señales para dicho ligando y una integración 2 a 1 respecto de las señales del ligando NHC, prueba de que se ha obtenido el dímero simétrico (figura 3.13).

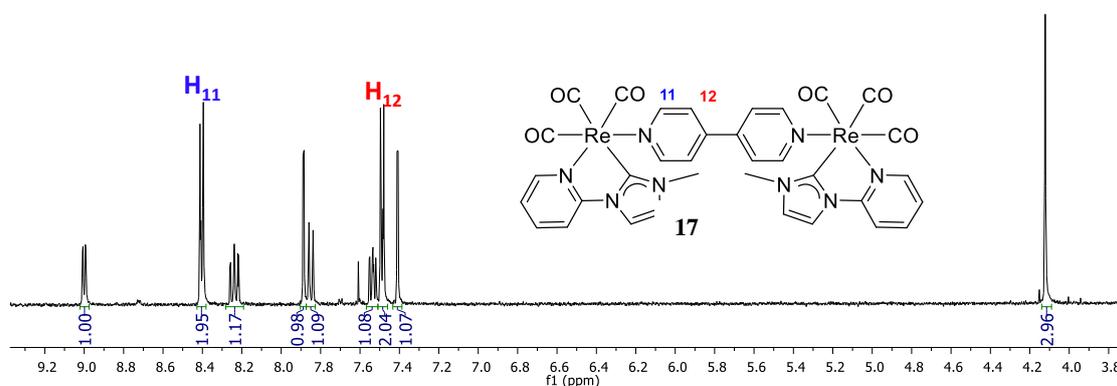
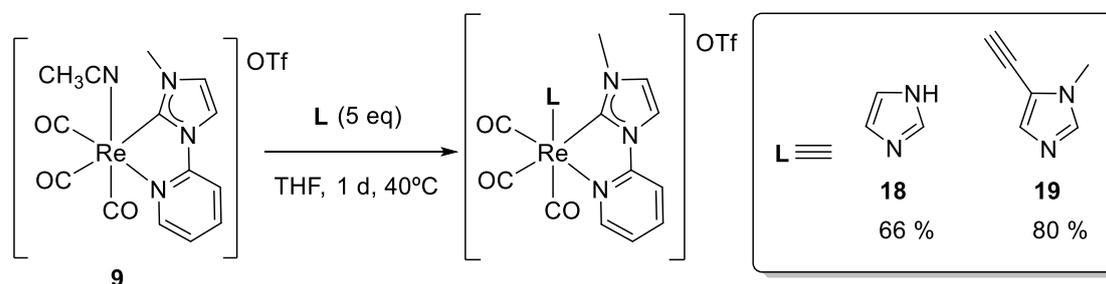


Figura 3.13 Espectro ¹H-RMN de **17**.

3.6 Síntesis de complejos con derivados de imidazol

La molécula de imidazol se considera un anfótero y según el medio puede actuar como ácido a través de su NH ($pK_a=14.5$), siendo algo más fuerte que un alcohol, o como base a través del nitrógeno con el par de electrones libre y cuyo pK_a del ácido conjugado se sitúa en torno a 7, siendo bastante más básico que la piridina (pK_a del ácido conjugado= 5.6). Esta mayor basicidad del nitrógeno de tipo imina le confiere un mayor carácter dador que resulta interesante para comparar el efecto causado en nuestros complejos de renio frente a las piridinas en posición axial. La coordinación del imidazol se llevó a cabo siguiendo el procedimiento habitual, pero no fue posible eliminar el exceso de ligando por recristalización al ser éste insoluble en éter y hexano. Por ello se emplearon cantidades estequiométricas y se aumentó el tiempo de reacción a 24 horas lo que llevó a la obtención de **18** con un rendimiento de 66 %. Siguiendo las mismas condiciones de reacción, una variante del imidazol conteniendo un alquino, 5-etinil-1-metil-1H-imidazol, también se coordinó satisfactoriamente al centro de renio, obteniendo así **19** (esquema 3.10).



Esquema 3.10 Síntesis de los complejos **18** y **19** con derivados de imidazol.

En ambos casos el ligando imidazol se coordina a través de su nitrógeno de tipo piridínico, al proceder la reacción en ausencia de base. La aparición del protón unido al nitrógeno a un desplazamiento de 11.6 ppm en el espectro ^1H -RMN confirma este tipo de coordinación (figura 3.14).

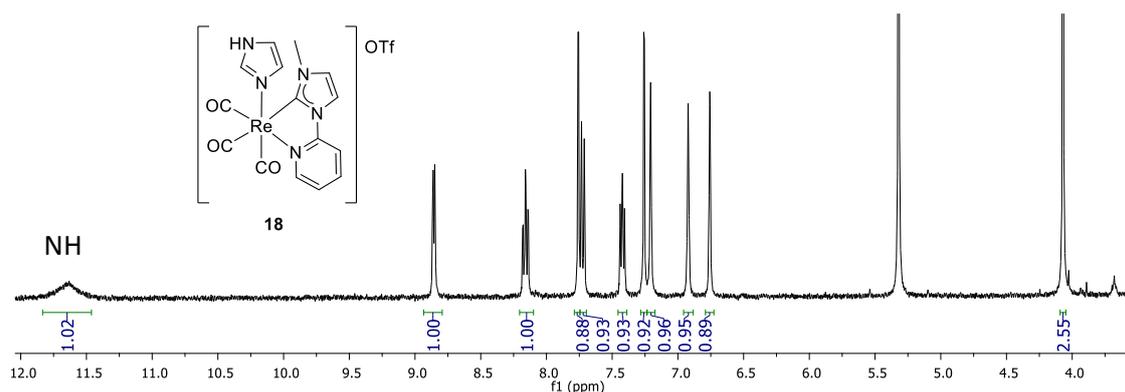


Figura 3. 14 Espectro ^1H -RMN de **18**.

Se obtuvieron cristales adecuados para su estudio por difracción por rayos X del compuesto **19** (figura 3.15). El compuesto cristaliza en el sistema monoclinico $P2_1/c$ cuya celdilla unidad está compuesta por 4 moléculas en donde se encuentran ambos enantiómeros y con una molécula por unidad asimétrica. Las distancias de enlace y ángulos más característicos se encuentran recogidos en la tabla 3.1 del apartado 3.9.

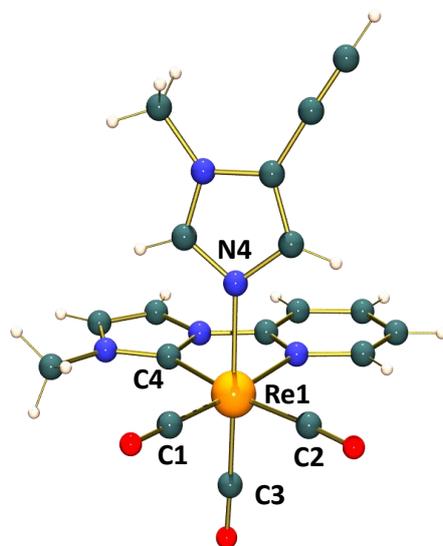
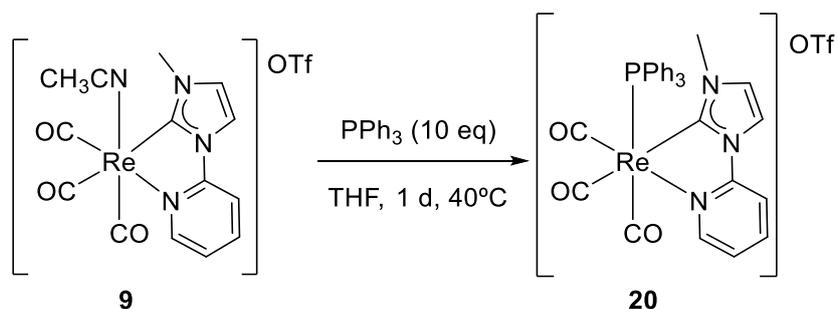


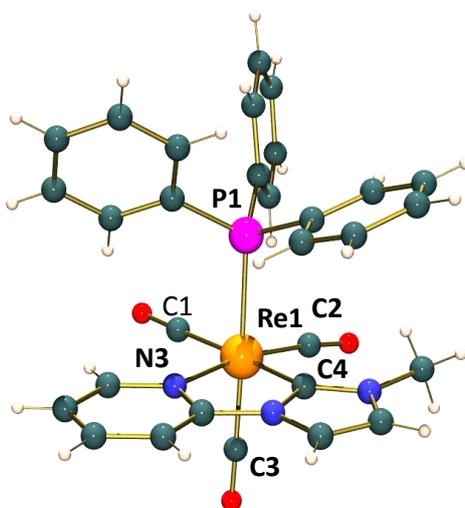
Figura 3.15 Estructura del catión del complejo **19**.

3.7 Síntesis de complejos con trifenilfosfina

Con el fin de ampliar el elenco de sustituyentes en posición axial, se coordinó un sustituyente de tipo fosfina como la trifenilfosfina (esquema 3.11).

Esquema 3. 11 Síntesis de **20**.

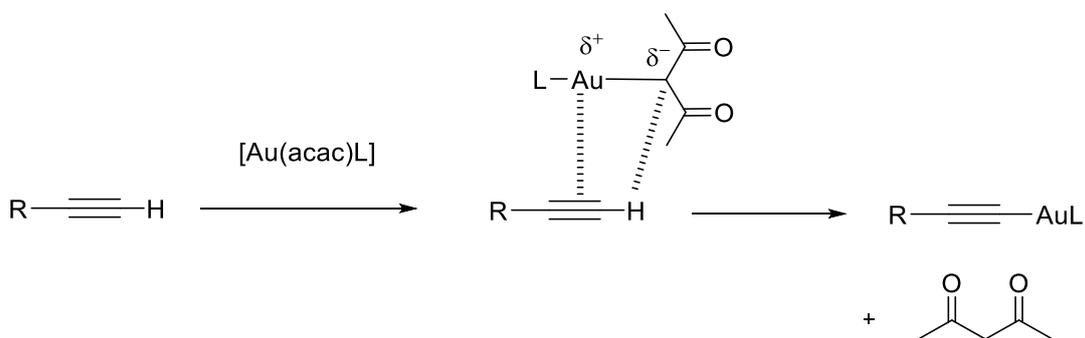
La reacción procede con exceso de fosfina (10 equivalentes) y la purificación se llevó a cabo por cromatografía de silicagel debido a la mayor estabilidad del producto final. El desplazamiento de fósforo a 14.75 ppm de **20** está en acuerdo con los valores descritos en la bibliografía para este tipo de compuestos y confirma la coordinación satisfactoria de la trifenilfosfina.²³ Adicionalmente, se obtuvieron cristales adecuados para su estudio por difracción de rayos X (figura 3.16). El complejo cristaliza en el sistema monoclinico $Pca2_1$ cuya celdilla unidad está compuesta por 4 moléculas en donde se encuentran ambos enantiómeros y con una molécula por unidad asimétrica. Las distancias de enlace y ángulos más característicos se encuentran recogidos en la tabla 3.1 del apartado 3.9. Conviene resaltar que la distancia entre el renio y el carbono del carbonilo *trans* al grupo trifenilfosfina (Re(1)-C(3): 1.954(4) Å) presenta un valor muy similar a la distancia observada entre el renio y el carbono del carbonilo *trans* al carbeno NHC (Re(1)-C(2): 1.955(4) Å), sugiriendo que la fosfina y el carbeno ejercen un efecto *trans* de similar magnitud.

Figura 3.16 Estructura del catión del complejo **20**.

3.8 Síntesis de complejos bimetalicos conectados por piridina

La funcionalidad alquino introducida en los compuestos **11** y **12** permite la coordinación de un centro metálico de oro y de este modo completar la síntesis de los complejos teragnósticos.

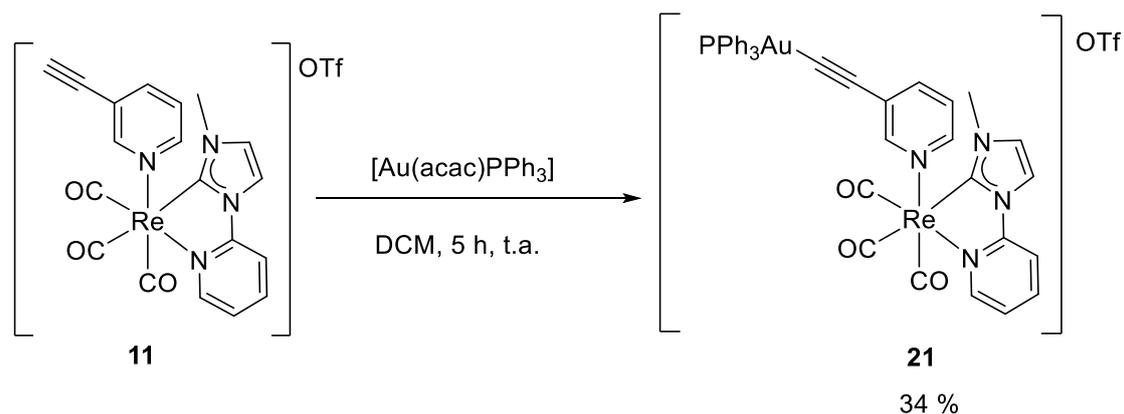
La coordinación de alquinos a complejos de oro transcurre fácilmente por desprotonación con una base suave. El oro interactúa con la densidad electrónica del triple enlace y acidifica el hidrógeno del alquino de manera análoga a como ocurre con el cobre en las reacciones de Sonogashira,²⁴ permitiendo emplear bases suaves (alcóxidos, aminas). En estos casos, el reactivo de oro más habitual se encuentra unido a un buen grupo saliente que normalmente es un cloruro. Para evitar la liberación de iones cloruro, se hizo uso del “método acac”²⁵ en donde la molécula de acetilacetonato está coordinada al oro y ejerce de base para arrancar el protón del alquino permitiendo su coordinación η^1 al metal (esquema 3.12).



Esquema 3.12 Mecanismo de desprotonación de alquinos por el método acac.

Así pues, el complejo **9** se hizo reaccionar con $[Au(acac)PPh_3]$ en diclorometano, el disolvente estándar para este reactivo de oro, dando lugar a **21** (esquema 3.13).

3.8 Síntesis de complejos bimetalicos conectados por piridina



Esquema 3.13 Síntesis de **21**.

El desplazamiento observado por $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN del átomo de fósforo de 33.7 a 41.19 ppm, corroboró la consecución de la reacción (figura 3.17). Este desplazamiento químico es característico de los complejos alquino-oro-fosfina²⁶ y confirma la formación del complejo heterometálico.

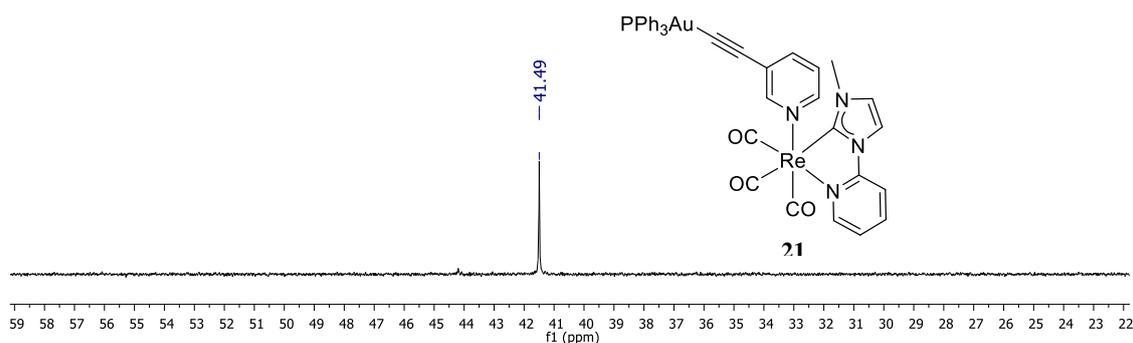
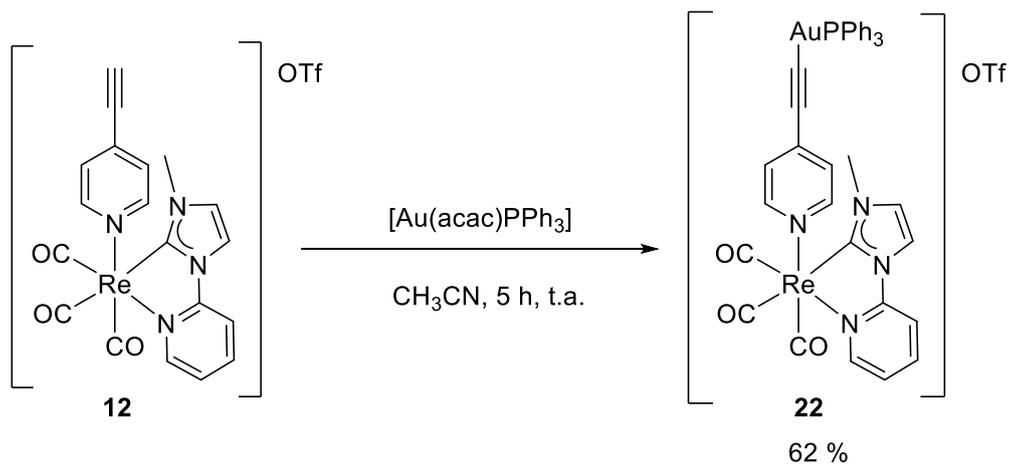


Figura 3.17 Espectro $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN de **21**.

El rendimiento obtenido (34 %) es bajo debido a las reiteradas recristalizaciones que fueron necesarias para obtener un sólido puro. Tras comprobar que la reacción tiene lugar con las condiciones estándar, se decidió emplear acetonitrilo como disolvente, por la mayor tolerancia del complejo de renio, en la síntesis del derivado con la piridina sustituida en *para* (**22**), obteniendo una mejoría notable en el rendimiento (62%, ver esquema 3.14).



Esquema 3.14 Síntesis del complejo **22**.

Se obtuvo un desplazamiento en el RMN de fósforo (41.53 ppm) prácticamente idéntico al del compuesto **21** (41.49 ppm) demostrando la formación del complejo deseado **22** y la poca influencia que tiene sobre el fósforo la distinta sustitución del alquino (*orto*, *para*) en el derivado de piridina (ver figura 3.18).

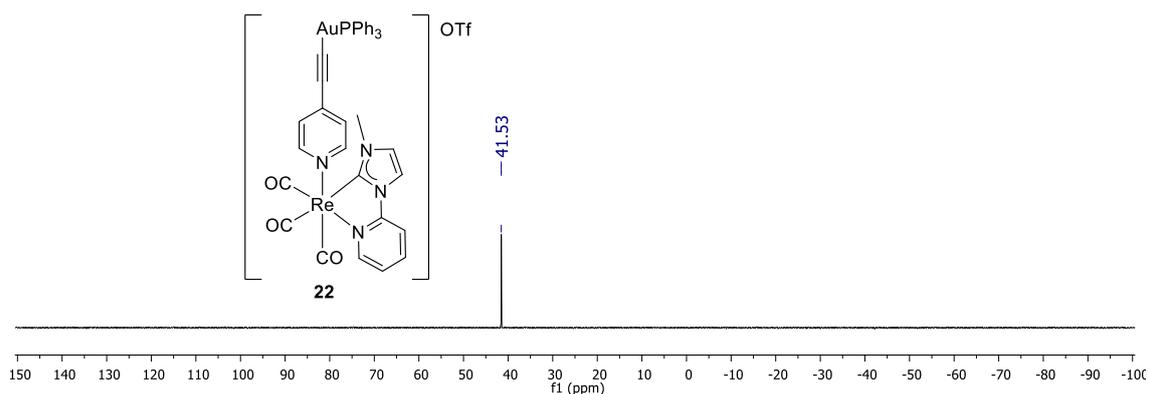
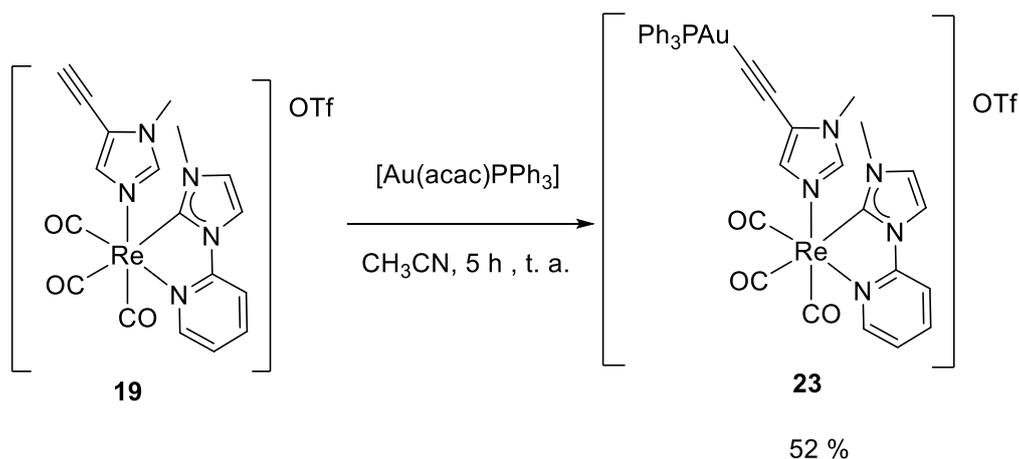
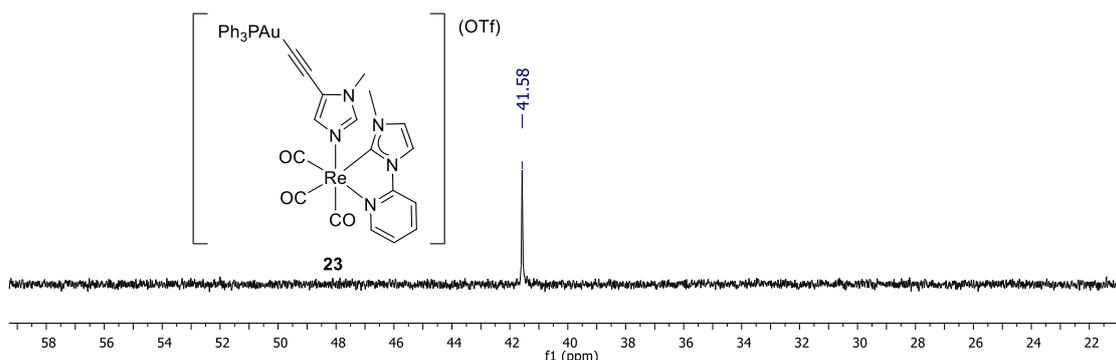


Figura 3.18 Espectro $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN de **22**.

La preparación del heterometálico enlazado por el etinimidazol se llevó a cabo de igual modo que para **22** obteniendo el producto deseado con un 52 % de rendimiento (esquema 3.15).

Esquema 3.15 Síntesis de **23**.

El desplazamiento de fósforo obtenido por $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN, a 41.58 ppm, concuerda nuevamente con lo esperado y demuestra una vez más la poca influencia de la naturaleza del alquino sobre la densidad electrónica en el átomo de fósforo (figura 3.19).

Figura 3.19 Espectro $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN de **22**.

3.9 Comparación de las distancias de enlace

Como se aprecia en los valores recogidos en la tabla 3.1, las distancias interatómicas más relevantes presentan pocas diferencias entre sí, a excepción de la distancia entre el renio y el carbonilo en posición *trans* al ligando axial cuyo valor varía en función del tipo de ligando coordinado, encontrando los valores más bajos cuando dicho ligando es de tipo nitrilo (**9**), piridina deficiente en electrones (**15**) o imidazol (**19**), y los más altos cuando es la fosfina (**20**), pasando por valores intermedios para las restantes piridinas. Debido al mayor radio atómico del fósforo respecto del nitrógeno, la distancia entre el renio y el átomo dador del ligando axial, es superior para el compuesto **20** que posee la trifenilfosfina. Asimismo se observa en todos los casos el efecto *trans* que experimenta el carbonilo en posición *trans* al carbeno, de forma que la distancia entre el renio y

dicho carbonilo es siempre superior a la que existe entre el metal y cualquiera de los otros dos carbonilos.

Tabla 3.1 Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace más característicos de los compuestos **9-20**.

Compuesto	Re- CO _{trans} NHC	Re- CO _{cis} NHC	Re- CO _{trans} (L)	Re-L _{axial}	Re-C _{NHC}	Re-N (NHCpy)	N-Re-C
9	1.972(6)	1.911(5)	1.906(6)	2.144(5)	2.125(5)	2.202(4)	74.6(2)
10	1.968(7)	1.920(9)	1.931(7)	2.204(6)	2.140(7)	2.204(6)	73.8(2)
11	1.968(4)	1.911(4)	1.935(4)	2.225(3)	2.130(4)	2.212(3)	74.5(1)
12	1.952(6)	1.919(6)	1.918(7)	2.215(5)	2.132(6)	2.188(4)	74.2(2)
13	1.954(14)	1.945(13)	1.942(13)	2.201(10)	2.172(11)	2.176(11)	74.2(3)
14	1.95(1)	1.95(1)	1.94(1)	2.20(1)	2.17(1)	2.18(1)	74.8(4)
15	1.969(5)	1.917(5)	1.904(4)	2.203(3)	2.134(4)	2.193(4)	74.5(1)
19	1.968(6)	1.921(4)	1.906(4)	2.188(3)	2.135(6)	2.192(4)	74.9(2)
20	1.955(4)	1.926(4)	1.954(4)	2.485(1)*	2.132(4)	2.198(3)	74.4(1)

* Distancia Re-PPh₃

3.10 Propiedades fotofísicas

Se han registrado los espectros de absorción UV-vis de los compuestos **10** a **21** a temperatura ambiente en disoluciones de DMSO y se presenta un resumen en la tabla 3.2, así como sus espectros en la figura 3.20. En ellos se observa como todos se componen de una banda intensa centrada en 290 nm seguida de una banda menos intensa que aparece en torno a 330 nm. La banda mayoritaria se atribuye a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ que tienen lugar en el seno del ligando NHC para los complejos monometálicos de renio, existiendo contribución de las transiciones entre los fenilos del residuo trifenilfosfina para los complejos heterometálicos. La banda menos intensa está asociada a una suma de diferentes transiciones de transferencia de carga entre ligandos (LLCT), mezcladas con transiciones del metal al ligando ecuatorial (MLCT), en consonancia con lo observado en trabajos similares,²⁷ por lo que se cataloga como MLLCT.

Tabla 3. 2 Bandas de absorción visible-UV y coeficiente de extinción molar.

Compuesto	$^1\text{LC}, \lambda_{\text{abs}}/\text{nm} (\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$^1\text{MLLCT}, \lambda_{\text{abs}}/\text{nm} (\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1})$
10	269 (15150)	331 (8900)
11	288 (11650)	329 (8175)
12	272 (15720), 287 (14500)	328 (11000)
13	260 (13050), 287 (11795)	322 (6300)
14	267 (12050), 290 (10700)	326 (8350)
15	283 (10600)	334 (11450)
16	286 (30300)	347 (4150)
17	284 (26200)	335 (17350)
18	270 (9700)	334 (7050)
19	271 (11500)	333 (7050)
20	261 (5590)	313 (2050)
21	278 (31950)	Englobada por la anterior
22	288 (30300)	310 (28170)
23	280 (25400)	339 (4000)

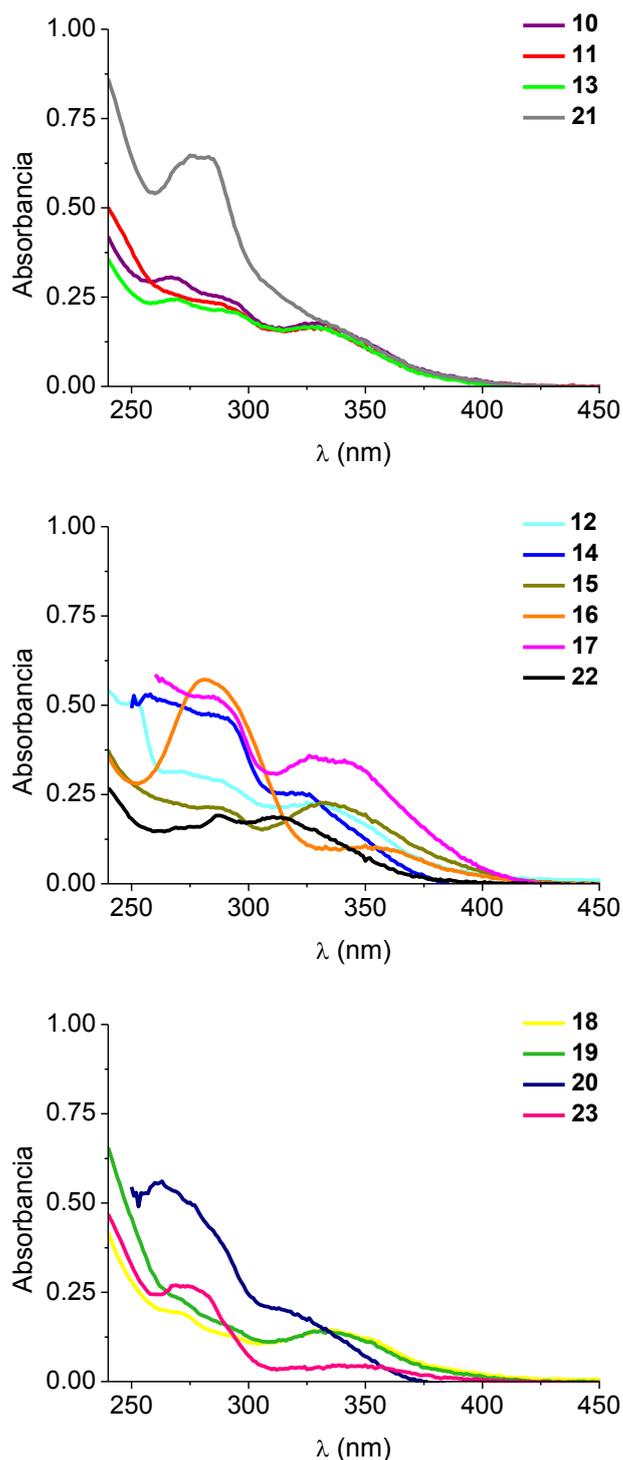


Figura 3.20 Gráficas de absorción ultravioleta-visible de los compuestos con piridinas sustituidas en *meta* (arriba), *para* (centro) y con sustituyentes fosfina e imidazol (abajo) en disoluciones de acetonitrilo. La concentración es de $2 \times 10^{-5} \text{M}$ excepto para los complejos **14** ($4 \cdot 10^{-5} \text{M}$), **20** ($1 \cdot 10^{-4} \text{M}$) y **23** ($1 \cdot 10^{-5} \text{M}$).

Asimismo, los espectros de excitación y emisión se registraron en disoluciones de acetonitrilo a temperatura ambiente. Tal y como se observa en la figura 3.21 que recoge dichos espectros, así como en los datos aportados en la tabla 3.3, la excitación se

caracteriza en general por la presencia de una banda poco estructurada que aparece en torno a 400 nm, mientras que la emisión presenta una banda fuertemente estructurada centrada en torno a 460 nm. Por comparación con las propiedades luminiscentes del sistema *fac*-[Re(bpy)(CO)₃(Cl)]²⁸ y *fac*-[Re(bpy)(CO)₃(py)]⁺,²⁹ la incorporación del carbeno NHC en lugar de la bipyridina en el ligando quelato ecuatorial produce un aumento en la energía de emisión. El marcado carácter σ -dador del carbeno produce un mayor desdoblamiento de los orbitales d del metal, de forma que la transición desde los orbitales del metal al ligando se equipara en energía a la transición de entre los orbitales del propio ligando ecuatorial. Adicionalmente, se comprueba que el intercambio del cloruro en posición axial por otro ligando neutro N-dador, produce un desplazamiento hipsocrómico de la banda de emisión, que pasa de ser una banda ancha centrada en 514 nm, a una banda estructurada en un pico central centrado en 456 nm con dos hombros a 436 nm y 485 nm. Dado que ligandos N-dadores como la piridina o el imidazol, atendiendo a la serie espectroquímica,³⁰ son ligandos de campo fuerte, provocan una mayor separación entre los orbitales HOMO y LUMO en comparación con el cloruro, explicando así el desplazamiento hipsocrómico observado.

Observando más en detalle los datos obtenidos, los complejos **15** y **17** constituyen una excepción al presentar una banda de emisión secundaria centrada en 595 nm para el compuesto **15** y en 640 nm para el compuesto **17**. Se ha podido observar, de manera excepcional en relación con los demás complejos, que una excitación a 400 nm conduce a la emisión cuya banda está más desplazada al rojo, mientras que la excitación a 420 nm conduce a la emisión más energética y estructurada, que es la que se observa en los demás compuestos de la serie. Mientras que **15** presenta el ligando más deficiente en electrones por efecto del grupo ciano, el complejo **17** comunica dos sistemas de renio combinando así sus orbitales. Se propone que el efecto de ambos ligandos ocasiona una estabilización del estado excitado emisor ³MLCT obteniendo de este modo una banda de emisión típica de los compuestos de renio.

Por otro lado, los complejos **21** y **22**, conteniendo el fragmento AuPPh₃, presentan un ligero desplazamiento al rojo en comparación con sus análogos monometálicos **11** y **12** respectivamente, debido al incremento en la conjugación del sistema, reduciendo así el gap entre orbitales.

Finalmente, el hecho de que los compuestos **14**, **16**, **17**, **18**, **19**, **22** y **23** presenten una única banda de excitación, unas veces a 400 nm y otras a 420 nm se debe a la mayor

intensidad de una de las dos transiciones, que engloba y enmascara a la otra, de forma que no puede ser interpretado como una modulación por parte del ligando axial.

Tabla 3. 3 Resumen del comportamiento luminiscente.

Compuesto	Excitación _{max} (λ/nm)	Emisión _{max} (λ/nm)
F	323	403
Re1	412	514
10	403, 420	432, 457, 483
11	400, 420	457, 483
12^a	402, 420	432, 456, 487
13	415	433, 456, 485
14	401, 419	436, 459, 487
15	403, 423	432, 456, 485(exc 420), 595(exc 400)
16	400	497
17	400, 420	438,455, 485 (exc 420), 640(exc 400)
18	398(ancha)	433, 461, 490
19^b	400, 419	432, 460, 487
20	No Lumi	No Lumi
21^c	414, 439	453, 474, 503
22^d	411	450, 476, 500
23^e	398(ancha)	496

Vidas medias: ^a 212 ns; ^b 10 ns, 136 ns; ^c 31 ns, 205 ns; ^d 207 ns; ^e 15ns, 123ns.

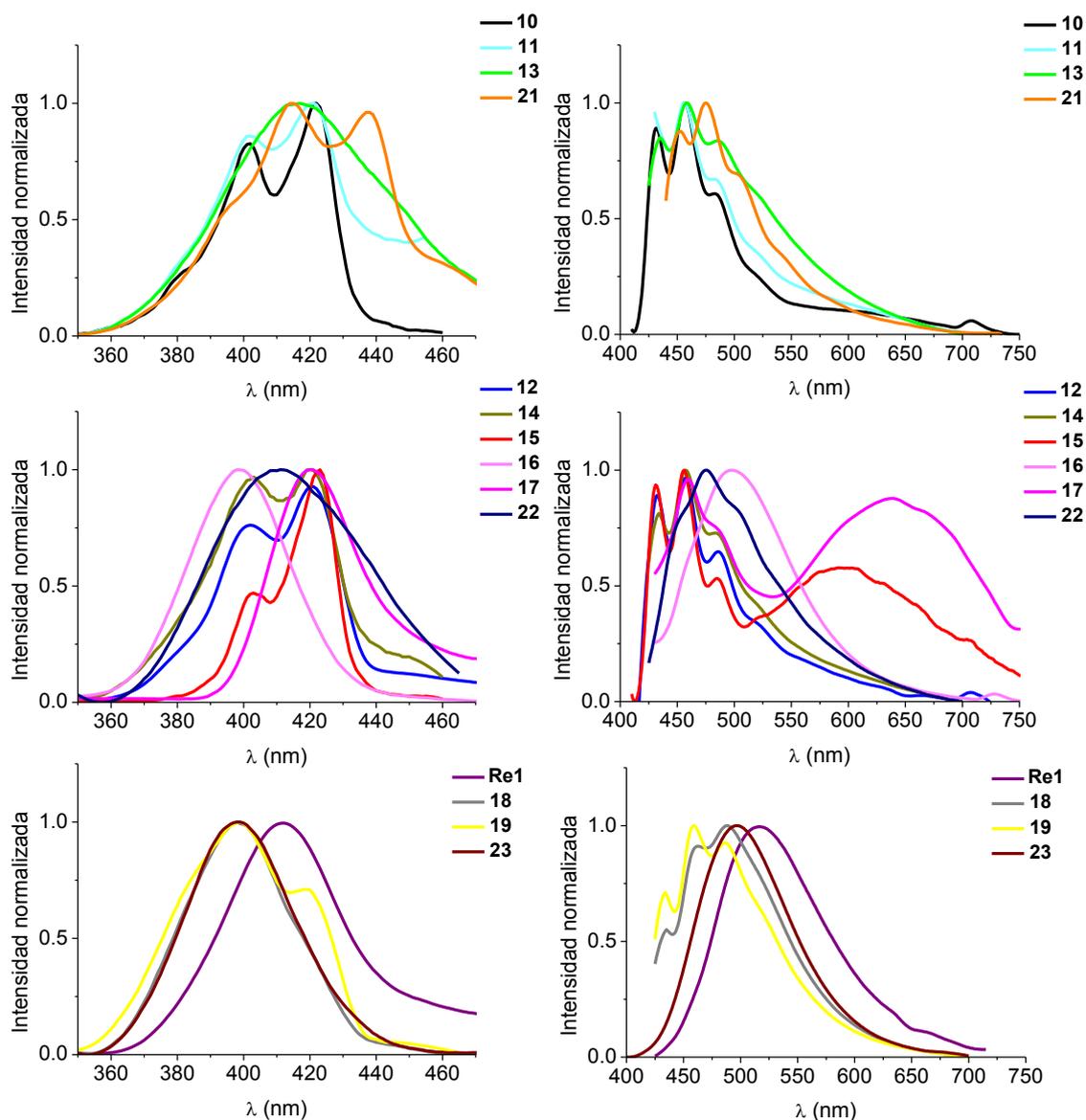


Figura 3.21 Espectros de excitación (izquierda) y emisión (derecha) de los compuestos en DMSO.

Con toda esta información se propone que la excitación se produce por medio de una transición intraligando ^1LC , dentro del esqueleto carbeno-piridina, modulada por el metal, al observar que la sal de imidazolio **F** presenta transiciones a energías más bajas, por lo que se cataloga como una combinación de ^1LC con $^1\text{MLCT}$. En lo referido a la emisión, los valores de tiempos de vida, en el rango entre la decena y el centenar de nanosegundos, además de observar un descenso en dicho valor al pasar de una disolución desgasificada a aireada, están de acuerdo con la naturaleza triplete del estado excitado. Por otro lado, el pequeño desplazamiento de Stokes observado además de la forma estructurada de la emisión, permiten afirmar que existe una contribución del

estado ^3LC ,³¹ por lo que se propone que la emisión parte de un estado excitado fruto de la combinación de ambos estados $^3\text{MLCT}$ y ^3LC . Los bajos rendimientos cuánticos, que no pudieron ser determinados debido a su bajo valor por lo que se fijan en inferiores al 1%, también corroboran esta propuesta. Como se ha explicado, la excepción la conformarían **15** y **17** en donde existe una emisión dual desde la combinación de estados $^3\text{MLCT}$ y ^3LC común a los demás compuestos sumada a una emisión desde un estado con mayor carácter $^3\text{MLCT}$ a mayores longitudes de onda.

3.11 Actividad biológica sobre células tumorales humanas

3.11.1 Estudio de la actividad citotóxica. Método MTT

Siguiendo con la línea celular evaluada en el capítulo 2, se midió la actividad de los compuestos heterometálicos **21**, **22** y **23**, y de sus precursores monometálicos **11**, **12** y **19**, frente a la cepa de células tumorales de cáncer de pulmón A549, con el fin de evaluar la influencia del oro en la citotoxicidad. Para completar el rango de complejos de renio evaluados, también se ensayaron los complejos **10** y **13**. Mientras que la evaluación de las propiedades de **10** permitirá ver la aportación del complejo de renio unido a la piridina en posición axial, sin ningún tipo de sustituyentes, el estudio de las propiedades del complejo **13** servirá para comprobar la influencia del grupo clorometilo, conocido grupo director hacia las mitocondrias.¹⁹ Como se aprecia en los resultados recogidos en la tabla 3.4, tan sólo aquellos complejos heterometálicos que contienen el fragmento de oro fueron activos, demostrando que cada metal ejerce su función por separado.

Adicionalmente, tal y como se ha explicado en la introducción de este capítulo, se pretende evaluar el potencial en la terapia fotodinámica de los diferentes complejos de renio unidos a carbenos NHC sintetizados. Dado que los rendimientos cuánticos obtenidos han sido bajos (inferiores al 1%), es posible que se esté produciendo una desactivación del estado excitado por transferencia de energía al oxígeno para alcanzar su estado singlete. Con este objetivo, los ensayos de citotoxicidad se repitieron irradiando durante 10 minutos a 405 nm las células con los complejos a estudio. Tan sólo los complejos heterometálicos mostraron un aumento de la actividad, invalidando la aplicación de los complejos monometálicos para este cometido. En concreto, los

complejos **21** y **22** mejoraron del orden de 3 veces su citotoxicidad, mientras que el complejo **23** sólo mostró una ligera mejora en la actividad. Los complejos que sólo contienen renio no mostraron un aumento de la actividad por irradiación y se ha propuesto como explicación que esto se debe a su baja permeabilidad de la membrana celular,³² como se corroboró posteriormente con los estudios de biodistribución. Pese a la mejora de la actividad debido a la irradiación, no se puede considerar a estos complejos **21**, **22** y **23** como agentes válidos en terapia fotodinámica por su elevada toxicidad en ausencia de radiación.

Tabla 3.4. Valores de IC₅₀ obtenidos tras 24 h de incubación sobre la línea de células tumorales A549 con y sin irradiación a 405 nm durante 10 minutos.

Complejo	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)(irradiado)
Re 2	>50	>50
10	>50	-
11	>50	>50
12	>50	>50
13	>50	-
19	>50	>50
21	12.18±1.19 ^a	4.48±0.71 ^a
22	10.82±1.63 ^b	2.66±0.56 ^b
23	12.65±2.10 ^b	9.97±3.04 ^b
Auranofín³³	7.59	

3.11.2 Estudios de biodistribución. Medidas de microscopio confocal

Las pruebas de biodistribución realizadas por medio del microscopio de fluorescencia confocal sólo fueron concluyentes para los compuestos **21** y **22**, sugiriendo que el fragmento trifenilfosfina ayuda a su internalización como se ha observado en otros trabajos.³⁴ Ambos compuestos fueron incubados junto con el tinte nuclear DRAQ5 (azul). Este fluoróforo se une específicamente al ADN y posee unos perfiles de excitación/emisión (646/697 nm respectivamente) que permiten su excitación selectiva respecto de los complejos sintetizados. En las imágenes se aprecia una distribución uniforme en el citoplasma de ambos complejos (amarillo) cuando se excitan a 405 nm, con una ligera emisión que también proviene del núcleo (figura 3.22).

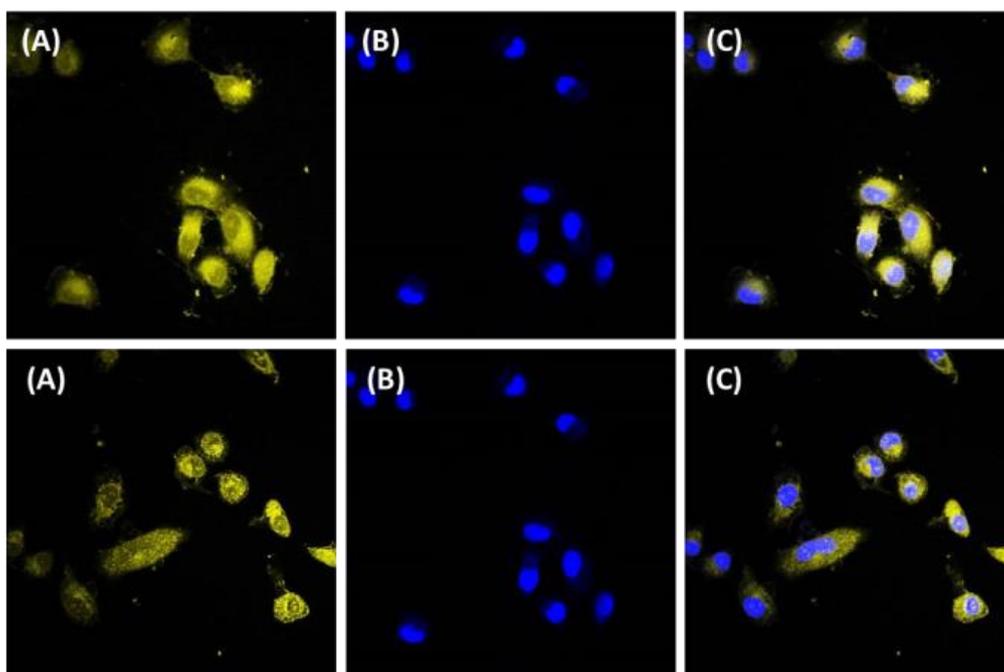


Figura 3.22 Imágenes de los complejos **21** (arriba) y **22** (abajo) incubados con las células A549 a 37 °C durante 24h. (A) Tras excitar a 405 nm. (B) Tras excitar a 647 nm. (C) Superposición de (A) y (B).

Los precursores monometálicos que sólo contenían renio **11** y **12** no pudieron ser observados en el microscopio, para lo cual se propusieron dos explicaciones: o bien dichos complejos se descomponían durante el proceso de incubación con las células, o bien su internalización era baja por un balance lipofílico inadecuado. La primera de las hipótesis fue descartada estudiando la estabilidad de los complejos **19** y **21** por medio de la espectroscopía UV-vis en un medio acuoso que reproduciría el empleado durante el cultivo celular, figura 3.23. Ambos complejos no presentaron variaciones significativas en su espectro de absorción UV-vis permitiendo confirmar que son estables durante el tiempo empleado para la incubación junto con las células tumorales.

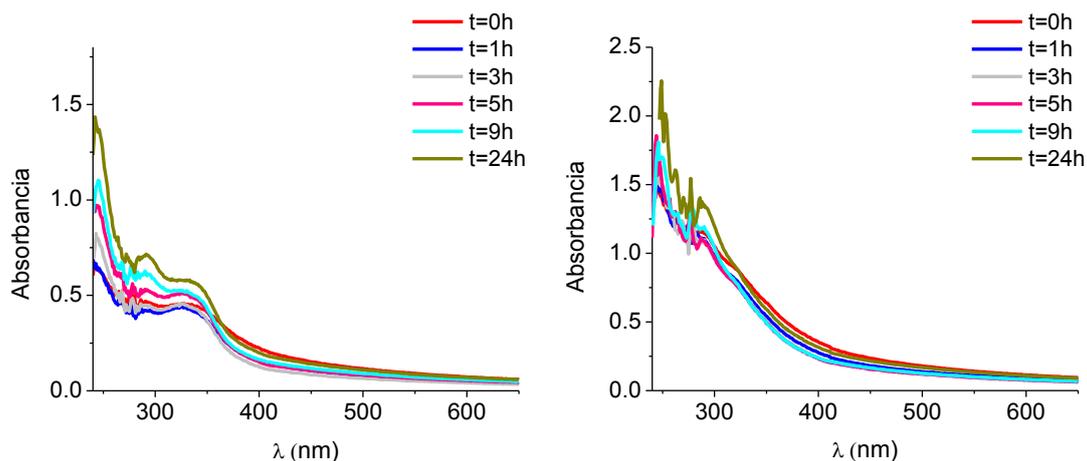


Figura 3.23 Espectros de UV-vis de los compuestos **19** (izquierda) y **21** (derecha) en DMSO-PBS a lo largo del tiempo.

El complejo heterometálico **23**, tampoco pudo ser observado a pesar de contener el fragmento AuPPh₃. Tras constatar que precisamente este compuesto era el que menos cambios en su actividad presentaba tras irradiación a 405 nm, se especuló con la posibilidad de que la extrapolación del máximo de excitación registrado en acetonitrilo (tabla 3.5) al medio celular, mezcla de disolución acuosa y DMSO, no fuera correcta. Por ello se midieron de nuevo los perfiles de excitación - emisión de los tres complejos heterometálicos **21**, **22** y **23** en DMSO obteniendo los datos aportados en la tabla 3.5.

Tabla 3.5 Comparación de los máximos de excitación en disoluciones de DMSO y CH₃CN de los compuestos **21**, **22** y **23**.

Compuesto	Exc DMSO (nm)	Exc CH ₃ CN (nm)
21	414, 439	414
22	411	412
23	398	377

Se aprecia claramente que mientras que **21** y **22** apenas presentan cambios en su máximo de excitación al pasar de acetonitrilo a DMSO, no es así para **23** en donde existe un desplazamiento hipsocrómico de la excitación hasta los 377 nm. Puesto que **21**, **22** y **23** tienen unos valores de IC₅₀ similares, se concluye que todos ellos son capaces de penetrar en las células tumorales, pero que debido a los bajos rendimientos

cuánticos, y a una excitación demasiado alejada del máximo de excitación correspondiente a **23**, la señal fluorescente sólo es suficientemente intensa para **21** y **22**.

3.11.3 Estudio del tipo de muerte celular

Se decidió estudiar el mecanismo de muerte celular empleando como ejemplo el complejo **21**. Un proceso apoptótico responde a una muerte celular programada en el que la célula se desintegra en pequeñas vacuolas que finalmente son digeridas.³⁵ Durante este proceso, se producen alteraciones de la membrana celular como la externalización de la fosfatidilserina,³⁶ un fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana celular. En cambio, en la necrosis, las membranas estallan liberando el contenido de la célula al exterior.³⁷ Las células A549 se incubaron durante 3 h con el complejo a estudio y en ese momento se añadieron dos marcadores fluorescentes específicos, dejando otras 21 h adicionales de incubación. En concreto, se emplearon Annexin V-DY634 y 7-AAD. Mientras que el primero se corresponde con una versión fluorescente de la anexina, una proteína que se une específicamente a la fosfatidilserina, 7-AAD es un tinte que sólo es capaz de penetrar en la célula si la membrana celular ha perdido su integridad. La respuesta positiva para la 7-AAD es indicativa de un proceso de necrosis, mientras que la respuesta positiva para la anexina indica que es la apoptosis el proceso que entra en juego.

Los resultados obtenidos con el complejo **21** se presentan en las gráficas de la figura 3.24. El eje Y representa el porcentaje de células que dan señal positiva a la anexina y el eje X el porcentaje de aquellas que dan señal positiva al marcador 7-AAD. Se estudió el comportamiento a diferentes concentraciones, observando una respuesta positiva para ambos marcadores (la señal se concentra en el cuadrante superior derecho de las gráficas) a medida que la concentración de compuesto añadida se acerca al valor de IC₅₀. Con estos datos se puede afirmar que el proceso de necrosis entra en juego, sin poder especificar si se trata de necroptosis,³⁸ necrosis secundaria a la apoptosis o necrosis puramente dicha.

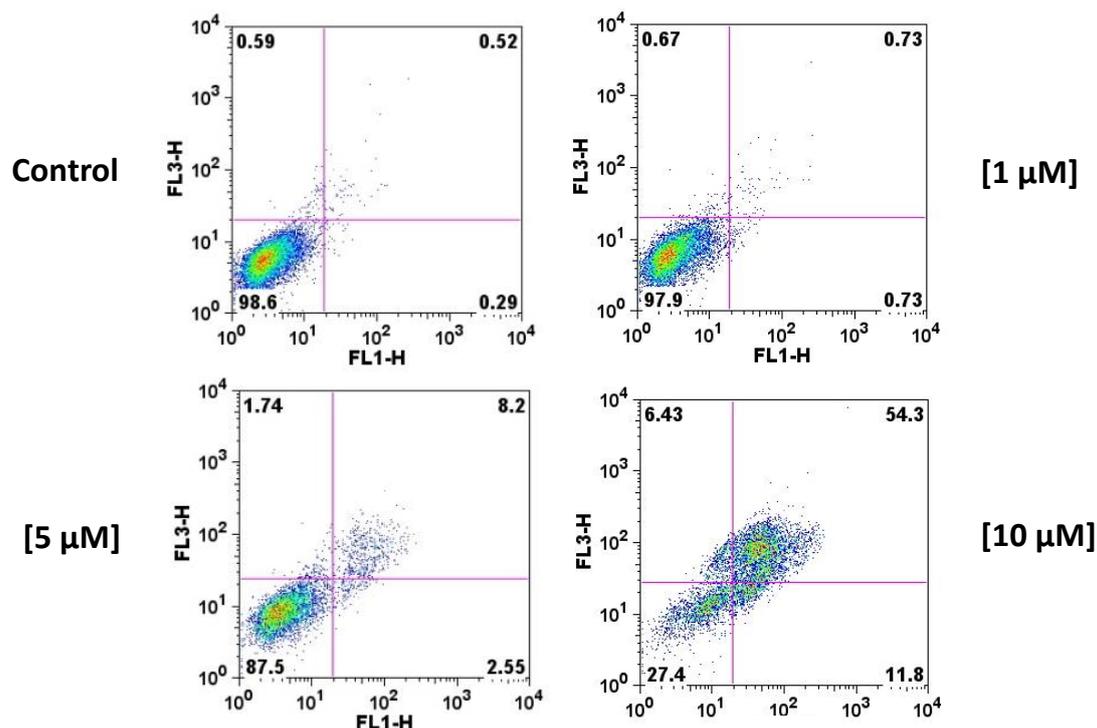


Figura 3.24 Gráficas de citometría de flujo tras incubación de las células A549 con diferentes concentraciones de **21**.

Adicionalmente, se evaluó la influencia de Z-VAD-fmk, un inhibidor de caspasas, en la muerte celular. Las caspasas son un conjunto de proteínas implicadas en los procesos de muerte celular, a menudo por la vía apoptótica.³⁹ Para comprobar si las caspasas participaban en el proceso de muerte celular, se evaluó por citometría de flujo el porcentaje de células que estaban marcadas con la anexina fluorescente, tras haber sido incubadas con diferentes concentraciones del compuesto **21** con y sin el inhibidor Z-VAD-fmk. La gráfica representada en la figura 3.25 permite afirmar que la muerte celular causada por el complejo **21** es independiente de las caspasas ya que el comportamiento observado para las células incubadas en presencia o ausencia del inhibidor de caspasas es similar.

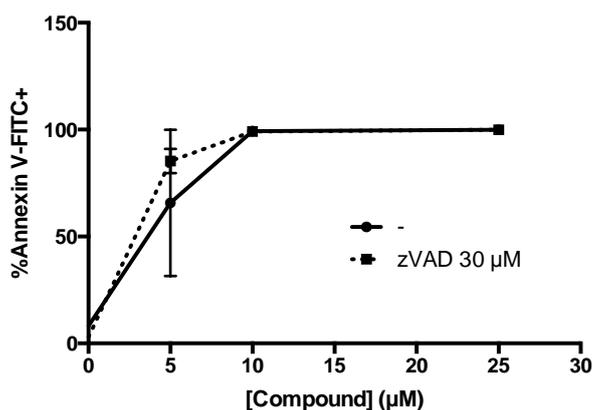


Figura 3.25 Porcentaje de células A549 marcadas con anexina fluorescente en función de la concentración de **21** suministrada, con (línea punteada) y sin (línea continua) inhibidor de caspasas zVAD.

Por añadidura, la observación al microscopio óptico de las células incubadas en presencia y ausencia del inhibidor permite asimismo descartar que exista una influencia por parte de las caspasas en el tipo de muerte celular: ambas fotografías muestran células con una morfología muy similar, sin que se aprecien diferencias significativas en la proporción de células muertas y vivas, y con principio de necrosis en ambos casos (ver figura 3.26).

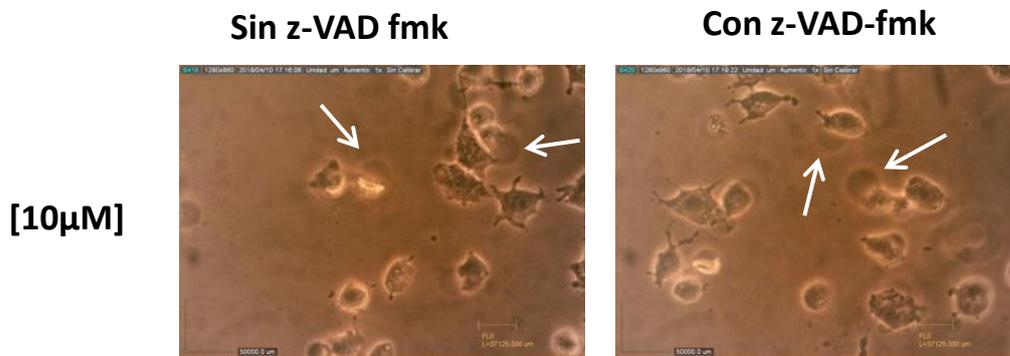


Figura 3.26 Imágenes al microscopio óptico de las células A549 incubadas con el complejo **21** a una concentración de 10 µM (izquierda) y junto con el inhibidor de caspasas z-VAD fmk (derecha). Las flechas señalan el hinchamiento de la célula característico de un proceso necrótico.

Por último, se realizaron dos ensayos adicionales para descartar la interrupción del correcto funcionamiento de la mitocondria como detonante del proceso de muerte celular. Como ya se explicó en la introducción general, los complejos de oro(I) tienen una gran afinidad por la tiorredoxina reductasa, que por su función reductora garantiza unos niveles de estrés oxidativo bajos. Dicho estrés oxidativo puede causar una disrupción de la membrana mitocondrial⁴⁰ y en consecuencia el comienzo de un proceso

apoptótico que en muchos casos implican a la caspasa 9 que a su vez activa a la caspasa 3.⁴¹

En primer lugar, se estudió la inhibición de la tioredoxina reductasa por parte del complejo **21**. Para ello, se incubaron las células A549 con el compuesto y con DMSO como control durante 4h. Pasado ese tiempo, se extrajeron todas las proteínas presentes del material celular y se añadió el sustrato 5,5'-ditiobis(ácido-2-nitrobenzoico) (DNTB) que se reduce rápidamente al 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) por medio de la tioredoxina reductasa en presencia de NADPH. El TNB puede ser detectado y cuantificado por espectroscopía UV-visible al absorber a una longitud de onda de 412 nm. Como se aprecia en la figura 3.27, la absorbancia de la muestra va creciendo con el tiempo con una velocidad incluso mayor que la del control (donde no se ha añadido el complejo **21**). Esto permite afirmar que la producción de TNB por parte de la enzima no se ha visto afectada negativamente al añadir el compuesto **21**. La mayor absorbancia registrada en la muestra conteniendo el complejo a estudio se explica porque éste también absorbe radiación a 412 nm.

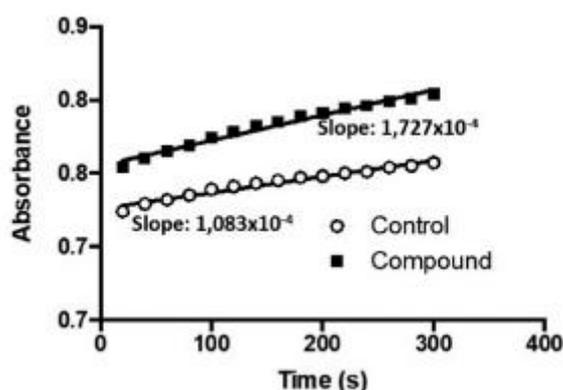


Figura 3.27 Ensayo de inhibición de la tioredoxina reductasa del complejo **21**. Se representa la evolución de la intensidad de la absorbancia del TNB durante 5 minutos.

En segundo lugar, siguiendo el procedimiento explicado en el capítulo 2, se evaluó la generación de ROS en células de adenocarcinoma colorrectal en comparación con un control en ausencia de compuesto. En este caso, la señal de fluorescencia no se vio incrementada respecto del control, en la muestra conteniendo el complejo **21** concluyendo que no se produce un aumento en los niveles de ROS.

Con estos dos experimentos, donde se demuestra por un lado que no existe inhibición de la tioredoxina reductasa y por el otro que no se produce un aumento en los niveles de

ROS, sumados a una vía de muerte celular independiente de las caspasas, se puede prácticamente descartar una vía mitocondrial para explicar el mecanismo de acción del complejo **21**, que de nuevo difiere del comportamiento general de los compuestos citotóxicos de oro (I) abriendo una puerta a diferentes dianas biológicas para este tipo de compuestos.

3.12 Conclusiones

Se han sintetizado 11 derivados de la forma *fac*-[Re(C^N)(CO)₃L] en donde (C^N) representa un ligando quelato de tipo imidazo-piridina, L representa un ligando axial de tipo piridina, imidazol o fosfina; así como 3 derivados heterometálicos en donde el ligando L conecta a través de un residuo alquino un átomo de oro unido a una trifenilfosfina. Dichos complejos de renio han mostrado unas emisiones con máximos centrados en 450 nm lo que los posiciona dentro de los complejos emisores más energéticos basados en este metal. Sin embargo, la baja intensidad de emisión y la fuerte estructuración de la emisión, revela que la emisión no parte de estados excitados de naturaleza ³MLCT pura, sino que existe contribución de estados ³LC por lo que no se puede considerar que se haya conseguido modular completamente la emisión. La naturaleza del ligando axial ha mostrado poca influencia sobre las propiedades luminiscentes a excepción de los complejos **15** y **17**, en donde se ha observado una emisión dual desde 450 nm (mezcla de ³MLCT y ³LC) y 590-640 nm (³MLCT), apuntando a que ligandos pobres en densidad electrónica son capaces de estabilizar el estado ³MLCT.

En cuanto a las propiedades biológicas, se ha observado que tan sólo los complejos heterometálicos han mostrado actividad citotóxica, que se vio incrementada tras irradiación, aunque no presentan las propiedades adecuadas para terapia fotodinámica por su elevada citotoxicidad en ausencia de luz. Las pruebas de biodistribución permitieron concluir que el fragmento oro-trifenilfosfina ayuda a la internalización explicando por qué los complejos homometálicos (**11**, **12** y **19**) no pudieron observarse por microscopía de fluorescencia. Así mismo se descarta también la aplicación del complejo heterobimetálico **23** en imagen celular debido a su perfil de excitación, cuyo máximo a 377 nm se encuentra demasiado alejado del láser de excitación utilizado en este caso. La biodistribución observada para los compuestos **21** y **22** es principalmente

citoplasmática, encontrándose también localizada en menor medida en puntos específicos en el interior del núcleo.

Se realizaron diversos estudios sobre el complejo **21** gracias a los cuales se han postulado varias ideas: a) la muerte celular provocada por estos complejos parece estar basada en un proceso de necrosis, b) se descarta la vía mitocondrial como fuente de citotoxicidad así como la producción de especies reactivas de oxígeno.

En comparación con los complejos de renio presentados en el capítulo 2 y aquellos reportados en la bibliografía, la introducción del ligando NHC en sustitución al ligando bisimina ha afectado negativamente al comportamiento luminiscente y a la permeabilidad celular. Aunque se ha observado una influencia de la naturaleza del ligando axial en las propiedades fotofísicas, también se constata la mayor contribución del ligando quelato en dichas propiedades.

3.13 Experimental

3.13.1 Starting Materials

The starting materials $[\text{AuClPPh}_3]$,⁴² $[\text{Au}(\text{acac})\text{PPh}_3]$ ⁴³ and Ag_2O were prepared according to published procedures. $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$ was purchased from STREM Chemicals and used as received. All other reagents were commercially available and were used without further purification. Solvents were dried with a SPS solvent purification system.

3.13.2 Instrumentation

Mass spectra were recorded on a Bruker Esquire 3000 PLUS, with the electrospray (ESI) technique and on a Bruker Microflex (MALDI-TOF). ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ and $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ including 2D experiments, were recorded at room temperature on a Bruker Avance 400 spectrometer (^1H 400.0 MHz, ^{13}C 100.6 MHz, ^{31}P 162.0 MHz) or on a Bruker Avance II 300 spectrometer (^1H 300.0 MHz, ^{13}C 75.5 MHz, ^{31}P 121.5 MHz) with chemical shifts (δ , ppm) reported relative to the solvent peaks of the deuterated solvent. All J values are given in Hz. IR spectra were recorded in neat samples on a Perkin-Elmer Spectrum 100FT-IR spectrometer. Room temperature steady-state emission and excitation spectra were recorded with a Jobin-Yvon-Horiba Fluorolog FL3-11 spectrometer fitted with a

JY TBX picosecond detection module. Nanosecond lifetimes were recorded with a Datastation HUB-B apparatus with a nanoLED controller and DAS6 software. The nanoLEDs employed for lifetime measurements had wavelengths of 370 and 390 nm. The lifetime data were fitted using the Jobin-Yvon software package and the Origin Pro 8 program. UV-vis spectra were recorded with 1 cm quartz cells on an Evolution 600 spectrophotometer. The quantum yields were measured in a Hamamatsu Photonics Quantaaurus-QY instrument at 300–950 nm.

3.13.3 Crystallography

Crystals were mounted in inert oil glass fibres and transferred to the cold gas stream of an Xcalibur Oxford Diffraction diffractometer equipped with a low-temperature attachment. Data were collected using monochromated Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å). Scan type ω . Absorption corrections based on multiple scans were applied with the program SADABS⁴⁴ or using spherical harmonics implemented in SCALE3 ABSPACK scaling algorithm.⁴⁵ The structures were solved by direct methods and refined on F^2 using the program SHELXL-97.⁴⁶ All nonhydrogen atoms were refined anisotropically. In most of the cases, hydrogen atoms were included in calculated positions and refined using a riding model; some of the hydrogen atoms have been located in the diffraction map. Refinements were carried out by full-matrix least-squares on F^2 for all data.

3.13.4 Procedures

Antiproliferative Studies: MTT Assay.

Exponentially growing cells (A549) were seeded at a density of $\sim 1 \times 10^4$ cells per well in 96-well flat-bottomed microplates and allowed to attach for 24 h prior to addition of compounds. The complexes were dissolved in DMSO and added to cells in concentrations ranging from 1.25 to 50 μM in quadruplicate. Cells were incubated with the compounds for 24 h or 72 h at 37 °C. MTT (10 μL , 5 mg mL^{-1}) was added to each well, and plates were incubated for 2 h at 37 °C. Finally, the growth media was eliminated, and DMSO (100 μL per well) was added to dissolve the formazan precipitates. The optical density was measured at 550 nm using a 96-well multiscanner autoreader (ELISA). The IC_{50} was calculated by nonlinear regression analysis.

Cell Fluorescence Microscopy Study.

European Collection of Cell Cultures were maintained in 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid (Hepes) modified minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin. A549 cells were detached from the plastic flask using trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution and suspended in an excess volume of growth medium. The homogeneous cell suspension was then distributed into 24-well flat-bottomed microplates over a coverslip placed inside each well, and they were allowed to attach for 24 h prior to addition of compounds. Complexes were added (10 μ L) to the cells up to the desired final concentration (from 5 μ M to 25 μ M). After incubation for 4 h or 24 h at 37 °C, the growth medium was removed, and 0.5 mL of PBS was added for a washing step (three times). Thereafter, 0.5 mL of paraformaldehyde (4%) was added and allowed to stand for 15 min at room temperature. Eventually the paraformaldehyde was removed, and further washings with PBS were performed (3 \times 0.5 mL). The coverslips were collected from the 24-well plate, immersed for 1 or 2 s in distilled water, and let them to drip the water. Then, they are placed over a microscope slide, where a drop of fluoromount with 2 μ M DRAQ5 was previously placed. Preparations were viewed using an Olympus FV10-i oil-type compact confocal laser microscope using a 10 \times or 60 \times objective, with excitation wavelength at 405 and 650 nm.

Flow cytometry assay.

Cells were treated for 24 h with compound **4** at 5, 10 and 25 μ M. Then, they were trypsinized and incubated at 37 °C for 5 minutes in ABB (140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4) containing 0.5 mg·mL⁻¹ of either annexin V-DY634 or 7-AAD. Finally, the cells were diluted to 0.5 mL with ABB and analysed by flow cytometry (FACScan, BD Biosciences, Spain).

Thioredoxin inhibition assay.

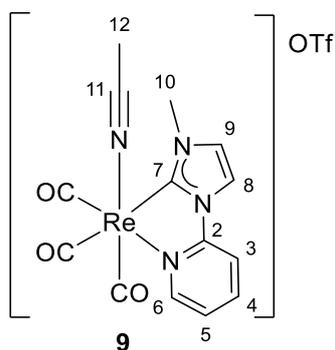
For determination of the thioredoxin reductase activity, A549 cells were incubated for 9 h with our compound at different concentrations near IC₅₀ values. Cells were collected and washed with PBS and 150 μ L of buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7.6, 10% v/v glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM

sodium pyrophosphate, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ leupeptin, 10 mM NaF, 1 mM sodium methylsulphonium) for 30 min at 0 °C, and centrifuged at 200 g for 10 min at 4 °C. The protein was quantified using the BCA protein assay (Thermo Scientific) and 80 μg was added in each assay. Kinetic studies were performed in a buffer containing 0.2 M NaCl, H-phosphate pH 7.4, 2 mM EDTA, 0.25 mM NADPH and 3 mM DTNB. The increase in the absorbance was measured at 412 nm for 5 min at 25 °C.

Intracellular peroxides (ROS) formation.

The production of ROS (Reactive Oxygen Species) was assessed using the dichlorofluorescein (DCF) assay.⁴⁷ Caco-2/TC7 cells were plated in 96-well plates at a density of 4000 cells per well and incubated for 24 h under standard cell culture conditions. For treatment, **4** was added to cells within its IC_{50} concentration that of IC_{50} and incubated 24 h; mock treated cells were just incubated with DMSO at the same concentration than treated cells. Then, cells were washed twice with PBS and 100 μL of 20 mM DCFH-DA (dichloro-dihydrofluoresceindiacetate) were added to each well. Cells were incubated 1 h at 37 °C and washed twice with PBS; finally, 100 μL of PBS were added and fluorescence was analyzed with DTX-880 (Beckman Counter). Excitation and emission settings were 485 and 535 nm, respectively. The intensity of fluorescence is considered as a reflection of total intracellular ROS.

3.13.5 Syntheses



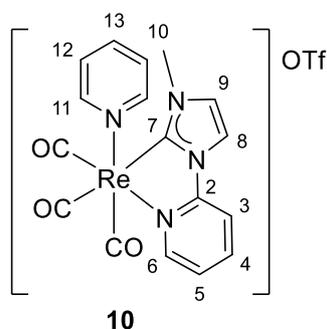
To a stirred solution of **Re 2** (83 mg, 0.178 mmol) in CH_3CN (20 mL) was added AgOTf (50.4 mg, 0.196 mmol) and refluxed over 5 h 30 in the dark. The suspension was filtered over celite and the solvent reduced to minimum volume. The addition of

ether afforded an oil which was triturated in cold to afford compound **9** as a white solid (83 mg, 79 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.76 (ddd, *J* = 5.6, 1.6, 0.7 Hz, 1H, H₆), 8.25 (ddd, *J* = 8.4, 7.6, 1.6 Hz, 1H, H₄), 8.14 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₈ or H₉), 8.13 – 8.10 (ddd, *J* = 8.4, 1.2, 0.7 Hz, 1H, H₃), 7.44 (ddd, *J* = 7.5, 5.6, 1.2 Hz, 1H, H₅), 7.29 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₈ or H₉), 4.02 (s, 3H, H₁₀), 2.22 (s, 3H, H₁₂). **¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂):** δ 195.00 (s, CO), 194.72 (s, CO), 189.22 (s, CO), 186.96 (s, C₇), 154.26 (s, C₂), 153.84 (s, C₆), 143.66 (s, C₄), 125.82 (s, C₈ or C₉), 124.83 (s, C₅), 118.90 (s, C₈ or C₉), 114.32 (s, C₃), 39.78 (s, C₁₀), 4.32 (s, C₁₂). **IR (cm⁻¹):** 3155 ν (C_{Ar}-H), 2027, 1882 ν (CO), 1621 ν (C_{Ar}=N). **HRMS (m/z):** 471.0470 [M-OTf], C₁₄H₁₂N₄O₃Re (471.0462), 430.0212 [M-(OTf + CH₃CN)], C₁₂H₁₀N₃O₃Re.

General procedure for coordination of the axial ligand:

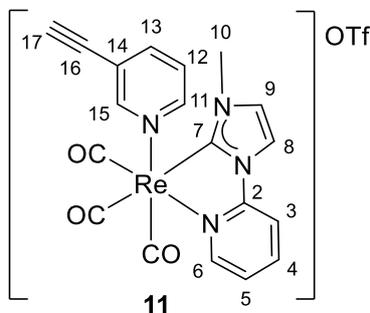
To a stirred solution of **9** in THF was added the corresponding ligand and the reaction mixture was heated several hours until consumption of the starting material. The solvent was then evaporated and the crude mixture redissolved in DCM. Filtration over celite followed by addition of ether afforded the desired product as a solid.



Compound **9** (86.1 mg, 0.139 mmol), and pyridine (1.251 mmol, 102 μL) were reacted in THF (5 mL) at 65 °C during 24 h following general procedure to afford compound **10** as a pale yellow solid (76.3 mg, 83 %).

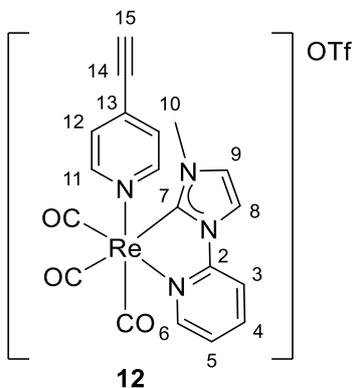
¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.89 (ddd, *J* = 5.6, 1.6, 0.7 Hz, 1H, H₆), 8.26 (ddd, *J* = 8.4, 7.5, 1.6 Hz, 1H, H₄), 8.24 (dt, *J* = 5.0, 1.6 Hz, 2H, H₁₁), 8.18 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₈), 8.16 – 8.12 (ddd, *J* = 8.4, 1.2, 0.7 Hz, 1H, H₃), 7.82 (tt, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H, H₁₃), 7.50 (ddd, *J* = 7.5, 5.6, 1.2 Hz, 1H, H₅), 7.35 – 7.30 (m, 3H, H₉ + H₁₂). **¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂):** δ 197.68 (s, CO), 197.20 (s, CO), 190.66 (s, CO), 190.35 (s, C₇), 154.13 (s, C₁₁), 153.35 (s, C₆), 144.04 (s, C₄), 139.72 (s, C₁₃), 127.49 (s, C₁₂), 126.21 (s,

C₈), 125.47 (s, C₅), 119.15 (C₉), 114.66 (s, C₃), 39.80 (s, C₁₀). **IR** (cm⁻¹): 3117 ν(C_{Ar}-H), 2018, 1895 ν(CO), 1619 ν(C_{Ar}=N). **HRMS** (m/z): 509.0616 [M-OTf], C₁₇H₁₄N₄O₃Re (509.0618).



Compound **9** (30 mg, 0.048 mmol) and 3-ethynylpyridine (25 mg, 0.242 mmol) were reacted in THF (5 mL) at 40 °C for 32 h following general procedure to afford compound **11** as a red solid (23.7 mg, 72 %).

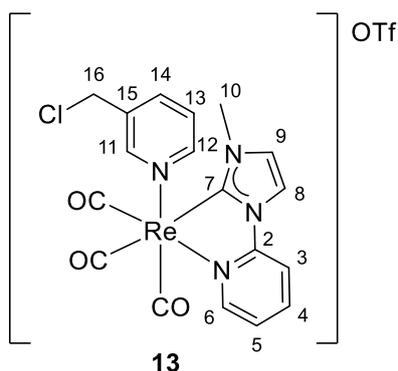
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ 8.99 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H₆), 8.39 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, H₁₅), 8.26-8.20 (m, 2H, H₄ + H₁₁), 7.93 – 7.89 (dt_{ap}, *J* = 8.0, 1.6 Hz, 1H, H₁₃), 7.89 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₈), 7.85 (dm, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₃), 7.52 (ddd, *J* = 7.5, 5.6, 1.1 Hz, 1H, H₅), 7.39 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₉), 7.29 (ddd, *J* = 8.0, 5.7, 0.6 Hz, 1H, H₁₂), 4.10 (s, 3H, H₁₀), 3.70 (s, 1H, H₁₇). **¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN):** δ 197.62 (s, CO), 191.29 (s, CO), 190.33 (s, C₇), 157.11 (s, C₁₅), 154.79 (s, C₁₁), 154.73 (s, C₆), 154.58 (s, C₂), 144.12 (s, C₄), 143.04 (s, C₁₃), 127.30 (s, C₁₂), 126.75 (s, C₉), 125.76 (s, C₅), 123.00 (s, C₁₄), 118.96 (s, C₈), 114.53 (s, C₁₃), 84.83 (s, C₁₇), 39.87 (s, C₁₀). **IR** (cm⁻¹): 3238 ν(C_{Ar}-H), 2113 ν(C≡C), 2022, 1895 ν CO), 1618 ν(C_{Ar}=N). **HRMS** (m/z): 533.0620 [M-OTf], C₁₉H₁₄AuN₄O₃Re (533.0618).



4-ethynylpyridine hydrochloride (85 mg, 0.609 mmol) was dissolved in a saturated aqueous solution of NaHCO₃ and extracted with DCM. The organic phase was dried

with anhydrous sodium sulfate and evaporated. Then the ligand was reacted with **9** (30 mg, 0.0484 mmol) in THF (5 mL) following general procedure to afford compound **12** as a brown solid (29.2 mg, 88 %).

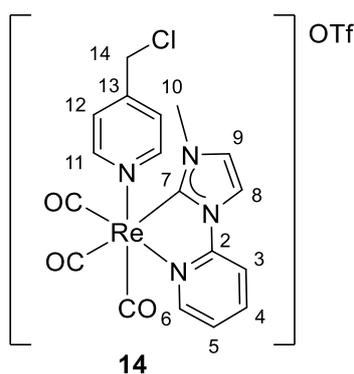
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ 8.88 (ddd, *J* = 5.6, 1.6, 0.7 Hz, 1H, H₆), 8.26 (ddd, *J* = 8.4, 7.5, 1.7 Hz, 1H, H₄), 8.21 (dd, *J* = 5.1, 1.5 Hz, 2H, H₁₁), 8.19 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₉), 8.16 (ddd, *J* = 8.4, 1.7, 1.2 Hz, 1H, H₃), 7.50 (ddd, *J* = 7.5, 5.6, 1.2 Hz, 1H, H₅), 7.35 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₈), 7.33 (dd, *J* = 5.1, 1.5 Hz, 2H, H₁₂), 4.12 (s, 3H, H₁₀), 3.62 (s, 1H, H₁₅). **¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂):** δ 197.44 (s, CO), 197.01 (s, CO), 190.33 (s, CO or C₇), 190.27 (s, CO or C₇), 154.10 (s, C₁₂), 154.06 (s, C₂), 153.47 (s, C₆), 144.07 (s, C₄), 134.16 (s, C₁₃), 129.75 (s, C₁₂), 126.33 (s, C₉), 125.59 (s, C₃), 119.12 (s, C₈), 114.68 (s, C₅), 87.57 (s, C₁₅), 79.48 (s, C₁₄), 39.80 (s, C₁₀). **IR (cm⁻¹):** 3236 ν(C_{Ar}-H), 2117 ν(C≡C), 2019, 1908 ν(CO), 1620 ν(C_{Ar}=N). **HRMS (m/z):** 533.0644 [M-OTf], C₁₉H₁₄AuN₄O₃Re (533.0618).



3-chloromethylpyridine hydrochloride (79.4 mg, 0.484 mmol) was dissolved in a saturated aqueous solution (20 mL) and extracted with ether (3 x 15 mL). The combined organic phases were washed with brine (20 mL) and dried over anhydrous sodium sulfate. Ether was evaporated, and the resulting oil was redissolved in THF (5 mL) and added to a Schlenk containing compound **9** (30 mg, 0.048 mmol). General procedure was then followed, heating the reaction mixture 28 h at 40 °C to afford the desired product as a beige solid (27 mg, 80 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.91 (ddd, *J* = 5.6, 1.6, 0.6 Hz, 1H, H₆), 8.30 (dd, *J* = 1.4, 0.6 Hz, 1H, H₁₁), 8.25 (ddd, *J* = 8.4, 7.6, 1.7 Hz, 1H, H₄), 8.16 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₈), 8.16 – 8.11 (m, 2H, H₁₂ + H₃), 7.84 (ddd, *J* = 8.0, 2.0, 1.4 Hz, 1H, H₁₄), 7.52 (ddd, *J* = 7.5, 5.6, 1.1 Hz, 1H, H₅), 7.35 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₉), 7.36 – 7.32 (m, 1H, H₁₃). **¹³C**

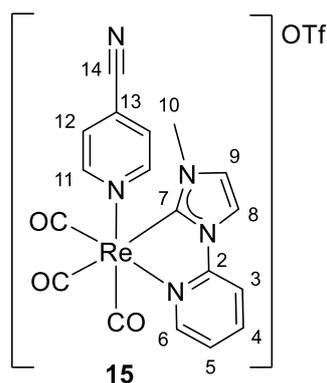
NMR (101 MHz, CD₂Cl₂): δ 197.50 (s, CO), 197.05 (s, CO), 190.37 (s, CO), 190.25 (s, C₇), 154.08 (s, C₂), 153.64 (s, C₁₁ or C₁₂), 153.61 (s, C₁₁ or C₁₂), 153.41 (s, C₆), 144.05 (s, C₄), 139.60 (s, C₁₄), 137.53 (s, C₁₅), 127.32 (s, C₁₃), 126.22 (s, C₉), 125.53 (s, C₅), 119.15 (s, C₈), 114.69 (s, C₃), 42.37 (s, C₁₆), 39.80 (s, C₁₀). **IR (cm⁻¹):** 3132 ν (C_{Ar}-H), 2021, 1900 ν (CO), 1618 ν (C_{Ar}=N). **HRMS (m/z):** 557.0408 [M-OTf], C₁₈H₁₅N₄O₃Re (557.0376).



Compound **14** was synthesized following the same procedure described for **13** starting from 4-chloromethylpyridine hydrochloride (39.4 mg, 0.24 mmol). Extraction was carried out with dichloromethane instead of ether, and the reaction was completed in 1 night. Pale yellow solid (27 mg, 80 %).

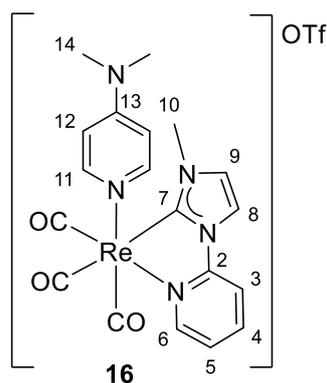
¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.89 (ddd, J = 5.6, 1.7, 0.8 Hz, 1H, H₆), 8.25 (dd, J = 8.4, 7.6, 1.7 Hz, 1H, H₄), 8.23 – 8.21 (m, 2H, H₁₁), 8.14 (d, J = 2.2 Hz, 1H, H₈), 8.10 (dt, J = 8.4, 1.2, 0.8 Hz, 1H, H₃), 7.50 (ddd, J = 7.6, 5.6, 1.2 Hz, 1H, H₅), 7.37 – 7.33 (m, 3H, H₁₂ + H₉), 4.52 (s, 2H, H₁₄), 4.13 (s, 3H, H₁₀). **¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂):** δ 197.56 (s, CO), 197.08 (s, CO), 190.47 (s, CO or C₇), 190.30 (s, CO or C₇), 154.32 (s, C₁₁), 154.06 (s, C₂), 153.38 (s, C₆), 150.31 (s, C₁₃), 144.01 (s, C₄), 126.59 (s, C₁₂), 126.20 (s, C₉), 125.49 (s, C₅), 119.05 (s, C₈), 114.60 (s, C₃), 43.64 (s, C₁₄), 39.81 (s, C₁₀).

HRMS (m/z): 557.0388 [M-OTf], C₁₈H₁₅ClN₄O₃Re (557.0376)



Compound **9** (30 mg, 0.048 mmol) and 4-cyanopyridine (25.7 mg, 0.242 mmol) were reacted 1 night in THF (5 mL) at 40 °C following general procedure to afford **15** as a beige solid (29 mg, 88 %).

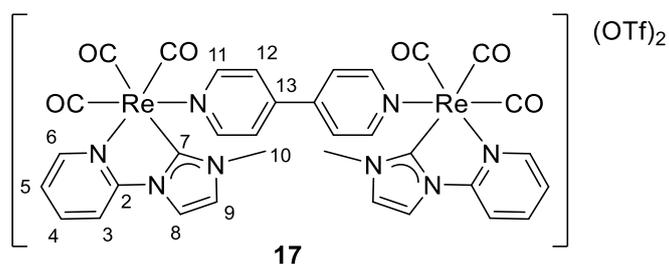
¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.88 (ddd, *J* = 5.6, 1.6, 0.7 Hz, 1H, H₆), 8.49 (dd, *J* = 5.2, 1.5 Hz, 2H, H₁₁), 8.26 (ddd, *J* = 8.4, 7.6, 1.7 Hz, 1H, H₄), 8.11 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₈), 8.10 (ddd, *J* = 8.4, 1.2, 0.7 Hz, 1H, H₃), 7.60 (dd, *J* = 5.2, 1.5 Hz 2H, H₁₂), 7.51 (ddd, *J* = 7.5, 5.6, 1.2 Hz, 1H, H₅), 7.34 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₉), 4.12 (s, 3H, H₁₀). **¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂):** δ 197.20 (s, CO), 196.66 (s, CO), 190.02 (s, CO), 189.70 (s, C₇), 155.55 (s, C₁₁), 154.10 (s, C₂), 153.45 (s, C₆), 144.10 (s, C₄), 129.43 (s, C₁₂), 126.36 (s, C₉), 125.66 (s, C₅), 123.58 (s, C₁₃), 119.27 (s, C₈), 115.32 (s, C₁₄), 114.94 (s, C₃), 39.92 (s, C₁₀). **IR (cm⁻¹):** 3133 ν(C_{Ar}-H), 2239 ν(C≡N), 2022, 1896 ν(CO), 1622 ν(C_{Ar}=N). **HRMS (m/z):** 534.0568 [M-OTf], C₁₈H₁₃N₅O₃Re (534.0571).



Compound **9** (29 mg, 0.047 mmol) and 4-dimethylaminopyridine (30.2 mg, 0.242 mmol) were reacted 1 night in THF (5 mL) at 40 °C following general procedure to afford **16** as a pale yellow solid (23.1 mg, 70 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.88 – 8.84 (m, 1H, H₆), 8.22 (ddd, *J* = 8.4, 7.1, 1.7 Hz 1H, H₄), 8.17 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₈), 8.12 (dm, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₃), 7.60 (dd, *J* = 6.0,

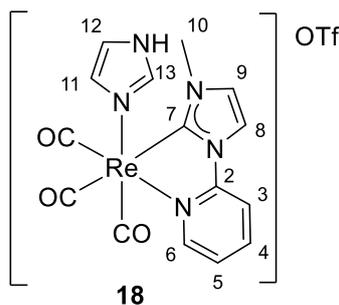
1.3 Hz, 2H, H₁₁), 7.46 (ddd, $J = 7.1, 5.7, 1.0$ Hz, 1H, H₅), 7.32 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H₉), 6.29 (dd, $J = 6.0, 1.3$ Hz, 2H, H₁₂), 4.11 (s, 3H, H₁₀), 2.94, (s, 6H, H₁₄). **¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂):** δ 198.16 (s, CO), 197.83 (s, CO), 191.49 (s, C₇), 190.92 (s, CO), 154.79 (s, C₁₃), 154.04 (s, C₂), 153.22 (s, C₆), 152.67 (s, C₁₁), 143.67 (s, C₄), 125.89 (s, C₉), 125.11 (s, C₅), 118.93 (s, C₈), 114.40 (s, C₃), 108.86 (s, C₁₂), 39.68 (s, C₁₀), 39.54 (s, C₁₄). **IR (cm⁻¹):** 3120 ν (C_{Ar}-H), 2022, 1875 ν (CO), 1624 ν (C_{Ar}=N). **HRMS (m/z):** 552.1066 [M-OTf], C₁₉H₁₉N₅O₃Re (552.1040).



Compound **9** (30 mg, 0.048 mmol) and 4,4'-bipyridyl (3.9 mg, 0.024 mmol) were reacted in THF (5 mL) at 40 °C for 6 days. The product precipitated directly in THF and was isolated by filtration, washing with cold THF and ether to afford **17** as a grey yellow solid (19.5 mg, 62 %).

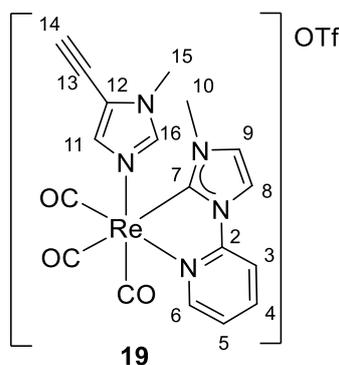
¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO): δ 9.23 (dm, $J = 5.6$, Hz, 1H, H₆), 8.73 (dd, $J = 5.3, 1.5$ Hz, 1H, H₁₁), 8.39 (ddd, $J = 8.4, 7.6, 1.6$ Hz, 1H, H₄), 8.33 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H₉), 8.23 (dm, $J = 8.4$ Hz, 1H, H₃), 7.79 (dd, $J = 5.3, 1.6$ Hz, 1H, H₁₂), 7.72 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H₉), 7.70 (ddd, $J = 7.5, 5.6, 1.1$ Hz, 1H, H₅), 4.28 (s, 3H, H₁₀). **¹³C NMR (101 MHz, (CD₃)₂CO):** δ 197.57 (s, CO), 197.53 (s, CO), 191.35 (s, CO), 190.02 (s, C₇), 156.13 (s, C₁₁), 154.84 (s, C₆), 154.58 (s, C₂), 146.48 (s, C₁₃), 144.38 (s, C₄), 127.04 (s, C₉), 126.06 (s, C₅), 125.28 (s, C₁₂), 119.11 (s, C₈), 114.48 (s, C₃), 39.63 (s, C₁₀). **IR (cm⁻¹):** 3123 ν (C_{Ar}-H), 2021, 1894 ν (CO), 1616 ν (C_{Ar}=N). **HRMS (m/z):** 586.0902 [M-OTf], C₂₂H₁₇N₅O₃Re (586.0884).

3.13 Experimental



Compound **9** (44.4 mg, 0.072 mmol), and imidazole (4.9 mg, 0.072 mmol) were reacted in THF (5 mL) at 40 °C during 24 h following general procedure to afford **18** as a beige solid (30.7 mg, 66 %).

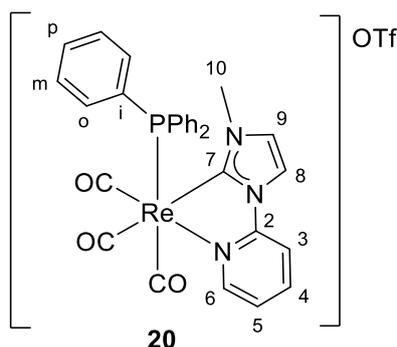
¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 11.63 (s, 1H, H, H_{imidazole}), 8.86 (dm, *J* = 5.6 Hz, 1H, H₆), 8.19 – 8.12 (m, 1H, H₄), 7.76 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₈), 7.72 (dm, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₃), 7.42 (ddd, *J* = 7.4, 5.6, 1.0 Hz, 1H, H₅), 7.26 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H₉), 7.21 (s, 1H, H₁₃), 6.92 (s, 1H, H₁₁), 6.76 (s, 1H, H₁₂), 4.07 (s, 3H, H₁₀). **¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂):** δ 197.58 (s, CO), 197.21 (s, CO), 191.19 (s, CO), 191.06 (s, C₇), 153.84 (s, C₆), 153.64 (s, C₂), 143.11 (s, C₄), 131.29 (s, C₁₂ or C₁₁), 125.86 (s, C₉), 125.08 (s, C₅), 119.11 (s, C₁₂ or C₁₁), 117.76 (s, C₈), 113.34 (s, C₃), 39.86 (s, C₁₀). **IR (cm⁻¹):** 3122 ν(C_{Ar}-H), 2015, 1911, 1887 ν(CO), 1619 ν(C_{Ar}=N). **HRMS (m/z):** 498.0591 [M-OTf], C₁₅H₁₃N₅O₃Re (498.0571).



Compound **9** (56.6 mg, 0.091 mmol) and 5-ethynyl-1-methyl-1H-imidazole (9.6 μL, 0.091 mmol) were reacted in THF (5 mL) at 40 °C for 24 h. Purification was carried out by recrystallization in acetone/ether to afford **19** as a grey solid (49.6 mg, 80 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.81 (ddd, *J* = 5.6, 1.6, 0.6 Hz, 1H, H₆), 8.20 (ddd, *J* = 8.4, 7.6, 1.6 Hz, 1H, H₄), 8.07 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₈), 8.03 (ddd, *J* = 8.4, 1.1, 0.6 Hz, 1H, H₃), 7.42 (ddd, *J* = 7.5, 5.6, 1.1 Hz, 1H, H₅), 7.32 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₉), 7.30 (s_{ap}, 1H, H₁₆), 6.96 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, H₁₁), 4.06 (s, 4H, H₁₀), 3.59 (s, 3H, H₁₅), 3.56 (s, 1H,

H₁₄). **¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂):** δ 197.44 (s, CO), 197.08 (s, CO), 190.78 (s, CO or C₇), 189.71 (s, CO or C₇), 153.88 (s, C₂), 153.53 (s, C₆), 143.38 (s, C₄), 142.56 (s, C₁₆), 136.78 (s, C₁₁), 126.05 (s, C₉), 125.06 (s, C₅), 118.74 (s, C₈), 118.18 (s, C₁₂), 114.37 (s, C₃), 87.24 (s, C₁₄), 69.24 (s, C₁₃), 39.86 (s, C₁₀), 33.58 (s, C₁₅). **IR (cm⁻¹):** 3122 ν(C_{Ar}-H), 2015, 1945, 1887 ν(CO), 1619 ν(C_{Ar}=N). **HRMS (m/z):** 536.0738 [M-OTf], C₁₈H₁₅N₅O₃Re (536.0732).

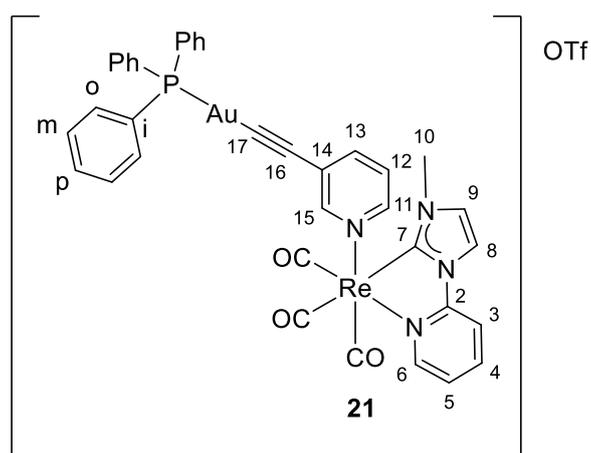


Compound **9** (40.4 mg, 0.065 mmol) and triphenylphosphine (282.96 mg, 1.08 mmol) were reacted in THF (5 mL) at 40 °C for 1 day. Purification was carried out by silicagel column chromatography using 8/2 to 6/4 DCM/acetone to afford **20** as a white solid (36.2 mg, 66 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ 8.51 (dd, $J = 5.7$ Hz, 1.6 Hz, 1H, H₂), 7.97 (td, $J = 8.3$, 1.6 Hz, 1H, H₄), 7.82 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H₇), 7.60 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H₅), 7.48 – 7.41 (m, 3H, *p*-H, Ph), 7.40 – 7.31 (m, 6H, *m*-H, Ph), 7.21 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H₈), 7.18 – 7.11 (m, 7H, H₃ + *p*-H, Ph), 3.37 (s, 3H, H₁₀). **³¹P NMR (121 MHz, CD₃CN):** δ 14.75 (s). **¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN):** δ 196.90 (d, $^2J_{P-C} = 9.0$ Hz, CO), 196.45 (d, $^2J_{P-C} = 8.2$ Hz, CO), 187.28 (d, $^2J_{P-C} = 54.3$ Hz, C₉), 185.79 (d, $^2J_{P-C} = 10.5$ Hz, CO), 155.24 (s, C₂), 153.64 (s, C₆), 142.90 (s, C₄), 133.70 (d, $^2J_{P-C} = 10.8$ Hz, 6C, *o*-C, Ph), 132.02 (d, $^4J_{P-C} = 2.3$ Hz, 3C, *p*-C, Ph), 131.46 (d, $^1J_{P-C} = 46.3$ Hz, 3C, *ipso*-C, Ph), 130.06 (d, $^3J_{P-C} = 9.9$ Hz, 6C, *m*-C, Ph), 127.03 (s, C₈), 125.15 (s, C₃), 119.09 (s, C₇), 113.90 (s, C₅), 39.06 (s, C₁₀). **IR (cm⁻¹):** 3125 ν(C_{Ar}-H), 2026, 1943, 1906 ν(CO), 1617 ν(C_{Ar}=N). **HRMS (m/z):** 692.1061 [M-OTf], C₃₀H₂₄N₃O₃PRe (692.1108).

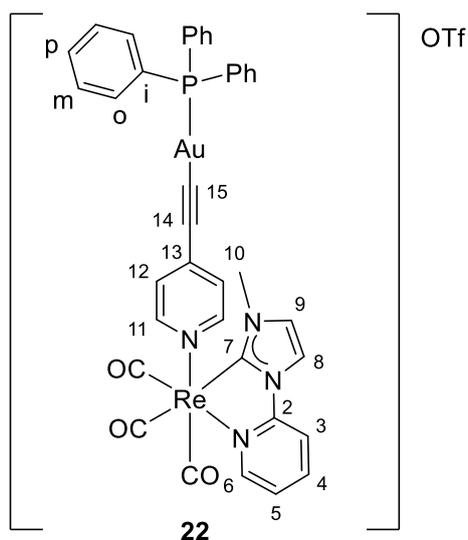
General procedure for gold addition

To a stirred solution of rhenium compound in acetonitrile (5 mL) was added Au(acac)PPh₃. After 5 hours at r.t. in the dark, the solution was filtered over celite and concentrated to dryness. Redissolution in DCM and addition of ether afforded the desired product as a solid.



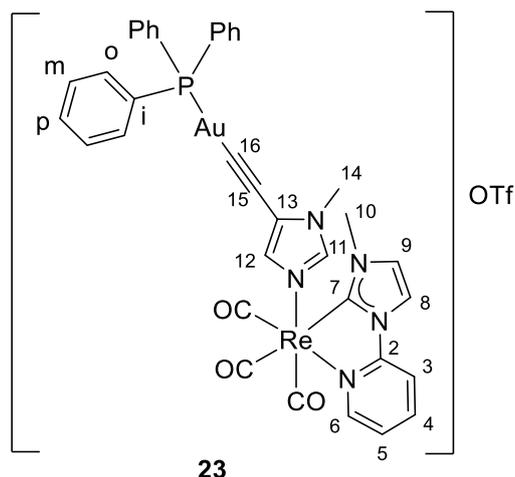
11 (58 mg, 0.085 mmol) and Au(acac)PPh₃ (47.5 mg, 0.085 mmol) were reacted in DCM (5 mL) affording the desired product as an orange solid (32.6 mg, 34 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.89 (dd, *J* = 5.6, 1.6 Hz, 1H, H₆), 8.37 – 8.36 (m, 1H, H₁₅), 8.26 (ddd, *J* = 8.5, 7.6, 1.6 Hz, 1H, H₄), 8.21 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₈), 8.17 (d_{br}, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₃), 7.87 (dd, *J* = 5.6, 1.4 Hz, 1H, H₁₁), 7.76 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H, H₁₃), 7.60 – 7.46 (m, 20H, H_{Ar}+H₅), 7.34 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₉), 7.16 (ddd, *J* = 8.0, 5.7, 0.6 Hz, 1H, H₁₂), 4.13 (s, 3H, H₁₀). **³¹P NMR (162 MHz, CD₃CN):** δ 41.49. **¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂):** δ 197.58 (s, CO), 197.10 (s, CO), 190.64 (s, C₇), 190.24 (s, CO), 157.05 (s, C₁₅), 154.14 (s, C₂), 153.36 (s, C₆), 150.61 (s, C₁₁), 144.11 (s, C₄), 142.26 (s, C₁₃), 134.78 (d, ²*J*_{P-C} = 13.8 Hz, 6C, *o*-C, Ph), 132.39 (d, ⁴*J*_{P-C} = 2.2 Hz, 3C, *p*-C, Ph), 129.91 (d, ¹*J*_{P-C} = 56.3 Hz, 3C, *ipso*-C, Ph), 129.86 (d, ²*J*_{P-C} = 11.4 Hz, 6C, *m*-C, Ph), 126.69 (s, C₁₂), 126.47 (s, C₁₄), 126.25 (s, C₉), 125.51 (s, C₅), 119.23 (s, C₈), 114.68 (s, C₃), 39.81 (s, C₁₀). **IR (cm⁻¹):** 3124 ν(C_{Ar}-H), 2125 ν(C≡C), 2023, 1900 ν(CO), 1617 ν(C_{Ar}=N). **HRMS (m/z):** 991.1122 [M-OTf], C₃₇H₂₈AuN₄O₃Pre (991.1118).



12 (30 mg, 0.044 mmol) and Au(acac)PPh₃ (24.6 mg, 0.044 mmol) were reacted in acetonitrile (5 mL) following general procedure for gold addition to afford the desired product as a red solid (31.2 mg, 62 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.89 (dd, *J* = 5.6, 0.9 Hz, 1H, H₆), 8.37 – 8.35 (m, 1H, H₁₄), 8.29 – 8.23 (m, 1H, H₄), 8.21 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₈), 8.17 (dm, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₃), 7.88 – 7.85 (dm, *J* = 5.7 Hz, 1H, H₁₁), 7.76 (dm, *J* = 8.0 Hz, 1H, H₁₃), 7.61 – 7.46 (m, 15H, H_{Ar}), 7.34 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₉), 7.17 (ddd, *J* = 8.0, 5.7, 0.7 Hz, 1H, H₁₂), 4.13 (s, 3H, H₁₀). **³¹P NMR (162 MHz, CD₂Cl₂):** δ 41.53. **¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂):** δ 197.66 (s, CO), 197.23 (s, CO), 190.59 (s, C₇), 190.45 (s, CO), 154.06 (s, C₆), 153.28 (s, 3C, C₁₁+C₂), 144.01 (s, C₄), 137.49 (s, C₁₃), 134.74 (d, ²*J*_{P-C} = 13.8 Hz, 6C, *o*-C, Ph), 132.35 (d, ⁴*J*_{P-C} = 2.4 Hz, 3C, *p*-C, Ph), 129.81 (d, ²*J*_{P-C} = 11.4 Hz, 6C, *m*-C, Ph), 129.75 (d, ¹*J*_{P-C} = 56.9 Hz, 3C, *ipso*-C, Ph), 129.71 (s, 2C, C₁₂), 126.16 (s, C₉), 125.41 (s, C₃), 119.17 (s, C₈), 114.64 (s, C₅), 39.76 (s, C₁₀). **IR (cm⁻¹):** 3124 ν(C_{Ar}-H), 2117 ν(C≡C), 2021, 1897 ν(CO), 1602 ν(C_{Ar}=N). **HRMS (m/z):** 991.1121 [M-OTf], C₃₇H₂₈AuN₄O₃Pre (991.1118).



19 (17.8 mg, 0.026 mmol) and Au(acac)PPh₃ (14.6 mg, 0.026 mmol) were reacted in acetonitrile (5 mL) following general procedure for gold addition to afford the desired product as a beige solid (16.8 mg, 52 %).

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.81 (ddd, *J* = 5.6, 1.6, 0.7 Hz, 1H, H₆), 8.20 (ddd, *J* = 8.4, 7.6, 1.7 Hz, 1H, H₄), 8.09 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₈), 8.04 (ddd, *J* = 8.4, 1.2, 0.7 Hz, 1H, H₃), 7.60 – 7.45 (m, 16H, H_{Ar}), 7.41 (ddd, *J* = 7.5, 5.6, 1.2 Hz, 1H, H₅), 7.31 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, H₉), 7.15 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H₁₁), 6.59 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H₁₂), 4.06 (s, 3H, H₁₀), 3.57 (s, 3H, H₁₄). **³¹P NMR (162 MHz, CD₂Cl₂):** δ 41.58. **¹³C NMR (75 MHz, CD₂Cl₂):** δ 197.55 (s, CO), 190.13 (s, CO or C₇), 153.85 (s, C₂), 153.50 (s, C₆), 143.36 (s, C₄), 140.63 (s, C₁₁), 134.74 (d, ²*J* = 14.4 Hz, 6C, *o*-C, Ph), 133.93 (s, C₁₂), 132.35 (s, *p*-C, Ph), 129.86 (d, ¹*J*_{P-C} = 57.3 Hz, 3C, *ipso*-C, Ph), 129.73 (d, ³*J*_{P-C} = 12.0 Hz, 6C, *m*-C, Ph), 125.94 (s, C₉), 125.00 (s, C₅), 120.97 (s, C₁₃), 118.64 (s, C₈), 114.16 (s, C₃), 39.81 (s, C₂), 33.25 (s, C₂). **IR (cm⁻¹):** 3127 ν(C_{Ar}-H), 2019, 1893 ν(CO), 1617 ν(C_{Ar}=N). **HRMS (m/z):** 994.1238 [M-OTf], C₃₆H₂₉AuN₅O₃Pre (994.1227).

3.13.6 References

- ¹ Y. Jiang, O. Blacque, T. Fox, C. M. Frech, H. Berke, *Organometallics*, **2009**, *28*, 5493 – 5504.
- ² N. P. Liyanage, H. A. Dulaney, A. J. Huckaba, J. W. Jurss, J. H. Delcamp, *Inorg. Chem.*, **2016**, *55*, 6085 – 6094.
- ³ T.-C. Su, Y.-H. Liu, S.-M. Peng, S.-T. Liu, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2013**, *13*, 2362 – 2367.
- ⁴ X.-W. Li, H.-Y. Li, G.-F. Wang, F. Chen, Y.-Z. Li, Y.-T. Chen, Y.-X. Zheng, Z.-L. Xue, *Organometallics*, **2012**, *31*, 3829 – 3835.
- ⁵ L. A. Casson, S. Muzzioli, P. Raiteri, B. W. Skelton, S. Stagni, M. Massi, D. H. Brown, *Dalton Trans.*, **2011**, *40*, 11960 – 11967.
- ⁶ R. A. Kirgan, B. P. Sullivan, D. Paul Rillema, *Top. Curr. Chem.*, **2007**, *281*, 45 – 100.
- ⁷ L. C.-C. Lee, K.-K. Leung, K. K.-W. Lo, *Dalton Trans.*, **2017**, *46*, 16357 – 16380.
- ⁸ a) M. Höckel, P. Vaupel, *J. Natl. Cancer Inst.*, **2001**, *93*, 266 – 276; b) J. M. Brown, *Methods Enzymol.*, **2007**, *435*, 297 – 321; c) Z. Huang, H. Xu, A. D. Meyers, A. I. Musani, L. Wang, R. Tagg, A. B. Barqawi, Y. K. Chen, *Technol. Cancer Res. Treat.*, **2008**, *7*, 309 – 320.
- ⁹ a) K. Wähler, A. Ludewig, P. Szabo, K. Harms, E. Meggers, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2014**, *5*, 807 – 811; b) M. V. Werrett, P. J. Wright, P. V. Simpson, P. Raiteri, B. W. Skelton, S. Stagni, A. G. Buckley, P. J. Rigby, M. Massi, *Dalton Trans.*, **2015**, *44*, 20636 – 20647; c) A. Leodinova, V. Pierroz, R. Rubbiani, J. Heier, S. Ferrari, G. Gasser, *Dalton Trans.*, **2014**, *43*, 4287 – 4294.
- ¹⁰ a) S. C. Marker, S. N. MacMillan, W. R. Zipfel, Z. Li, P. C. Ford, J. J. Wilson, *Inorg. Chem.*, **2018**, *57*, 1311 – 1331. b) I. Chakraborty, S. J. Carrington, J. Hauser, S. R. J. Oliver, P. K. Mascharak, *Chem. Mater.*, **2015**, *27*, 8387 – 8397.
- ¹¹ J. G. Vaughan, B. L. Reid, P. J. Wright, S. Ramchandani, P. J. Wright, S. Muzzoli, B. W. Skelton, P. Raiteri, D. H. Brown, S. Stagni, M. Massi, *Dalton Trans.*, **2013**, *42*, 14100 – 14114.
- ¹² V. Fernández-Moreira, F. L. Thorp-Greenwood, M. P. Coogan, *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 186 – 202.

- ¹³ A. J. Hallet, E. Placet, R. Prioux, D. McCafferty, J. A. Platts, D. Lloyd, M. Isaacs, A. J. Hayes, S. J. Coles, M. B. Pitak, S. Marchant, S. N. Marriot, R. K. Allemann, A. Dervisi, I. A. Fallis, *Dalton Trans.*, **2018**, 47, 14241 – 14253.
- ¹⁴ J. Szychowski, A. Mahdavi, J. J. L. Hodas, J. D. Bagert, J. T. Ngo, P. Landgraf, D. C. Dieterich, E. M. Schuman, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 18351 – 18360.
- ¹⁵ a) A. Raba, M. R. Anneser, D. Jantke, M. Cokoja, W. A. Hermann, F. E. Kühn, *Tetrahedron Lett.*, **2013**, 54, 3384 – 3387; b) R.-T. Zhuang, W.-J. Lin, R. R. Zhuang, W.-S. Hwang, *Polyhedron*, **2013**, 51, 132 – 141.
- ¹⁶ F. H. Allen, O. Kennard, D. G. Watson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans II*, **1987**, S1 – S19.
- ¹⁷ V. Fernández-Moreira, H. Sastre-Martín, *Inorg. Chim. Acta*, **2017**, 460, 127 – 133.
- ¹⁸ A. Casula, V. Nairi, V. Fernández-Moreira, A. Laguna, V. Lippolis, A. Garau, M. C. Gimeno, *Dalton Trans.*, **2015**, 44, 18506 – 18517.
- ¹⁹ a) A. J., Amoroso, R. J. Arthur, M. P. Coogan, J. B. Court, V. Fernández-Moreira, A. J. Hayes, D. Lloyd, C. Millet, S. J. A. Pope, *New J. Chem.*, **2008**, 32, 1097 – 1102; b) J. Yang, J.-X. Zhao, Q. Cao, L. Hao, D. Zhou, Z. Gan, L.-N. Ji, Z.-W. Mao, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9, 13900 – 13912.
- ²⁰ F. L. Thorp-Greenwood, J. A. Platts, M. P. Coogan, *Polyhedron*, **2014**, 67, 505 – 512.
- ²¹ O. S. Wenger, L. M. Hengling, M. W. Day, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Inorg. Chem.*, **2004**, 43, 2043 – 2048.
- ²² a) T. Mukuta, P. V. Simpson, J. G. Vaughan, B. W. Skelton, S. Stagni, M. Massi, K. Koike, O. Ishitani, K. Onda, *Inorg. Chem.*, **2017**, 56, 3404 – 3413; b) J. G. Vaughan, B. L. Reid, P. J. Wright, S. Ramchandani, B. W. Skelton, P. Raiteri, D. H. Brown, S. Stagni, M. Massi, *Inorg. Chem.*, **2014**, 53, 3629 – 3641.
- ²³ H. Hori, K. Koike, M. Ishizuka, K. Takeuchi, T. Ibusuki, O. Ishitani, *J. Organomet. Chem.*, **1997**, 530, 169 – 176.
- ²⁴ R. Chinchilla, C. Nájera, *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 874 – 922.
- ²⁵ J. Vicente, M. T. Chicote, *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 193-195, 1143 – 1161.
- ²⁶ V. Fernández-Moreira, I. Marzo, M. C. Gimeno, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 4434 – 4446.
- ²⁷ a) J. G. Vaughan, B. L. Reid, P. J. Wright, S. Ramchandani, P. J. Wright, S. Muzzoli, B. W. Skelton, P. Raiteri, D. H. Brown, S. Stagni, M. Massi, *Dalton Trans.*, **2013**, 42, 14100 – 14114; b) C. J. Stanton, C. W. Machan, J. E. Vandezande, T. Jin, G. F.

- Majetich, H. F. Schaefer, C. P. Kubiak, G. Li, J. Agarwal, *Inorg. Chem.*, **2016**, *55*, 3136 – 3144.
- ²⁸ M. Obata, A. Kitamura, A. Mori, C. Kameyama, J. A. Czaplewska, R. Tanaka, I. Kinoshita, T. Kusumoto, H. Hashimoto, M. Harada, Y. Mikata, T. Funabiki, S. Yano, *Dalton Trans.*, **2008**, *25*, 3292 – 3300.
- ²⁹ J. Buvaneswari, P. M. Mareeswaran, S. Shanmugasundaram, S. Rajagopal, *Inorg. Chim. Acta*, **2011**, *375*, 205 – 212.
- ³⁰ D. F. Shriver, P. W. Atkins en *Inorganic Chemistry*, 3rd edition, Oxford University Press, 2001, 227 – 236.
- ³¹ L. A. Casson, S. Muzzioli, P. Raiteri, B. W. Skelton, S. Stagni, M. Massi, D. H. Brown, *Dalton Trans.*, **2011**, *40*, 11960 – 11967.
- ³² A. Leonidova, V. Pierroz, R. Rubbiani, J. Heier, S. Ferrari, G. Gasser, *Dalton Trans.*, **2014**, *43*, 4287 – 4294.
- ³³ E. Hatem, S. Azzi, N. El Banna, T. He, A. Héneman-Masurel, L. Vernis, D. Baille, V. Masson, F. Dingli, D. Loew, B. Azzarone, P. Eid, G. Baldacci, M. Er-Huang, *J. Natl. Cancer Inst.*, **2019**, *111*, 1 – 12.
- ³⁴ J. C. Lima, L. Rodríguez, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2011**, *11*, 921 – 928.
- ³⁵ S. Elmore, *Toxicol. Pathol.*, **2007**, *35*, 495 – 516.
- ³⁶ G. Mariño, G. Kroemer, *Cell Res.*, **2013**, *23*, 1247 – 1248.
- ³⁷ S. L. Flink, B. T. Cookson, *Infect. Immun.*, **2005**, *73*, 1907 – 1916.
- ³⁸ Y. K. Dhuriya, D. Sharma, *J. Neuroinflammation*, **2018**, *15*:199.
- ³⁹ D. R. McIlwain, T. Berger, T. W. Mak, *Cold Spring. Harb. Perspect. Biol.*, **2013**, *5*:a008656.
- ⁴⁰ A. J. Kowaltowski, R. F. Castilho, A. E. Vercesi, *FEBS Lett.*, **2001**, *495*, 12 – 15.
- ⁴¹ J. Estaquier, F. Vallette, J.-L. Vayssiere, B. Mignotte en *Advances in mitochondrial medicine*, eds R. Scatena, P. Bottoni, B. Giardina, Springer, 2012, cap 7, 157 – 183.
- ⁴² L. K. Batchelor, E. Paunescu, M. Soudani, R. Scopelliti, P. J. Dyson, *Inorg. Chem.*, **2017**, *56*, 9617 – 9633.
- ⁴³ D. Gibson, B. F. G. Johnson, J. Lewis, *J. Chem. Soc. A*, **1970**, 1730 – 1735.
- ⁴⁴ G. M. Sheldrick, *SADABS, Program for adsorption correction*, University of Göttingen, Göttingen, Germany, **1996**.
- ⁴⁵ *CrysAlisPro, Agilent Technologies, Version 1.171.35.11 Multi-scans absorption correction with SCALE3 ABSPACK scaling algorithm.*

⁴⁶ G. M. Sheldrick, *SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement*, University of Göttingen, Göttingen, Germany, **1997**.

⁴⁷ M. Ruiz-Leal, S. George, *Mar. Environ. Res.*, **2004**, 58, 631 – 635.

Capítulo 4
Complejos de renio y oro conectados
a través del ligando ecuatorial

Capítulo 4

4.1 Objetivos

El principal objetivo de este capítulo es la síntesis de complejos teragnósticos basados en renio(I) y oro(I) conectados a través del ligando diimina (N^N) unido al renio, que vendrá representado por derivados de bipyridina o fenantrolina. La funcionalización del ligando N^N permitirá modular la luminiscencia a la par que incorporar el fragmento de oro. Adicionalmente, se abre así la posibilidad de que tras interacción del fragmento bioactivo con su diana biológica, ocurra un cambio detectable en las propiedades ópticas, permitiendo así conocer el momento exacto de dicha interacción. Por otro lado, el bloqueo de la posición axial con un cloruro permitirá reducir los problemas de síntesis observados en los capítulos anteriores en donde esta posición la ocupaba un ligando más lábil de tipo piridina.

La naturaleza del ligando conector deberá servir para completar el abanico de derivados heterometálicos iniciados en el capítulo 1, y por ello se sintetizarán tres familias de complejos heterometálicos en los que se mantendrá constante un ligando tiolato, alquino o carbeno respectivamente, haciendo variar el ligando auxiliar del oro (X) (figura 4.1).

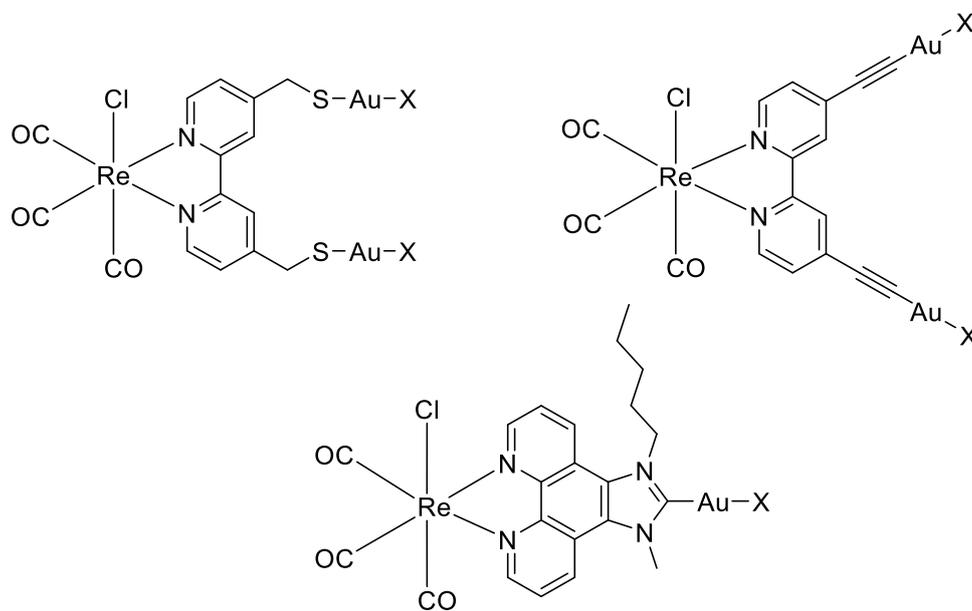


Figura 4.1 Tipos de compuestos heterometálicos cuya síntesis se propone como objetivo.

4.2 Introducción

Como ya se comentó en la introducción general, la idea de emplear complejos heterometálicos de renio y oro para su uso como agentes teragnósticos está completamente inexplorada a excepción del trabajo realizado por el grupo de la prof. Gimeno.¹ Sin embargo, existen en la bibliografía ejemplos de complejos heterometálicos de renio y oro, aunque también platino o iridio, empleando ligandos muy similares a los que se van a tratar en este capítulo (figura 4.2). La mayoría de estos trabajos conectan los dos metales por resonancia con la estrategia de emplear el entorno del renio como antena para la excitación del segundo metal que actúe como catalizador² o que simplemente module las propiedades luminiscentes del complejo de renio.³

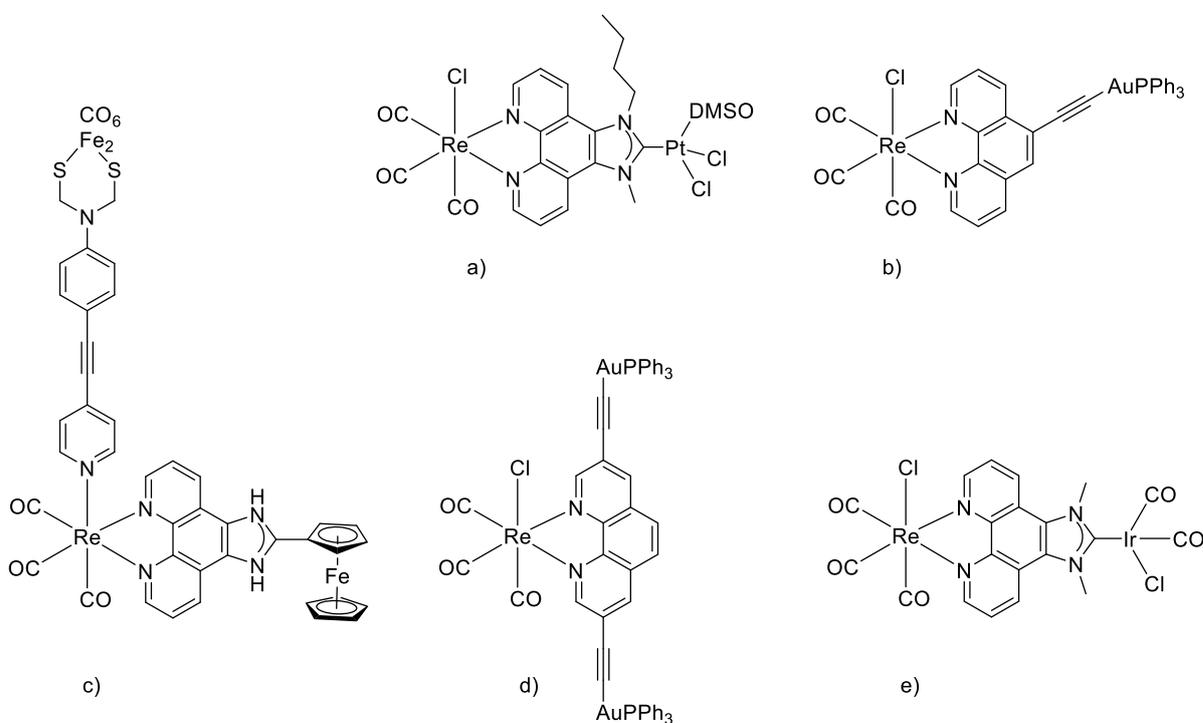


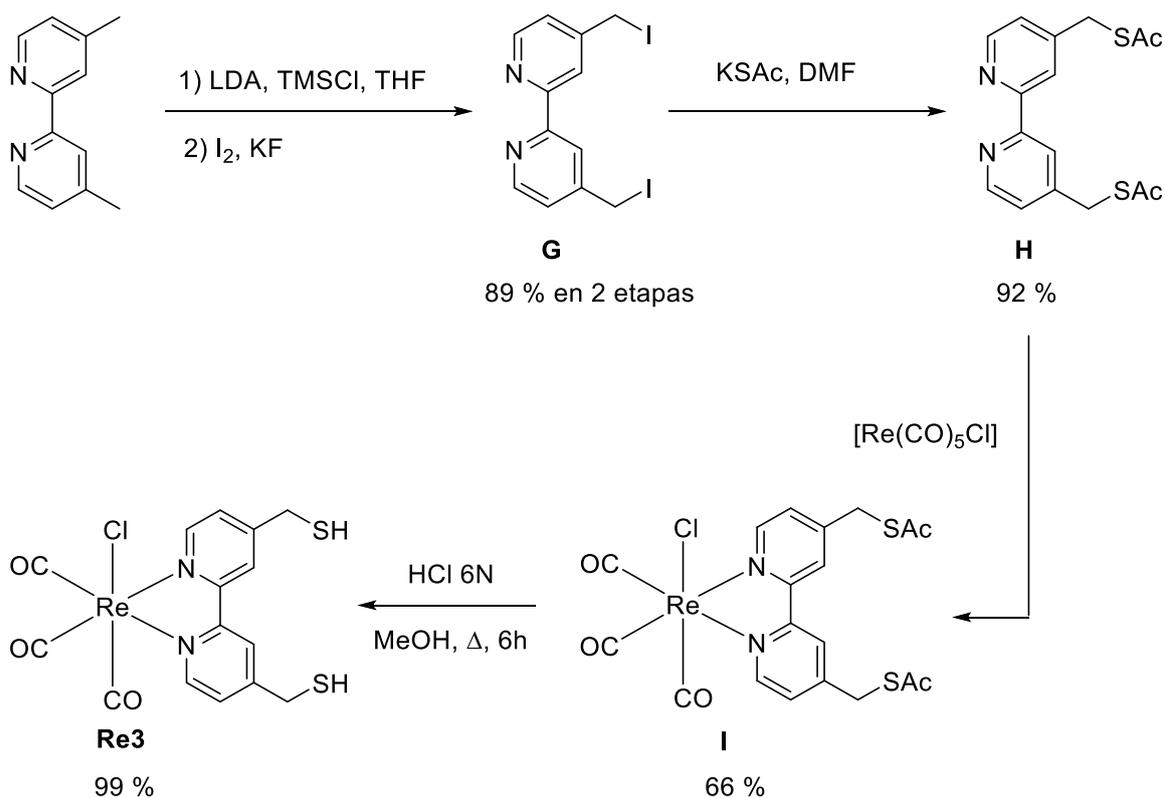
Figura 4.2 Ejemplos de complejos heterometálicos con aplicaciones en fotocatalisis (a y c) y para el estudio de su luminiscencia (b, d y e).

4.3 Síntesis de derivados conectados a través de tiolatos

4.3.1 Síntesis del complejo de renio precursor

Se sintetizó el complejo de renio **Re3** unido a la 4,4'-dimetilbipiridina reproduciendo las condiciones descritas en la bibliografía (ver esquema 4.1).⁴ De manera resumida, la 4,4'-dimetilbipiridina se transformó en su dianión, por reacción con

n-butil-litio, que fue inmediatamente atrapado con cloruro de trimetilsilano obteniendo un intermedio estable hasta su desprotección con fluoruro de potasio. En ese momento se reaccionó el dianión con iodo molecular sintetizando el derivado iodado **G** con un rendimiento global de 89 %. El iodo incorporado ejerce de buen grupo saliente para ser sustituido por el grupo tioacetato conduciendo al derivado sulfurado protegido **H**. Finalmente se coordinó el renio a los nitrógenos de la bipyridina (**I**) tras lo cual se desprotegeron los tioles empleando ácido clorhídrico en metanol.



Esquema 4.1 Síntesis del precursor **Re3**.

Las características espectrales del complejo de renio **Re3** coinciden con las descritas en la bibliografía.⁴ Se observan las señales de los protones aromáticos entre 9 y 7.5 ppm y en la zona alifática los protones del metileno que se acoplan con los del grupo tiol, dando una señal doblete y triplete respectivamente (figura 4.3).

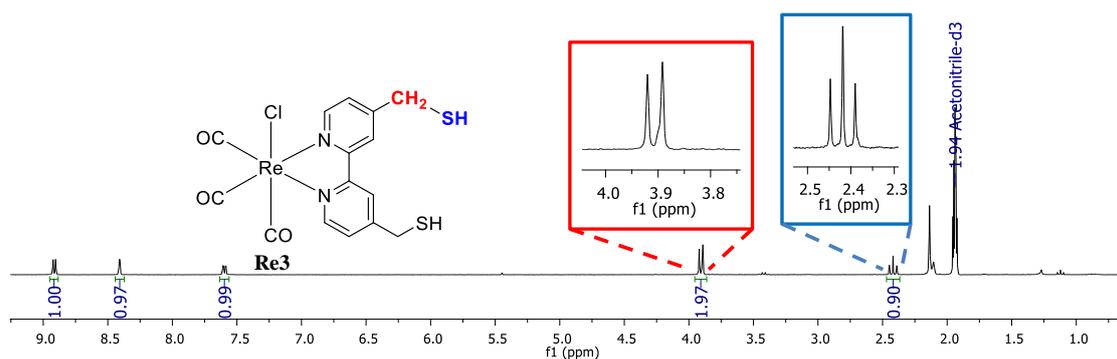
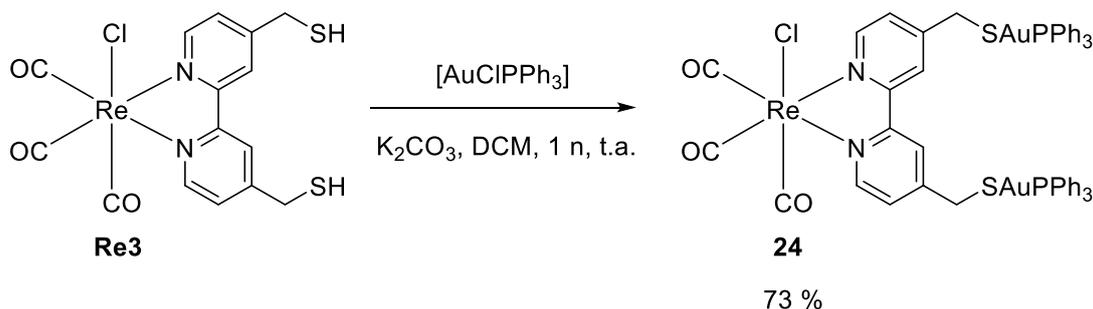


Figura 4.3 Espectro ^1H -RMN de **Re3** en acetonitrilo deuterado.

4.3.2 Síntesis de los derivados heterometálicos

El derivado heterometálico **24** se sintetizó por reacción del complejo **Re3** con $[\text{AuClPPh}_3]$ y K_2CO_3 como base para asistir en la desprotonación del tiol. La reacción procede en una noche a temperatura ambiente (esquema 4.2) y permite obtener el producto puro por recristalización en diclorometano-éter.

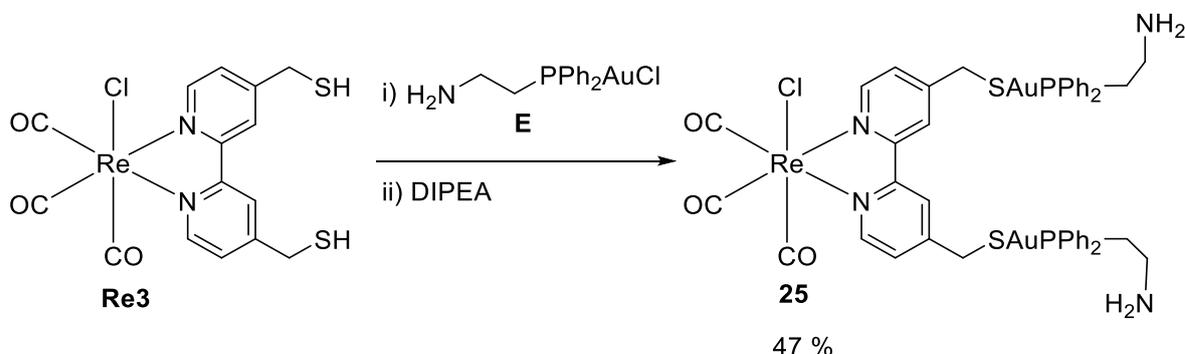


Esquema 4.2 Síntesis de **24**.

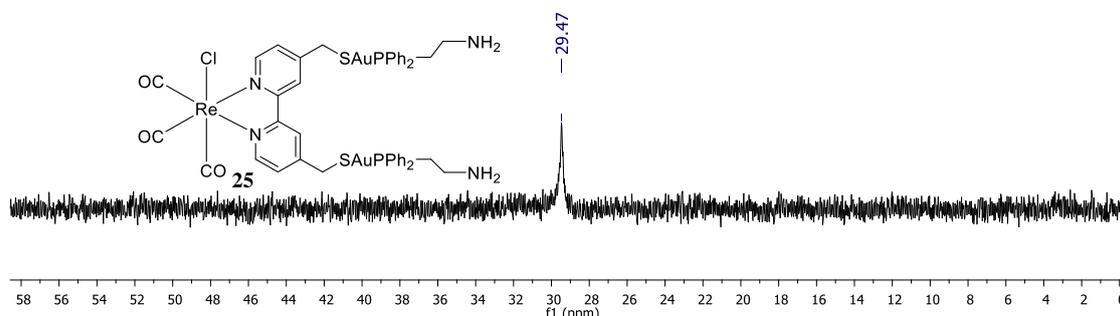
La aparición de una única señal de fósforo a 37.06 ppm, junto con una correcta integración de los protones aromáticos de la trifenilfosfina y la desaparición de los protones del tiol permiten confirmar la presencia del producto deseado en su forma pura.

Se consideró interesante sintetizar un derivado heterometálico conteniendo grupos amino primarios. Se espera así mejorar la solubilidad en el medio acuoso e incluso facilitar la permeabilidad celular de la misma manera que lo hacen los residuos lisina que se incorporan a secuencias de péptidos con este fin.⁵ En este caso la reacción entre **Re3** y el compuesto de oro **E** ya sintetizado en el capítulo 1 procede sin necesidad de base externa al actuar la amina del complejo de oro como base. Ambos productos son

solubles en diclorometano y rápidamente se obtiene un precipitado amarillo demostrando la rapidez de la reacción. Sin embargo, fue necesaria la adición de una base externa para neutralizar los grupos amonio con el fin de obtener un producto suficientemente soluble como para ser purificado por recristalización (ver esquema 4.3).



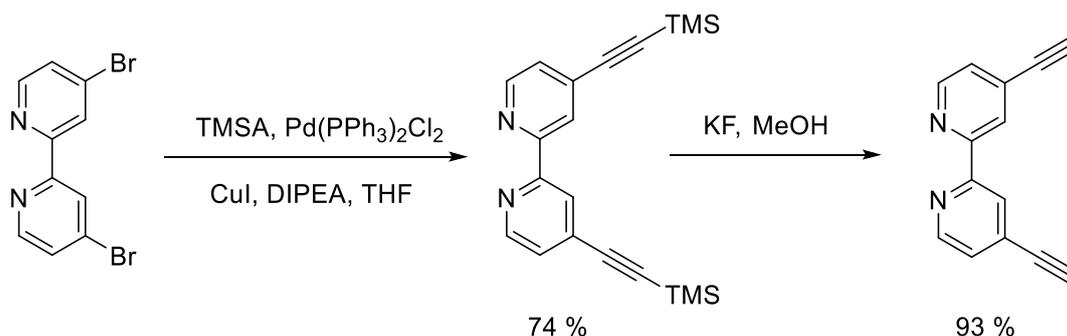
De nuevo se comprobó la formación del producto **25** por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de fósforo $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN (figura 4.4), obteniéndose un único pico a 29.47 ppm que está de acuerdo con los valores publicados para este tipo de compuestos.⁶



4.4 Síntesis de derivados neutros conectados a través de alquinos

4.4.1 Síntesis del complejo de renio precursor

La síntesis del ligando 4,4'-dietinil-2,2'-bipiridina está descrita en la bibliografía⁷ y se llevó a cabo en dos etapas como se indica en el esquema 4.4.



Esquema 4.4 Síntesis de 4,4'-dietinil-2,2'-bipiridina.

A continuación, el ligando 4,4'-dietinil-2,2'-bipiridina se coordinó al átomo de renio por reacción con $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ a reflujo en metanol durante 8 horas (esquema 4.5). Se obtuvo un sólido naranja cuyo espectro de infrarrojo confirma la obtención de un complejo neutro de renio *fac*-tricarbonil (ver figura 4.5).

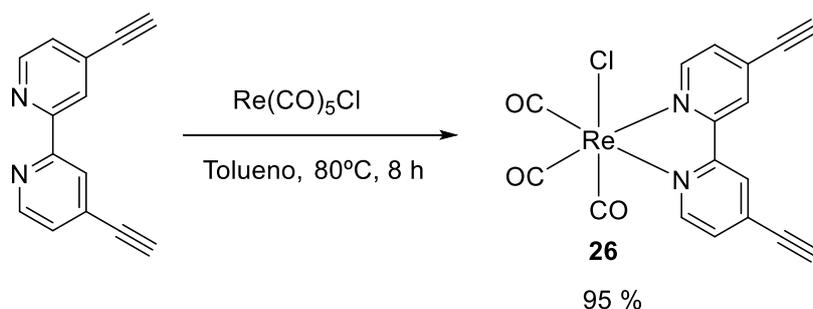
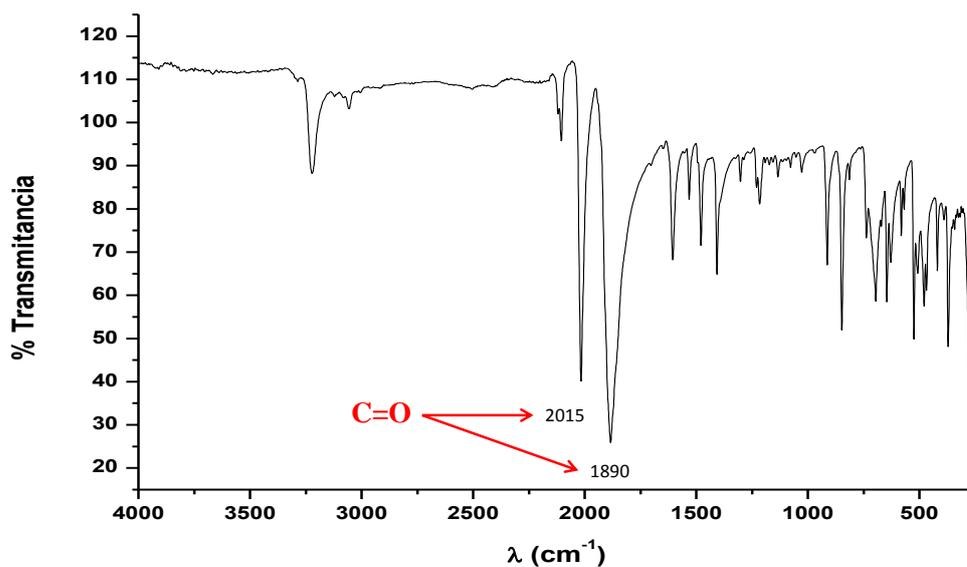
Esquema 4.5 Síntesis de **26**.

Figura 4.5 Espectro de infrarrojo de **26**. Las bandas a 2015 cm^{-1} y 1890 cm^{-1} están de acuerdo con la presencia de un complejo de renio *fac*-tricarbonil.

Este complejo **26** constituye el producto de partida común para la síntesis de los diferentes complejos heterometálicos conectados por el ligando 4,4'-dialquinilbipiridina. Asimismo, se obtuvieron cristales adecuados para su estudio por difracción de rayos X (figura 4.6). La molécula cristaliza en el grupo monoclinico C2/c con una celdilla unidad compuesta por 8 moléculas, mientras que la unidad asimétrica se compone por una sola molécula. En lo referido a las distancias de enlace, se comprueba una relativa homogeneidad en los enlaces renio-carbonilo (1.928(5) Å Re-C1, 1.923(6) Å Re-C2, 1.933(4) Å Re-C3), y un valor de acuerdo con el descrito en la bibliografía para el triple enlace (1.180(7) Å).⁸

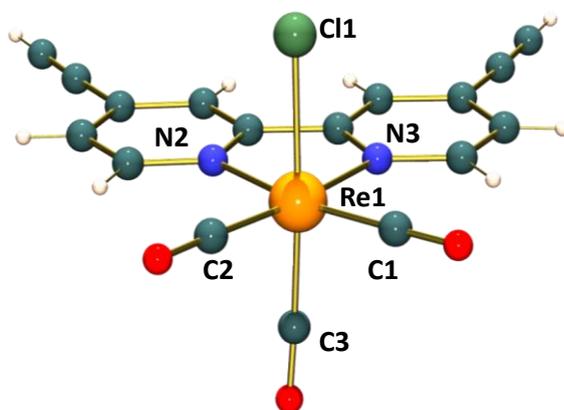
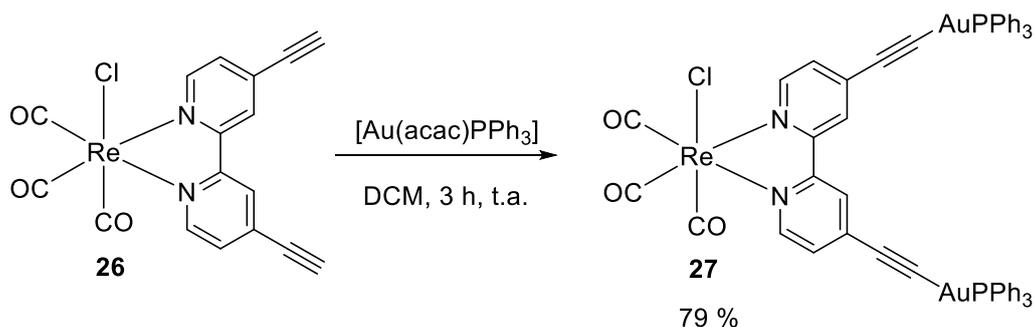


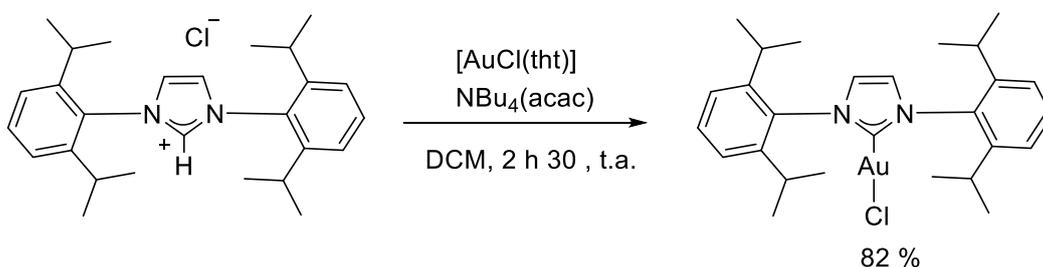
Figura 4.6 Estructura del complejo **26**.

4.4.2 Síntesis de los derivados heterometálicos

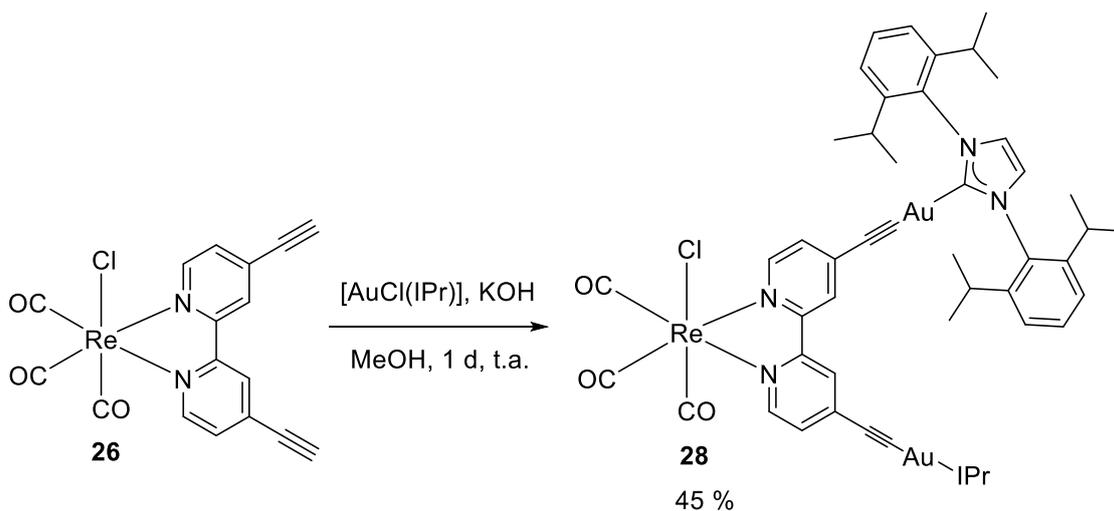
El complejo **26** se hizo reaccionar con $[\text{Au}(\text{acac})\text{PPh}_3]$ en diclorometano obteniendo el producto deseado **27** tras 3 horas de reacción a temperatura ambiente (esquema 4.6). El análisis por espectroscopia de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN permitió confirmar la formación del producto por la presencia de un único pico a 41.49 ppm, cuyo valor concuerda con el descrito para este tipo de compuestos en la bibliografía.⁹ Adicionalmente, en el espectro de protón se observa la desaparición de los protones de los alquinos terminales y la aparición de las señales correspondientes a las dos unidades trifenilfosfina con una integración adecuada.

Esquema 4.6 Síntesis de **27**.

Sintetizada la variante alquino-oro-fosfina correspondiente al complejo **27**, se quiso estudiar las propiedades de complejos de oro unidos a dos ligandos carbono dadores, optando en este caso por la incorporación de un carbeno obteniendo así la variante alquino-oro-carbeno. Los carbenos de oro estéricamente impedidos han mostrado más compatibilidad que aquellos que no lo están por su baja tendencia a la formación de biscarbenos permitiendo la síntesis de especies mixtas.¹⁰ Se decidió trabajar con el carbeno de oro unido al ligando (1,3-bis(2,6-diisopropilfenil)imidazolideno) comúnmente apodado IPr. Este ligando es muy conocido en complejos metálicos con aplicación en catálisis y muy apreciado por su alto impedimento estérico. La sal de imidazolio precursora se preparó siguiendo protocolos descritos en la bibliografía¹¹ tras lo cual la formación del carbeno tuvo lugar por reacción con $[\text{AuCl}(\text{tht})]$, y $\text{NBu}_4(\text{acac})$ como base, esquema 4.7. Esta reacción ha sido desarrollada por el grupo de investigación previamente, permitiendo establecer un nuevo método de síntesis de carbenos de oro mucho más suave a las alternativas que emplean bases fuertes.¹²

Esquema 4.7 Preparación de $[\text{AuCl}(\text{IPr})]$

La coordinación del alquino de renio **26** al carbeno de oro se llevó a cabo por reacción en metanol con un ligero exceso de KOH. El crudo se purificó por cromatografía en columna de silicagel obteniendo el producto puro **28** con un 45 % de rendimiento (esquema 4.8).



Esquema 4.8 Síntesis de **28**.

De nuevo la desaparición de los hidrógenos de los alquinos terminales en el espectro de RMN de ^1H , unida a una correcta integración de las señales (buen ratio protones aromáticos-metilos del ligando IPr), permitieron confirmar la presencia del producto deseado en su forma pura. Asimismo, se obtuvieron cristales adecuados para su estudio por difracción de rayos X. La molécula cristaliza en el grupo ortorómbico centrosimétrico Pnma con cuatro moléculas por celdilla unidad y media molécula representando la unidad asimétrica (figura 4.7). La distancia del oro a los carbonos del alquino y del carbeno que se encuentran en su esfera de coordinación son aproximadamente iguales ($1.993(9) \text{ \AA}$ y $2.024(9) \text{ \AA}$ respectivamente), y el ángulo formado por ambos carbonos y el oro es $173.8(4)^\circ$ confirmando un entorno cuasi lineal para el átomo de oro. Por otro lado, la distancia entre los carbonos que conforman el triple enlace ($1.20(1) \text{ \AA}$) se encuentra dentro de los valores habituales⁸ por lo que la presencia del oro y del ligando bipyridina no ejercen excesiva influencia sobre dicho enlace.

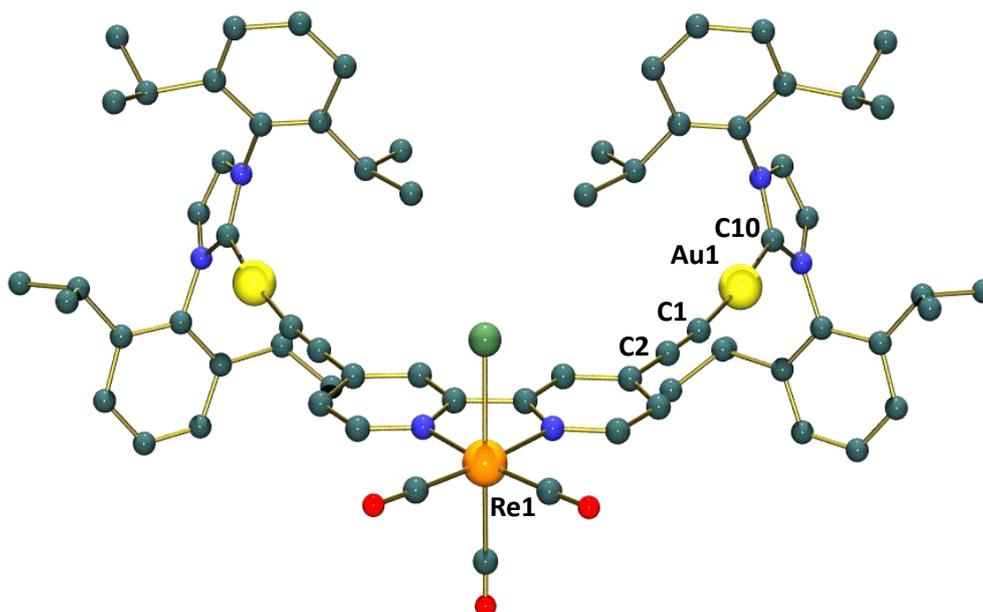
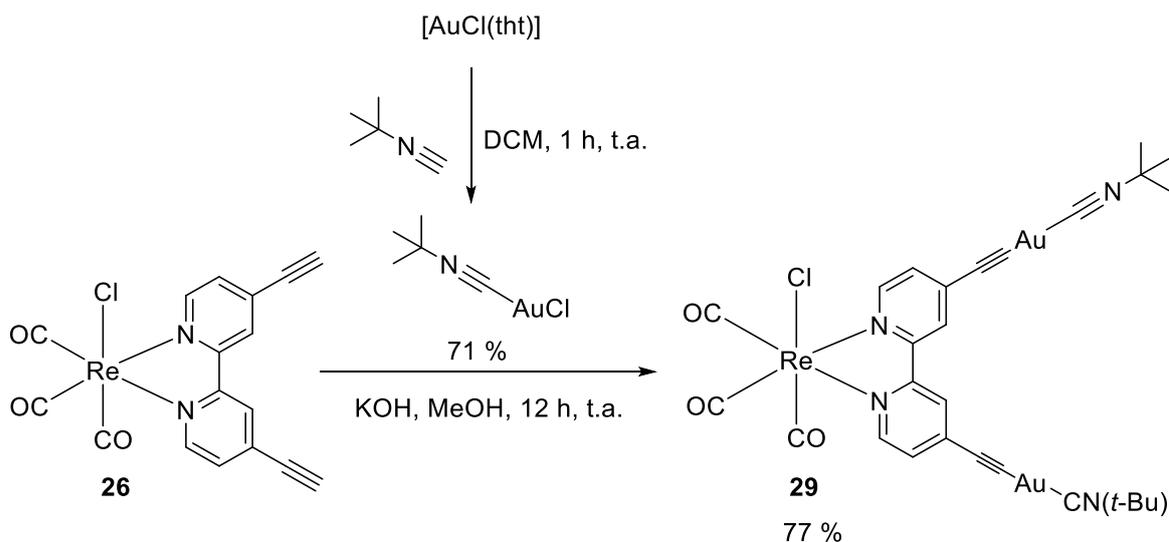


Figura 4.7 Estructura de **28**.

Los isocianuros representan otra manera de incorporar ligandos C-dadores con unas características diferentes a los carbenos por su habilidad para aceptar densidad electrónica por retrodonación,¹³ pudiendo modular las propiedades luminiscentes. Además, son ligandos más lábiles que los carbenos por lo que son susceptibles de ser desplazados más fácilmente por biomoléculas dentro de la célula dando lugar a un cambio en la actividad biológica.

El cloruro de *tert*-butilisocianato de oro se preparó por coordinación de dicho ligando a la molécula de [AuCl(tht)] desplazando al ligando lábil tht. La incorporación al complejo de renio se llevó a cabo por condiciones similares empleadas para la síntesis de **28**, en metanol y con KOH como base (esquema 4.9).



Esquema 4.9 Síntesis de **29**.

En el espectro de RMN de protón se aprecia la desaparición de los protones de los alquinos terminales, así como la aparición de la señal correspondiente a los protones del grupo *tert*-butilo incorporado, confirmando la presencia del compuesto **29** (ver figura 4.8).

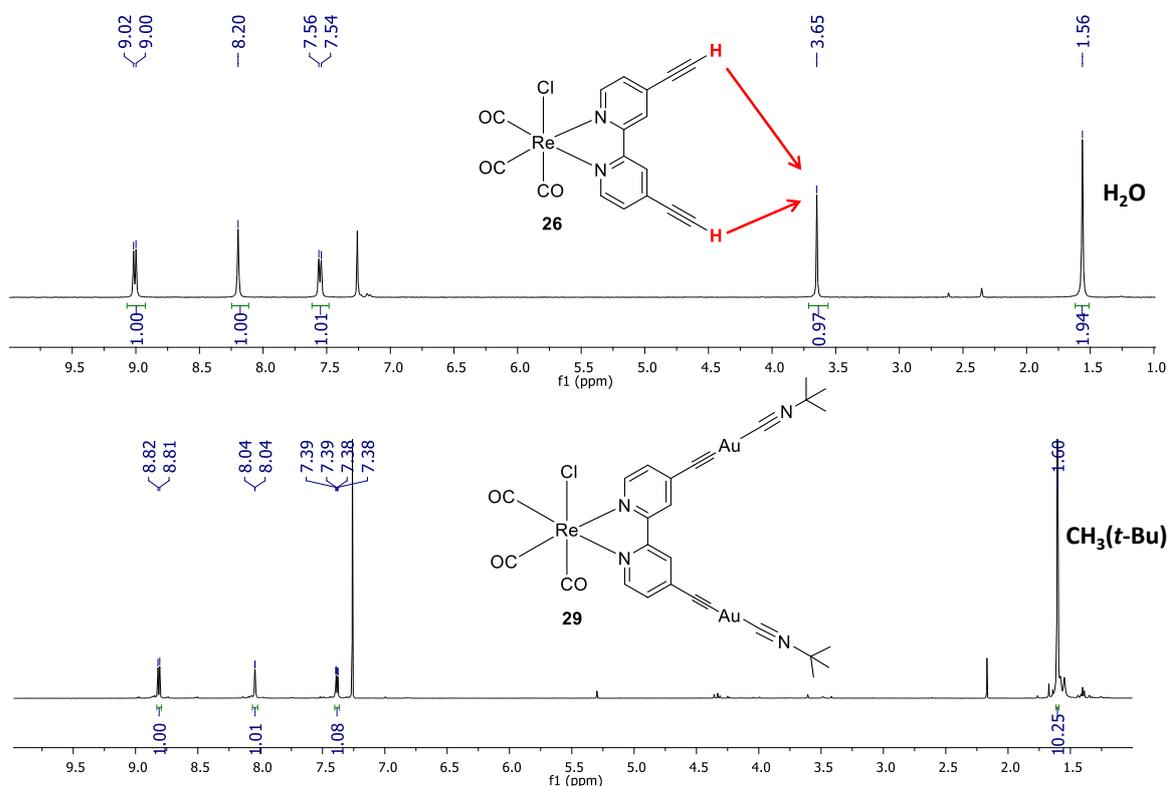
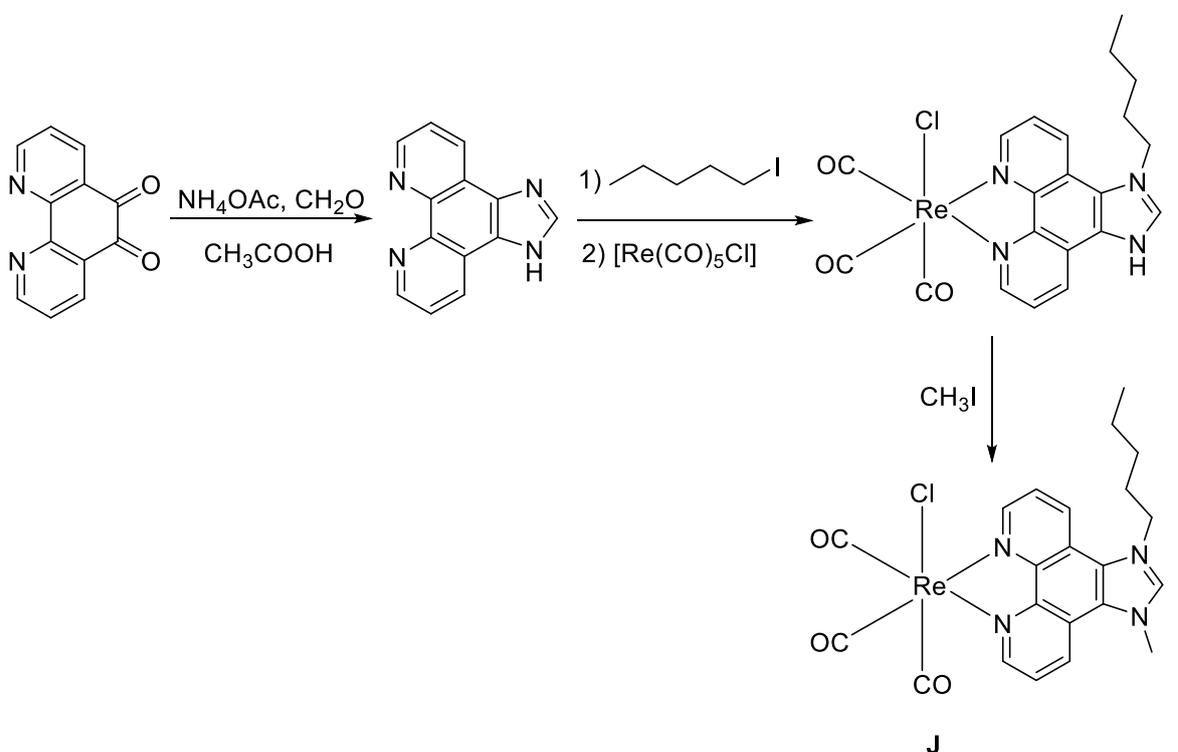


Figura 4.8 Espectro de infrarrojo de **29** en donde no se aprecia la banda correspondiente a la vibración del enlace Au-Cl situada en torno a 330 cm^{-1} .

4.5 Síntesis de derivados conectados por carbenos

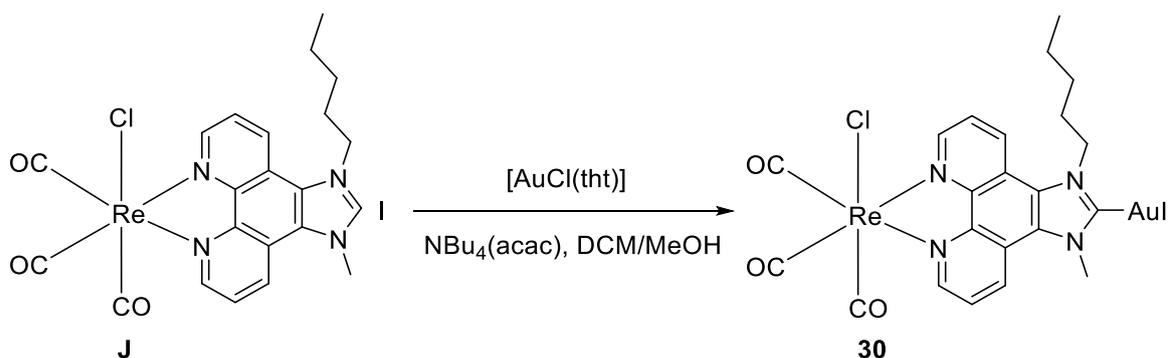
4.5.1 Síntesis del complejo de renio precursor

Buscando tener ambos metales conectados por resonancia, se escogió el ligando fenantrolina fusionado con un ciclo de imidazol como ligando conector entre ambos. En 2015 se publicó un trabajo en el cual se sintetizaba este ligando para más tarde coordinarlo al renio de forma bidentada por los dos nitrógenos.³ Mientras que la motivación principal de los autores se centraba en el diseño de nuevos fotocatalizadores, la vertiente biológica quedaba completamente inexplorada. La síntesis de la sal de imidazolio **J** parte de la 1,10-fenantrolin-5,6-dicetona, que se transformó en el ciclo de fenantrolina fusionado con el de imidazol por reacción con formaldehído y acetato de amonio como fuente de nitrógeno, esquema 4.10. Una primera alquilación con yoduro de pentilo, seguida de la coordinación al renio a través de los nitrógenos de la fenantrolina, y posteriormente una segunda alquilación con yodometano permitieron obtener **J**. Es necesario intercalar la coordinación del renio entre ambas alquilaciones para evitar reacciones secundarias de alquilación sobre los nitrógenos de la fenantrolina.



Esquema 4.10 Síntesis de **J**.

La formación del carbeno de oro **30** a partir de la sal de imidazolio **J** se llevó a cabo por el método “*acac*” (ver esquema 4.11) como ya se ha explicado anteriormente (sección 4.4.2). La elevada insolubilidad de **30** permitió purificar el complejo mediante lavado con metanol, cuya principal impureza se corresponde con el NBu_4Cl formado como subproducto, evitando la columna de silicagel.



Esquema 4.11 Reacción de formación de **30**.

Prueba de la coordinación del oro es la desaparición de la señal correspondiente al protón imidazólico a 10.06 ppm y un ligero desplazamiento de las señales de los protones aromáticos en el espectro de ^1H -RMN, figura 4.9.

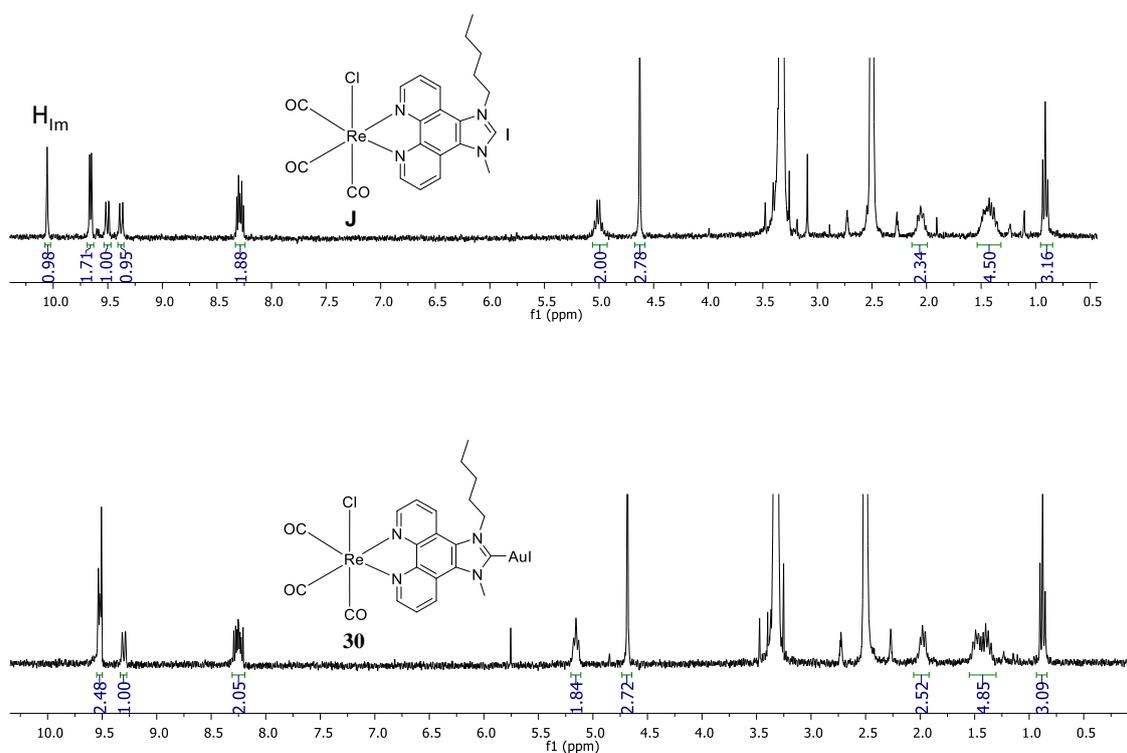
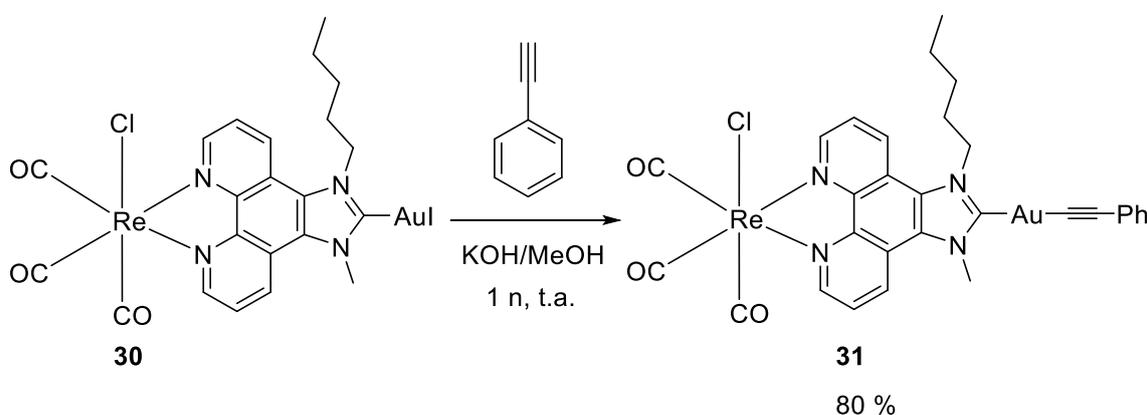


Figura 4.9 Comparación de los espectros ^1H -RMN de **J** y **30** permitiendo observar la desaparición del protón imidazólico denotado como H_{Im} .

4.5.2 Síntesis de los derivados heterometálicos

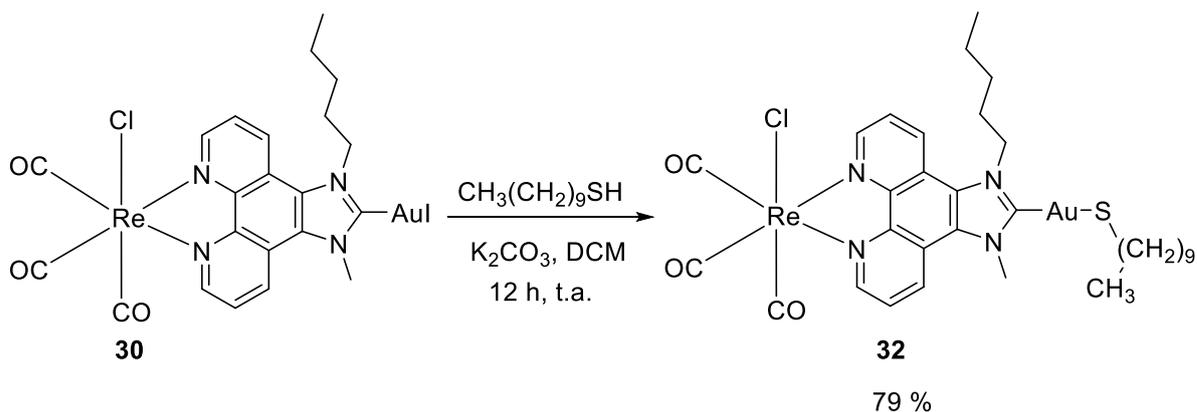
El ligando ioduro unido al átomo de oro se desplaza con facilidad y su sustitución por diferentes tipos de ligandos auxiliares permite explorar su influencia en las propiedades de los complejos resultantes obtenidos a partir de **30**. Además, **30** resulta poco atractivo por su elevada insolubilidad por lo que resulta esencial continuar en su derivatización para obtener complejos funcionales. En este caso, se decidió trabajar con ligandos auxiliares de tipo tiolato, así como ligandos C-dadores. Como primera reacción, se ensayó la reacción con fenilacetileno, llevada a cabo en metanol empleando KOH como base. Pese a la insolubilidad de **30**, la reacción se completó en una noche obteniendo el compuesto **31** como un sólido amarillo (esquema 4.12).



Esquema 4.12 Reacción de formación de **31**.

Como era de esperar, la sustitución del ioduro por un ligando orgánico produce un aumento notable de la solubilidad como ocurre en este compuesto y en los que se presentan a continuación. Es también común a todos los complejos de esta familia su deficiencia en la ionización por lo que algunos no han podido ser caracterizados por espectrometría de masas. En esos casos, las espectroscopias RMN de protón, carbono, fósforo si procede, y de infrarrojo han bastado para confirmar la presencia del producto en su forma pura como se aprecia en los anexos.

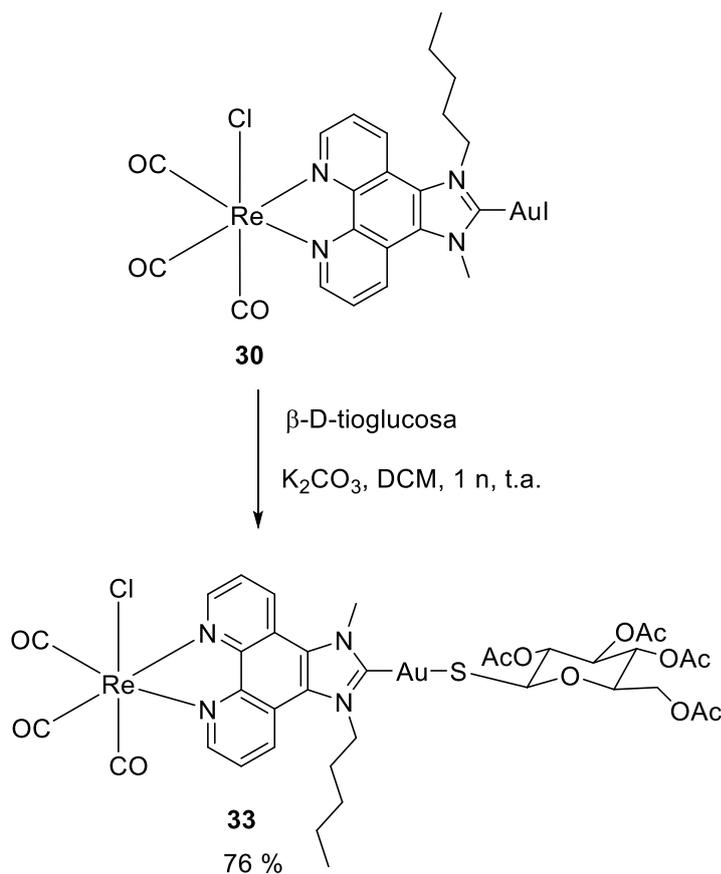
Se coordinó asimismo un ligando azufre dador que mejorase la solubilidad en disolventes orgánicos para facilitar las tareas de síntesis. El ligando elegido fue el dodecanotiol que se coordinó en una noche de reacción en diclorometano empleando como base suave el carbonato de potasio. La reacción se llevó a cabo en atmósfera inerte con el fin de evitar una posible oxidación del tiol (esquema 4.13).



Esquema 4.13 Reacción de formación de **32**.

Las señales de los protones alifáticos entre 3.01 y 0.87 ppm de la cadena de dodecilo confirman la coordinación del tiol al oro.

Tras verificar que es posible incorporar ligandos tiol como ligandos auxiliares del átomo de oro en este tipo de compuestos heterometálicos, se decidió coordinar la beta tioglucosa peracetilada por los buenos resultados que aporta en términos de actividad biológica como ocurre por ejemplo en el Auranofín. La reacción procede de manera análoga a como sucedía para el complejo **32** y en este caso fue necesario purificar por columna de silicagel (esquema 4.14).



Esquema 4.14 Reacción de formación de **33**.

Conviene resaltar que puesto que el complejo de renio no es simétrico, al incorporar centros estereogénicos provenientes de la glucosa, se obtiene una mezcla estequiométrica de diastereoisómeros que no fue posible separar por cromatografía en columna. El espectro 1H -RMN permite confirmar que se encuentran en una relación 1:1 ambos diastereoisómeros al observar con detalle las señales correspondientes a los protones aromáticos (H_2 - H_4 y H_{10} - H_{12}) o los protones del grupo metilo unido al nitrógeno del carbeno NHC (H_{14}) (figura 4.10). La asignación de H_4 y H_{10} fue posible gracias al experimento HMBC protón - carbono.

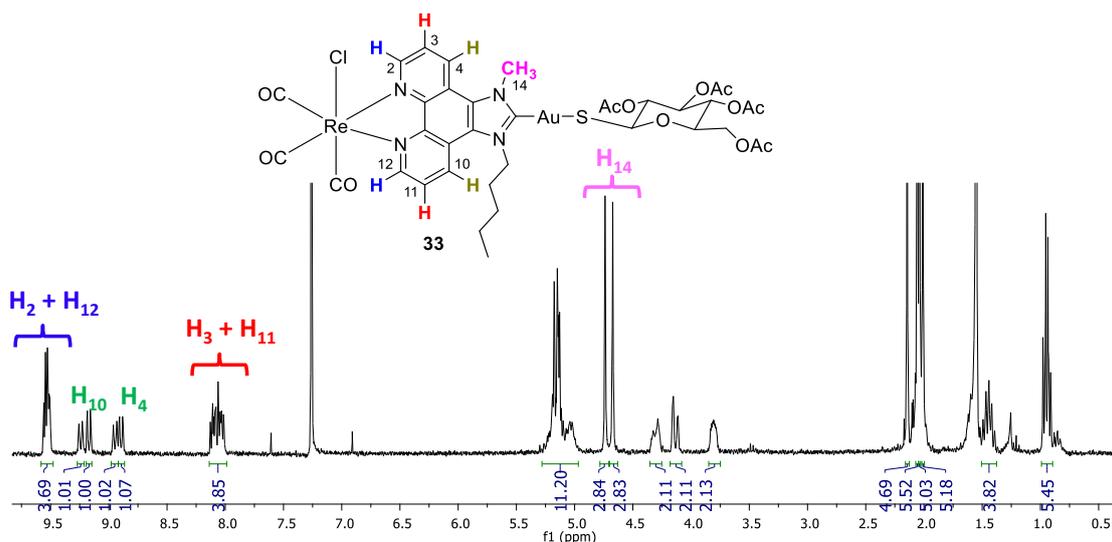
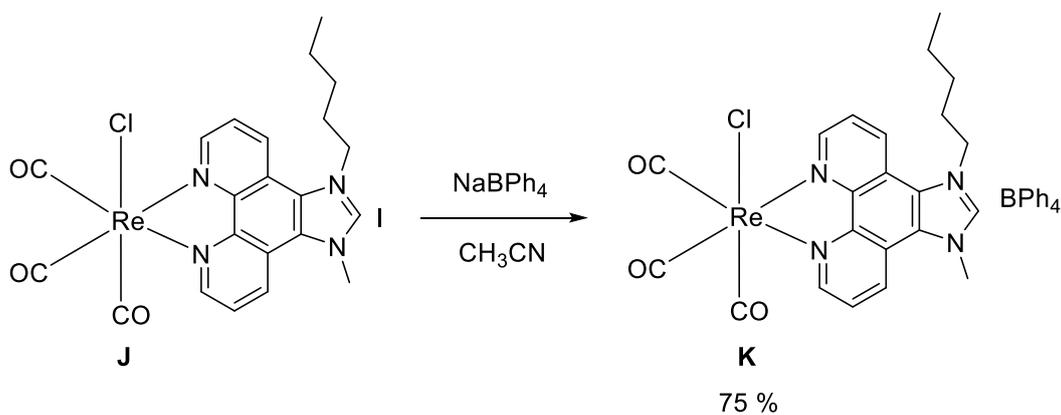


Figura 4.10 Espectro ¹H-RMN de **33**.

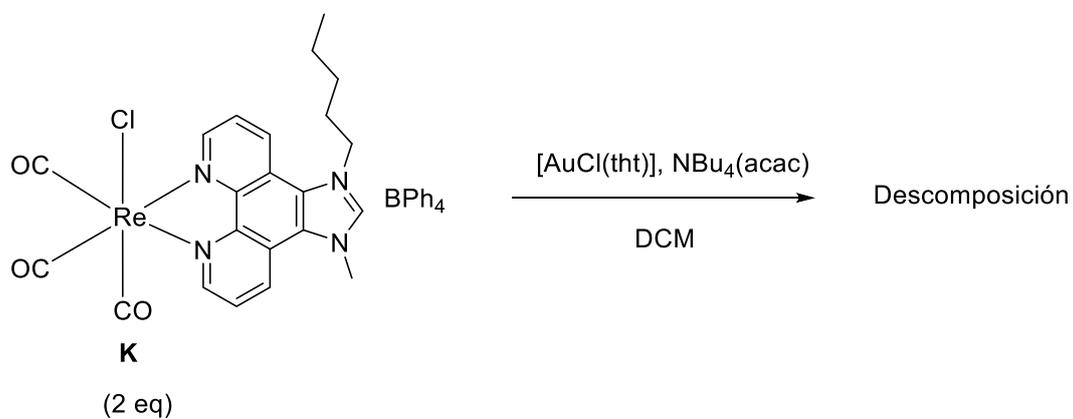
Siguiendo con la línea de derivados en donde el átomo de oro está enlazado a dos ligandos C-dadores, se exploró la síntesis de un derivado biscarbene. Para ello, se recuperó la sal de imidazolio **J**, y se intercambió el anión ioduro por un anión no coordinante como el tetrafenilborato (esquema 4.15) La sal de imidazolio resultante **K** ya está publicada y sus características espectrales concuerdan con las descritas en la bibliografía.^{3b}



Esquema 4.15 Metátesis del contraión de **J** para obtener la sal **K**.

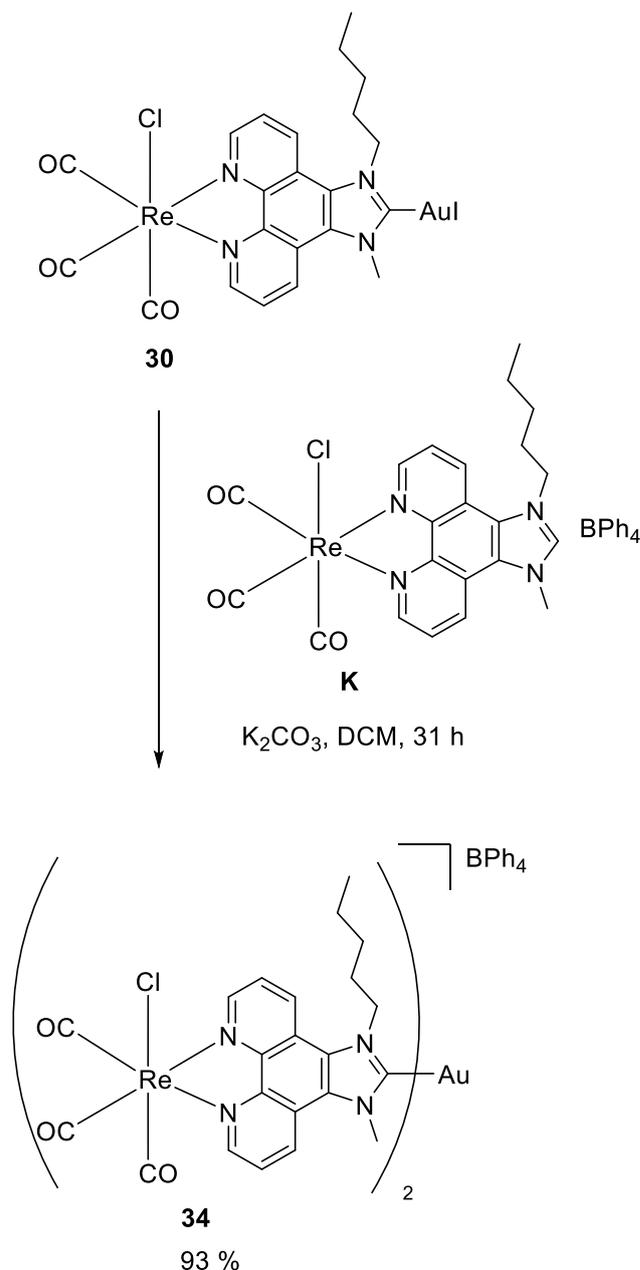
A continuación, se hicieron reaccionar dos equivalentes de **K** con [AuCl(tht)] y NBu₄(acac). Sin embargo, el oro se descompuso instantáneamente al ser añadido a la disolución conteniendo la sal de imidazolio. Se propone que el carbene de oro se forma muy rápidamente pero al carecer de un ligando coordinante, la especie formada es demasiado inestable para sobrevivir el tiempo necesario hasta la formación del

biscarbeno, más lenta por el impedimento estérico, produciéndose la descomposición del carbeno (esquema 4.16).



Esquema 4.16 Intento de formación de la especie biscarbeno a partir de 2 equivalentes de **K**.

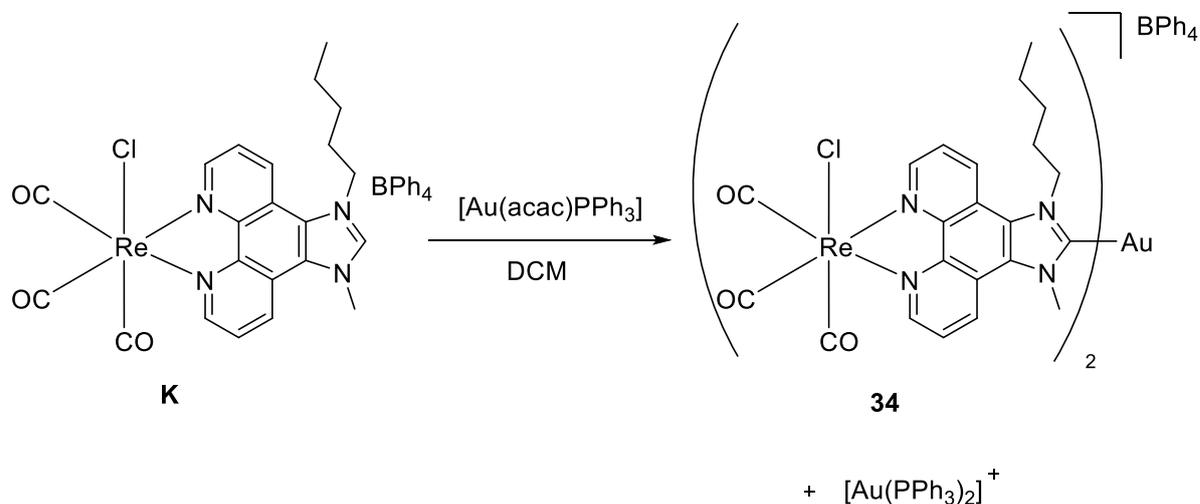
La solución pasó por hacer reaccionar 1 equivalente del carbeno de oro **30** con 1 equivalente de la sal de tetrafenilborato **K**, obteniendo el producto deseado con un 93 % de rendimiento tras 31 horas de reacción.



Esquema 4.17 Formación de **34**.

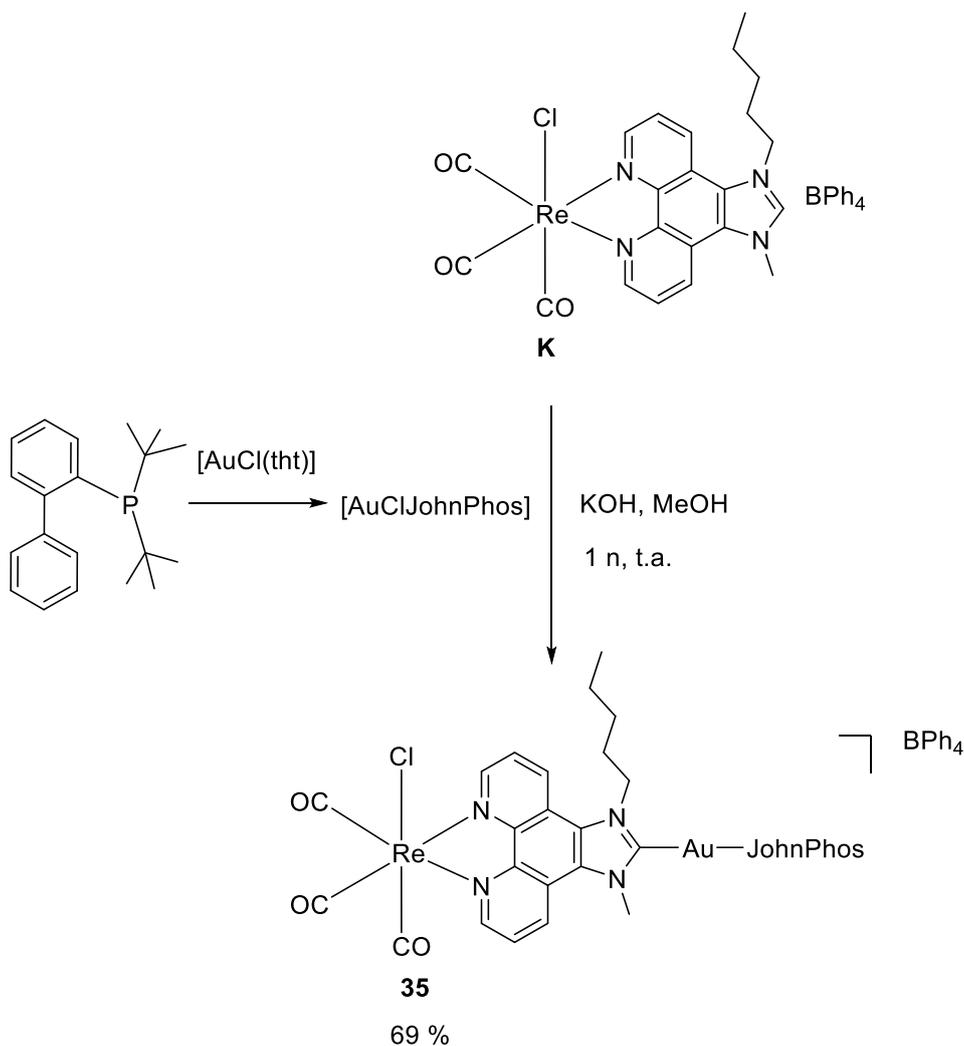
La síntesis de las especies carbeno-oro-fosfina puede realizarse partiendo del complejo carbeno-oro-halógeno con la fosfina o bien por formación directa del carbeno empleando un reactivo de oro ya enlazado a una fosfina. Como se ha explicado en la síntesis del complejo **28**, es necesario que al menos uno de los dos ligandos (el carbeno o la fosfina en este caso) sean voluminosos o bien se observa una disociación de la especie carbeno-oro-fosfina hacia las especies biscarbeno de oro y bisfosfina de oro. Conjeturando que la sal de imidazolio **K** produciría un carbeno suficientemente voluminoso, se puso en reacción con $[\text{Au}(\text{acac})\text{PPh}_3]$ como fuente de oro. Se empleó la sal de tetrafenilborato **K** y no la sal de yoduro **J** para evitar que el halógeno quedase

ligado al oro, como había ocurrido en la síntesis del carbeno **30**. Desafortunadamente, la reacción condujo igualmente a una mezcla compuesta por el biscarbeno de oro **34** y la especie $[\text{Au}(\text{PPh}_3)_2]^+$, demostrando que el carbeno no ejerce el suficiente impedimento estérico sobre el oro (esquema 4.18).



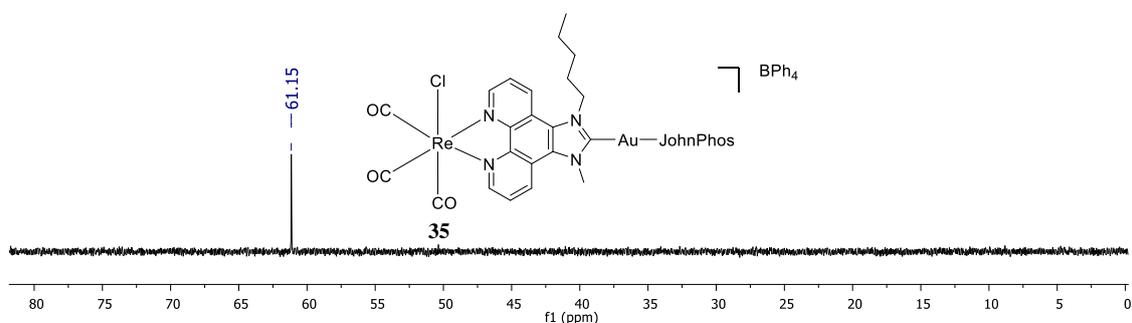
Esquema 4.18 Síntesis fallida de la especie carbeno-oro-fosfina a partir de **K**.

Puesto que en este punto ya no era posible actuar sobre el carbeno para aumentar su impedimento estérico, se escogió una fosfina voluminosa como la JohnPhos, ampliamente utilizada en catálisis¹⁴ aunque recientemente recuperada por el grupo de investigación para la concepción de iluros de oro con potencial antitumoral.¹⁵ La reacción se completó en una noche empleando KOH como base para desprotonar la sal de imidazolio (esquema 4.19)



Esquema 4.19 Síntesis de **35**.

La desaparición del protón imidazólico a 10.0 ppm junto con la presencia de un único pico en el espectro ^{31}P -RMN a 61.15 ppm fueron pruebas suficientes de la obtención del producto deseado **35** en su forma pura (figura 4.20).



Esquema 4.20 Espectro ^{31}P -RMN de **35** confirmando la presencia de un único producto.

4.6 Actividad biológica

Se midió la actividad de los compuestos frente a la cepa de células tumorales de cáncer de pulmón A549, constatando una toxicidad muy baja para todos los compuestos (ver tabla 4.1). Durante la realización del ensayo MTT se constató que tras disolver correctamente los compuestos en DMSO, las diluciones con medio de cultivo provocaron la precipitación del complejo. En consecuencia, la concentración real añadida a las células es menor de la teórica y desconocida. Se propone que la escasa solubilidad en el medio acuoso está causada por la elevada presencia de ciclos aromáticos y por el carácter neutro de los complejos. Si se compara con los compuestos del capítulo 2, se observa que en aquella ocasión las estructuras no eran demasiado diferentes a las presentadas en este capítulo, pero en cambio la actividad biológica era netamente superior.

Tabla 4.1 Valores de IC₅₀ obtenidos tras 24 h de incubación sobre la línea de células tumorales A549.

Complejo	A549 24 h
24	>50
25	>25
26	>25
27	>50
28	>50
29	>50
30	>50
31	>50
33	>50
32	>50
34	>50
35	>50
Auranofin ¹⁶	7.59

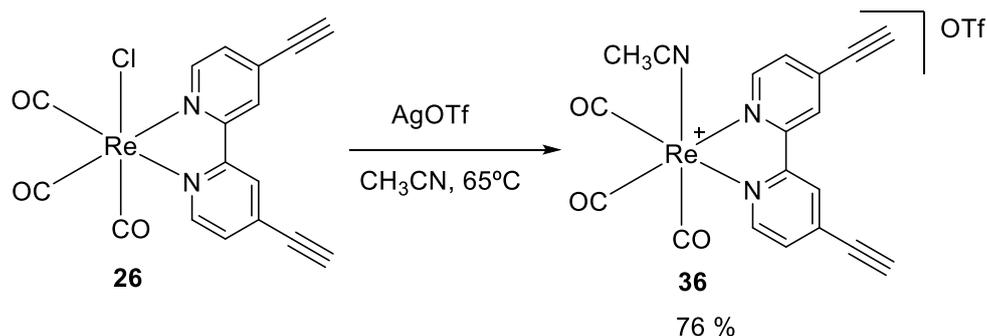
Convencidos de que la escasa actividad se debía a la baja solubilidad e internalización de los compuestos, se concluyó que la única manera de desenterrar su potencial a nivel biológico era transformarlos en su versión catiónica.

4.7 Síntesis de derivados catiónicos

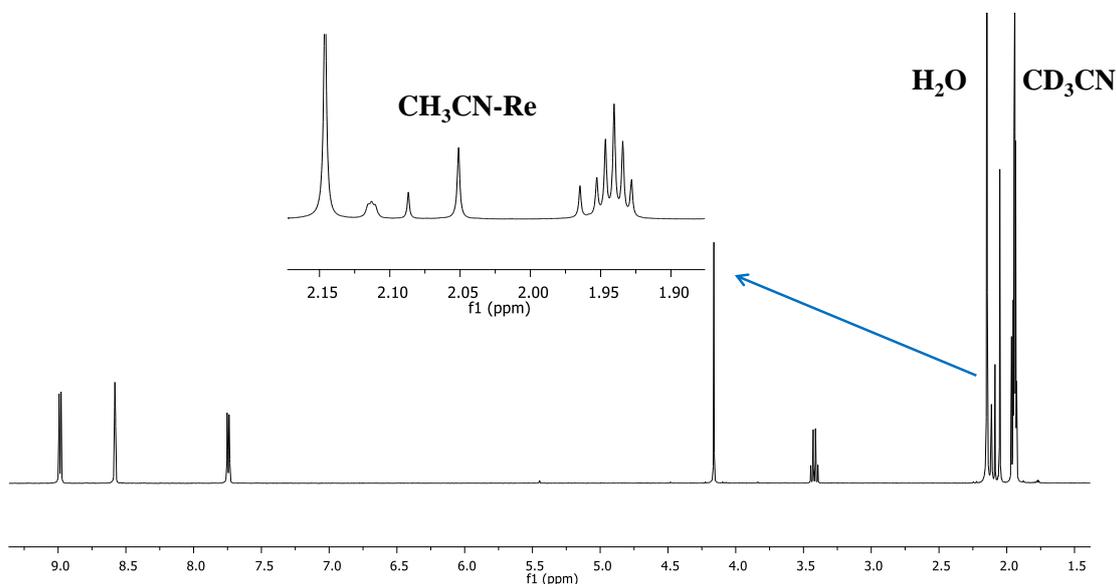
Los complejos previamente sintetizados han mostrado una elevada estabilidad hacia diferentes condiciones de reacción (bases fuertes, disolventes próticos, condiciones no anhidras, presencia de complejos de oro) permitiendo la síntesis de interesantes derivados heterometálicos. Sin embargo, su carácter neutro ha reducido su solubilidad y más aún su actividad biológica hasta valores no esperados. Recientemente se han publicado trabajos exponiendo la toxicidad de acuocomplejos de renio¹⁷ en donde la molécula de agua se encuentra en posición axial. Los autores no han podido concretar el mecanismo de acción pero parece claro que el renio es capaz de inhibir a ciertas enzimas y que esta inhibición debe producirse por coordinación de la enzima al renio. El ligando aquo es el más lábil de todos los presentes en esos complejos y con certeza se ve desplazado por otras moléculas. Se puede concluir que el ligando aquo otorga más solubilidad al complejo al conferirle un carácter catiónico y por la propia molécula de agua. En términos de actividad es la labilidad de este ligando el responsable del buen comportamiento observado. Estas conclusiones motivaron la preparación de los derivados heterometálicos unidos por bipyridinas funcionalizadas con residuos alquino en su versión catiónica, escogiendo como ligando lábil el acetonitrilo por una mayor facilidad de síntesis y compatibilidad con reactivos y condiciones.

4.7.1 Síntesis de derivados catiónicos conectados por alquinos

El primer paso en la aproximación hacia los derivados heterometálicos catiónicos consistió en la abstracción del cloruro empleando triflato de plata y acetonitrilo como disolvente, asegurando de este modo la coordinación de esta molécula en posición axial. La reacción reprodujo las condiciones descritas en el capítulo 2, es decir, 1 noche de reacción a 65°C en ausencia de luz, para conducir al producto deseado **36** con un 76 % de rendimiento (esquema 4.21).

Esquema 4.21 Síntesis de **36**.

La coordinación de la molécula de acetonitrilo se puede observar por ^1H -RMN por la presencia de un pico a 2.05 ppm (ver figura 4.11). La integración no es exacta debido a que esta molécula se intercambia con las moléculas de acetonitrilo del disolvente deuterado.

Figura 4.11 Espectro ^1H -RMN de **36**.

No obstante, la obtención de cristales adecuados para difracción por rayos X permitió confirmar la obtención de **36** (figura 4.12). El compuesto cristaliza en el sistema triclinico P-1 cuya celdilla unidad está compuesta por 4 moléculas y dos moléculas de pentano. La unidad asimétrica por su lado se compone de dos moléculas del compuesto y una molécula de pentano. Las distancias de enlace entre el átomo de renio y las moléculas de carbonilo son aproximadamente iguales (1.920(4) Å, Re(1)-C(1); 1.932(5) Å, Re(1)-C(2) y 1.926(5) Å, Re(1)-C(3)), del mismo modo que ocurre para las tres distancias Re-N (2.129(3) Å, Re(1)-N(1); 2.159(3) Å, Re(1)-N(2); 2.174(4) Å, Re(1)-N(3)), de acuerdo con los valores descritos en la bibliografía para este tipo de compuestos.¹⁸ Por otro lado, la distancia de enlace (1.188(8) Å) así como el ángulo

(176.9(5)°) formado por los átomos que componen el residuo alquino (C(13)-C(18)-C(19)), concuerda con los valores esperados.

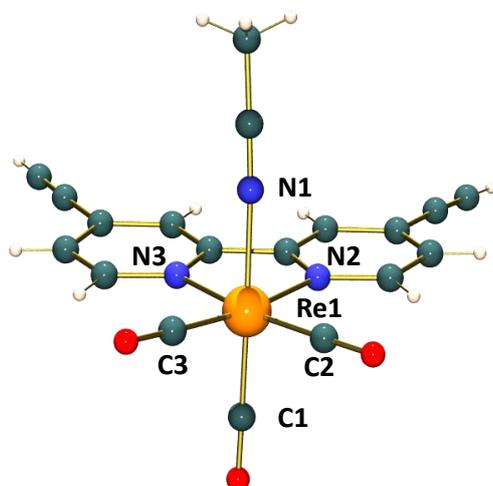
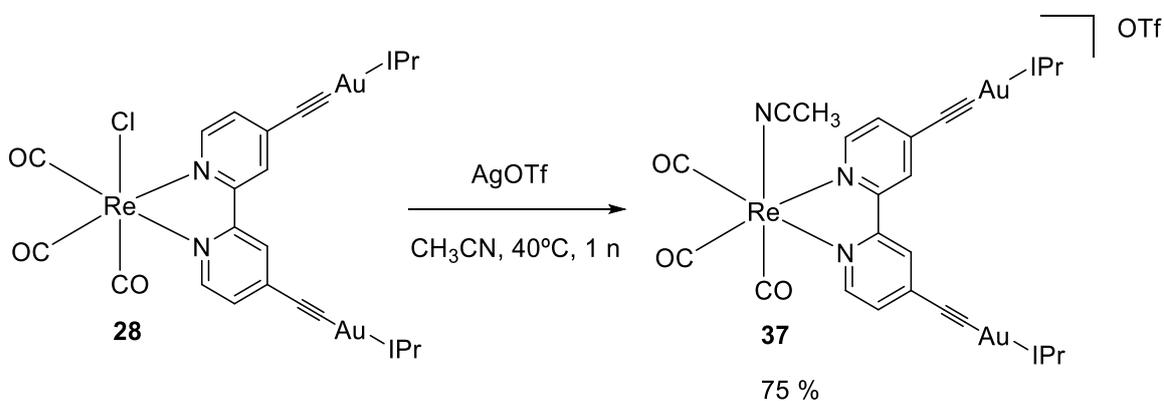


Figura 4.12 Estructura del catión del complejo **36**.

Observando los buenos resultados obtenidos en la síntesis del complejo **36**, se empleó la misma estrategia sintética para la obtención del heterometálico **37**. La temperatura se redujo a 40°C para evitar la descomposición del oro y la reacción se completó igualmente en una noche en ausencia de luz (esquema 4.22).



Esquema 4.22 Síntesis de **37**.

La formación del producto **37** se confirmó por ^1H -RMN, observando un desplazamiento de las señales de los protones aromáticos con respecto a **28** (ver figura 4.13). El espectro de masas permitió observar el pico correspondiente al ión molecular $\text{C}_{71}\text{H}_{78}\text{Au}_2\text{N}_6\text{O}_3\text{Re}^+$ (1643.4 m/z) aportando una prueba adicional.

4.7 Síntesis de derivados catiónicos

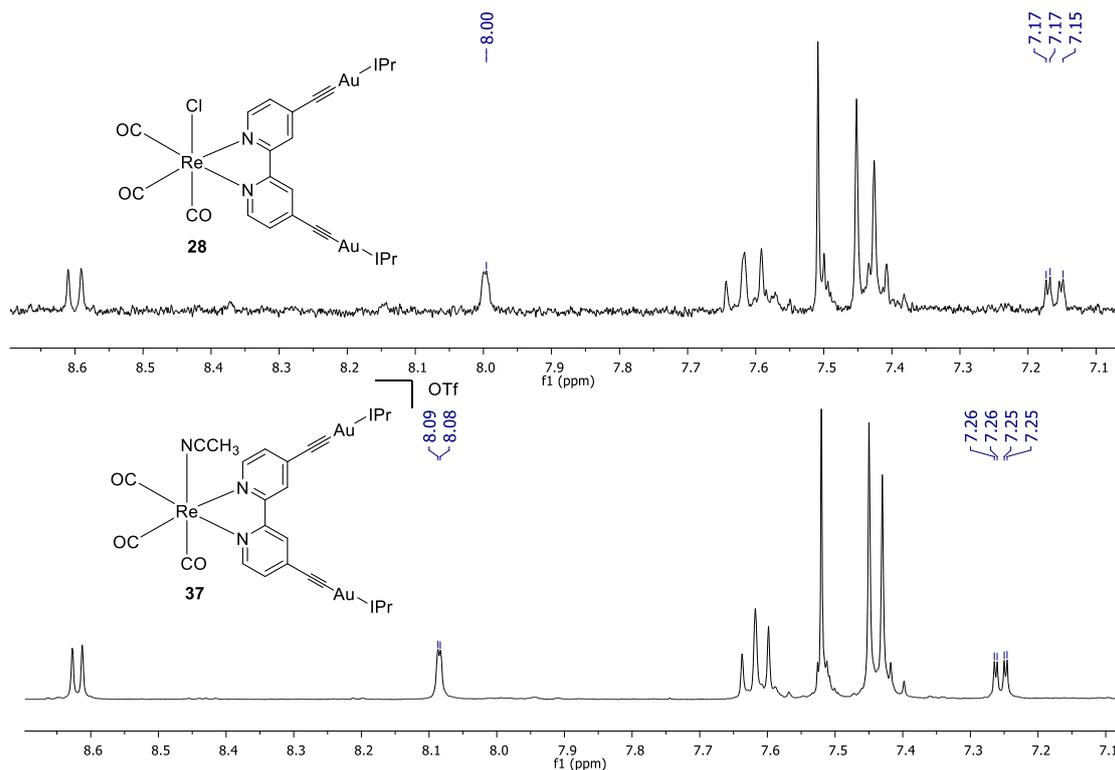
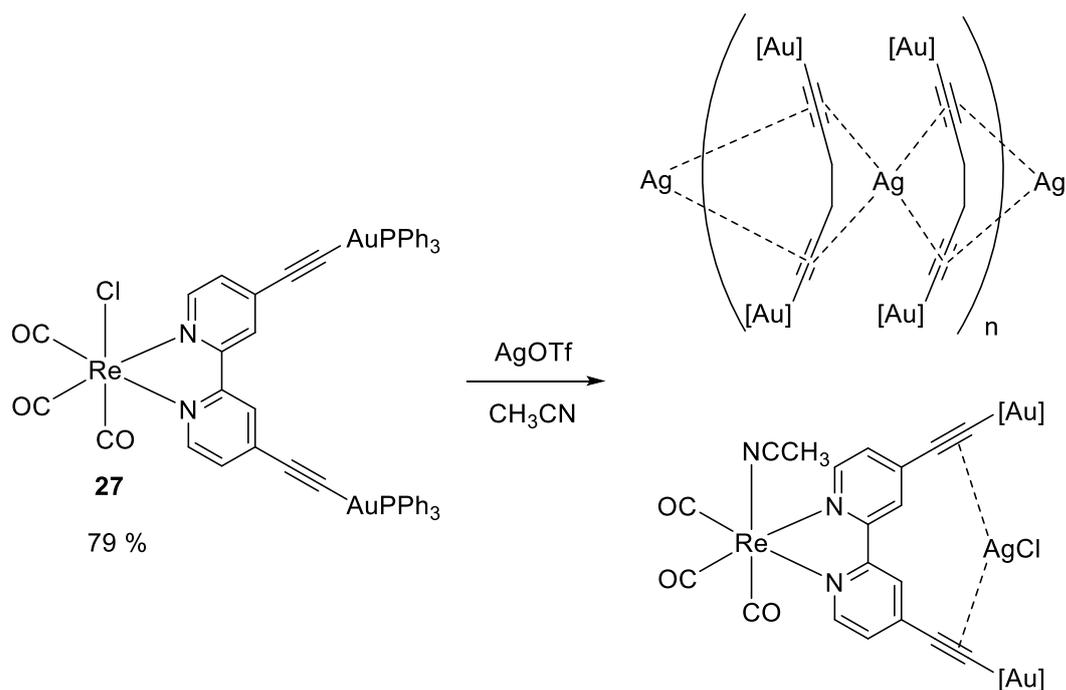


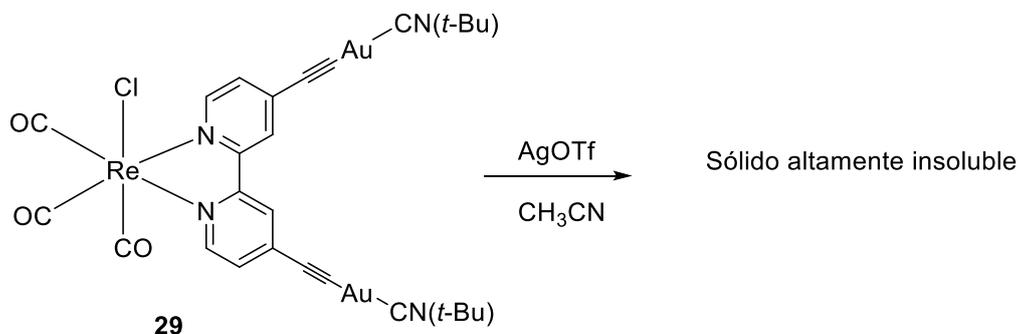
Figura 4.13 Comparación de espectros ¹H-RMN de **28** y **37**.

El heterometálico **27** se hizo reaccionar con AgOTf emulando las condiciones empleadas previamente. Como resultado se obtuvo un sólido altamente insoluble que no fue posible identificar. En las aguas madres de la reacción se detectó la presencia de la conocida especie bisfosfina de oro $[\text{Au}(\text{PPh}_3)_2]^+$ que posee un característico desplazamiento en ³¹P-RMN a 45 ppm. La obtención de un sólido de escasa solubilidad puede ser indicadora de la formación de especies poliméricas o de alta nuclearidad como se ha expuesto en trabajos previos del grupo de investigación¹⁹ y de otros autores (ver esquema 4.23).²⁰ Mientras que en el caso del complejo **37** se pudo obtener el complejo catiónico deseado, en este caso, partiendo de **27**, el menor impedimento estérico que ejercen las fosfinas respecto del que ejercen los ligandos IPr puede ser la causa de una posible coordinación de la plata a los alquinos cuyo resultado final sea la producción de especies polinucleares.



Esquema 4.23 Posibles productos obtenidos de la reacción con triflato de plata.

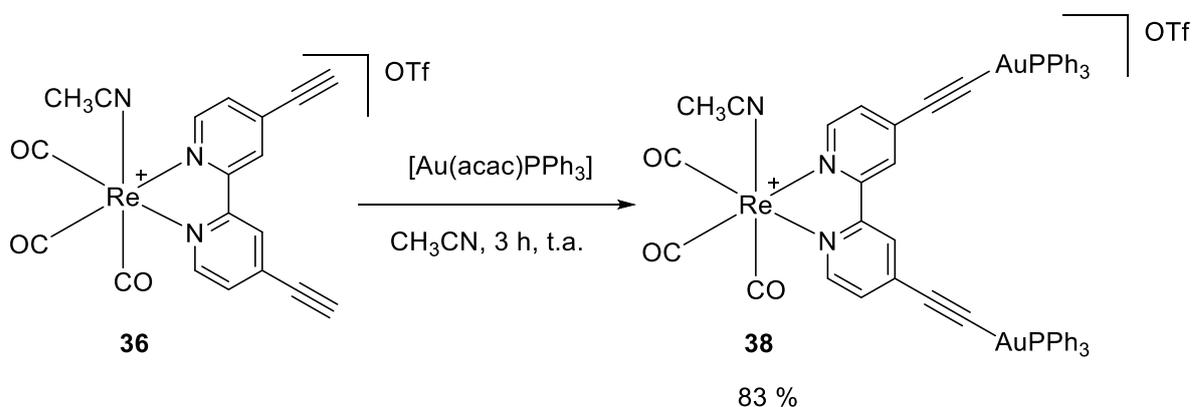
La formación de un sólido altamente insoluble también se observó al hacer reaccionar el heterometálico **29** conteniendo el residuo isocianuro, demostrando que el empleo de cationes de plata no constituye un buen método para la extracción del ligando cloruro en complejos poco impedidos (esquema 4.24).



Esquema 4.24 Intento de abstracción del cloruro en el compuesto **29** mediante el uso de triflato de plata.

Finalmente, se decidió cambiar la estrategia de síntesis y se partió del complejo catiónico **36** que se hizo reaccionar con $[\text{Au}(\text{acac})\text{PPh}_3]$ empleando acetonitrilo como disolvente para evitar su descoordinación en posición axial. Como el pKa del acetonitrilo es mucho más elevado que el de la acetilacetona (25 frente a 9 respectivamente), no es capaz de protonar el acac unido al oro permitiendo que la reacción tenga lugar, siendo así un disolvente igualmente válido al diclorometano que es

el disolvente habitual para este tipo de reactivo. El derivado heterometálico **38** se obtuvo con un 83 % de rendimiento en tan sólo 3 horas de reacción (esquema 4.25).



Se observó un cambio de color en la disolución, pasando de amarilla a marrón, y de nuevo la espectroscopia de ^1H -RMN permitió confirmar la formación del heterometálico catiónico al observar el pico correspondiente al grupo metilo de la molécula de acetonitrilo coordinada axialmente al renio, a 2.07 ppm (figura 4.14).

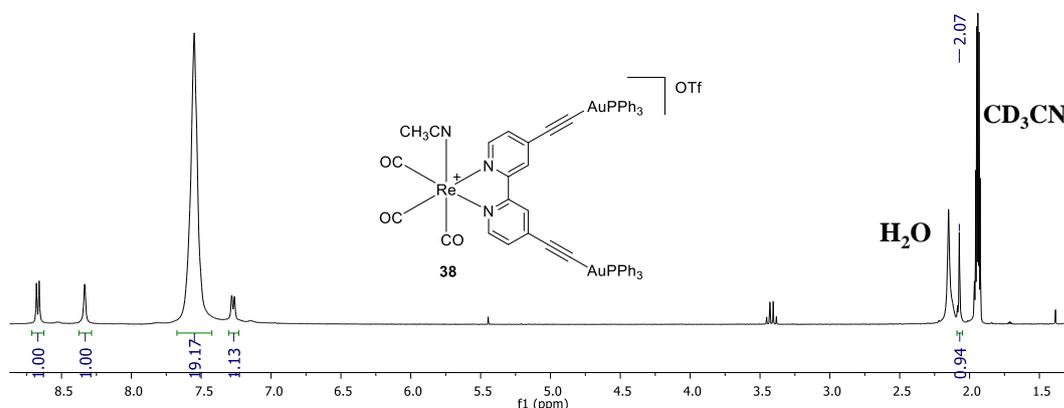
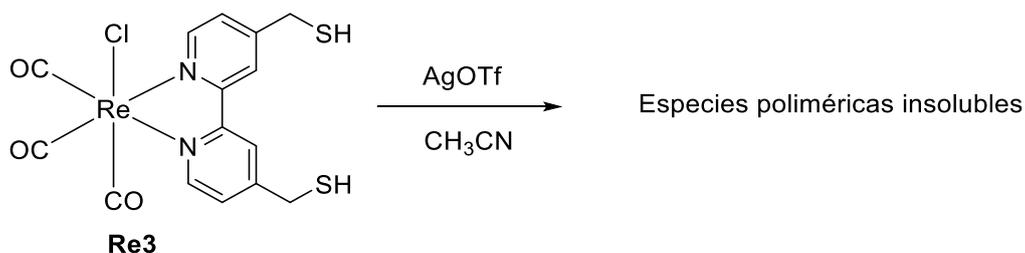


Figura 4.14 Espectro ^1H -RMN de **38**.

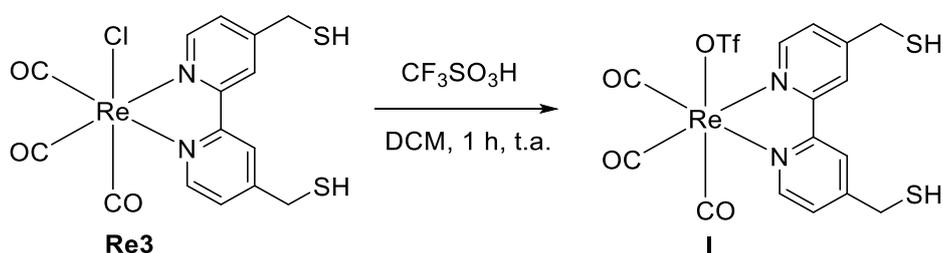
4.7.2 Síntesis de derivados catiónicos conectados por tiolatos

Como primera aproximación, el complejo neutro **Re3** se hizo reaccionar con AgOTf con el fin de abstraer el cloruro en posición axial. Una vez más, se obtuvo un sólido altamente insoluble, que en este caso debe responder a una especie polimérica en donde la plata está enlazada a los tiolatos formando especies polinucleares (esquema 4.26).



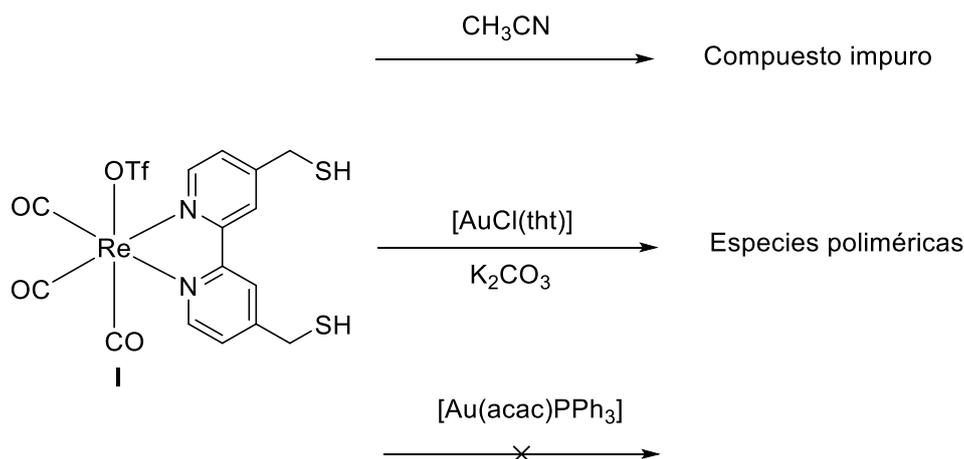
Esquema 4.26 Intento de abstracción del cloruro en el compuesto **Re3** mediante el uso de triflato de plata.

Descartada esta vía de síntesis, se recurrió al intercambio del cloruro por un anión triflato empleando para ello las condiciones descritas en el capítulo 2 para el complejo **Re1**(esquema 4.27).



Esquema 4.27 Formación del complejo activado **I**.

La reacción rinde un sólido amarillo pálido, que sin embargo oscurece, tornándose hacia colores anaranjados más parecidos a los análogos con cloruro en posición axial, al eliminar el exceso de ácido tríflico tras completarse la reacción. Se observó un desplazamiento en las señales en el espectro de protón aunque no se obtuvo un producto puro. Dada la inestabilidad mostrada por **I**, se decidió transformarlo en un producto más estable que permitiera su purificación. Los intentos por coordinar en la posición axial una molécula de acetonitrilo no permitieron aislar un producto puro. Sospechando que la presencia de los grupos tiolato podían ser la causa de las reacciones secundarias, se puso en reacción **I** con $[\text{AuCl}(\text{tht})]$ y carbonato de potasio como base suave (esquema 4.28). Desafortunadamente, minutos después de la adición del carbonato de potasio se obtiene una disolución rojiza, característica de los complejos de renio unidos a azufre.¹⁸ Con el tiempo, se observó la precipitación de un sólido rojo altamente insoluble, que se postula que se corresponde con una especie polimérica por la unión de varios complejos de renio. En ese momento, se decidió hacer reaccionar **I** con el reactivo $[\text{Au}(\text{acac})\text{PPh}_3]$, con la esperanza de que la base acac sólo desprotonase aquellos grupos tiol que interaccionasen con los átomos de oro. Sin embargo, en este caso no se observó reacción alguna (esquema 4.28).



Esquema 4.28 Reacciones fallidas de sustitución del ligando triflato o de coordinación de complejos de oro a través de los grupos tiol.

Como último intento de obtener un derivado catiónico en esta serie de derivados, se intentó la reacción de **I** en acetonitrilo con exceso de piridina, obteniendo igualmente disoluciones rojizas indicadoras de la formación del enlace renio-azufre. De este modo, se concluyó que no sería posible obtener los derivados catiónicos por la tendencia del azufre a ocupar la posición axial en este tipo de complejos de renio, como ya se observó en su momento en el capítulo 2.

4.8 Propiedades fotofísicas

Las medidas de absorción UV-vis y de luminiscencia se han registrado en disoluciones de DMSO. Se presentan a continuación los datos obtenidos agrupándolos en tres grandes categorías según el ligando diimina empleado.

4.8.1 Derivados heterometálicos conectados por tiolatos

El máximo de absorción se encuentra en la región comprendida entre 250 y 300 nm, permitiendo distinguir diferentes transiciones para el compuesto **Re3**. La transición $^1\text{MLCT}$ está centrada en 370 nm y concuerda con los valores que se encuentran en la bibliografía para los complejos del tipo *fac*-[Re(CO)₃(4,4'-Me₂bpy)Cl].²¹ Pese a que el grupo metioltioliol del complejo **Re3** o los correspondientes derivados de los complejos **24** y **25** no están conectados por resonancia, se observan diferencias en el coeficiente de

absorción molar, y como se discutirá a continuación, en el comportamiento luminiscente. Este dato aparentemente sorprendente ya ha sido observado en otros trabajos con complejos similares demostrando que los sustituyentes pueden ejercer su influencia aunque no estén conectados por resonancia.²² En comparación a aquellos compuestos que contienen los ligandos bipyridina alquino y fenantrolina-imidazol, se observan coeficientes de extinción molar del orden de 2 ó 3 veces más bajos que se explica por la falta de conjugación presente entre los grupos activos en UV de los complejos **Re3**, **24** y **25** (ver tabla 4.2 y figura 4.15 en comparación con la tablas 4.4 y 4.6).

Tabla 4.2 Bandas de absorción visible-UV y coeficientes de extinción molar

Compuesto	¹ IL, $\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	¹ MLCT, $\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
Re3	261 (7822), 294 (7266), 322 (5041)	371 (2020)
24	289 (20200)	369 (6420)
25	291 (20400)	369 (6380)

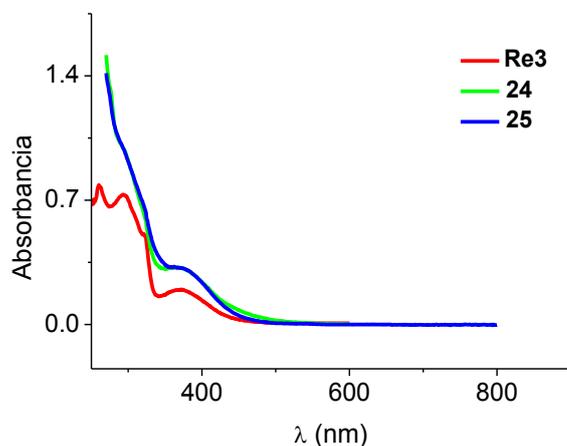


Figura 4.15 Espectros de absorción UV-visible en DMSO.

La excitación se caracteriza por la presencia de una primera banda de baja intensidad a 350 nm aproximadamente seguida por la principal banda de excitación en la zona comprendida entre 415 y 440 nm. Por su parte, la emisión se compone de una única transición centrada entre 615 y 655 nm. Los complejos bimetálicos **24** y **25** muestran un desplazamiento hipsocrómico para excitación y emisión respecto del precursor **Re3**,

observando la mayor diferencia en la emisión (36 nm de desplazamiento para **24** y 24 nm para **25**) (ver tabla 4.3 y figura 4.16). La presencia creciente de anillos aromáticos en la fosfina parece acortar el desplazamiento de Stokes conduciendo a la vez a excitaciones y emisiones menos energéticas, sin poder descartar que exista una transferencia de carga entre estos fenilos y el metal o el ligando bipyridina.

Tabla 4.3 Resumen del comportamiento luminiscente.

Compuesto	Excitación _{max} (λ/nm)	Emisión _{max} (λ/nm)	τ (ns)	Φ(%)
Re3	340, 438	653	-	-
24	365, 417	617	40	0.4
25	347, 424	629	-	<1

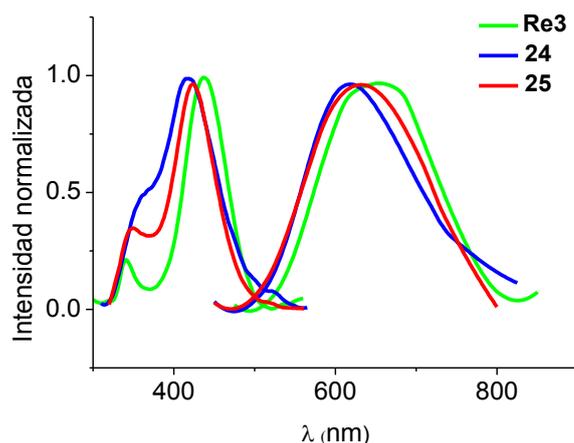


Figura 4.16 Espectros de emisión y excitación de los compuestos en DMSO.

4.8.2 Derivados conectados por alquinos

Los espectros de absorción están divididos en dos zonas. Por un lado, encontramos transiciones intraligando 1IL bajo la forma de una banda ancha no estructurada a longitudes de onda inferiores a 350 nm, que en el caso de los complejos catiónicos **36**, **37** y **38** se estructura en dos bandas diferenciadas con máximos a 300 y 350 nm aproximadamente. Adicionalmente, los complejos monometálicos **26** y **36** presentan una banda adicional muy intensa centrada en 260 nm. Por otro lado, la transición correspondiente a la transición de los orbitales del metal al ligando 1MLCT está

centrada en 370-380 nm con un ligero desplazamiento batocrómico para el complejo monometálico **26** (ver tabla 4.4 y figura 4.17).

Tabla 4.4 Bandas de absorción visible-UV y coeficientes de extinción molar

Compuesto	${}^1\text{IL}$, $\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	${}^1\text{MLCT}$, $\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
26	262 (21600), 306 (13320)	400 (4000)
27	303 (42460)	381 (13200)
28	309 (43480)	376 (10720)
29	304 (42320)	380 (13320)
36	262 (29360), 323 (14280), 338 (15160)	365 (6788)
37	305 (18740), 345 (12440)	No se aprecia
38	302 (33350), 345 (21750)	371 (15150)

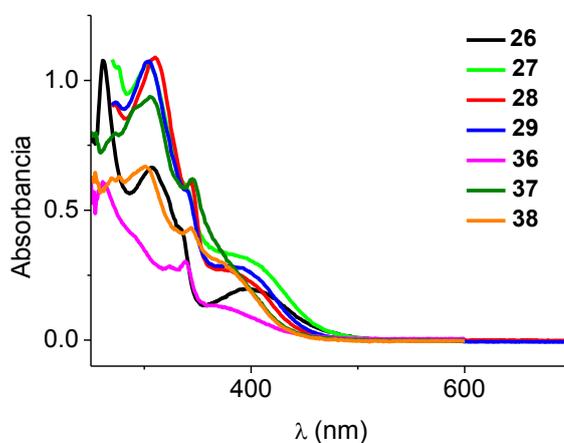


Figura 4.17 Espectros de absorción UV-visible en DMSO.

La emisión de los complejos unidos al ligando cloruro en su posición axial presenta un máximo de excitación en torno a 450-480 nm y un máximo de emisión comprendido en el intervalo comprendido entre 635 y 681 nm, en línea con el comportamiento observado para la referencia *fac*-[Re(CO)₃(bpy)Cl].¹⁶ Los datos experimentales muestran que la incorporación del oro provoca un desplazamiento hipsocrómico, que se aprecia especialmente para el complejo **28**. Se propone que el carácter más dador del carbeno unido al oro provoca una ligera desestabilización del LUMO incrementando así

la energía de las transiciones. En lo referido a los análogos catiónicos, con el ligando acetonitrilo en posición axial, se observa un desplazamiento hipsocrómico de unos 50 nm para la excitación y 70 nm para la emisión). Tal y como ocurría en los compuestos catiónicos del capítulo 3, el intercambio del cloruro por el ligando N-dador acetonitrilo, acrecenta la separación entre HOMO y LUMO, explicando así el desplazamiento hipsocrómico observado (ver tabla 4.5 y figura 4.18).

Tabla 4.5 Resumen del comportamiento luminiscente.

Compuesto	Excitación _{max} (λ/nm)	Emisión _{max} (λ/nm)
26^a	358, 480	681
27^{a,b}	474	651
28^b	452	635
29^b	478	666
36	437	616
37	330, 401	563
38	330, 421	583

^a Vida media 80 ns. ^b Rendimientos cuánticos: **27** (<1%), **28** (1.7%), **29** (0.9%).

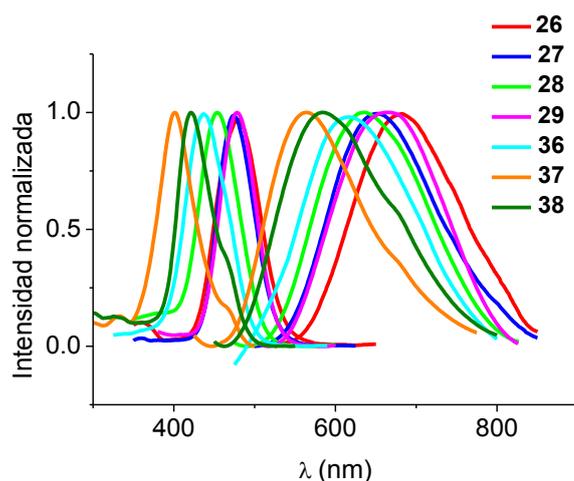


Figura 4.18 Espectros de emisión y excitación de los compuestos en DMSO.

4.8.3 Derivados conectados por carbenos

La absorción máxima se centra en 260 nm con un ligero desplazamiento batocrómico (unos 20 nm) para aquellos derivados que aportan una mayor conjugación (**31** y **34**), y se cataloga como una transición intraligando ^1IL dentro de los orbitales del propio ligando fenantrolina-imidazol. Esta transición se presenta como una banda ancha que engloba a otras transiciones de menor intensidad no observadas a excepción del compuesto **33** en donde se ha podido apreciar un hombro a 291 nm correspondiente igualmente a una transición intraligando ^1IL en base a su intensidad y longitud de onda. Por otro lado, a 400 nm se aprecia una banda de menor intensidad que ha sido clasificada como la transición del metal al ligando típica para los complejos de renio $^1\text{MLCT}$. El coeficiente de extinción molar puede verse incrementado casi hasta el doble de su valor para las transiciones observadas para el complejo **34** pues al ser un biscarbeno presenta dos centros de renio (ver tabla 4.6 y figura 4.19).

Tabla 4.6 Bandas de absorción visible-UV y coeficientes de extinción molar

Compuesto	^1IL , $\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$^1\text{MLCT}$, $\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$ ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
30	264 (59880)	398 (4970)
31	280 (61976)	399 (5149)
32	261 (35748)	402 (4640)
33	262 (48383), 291 (36467)	400 (5449)
34	276 (92750)	395 (11500)
35	263 (57050)	398 (5151)

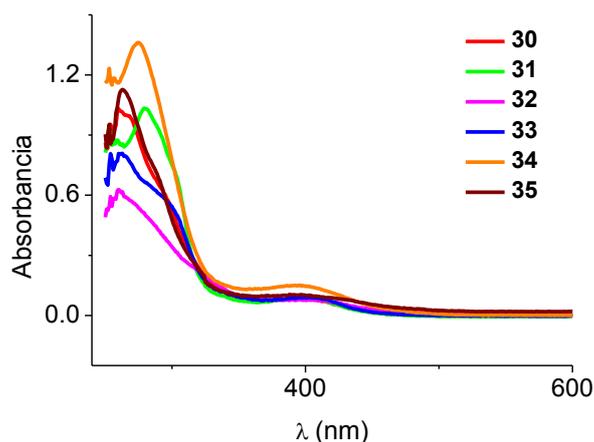


Figura 4.19 Espectros de absorción UV-visible en DMSO.

Al igual que para los compuestos previamente descritos, la excitación se encuentra estructurada en dos bandas, una menos intensa centrada en 365 nm aproximadamente, y otra más intensa centrada en 460 nm excepto para el compuesto **32** cuyo máximo de excitación está centrado en 406 nm. La emisión apenas experimenta la influencia del ligando auxiliar del oro y está centrada en 650 nm aproximadamente, excepto para el complejo **33** que experimenta un ligero desplazamiento batocrómico hasta los 673 nm (ver tabla 4.7 y figura 4.20).

Tabla 4.7 Resumen del comportamiento luminiscente.

Compuesto	Excitación _{max} (λ/nm)	Emisión _{max} (λ/nm)
30	364, 451	650
31	362, 444	652
32	375, 406	652
33	369, 438	673
34	352, 470	641
35	362, 453	655

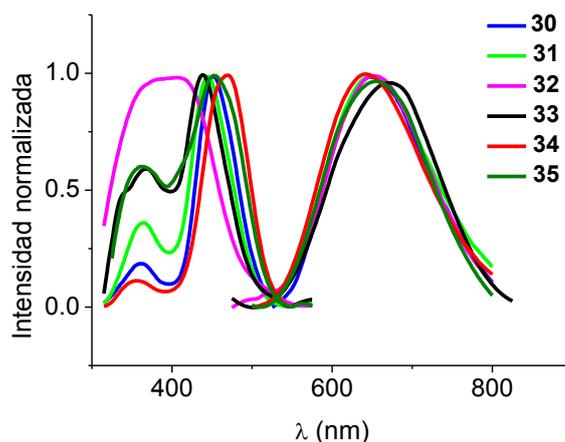


Figura 4.20 Espectros de emisión y excitación de los compuestos en DMSO.

4.9 Propiedades biológicas de los derivados catiónicos y comparación con los derivados neutros

4.9.1 Ensayos de citotoxicidad

Con el fin de comprobar si la transformación de los complejos neutros en su versión catiónica mejoraba la actividad biológica, se llevó a cabo un estudio sistemático de todos los complejos, incubándolos a 24 y 72 horas, en las líneas de células tumorales A549 y HeLa (cáncer de cuello de útero). La incubación a tiempos mayores de 24 horas se fundamenta en la elevada fortaleza del enlace carbono-oro,²³ pues su rotura para que el átomo de oro pueda interactuar con su diana biológica puede necesitar tiempos de incubación elevados. Por otro lado, el estudio sobre la cepa HeLa responde al objetivo de comprobar si pudiera existir algún tipo de selectividad entre cepas tumorales. Estos datos se recogen en la tabla 4.8.

Tabla 4.8 Valores de IC₅₀ obtenidos en las cepas tumorales A549 y HeLa.

Complejo	A549 24 h	A549 72 h	HeLa 24 h	HeLa 72 h
24	>50	>25	>25	6.59±0.50
25	>25	>25	>25	9.69±1.21
26	>25	18.51±3.71	17.01±1.84	7.15±0.47
27	>50	>25	>25	6.46±0.35
28	>50	>25	>25	>25
29	>50	>25	>25	10.79±0.48
30	>50	>25		>25
31	>50	>25	>25	>25
33	>50	>25		>25
32	>50	18.70±4.67	>25	22.9±1.98
34	>50	>25	>25	>25
35	>50	>25	>25	>25
36	8.37±0.29	4.92±0.38	5.10±0.45	1.16±0.13
37	>25	>25	>25	16.4±2.80
38	>25	17.52±1.40	18.8±1.15	2.35±0.06

En primer lugar, por comparación de los resultados obtenidos en ambas líneas celulares, se observa que todos los compuestos son mucho más activos en la línea HeLa que en la línea A549. Es conocido la mayor resistencia de las células A549 frente a las HeLa, por procesos en donde la sobreexpresión de la proteína Bcl-x(L), en conjunción con una menor presencia de proteínas Bak, permiten a las células A549 escapar de la etapa de arresto mitocondrial causada por un agente externo y prolongar así su supervivencia.²⁴

Por otro lado, se comprueba que los complejos catiónicos (**36**, **37** y **38**) presentan valores mucho más bajos que sus análogos neutros (**26**, **27** y **28**), de acuerdo con la teoría de que la naturaleza neutra de los compuestos limitaba su potencial antitumoral. Asimismo, el valor obtenido para el complejo **36** tras 72 h de incubación en la línea tumoral HeLa ($1.16 \pm 0.13 \mu\text{M}$) coincide prácticamente con el publicado para el compuesto más activo de los acuocomplejos de renio del trabajo del profesor Wilson.¹⁷

En lo referido al tiempo de incubación, la actividad se incrementa al pasar de 24 h a 72 h, en una proporción no necesariamente lineal y que varía para cada compuesto. El incremento en la actividad se aprecia más claramente en la línea celular HeLa, quizás por presentar unos valores a 24 h ya de por sí más bajos que la línea A549, que permite en muchos casos calcular el incremento en el valor de IC₅₀.

4.9.2 Estudios de biodistribución. Medidas de microscopio confocal

Después de los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, se evaluó la biodistribución de los complejos **26** a **38**, por ser los compuestos más activos, así como por permitir comparar la posible diferencia en la acumulación de especies neutras y catiónicas. Además, la notable diferencia observada en las dos líneas celulares, puede ser consecuencia de un modo de acción condicionado por una acumulación en diferentes orgánulos según la cepa tumoral, o bien por la mayor o menor internalización de los compuestos.

En una primera experiencia, se incubó la línea de células tumorales A549 junto con una concentración de 25 μM de los compuestos seleccionados, durante 24 horas. Se empleó un láser de excitación fijado en 405 nm para los complejos catiónicos **36**, **37** y **38** y en 474 nm para los complejos neutros **26**, **27**, **28** y **29**. Como agente de contraste se empleó LysoTracker Red DND-99, un tinte específico de lisosomas (máximo de excitación a 577 nm y máximo de emisión a 590 nm). En la figura 4.21 se pueden apreciar las diferentes imágenes captadas por el microscopio confocal de fluorescencia, donde en general la señal de los compuestos proviene del espacio extracelular, bajo forma de precipitado.

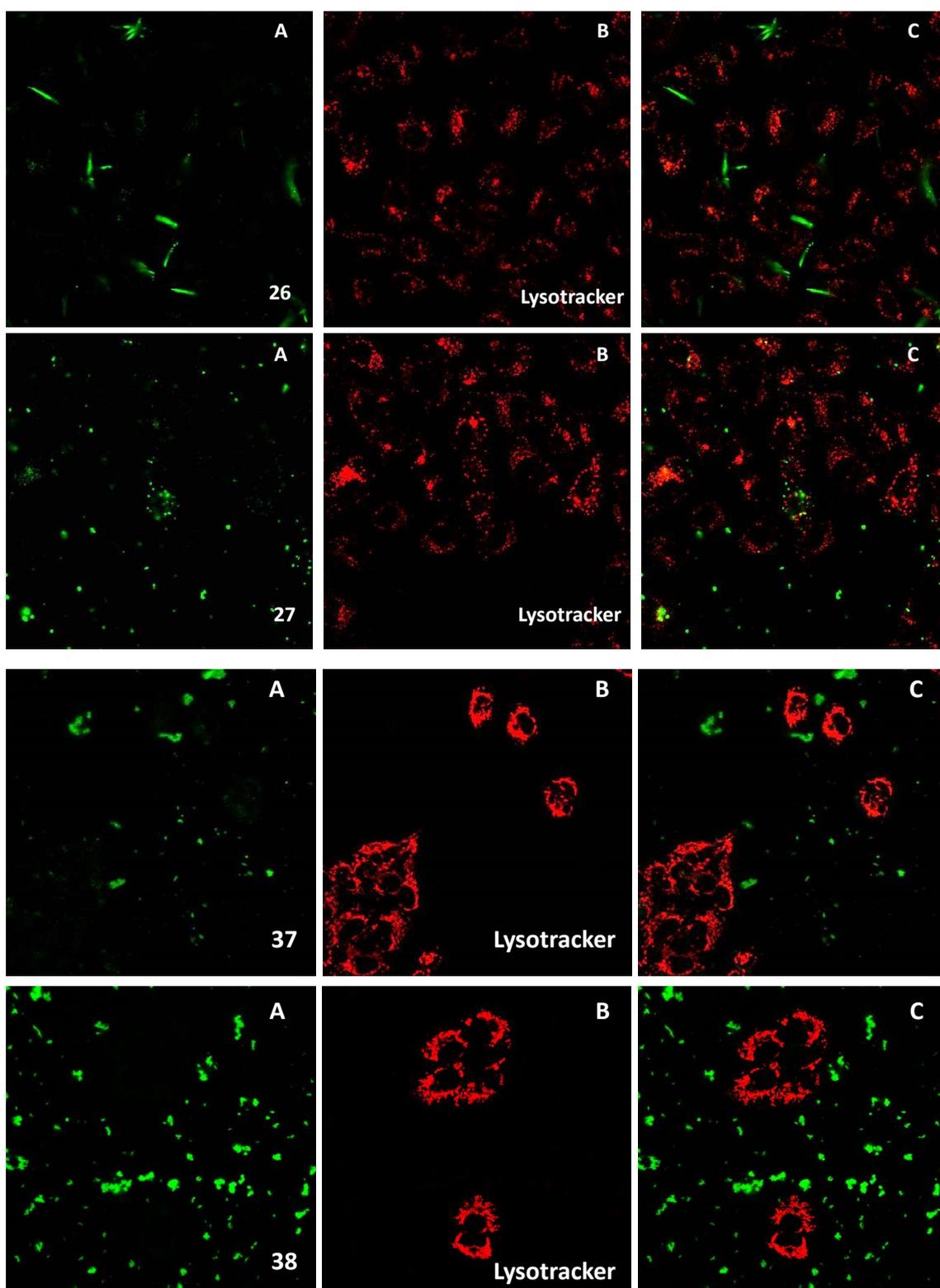


Figura 4.21 Imágenes de **26**, **27**, **37** y **38** incubados a una concentración de 25 μ M sobre células A549 de carcinoma de pulmón a 37°C durante 24 horas. (A) Excitación a 405 nm. (B) Excitación a 588 nm. (C) Superposición de imágenes.

La excepción vino marcada por las imágenes registradas para el compuesto catiónico **36**, en donde se aprecia a las células en un avanzado estado de muerte celular, con

apenas precipitado en el espacio extracelular, indicando que dicha molécula sí se internaliza (figura 4.22). Esta observación concuerda con su valor de IC_{50} previamente calculado ($8.37 \pm 0.29 \mu\text{M}$, tabla 4.8).

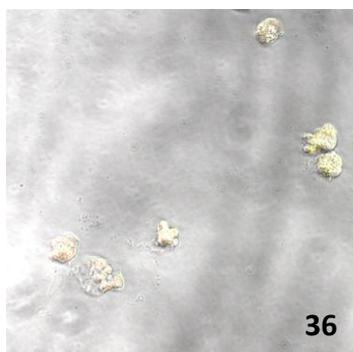


Figura 4.22 Imagen de contraste de **36** incubados a una concentración de $25 \mu\text{M}$ sobre células A549 de carcinoma de pulmón a 37°C durante 24 horas.

En lo referido a la línea celular HeLa, los experimentos de biodistribución se llevaron a cabo empleando una concentración de $5 \mu\text{M}$ y con un tiempo de incubación de 24 horas. El valor de concentración empleado tiene como fin asegurar la suficiente viabilidad de las células para que puedan captar los compuestos y ser observadas aún vivas en el microscopio confocal. De nuevo, las imágenes registradas muestran la presencia de precipitado fuera de las células, aunque en este caso, con una tendencia a acumularse justo en el exterior de las células, pareciendo indicar algún tipo de asociación con la membrana celular. Sin embargo, la baja intensidad de emisión no permitió obtener unas imágenes que corroborasen claramente dicha hipótesis (figura 4.23).

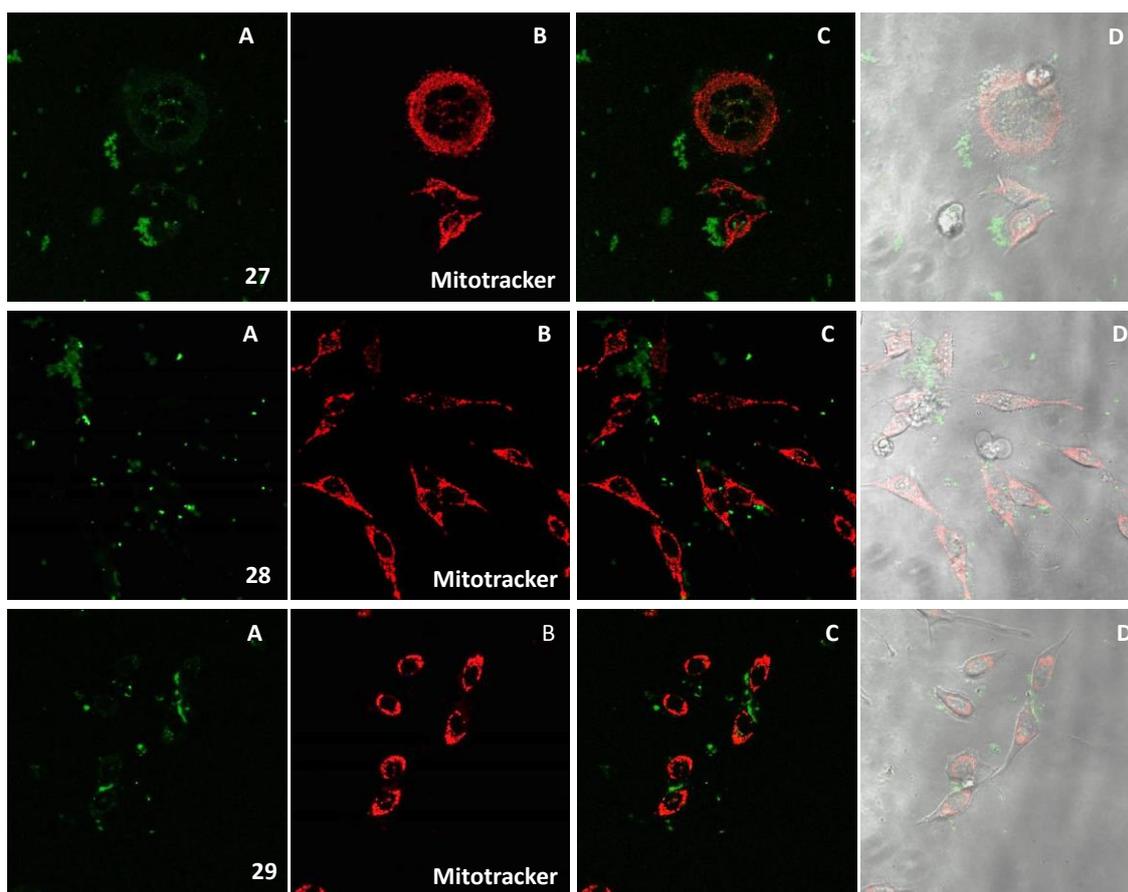


Figura 4.23 Imágenes de **27**, **28** y **29** incubados a una concentración de $5 \mu\text{M}$ sobre células HeLa a 37°C durante 24 horas. (A) Excitación a 405 nm. (B) Excitación a 588 nm. (C) Superposición de imágenes. (D) Imagen de contraste.

Por último, se aumentó la concentración suministrada a las células HeLa, y se redujo el tiempo de incubación a 4 horas. De esta forma, se pretende facilitar la observación de los compuestos preservando la integridad de las células. Tan sólo se seleccionaron los complejos **36**, **37** y **38** por su mayor solubilidad en medio acuoso. Las imágenes de la figura 4.24 permiten comprobar la tendencia de **37** y **38** a asociarse con la membrana celular sin poder determinar si esta asociación responde a una intercalación en la membrana lipídica o a una asociación con la parte externa de la membrana.

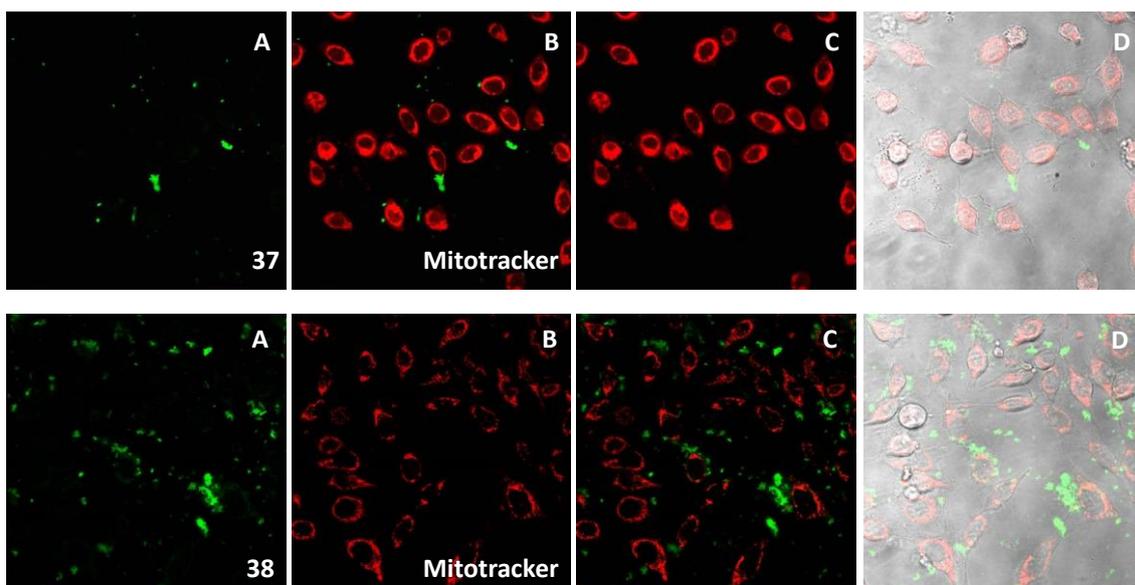


Figura 4.24 Imágenes de **37** y **38** incubados a una concentración de 25 μM sobre células HeLa a 37°C durante 4 horas. (A) Excitación a 405 nm. (B) Excitación a 588 nm. (C) Superposición de imágenes. (D) Imagen de contraste.

Las células incubadas con **36** mostraron claros signos de necrosis por la presencia de un gran abultamiento de la membrana, repitiendo el comportamiento observado durante la incubación con la cepa A549. Asimismo, la señal proviene del interior de la célula, asegurando que existe internalización (figura 4.25).

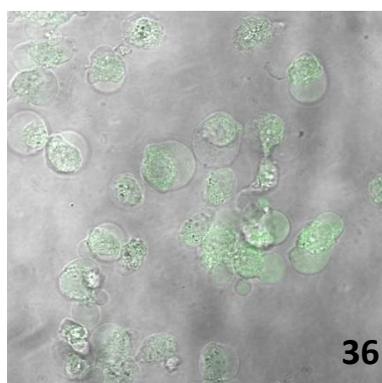


Figura 4.25 Imagen de contraste de **36** incubados a una concentración de 25 μM sobre células HeLa a 37°C durante 4 horas.

Poniendo en conjunto todos los experimentos de biodistribución, se observa que no existe internalización en las células A549 a excepción del complejo **36**, lo que está de acuerdo con los valores obtenidos de citotoxicidad. Sin embargo, respecto a la cepa HeLa, sí se ha podido observar una señal proveniente de la membrana celular para los compuestos **37** y **38**, que son los más activos de la serie heterometálica. Con esta información, se propone que la captación por parte de las células HeLa es mayor que

por parte de las células A549, ayudando a explicar así la selectividad observada hacia la cepa HeLa respecto de la cepa A549.

4.9.3 Acumulación celular por ICP-MS

El hecho de sólo haber podido observar con nitidez la internalización de **36** en las pruebas de biodistribución, plantea la duda de si los demás compuestos sufren reacciones dentro de la célula por el cual se transforman en especies no emisoras, de si existe una descomposición de la especie heterometálica de modo que renio y oro se separan en moléculas diferentes, o de si simplemente ocurren procesos de quenching en el medio celular. Una opción para esclarecer si existe captación de los compuestos a estudio pasa por la determinación de oro aplicando la espectrometría de masas atómica asociada a un instrumento de excitación por plasma (ICP-MS). Esta técnica tiene gran popularidad entre aquellos complejos que carecen de propiedades luminiscentes y que en consecuencia no pueden ser detectados por microscopía de fluorescencia.²⁵

De manera resumida, se incubaron células de la cepa tumoral HeLa junto con **24**, **29** y **38** a una concentración de 25 μM durante 4 horas a 37°C. Pasado ese tiempo, se retiró el medio de cultivo y se lavó con PBS para asegurar la eliminación de todo posible compuesto no asociado a las células. A continuación, se despegaron las células de las placas de cultivo empleando para ello una disolución conteniendo la enzima tripsina, y se cuantificó el número de células con la ayuda de un microscopio. Se centrifugó la suspensión celular, se retiró el medio, y el pellet obtenido se digirió con agua regia concentrada durante 1 noche, con objeto de destruir toda la materia orgánica a la vez que asegurar la disolución de todo el oro presente en la muestra. Finalmente, el resultado de la digestión fue diluído y analizado por ICP-MS, obteniendo los resultados presentados en la tabla 4.9.

Tabla 4.9 Acumulación celular de oro captado por las células HeLa tras incubación con los compuestos **24**, **27** y **38** y sus valores de IC_{50} a las 72 horas de incubación.

Complejo	$\mu\text{g Au}/10^5$ células	IC_{50} HeLa 72 h
24	1.634 \pm 0.011	6.59 \pm 0.50
27	1.420 \pm 0.014	6.46 \pm 0.35
38	2.207 \pm 0.017	2.35 \pm 0.06

Comparando los resultados de **27** y **38**, que se corresponden a la versión neutra y catiónica del mismo compuesto, se demuestra claramente cómo la transformación de **27** en su análogo catiónico **38** ha mejorado sustancialmente su internalización, doblando prácticamente la cantidad de oro acumulado. El hecho de que la acumulación de oro en las células encontrada para el complejo neutro **24**, con una actividad biológica similar a **27**, sea del mismo modo no muy diferente a la acumulación encontrada para **27**, demuestra la validez de la relación entre oro acumulado y citotoxicidad para los derivados heterometálicos. Con todo esto se concluye que el oro ejerce un papel fundamental en la citotoxicidad, y que ésta está fuertemente condicionada por la capacidad de internalización de cada compuesto, que depende a su vez del balance lipofílico. El hecho de que los derivados **26**, **27**, **28**, **29**, **37** y **38** no presenten los mismos valores de citotoxicidad a las 72 h en la línea HeLa, parece descartar la posibilidad de que dichos compuestos se transformen en el monometálico **36** por descomposición, y que sea el renio el único responsable de la citotoxicidad. Por otro lado, la ausencia de señal de estos complejos dentro de la célula debe por tanto asociarse a los bajos rendimientos cuánticos que ya de por sí los caracterizan sumado a procesos de quenching en el interior de la célula. Ante la imposibilidad de localizar los diferentes compuestos sintetizados dentro de la célula, se propone que estén operando dos mecanismos de acción diferentes en función de la naturaleza mono o heterometálica del compuesto. De este modo, mientras que los complejos **26** y **36** tienen la capacidad de penetrar tanto en las células A549 como en las HeLa, los complejos que contienen oro **27**, **28**, **29**, **37** y **38** presentan otro mecanismo de acción, más selectivo hacia las células HeLa, en donde la actividad depende de la naturaleza más o menos lipofílica del complejo así como de su carga.

4.10 Conclusiones

Se han sintetizado tres familias de complejos heterometálicos de renio(I) y oro(I), enlazando ambos metales a través de la funcionalización del ligando quelato unido al renio. En concreto, se ha combinado la estructura típica $[\text{Re}(\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{CO})_3\text{Cl}]$, en donde $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ representa una bipyridina o una fenantrolina, con diferentes complejos de oro cuya naturaleza se ha visto condicionada por el fragmento conector. La conexión entre ambos

metales se ha llevado a cabo a través del ligando quelato, empleando tres tipos de ligandos: la 4,4'-dimetiltiol-2,2'-bipiridina, la 4,4'-dialquinil-2,2'-bipiridina, así como un carbeno NHC fusionado al ligando fenantrolina. El estudio de sus propiedades biológicas ha demostrado el limitado potencial de dichos compuestos neutros por su escasa solubilidad en el medio acuoso y la restringida capacidad de atravesar la membrana celular. Esta limitación ha motivado la transformación de los derivados enlazados por alquinilbipiridinas en sus análogos catiónicos, observando una mejora sustancial en la actividad biológica.

La determinación de las propiedades fotofísicas ha permitido constatar un desplazamiento batocrómico en los perfiles de emisión para aquellos complejos que conectan ambos metales por resonancia, permitiendo alcanzar transiciones con máximos de emisión en torno a 650 nm.

Los experimentos de biodistribución han permitido proponer que la presencia del oro determina el mecanismo de acción del complejo heterometálico, de forma que internalización es más acusada en las células HeLa, explicando así la selectividad observada.

Finalmente, se ha podido establecer una comparativa entre acumulación de complejos neutros y catiónicos por espectrometría de masas atómica acoplada a una fuente de excitación por plasma. Así pues, la acumulación de oro encontrada para el compuesto catiónico **38** ha sido 1.55 veces superior a la observada para su análogo neutro **27**, y 1.35 veces superior a la encontrada para el complejo neutro **24** que conecta renio y oro por una dimetiltiolbipiridina, demostrando que el paso de complejos neutros a catiónicos facilita que las células capten dichos compuestos.

4.11 Experimental

4.11.1 Starting materials

The starting materials $[\text{AuCl}(\text{tht})]$,²⁶ $[\text{AuClPPh}_3]$,²⁷ $[\text{Au}(\text{acac})\text{PPh}_3]$ ²⁸ were prepared according to published procedures. $[\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}]$ and $[\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ were purchased from STREM Chemicals and TCI respectively and used as received. All other reagents were commercially available and were used without further purification. Solvents were dried with a SPS solvent purification system.

4.11.2 Instrumentation

Mass spectra were recorded on a Bruker Esquire 3000 PLUS, with the electrospray (ESI) technique and on a Bruker Microflex (MALDI-TOF). ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ and $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ including 2D experiments, were recorded at room temperature on a Bruker Avance 400 spectrometer (^1H 400.0 MHz, ^{13}C 100.6 MHz, ^{31}P 162.0 MHz) or on a Bruker Avance II 300 spectrometer (^1H 300.0 MHz, ^{13}C 75.5 MHz, ^{31}P 121.5 MHz) with chemical shifts (δ , ppm) reported relative to the solvent peaks of the deuterated solvent. All J values are given in Hz. IR spectra were recorded in neat samples on a Perkin-Elmer Spectrum 100FT-IR spectrometer. Room temperature steady-state emission and excitation spectra were recorded with a Jobin-Yvon-Horiba Fluorolog FL3-11 spectrometer fitted with a JY TBX picosecond detection module. Nanosecond lifetimes were recorded with a Datastation HUB-B apparatus with a nanoLED controller and DAS6 software. The nanoLEDs employed for lifetime measurements had wavelengths of 370 and 390 nm. The lifetime data were fitted using the Jobin-Yvon software package and the Origin Pro 8 program. UV-vis spectra were recorded with 1 cm quartz cells on an Evolution 600 spectrophotometer. The quantum yields were measured in a Hamamatsu Photonics Quantaaurus-QY instrument at 300–950 nm. Measurements were performed by an ICP quadrupole mass spectrometer (Elan DRC-e, PerkinElmer, Shelton, CT, USA) equipped with a standard ICP torch, cross-flow nebulizer, nickel sampler and skimmer cones and DRC. PTFE vessels, micropipette tips, eppendorfs for digestion and polypropylene (PP) tubes were cleaned in 10% HNO_3 overnight and rinsed thoroughly with ultrapure water.

4.11.3 Crystallography

Crystals were mounted in inert oil glass fibres and transferred to the cold gas stream of an Xcalibur Oxford Diffraction diffractometer equipped with a low-temperature attachment. Data were collected using monochromated Mo $\text{K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073$ Å). Scan type ω . Absorption corrections based on multiple scans were applied with the program SADABS²⁹ or using spherical harmonics implemented in SCALE3 ABSPACK scaling algorithm.³⁰ The structures were solved by direct methods and refined on F^2 using the program SHELXL-97.³¹ All nonhydrogen atoms were refined anisotropically. In most of the cases, hydrogen atoms were included in calculated positions and refined using a riding model; some of the hydrogen atoms have been located in the diffraction map. Refinements were carried out by full-matrix least-squares on F^2 for all data.

4.11.4 Procedures

Antiproliferative Studies: MTT Assay.

Exponentially growing cells (A549) were seeded at a density of $\sim 1 \times 10^4$ cells per well in 96-well flat-bottomed microplates and allowed to attach for 24 h prior to addition of compounds. The complexes were dissolved in DMSO and added to cells in concentrations ranging from 1.25 to 50 μM in quadruplicate. Cells were incubated with the compounds for 24 h or 72 h at 37 °C. MTT (10 μL , 5 mg mL^{-1}) was added to each well, and plates were incubated for 2 h at 37 °C. Finally, the growth media was eliminated, and DMSO (100 μL per well) was added to dissolve the formazan precipitates. The optical density was measured at 550 nm using a 96-well multiscanner autoreader (ELISA). The IC_{50} was calculated by nonlinear regression analysis.

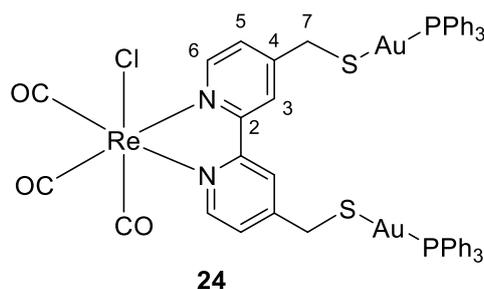
Cell Fluorescence Microscopy Study.

European Collection of Cell Cultures were maintained in 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid (Hepes) modified minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin. A549 cells were detached from the plastic flask using trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution and suspended in an excess volume of growth medium. The homogeneous cell suspension was then distributed into 24-well flat-bottomed microplates over a coverslip placed inside each well, and they were allowed to attach for 24 h prior to addition of compounds. Complexes were added (10 μL) to the cells up to the desired final concentration (from 5 μM to 25 μM). After incubation for 4 h or 24 h at 37 °C, the growth medium was removed, and 0.5 mL of PBS was added for a washing step (three times). Thereafter, 0.5 mL of paraformaldehyde (4%) was added and allowed to stand for 15 min at room temperature. Eventually the paraformaldehyde was removed, and further washings with PBS were performed (3×0.5 mL). The coverslips were collected from the 24-well plate, immersed for 1 or 2 s in distilled water, and let them to drip the water. Then, they are placed over a microscope slide, where a drop of fluoromount with 2 μM DRAQ5 was previously placed. Preparations were viewed using an Olympus FV10-i oil-type compact confocal laser microscope using a 10 \times or 60 \times objective, with excitation wavelength at 405 and 650 nm.

Cell uptake determination

Twelve-well plates were seeded with 10^5 cells in 1.6 mL culture medium per well. Cultures were incubated at 37°C in an atmosphere of 5% $\text{CO}_2/95\%$ for 24 h. The culture medium was then removed and replaced with 2 mL drug containing medium at $25\ \mu\text{M}$. After 4 h of incubation at 37°C , the medium was removed and the cell monolayer washed two times with phosphate-buffer saline. Then 1 mL of a trypsin solution was added and the plate was placed in the incubator for 5 min. 500 μL of fresh medium was then added and the resulting suspension was pelleted in 1.5 mL eppendorfs by centrifuging 5 min at 1200 rpm. The pellets were resuspended in 500 μL of fresh medium, and a 50 μL fraction was separated for cell counting employing a Neubauer chamber after staining with Trypan Blue. The suspension was centrifuged again, the medium was removed and 0.5 mL of concentrated aqua regia was added for digestion overnight. The resulting solutions were diluted gravimetrically with ultrapure water and analysed by ICP-MS.

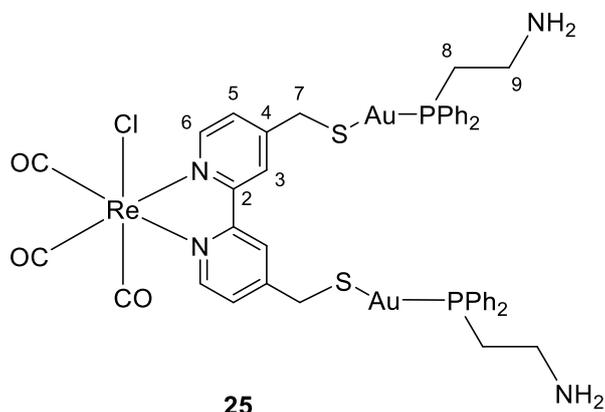
4.11.5 Syntheses



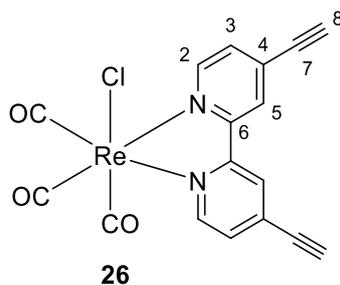
To a stirred solution of **Re3** (1eq, 19.1 mg, 0.034 mmol) in DCM (5 mL) was added AuClPPh_3 (2eq, 34.1 mg, 0.069 mmol) and potassium carbonate in excess and the mixture was allowed to react 1 night at r.t. The resulting red solution was filtered over celite and concentrated, and ether was added to afford a red solid (36.7 mg, 73 %).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.55 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H, H_6), 8.21 (s, 2H, H_3), 7.51 – 7.32 (m, 32H, $\text{H}_5 + \text{H}_{\text{Ar}}$), 4.11 (d, $J = 4.1$ Hz, 2H, H_7). ^{31}P NMR (121 MHz, CDCl_3): δ 37.06 (s). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 197.74 (s, CO), 190.12 (s, CO), 160.13 (s,

2C, C₂), 155.77 (s, 2C, C₄), 152.53 (s, 2C, C₆), 134.16 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 13.7$ Hz, 12C, *ortho*-C, Ph), 132.07 (d, $^4J_{\text{P-C}} = 2.1$ Hz, 6C, *para*-C, Ph), 129.49 (d, $^3J_{\text{P-C}} = 11.5$ Hz, 12C, *meta*-C, Ph), 130.00 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 57.7$ Hz, 6C, *ipso*-C, Ph), 126.84 (s, 2C, C₃), 123.38 (s, 2C, C₅), 32.16 (s, 2C, C₇). **IR** (cm⁻¹): 3055 ν (C_{Ar}-H), 2012, 1876 ν (CO), 1609 ν (C=N).

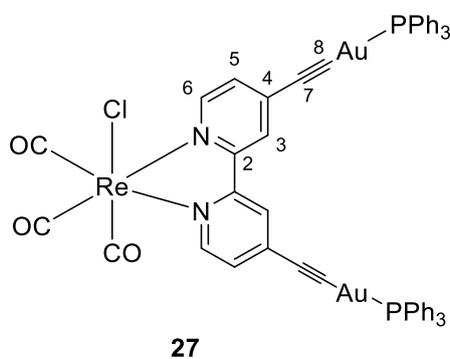


To a stirred solution of **Re3** (1 eq, 46.9 mg, 0.085 mmol) in DCM (5 mL) was added **E** (2 eq, 78.2 mg, 0.169 mmol) followed by DIPEA (2 eq, 29.6 μ L, 0.169 mmol). The solution was allowed to react 1 night at r.t. The resulting red solution was washed twice with a saturated sodium hydrogen carbonate solution, dried with anhydrous Na₂SO₃, filtered and concentrated. Ether was then added to afford a yellow solid (56.7 mg, 47%). **¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂):** δ 8.66 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, H₆), 8.34 (s, 2H, H₃), 7.64 – 7.56 (m, 8H, H_{Ar}), 7.49 – 7.42 (m, 14H, H_{Ar} + H₅), 4.12 (s, 4H, NH₂), 2.94 – 2.85 (m, 4H, H₉), 2.63 – 2.55 (m, 4H, H₈). **³¹P NMR (162 MHz, CD₂Cl₂):** δ 29.15 (s). **¹³C NMR (101 MHz, CD₂Cl₂):** δ 198.53 (s, CO), 161.28 (s, 2C, C₆), 156.19 (s, 2C, C₄), 152.81 (s, 2C, C₆), 133.68 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 13.1$ Hz, 12C, *ortho*-C, Ph), 132.14 (s, 6C, *para*-C, Ph), 130.87 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 56.2$ Hz, 6C, *ipso*-C, Ph), 129.76 (d, $^3J_{\text{P-C}} = 11.0$ Hz, 12C, *meta*-C, Ph), 127.25 (s, 2C, C₃), 123.94 (s, 2C, C₅), 39.08 (s, 2C, C₉), 32.52 (s, 2C, C₈). **IR** (cm⁻¹): 3052 ν (C_{Ar}-H), 2015, 1880 ν (CO), 1612 ν (C=N).



4,4'-dialkynyl-2,2'-bipyridine (1 eq, 129 mg, 0.632 mmol) and $\text{Re}(\text{CO})_5\text{Cl}$ (1 eq, 228.7 mg, 0.632 mmol) were suspended in toluene (10 mL) and heated at 80°C for 8 h. The suspension was cooled to r.t. then filtered and washed with a small amount of toluene and then petroleum ether. The compound was obtained as an orange solid (306.3 mg, 95 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 9.01 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, H_6), 8.20 (s_{br}, 2H, H_3), 7.55 (dd, $J = 5.8, 1.7$ Hz, 2H, H_5), 3.65 (s, 2H, H_8). $^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3): δ 196.9 (s, CO), 190.3 (s, CO), 155.3 (s, 2C, C_6), 153.2 (s, 2C, C_2), 133.9 (s, 2C, C_4), 129.6 (s, 2C, C_3), 128.3 (s, 2C, C_8), 125.7 (s, 2C, C_5), 87.3 (s, 2C, C_7). IR (ν , cm^{-1}): 3222 $\nu(\text{C}\equiv\text{C}-\text{H})$, 3056 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}-\text{H})$, 2107 $\nu(\text{C}\equiv\text{C})$, 2016, 1884 $\nu(\text{CO})$, 1605 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}=\text{N})$. HRMS (m/z): 532.9685 [$\text{M} + \text{Na}$], $\text{C}_{17}\text{H}_8\text{ClN}_2\text{NaClO}_3\text{Re}$ (532.9664).

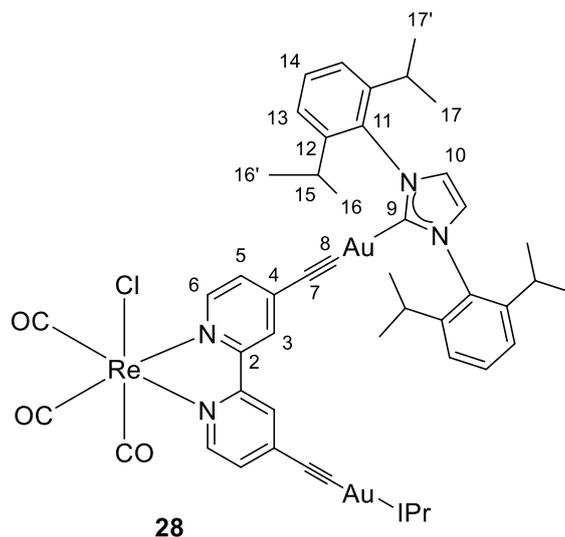


To a stirred solution of **26** (1 eq, 13 mg, 0.0255 mmol) in DCM (2.5 mL) was added acacAuPPh_3 (2 eq, 28.2 mg, 0.031 mmol). After 3 hours the solvent was reduced to minimum volume and petroleum ether was added to afford a yellow solid (28.6 mg, 79%).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 8.78 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H, H_6), 8.10 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H, H_3), 7.63 – 7.45 (m, 30H, H_{Ar} , Ph), 7.41 (dd, $J = 5.8, 1.6$ Hz, 2H, H_5). $^{31}\text{P NMR}$ (121 MHz, CD_2Cl_2): δ 41.49 (s). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CD_2Cl_2): δ 198.47 (s, CO), 155.85 (s, 2C, C_2), 152.76 (s, 2C, C_6), 137.62 (s, 2C, C_4), 134.86 (d, $^2J_{\text{P-C}} = 13.8$ Hz, 12C, *ortho*-C, Ph), 132.38 (s, 6C, *para*-C, Ph), 129.99 (d, $^1J_{\text{P-C}} = 57.3$ Hz, 6C, *ipso*-C, Ph), 129.86

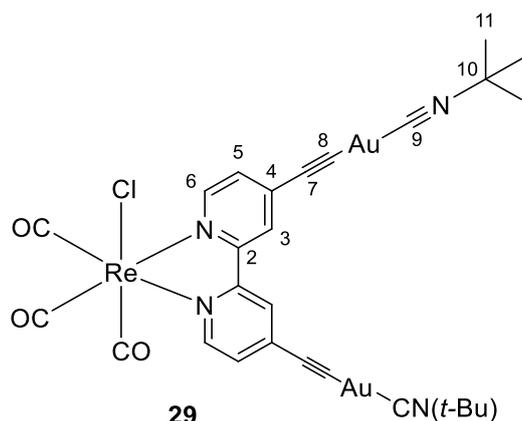
4.11 Experimental

(d, $^2J_{\text{P-C}} = 11.3$ Hz, 12C, *meta*-C, Ph), 129.86 (s, 2C, C₅), 126.37 (s, 2C, C₃), 110.60 (s, 1C, C₈), 100.22 (s, 1C, C₇). **IR** (cm⁻¹): 3046 ν (C_{Ar}-H), 2107 ν (C \equiv C), 1998, 1884 ν (CO), 1600 ν (C_{Ar}=N). **HRMS** (m/z): 1391.1089 [M-Cl], C₅₃H₃₀Au₂ClN₂O₃P₂Re (1391.1087).



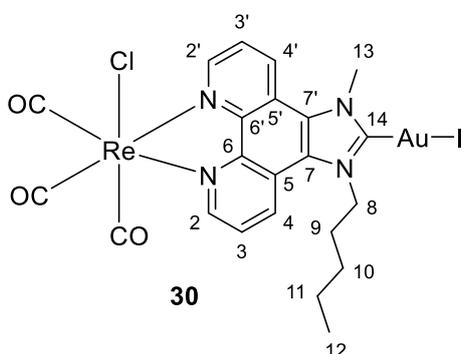
To a stirred solution of **26** (1 eq, 15 mg, 0.0294 mmol) in MeOH (5 mL) was added a solution of KOH (1eq, 3.87 mg, 0.0588 mmol) in MeOH (3 mL). The mixture was stirred 24 h at r.t. and then purified by alumina column chromatography using Ether/MeOH (97/3 to 93/7) (22.4 mg, 15%).

¹H NMR (300 MHz, Acetone): δ 8.67 (d_{br}, $J = 5.8$ Hz, 2H, H₆), 8.22 (d_{br}, $J = 1.6$ Hz, 2H, H₃), 7.81 (s, 4H, H₁₀), 7.61 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H, H₁₄), 7.45 (d, $J = 7.8$ Hz, 8H, H₁₃), 7.24 (dd, $J = 5.8, 1.6$ Hz, 2H, H₅), 2.72 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H, H₁₅), 2.68 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H, H_{15'}), 1.39 (d, $J = 6.9$ Hz, 24H, CH₃), 1.27 (d, $J = 6.9$ Hz, 24H, CH₃). **¹³C NMR (101 MHz, Acetone):** δ 199.26 (s, CO), 191.08 (s, CO), 189.94 (s, 2C, C₉), 156.34 (s, 2C, C₂), 152.64 (s, 2C, C₆), 148.63 (s, 2C, C₈), 146.68 (s, 4C, C₁₂), 139.06 (s, 2C, C₄), 135.40 (s, 4C, C₁₁), 131.41 (s, 2C, C₁₄), 129.78 (s, 2C, C₅), 126.91 (s, 2C, C₃), 125.32 (s, 4C, C₁₀), 125.00 (s, 8C, C₁₃), 101.18 (s, 2C, C₇), 24.91 (s, 8C, CH₃), 24.13 (s, 8C, CH₃). **IR** (cm⁻¹): 2962 ν (C_{sp3}-H), 2110 ν (C \equiv C), 2016, 1911, 1888 ν (CO), 1603 ν (C_{Ar}=N).



To a suspension of **26** (1 eq, 40 mg, 0.078 mmol) and (tert-butyl-isocyanide) gold(I) chloride (2 eq, 49.5 mg, 0.157 mmol) in MeOH (5mL) was added a solution of KOH (2.1 eq, 10.8 mg, 0.164 mmol) in MeOH (2 mL) and the mixture was allowed to react 1 h at r.t. MeOH was then evaporated and the residue redissolved in DCM. After filtration over celite, the volume was reduced to 1-2 mL and ether was added to precipitate a yellow solid (64.5 mg, 77 %).

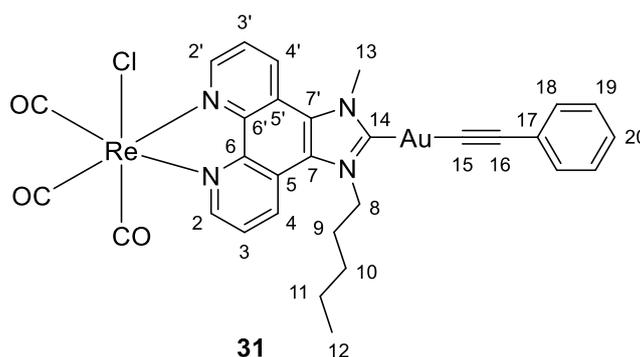
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.81 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, H₂), 8.04 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H, H₅), 7.38 (dd, *J* = 5.8, 1.6 Hz, 2H, H₃), 1.60 (s, 18H, H₁₁). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃):** δ 197.52 (s, CO), 189.91 (s, CO), 155.37 (s, 2C, C₆), 152.40 (s, 2C, C₂), 137.34 (s, 2C, C₉), 136.73 (s, 2C, C₄), 129.58 (s, 2C, C₃), 126.07 (s, 2C, C₅), 99.50 (s, 2C, C₇), 59.12 (s, 2C, C₁₀), 29.94 (s, 6C, C₁₁). **IR (cm⁻¹):** 2984 ν(C_{sp³}-H), 2231 ν(C≡N), 2119 ν(C≡C), 2016, 1887 ν(CO), 1603 ν(C_{Ar}=N).



To a stirred solution of **G** (1 eq, 150 mg, 0.203 mmol), in a mixture of DCM (21 mL) and MeOH (14 mL) was added [AuCl(tht)] (1 eq, 65.1 mg, 0.203 mmol) followed by NBu₄(acac) (1 eq, 69.4 mg, 0.203 mmol). After 2h30 in the dark the yellow solution

turned to a suspension. Solvent was evaporated to 1-2 mL and more MeOH was added. The yellow solid was filtered and washed with MeOH (154.9 mg, 82%).

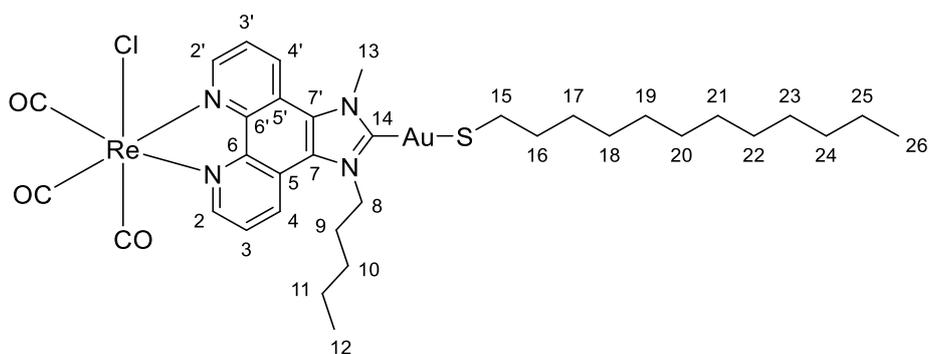
^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 9.55 – 9.49 (m, 3H, $\text{H}_2 + \text{H}_2' + \text{H}_4$ or H_4'), 9.30 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_4 or H_4'), 8.27 (dd, $J = 8.7, 5.1$ Hz, 1H, H_3 or H_3'), 8.23 (dd, $J = 8.3, 5.5$ Hz, 1H, H_3 or H_3'), 5.15 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H, H_8) 4.68 (s, 3H, H_{13}), 2.03-1.92 (m, 2H, H_9), 1.55-1.32 (m, 4H, $\text{H}_{10} + \text{H}_{11}$), 0.88 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H_{12}). **^{13}C NMR (101 MHz, DMSO):** δ 197.62 (s, CO), 188.67 (s, C_{14}), 152.96 (s, C_2 or C_2'), 152.87 (s, C_2 or C_2'), 144.48 (s, 2C, $\text{C}_6 + \text{C}_6'$), 134.28 (s, C_4 or C_4'), 133.75 (s, C_4 or C_4'), 127.33 (s, C_3 or C_3'), 127.05 (s, C_7), 126.82 (s, C_3 or C_3'), 125.19 (s, C_7), 120.96 (s, C_5 or C_5'), 120.31 (s, C_5 or C_5'), 50.74 (s, C_8), 39.73 (s, C_9), 28.77 (s, C_{13}), 27.86 (s, C_{10}), 21.66 (s, C_{11}), 13.86 (s, C_{12}). **IR (cm^{-1}):** 2016, 1885 $\nu(\text{CO})$, 1662 $\nu(\text{N-C=O})$. **HRMS (m/z):** 956.9389 [$\text{M}+\text{Na}^+$], $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{AuClN}_4\text{NaO}_3\text{Re}$ (909.0916).



To a solution of KOH (1.2 eq, 1.6 mg, 0.024 mmol) in MeOH (5 mL) was added **30** (1 eq, 20 mg, 0.021 mmol) and the resulting suspension was allowed to react overnight. Water was then added and methanol was evaporated. DCM was added and the organic phase was decanted and evaporated. The resulting solid was washed with MeOH to remove traces of water. (15.2 mg, 80 %).

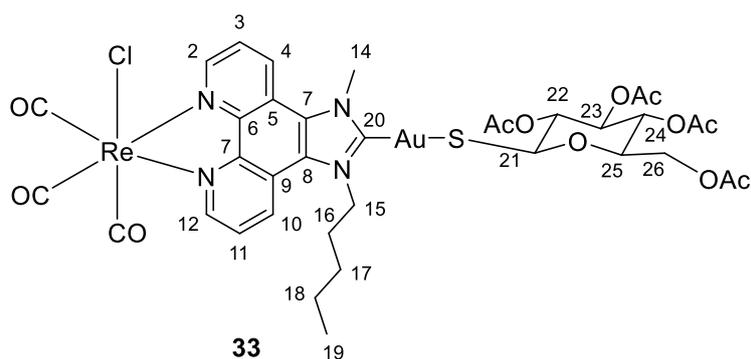
^1H NMR (400 MHz, DMSO): δ 9.53-9.49 (m, 3H, $\text{H}_2 + \text{H}_2' + \text{H}_4$ or H_4'), 9.27 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H_4 or H_4'), 8.26 (dd, $J = 8.7, 5.2$ Hz, 1H, H_3 or H_3'), 8.21 (dd, $J = 8.6, 5.2$ Hz, 1H, H_3 or H_3'), 7.29 – 7.15 (m, 5H, H_{Ar}), 5.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H, H_8), 4.70 (s, 3H, H_{13}), 2.04 – 1.93 (m, 2H, H_9), 1.57 – 1.47 (m, 2H, H_{10}), 1.44 – 1.35 (m, 2H, H_{11}), 0.90 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H_{12}). **^{13}C NMR (101 MHz, DMSO):** δ 197.62 (s, CO), 195.17 (s, C_{14}), 152.76 (s, C_2 or C_2'), 152.67 (s, C_2 or C_2'), 144.32 (s, $\text{C}_6 + \text{C}_6'$), 134.18 (s, C_4 or C_4'), 133.61 (s, C_4 or C_4'), 131.14 (s, 2C, C_{19}), 128.13 (s, C_{18}), 127.70 (s, C_3 or C_3'),

127.30 (s, C₁₇), 127.19 (s, C₃ or C_{3'}), 126.71 (s, C₂₀), 125.87 (s, C₇ or C_{7'}), 125.45 (s, C₇ or C_{7'}), 120.90 (s, C₅ or C_{5'}), 120.25 (s, C₅ or C_{5'}), 104.16 (s, C₁₆), 50.88 (s, C₈), 39.78 (s, C₁₃), 29.02 (s, C₉), 27.95 (s, C₁₀), 21.81 (s, C₁₁), 13.80 (s, C₁₂). **IR** (cm⁻¹): 2018, 1890 ν(CO), 1662 ν(N-C=O). **HRMS** (m/z): 909.0857 [M+H⁺], C₃₀H₂₆AuClN₄O₃Re (909.0916).


32

To a suspension of **30** (1 eq, 25 mg, 0.027 mmol) in degassed DCM (7 mL) was added dodecanethiol (1 eq, 4.9 μL, 0.025 mmol) followed by K₂CO₃ (excess). After 1 night of reaction the suspension turned from yellow suspension to orange solution with remaining potassium carbonate. Water was then added and the organic phase was decanted. The aqueous phase was extracted once with DCM and then the combined organic phases were dried with anhydrous Na₂SO₄. DCM was concentrated and hexane was added to afford an orange solid. (21.5 mg, 79%).

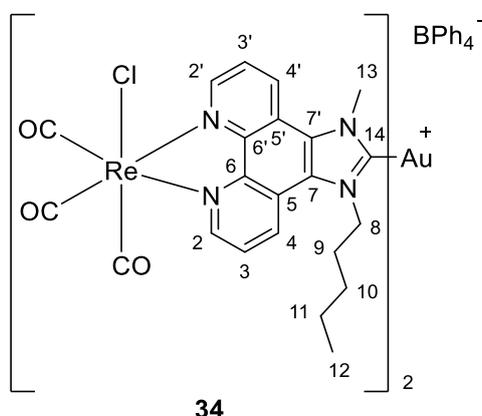
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.50 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H, H₂ + H_{2'}), 9.21 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.90 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.05 (dd, *J* = 8.6, 5.1 Hz, 1H, H₃ or H_{3'}), 8.03 (dd, *J* = 8.6, 5.1 Hz, 1H, H₃ or H_{3'}), 4.99 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H₈), 4.63 (s, 3H, H₁₃), 3.01 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H₁₅), 2.01– 1.91 (m, 2H, H₉), 1.80 (q_{ap}, *J* = 7.6 Hz, 2H, H₁₆), 1.56 – 1.45 (m, 4H, H₁₀ + H₁₇), 1.45 – 1.36 (m, 2H, H₁₁), 1.36 – 1.19 (m, 16H, H₁₈ to H₂₅), 0.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H₁₂), 0.87 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H₂₆). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃):** δ 196.79 (s, CO), 194.50 (s, C₁₄), 188.75 (s, CO), 152.78 (s, C₂ or C_{2'}), 152.64 (s, C₂ or C_{2'}), 145.57 (s, C₆ or C_{6'}), 145.51 (s, C₆ or C_{6'}), 131.79 (s, C₄ or C_{4'}), 131.74 (s, C₄ or C_{4'}), 127.08 (s, C₇), 126.82 (s, C₃ or C_{3'}), 126.73 (s, C₃ or C_{3'}), 125.82 (s, C_{7'}), 121.18 (s, C₅ or C_{5'}), 120.69 (s, C₅ or C_{5'}), 51.89 (s, C₈), 40.33 (s, C₁₃), 38.76 (s, C₁₆), 32.08 (s, C_{alk}), 29.91 (s, C_{alk}), 29.89 (s, C_{alk}), 29.83 (s, C_{alk}), 29.74 (s, C_{alk}), 29.70 (s, C_{alk}), 29.52 (s, C_{alk}), 28.75 (s, C_{alk}), 28.59 (s, C_{alk}), 22.84 (s, C_{alk}), 22.48 (s, C_{alk}), 14.28 (s, C₂₆), 14.01 (s, C₂₆). **IR** (cm⁻¹): 2019, 1893 ν(CO), 1662 ν(N-C=O).



To a suspension of **30** (1 eq, 60 mg, 0.064 mmol) in DCM (10 mL) was added thio-beta glucosetetraacetate (1 eq, 26.5 mg, 0.070 mmol) followed by K_2CO_3 in excess. After 1 night of reaction the suspension turned from yellow suspension to orange solution with remaining potassium carbonate. The suspension was filtered over celite and the filtrate was concentrated and purified by silica gel column chromatography employing 97/3 DCM/MeOH as eluent (57.1 mg, 76%).

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 9.59 – 9.51 (m, 4H, $H_{2+H_2'}+H_{12+H_{12}'}$), 9.26 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_{10} or H_{10}'), 9.22 – 9.15 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H_{10} or H_{10}'), 8.97 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, H_4 or H_4'), 8.91 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_4 or H_4'), 8.16 – 8.02 (m, 4H, $H_3+H_3'+H_{11}+H_{11}'$), 5.29 – 4.97 (m, 12H, $H_{21-24}+H_{21'-24'}+H_{15}+H_{15}'$), 4.76 (s, 3H, H_{14}), 4.69 (s, 3H, H_{14}'), 4.38 – 4.28 (m, 2H, H_{26} or H_{26}'), 4.19 – 4.12 (m, 2H, H_{26} or H_{26}'), 3.87 – 3.79 (m, 2H, $H_{25}+H_{25}'$), 2.16 (s, 6H, $CH_3(OAc)$), 2.13 – 2.01 (m, 4H, $H_{16}+H_{16}'$), 2.08 (s, 6H, $CH_3(OAc)$), 2.06 (s, 6H, $CH_3(OAc)$), 2.03 (s, 6H, $CH_3(OAc)$), 1.67 – 1.56 (m, 4H, $H_{17}+H_{17}'$), 1.46 (dt, $J = 14.5, 7.4$ Hz, 4H, $H_{18}+H_{18}'$), 0.97 (td, $J = 7.4, 5.5$ Hz, 4H, $H_{19}+H_{19}'$). **^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$):** δ 196.78 (s, $C\equiv O$), 196.77 (s, $C\equiv O$), 196.75 (s, $C\equiv O$), 196.71 (s, $C\equiv O$), 188.75 (s, $C\equiv O$), 188.73 (s, $C\equiv O$), 170.85 (s, $C=O$), 170.32 (s, $C=O$), 170.22 (s, $C=O$), 169.97 (s, $C=O$), 153.05 (s, C_2 or C_2' or C_{12} or C_{12}'), 152.80 (s, 2C, C_2 or C_2' or C_{12} or C_{12}' + C_2 or C_2' or C_{12} or C_{12}'), 152.62 (s, C_2 or C_2' or C_{12} or C_{12}'), 145.60 (s, C_6 or C_6' or C_{13} or C_{13}'), 145.58 (s, C_6 or C_6' or C_{13} or C_{13}'), 145.53 (s, C_6 or C_6' or C_{13} or C_{13}'), 145.35 (s, C_6 or C_6' or C_{13} or C_{13}'), 131.90 (s, 2C, C_4 or C_4' or C_{10} or C_{10}' + C_4 or C_4' or C_{10} or C_{10}'), 131.81 (s, C_4 or C_4' or C_{10} or C_{10}'), 131.75 (s, C_4 or C_4' or C_{10} or C_{10}'), 127.06 (s, C_8 or C_8'), 127.03 (s, C_8 or C_8'), 126.90 (s, 2C, C_3 or C_3' or C_{11} or C_{11}' + C_3 or C_3' or C_{11} or C_{11}'), 126.85 (s, C_3 or C_3' or C_{11} or C_{11}'), 126.74 (s, C_3 or C_3' or C_{11} or C_{11}'), 125.84 (s, C_7 or C_7'), 125.69 (s, C_7 or C_7'), 121.17 (s, C_5 or C_5'), 121.12 (s, C_5 or C_5'), 120.76 (s, C_9 or C_9'), 120.56 (s, C_9 or C_9'),

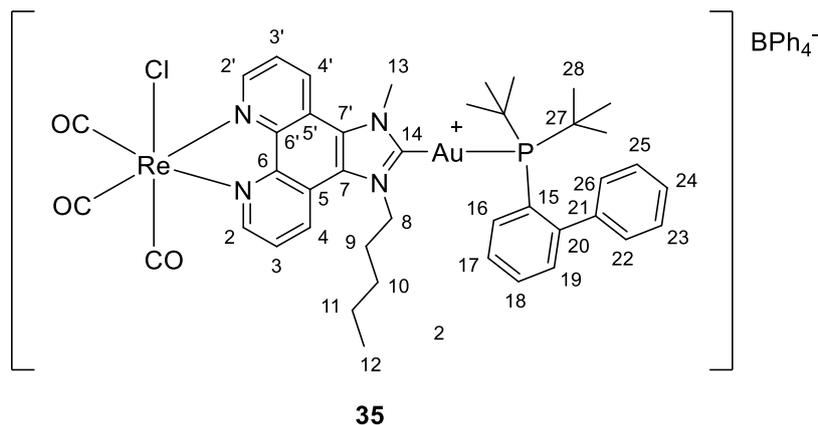
83.32 (s, C₂₁ + C_{21'}), 78.18 (s, C₂₂ or C₂₃ or C₂₄), 76.09 (s, C₂₅ + C_{25'}), 74.42 (s, C₂₂ or C₂₃ or C₂₄), 69.15 (s, C₂₂ or C₂₃ or C₂₄), 63.07 (s, C₂₆ + C_{26'}), 51.97 (s, C₁₅ or C_{15'}), 51.73 (s, C₁₅ or C_{15'}), 40.47 (s, C₁₄ or C_{14'}), 40.27 (s, C₁₄ or C_{14'}), 31.06 (s, 2C, CH₃OAc), 29.75 (s, C₁₆ or C_{16'}), 29.63 (s, C₁₆ or C_{16'}), 28.66 (s, C₁₇ or C_{17'}), 28.55 (s, C₁₇ or C_{17'}), 22.79 (s, C₁₈ or C_{18'}), 22.49 (s, C₁₈ or C_{18'}), 22.46 (s), 21.41 (s, 2C, CH₃OAc), 20.87 (s, 2C, CH₃OAc), 20.82 (s, 2C, CH₃OAc), 13.97 (s, C₁₉ or C_{19'}), 13.93 (s, C₁₉ or C_{19'}). **IR** (cm⁻¹): 2020, 1890 ν (CO), 1746 ν (O-C=O), 1220, 1032 ν (C-O st). **HRMS** (m/z): 1193.1075 [M+Na], C₃₆H₃₉AuClN₄O₁₂ReS (1193.1080).



To a suspension of **H** (1 eq, 20 mg, 0.0215 mmol) in DCM (7 mL) was added **30** (1 eq, 20.1 mg, 0.0215 mmol) followed by excess of potassium carbonate. After 31h at r.t. water was added and the organic layer was decanted. The aqueous phase was washed with DCM (2 x10 mL) and the combined organic phases were dried with anhydrous sodium sulfate. The suspension was decanted from the sodium sulfate, and the solvent evaporated. After redissolving in acetone and filtration over celite, addition of petroleum ether afforded a yellow-orange solid (34.5 mg, 93%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 9.65 – 9.54 (m, 6H, H₂+H_{2'}+H₃ or H_{3'}), 9.40 – 9.33 (m, 2H, H₃ or H_{3'}), 8.29 (d, J = 5.2 Hz, 4H, H₄+H_{4'}), 7.20 – 7.14 (t, J = 7.4 Hz, 8H, H_{meta}), 6.94 – 6.91 (t, J = 7.4 Hz, 8H, H_{ortho}), 6.80 – 6.75 (t, 4H, H_{para}), 5.30 (s_{br}, 4H, H₈), 4.84 (s, 6H, H₁₃), 2.13 – 2.06 (m, 4H, H₉), 1.64 – 1.56 (m, 4H, H₁₀), 1.46 – 1.34 (m, 4H, H₁₁), 0.90 (t, J = 7.3 Hz, 4H, H₁₂). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO):** δ 197.59 (s, CO), 196.51 (s, CO), 191.40 (s, 1C, C₁₄), 191.35 (s, 1C, C_{14'}), 189.73 (s, CO), 188.55 (s, CO), 163.34 (q, $^1J_{P-B}$ = 49.4 Hz, 4C, *ipso*-C, BPh₄), 153.33 (s, 4C, C₂+C_{2'}), 144.64 (s, 4C, C₆+C_{6'}), 135.51 (s_{br}, 8C, *meta*-C, BPh₄), 134.23 (s, 2C, C₃ or C_{3'}), 133.59 (s, 2C, C₃ or C_{3'}), 127.62 (s, 2C, C₇ or C_{7'}), 127.41 (s, 2C, C₄ or C_{4'}), 126.67 (s, 2C, C₄ or C_{4'}),

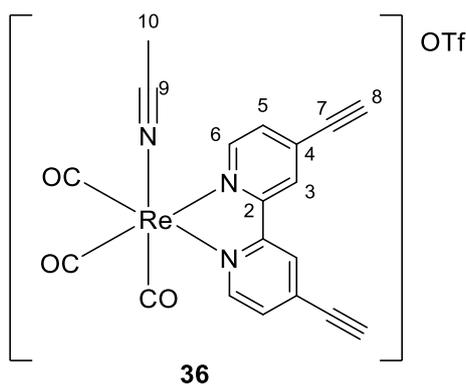
125.80 (s, 2C, C₇ or C_{7'}), 125.27 (q, ²J_{P-B} = 2.7 Hz, 8C, *ortho*-C, BPh₄), 121.49 (s_{br}, 4C, *para*-C, BPh₄), 120.96 (s, 2C, C₅ or C_{5'}), 120.34 (s, 2C, C₅ or C_{5'}), 51.50 (s, 2C, C₈+C_{8'}), 39.91 (s, 2C, C₁₃+C_{13'}), 29.37 (s, 2C, C₉+C_{9'}), 28.37 (s, 2C, C₁₀+C_{10'}), 21.95 (s, 2C, C₁₁+C_{11'}), 13.85 (s, 2C, C₁₂+C_{12'}). **IR (cm⁻¹):** 3057 ν(C_{Ar}-H) 2017, 1885 ν(CO). **HRMS (m/z):** 1417.1189 M⁺, C₄₄H₄₀AuCl₂N₈O₆Re₂ (1417.1218).



To a stirred solution of **H** (1 eq, 60 mg, 0.0645 mmol) in DCM (5 mL) was added [AuCl(JohnPhos)] (1 eq, 34.2 mg, 0.0645 mmol) followed by NBu₄(acac) (1 eq, 22 mg, 0.0645 mmol). The reaction mixture was stirred 1 night at r.t. and evaporated. The crude was then washed several times with MeOH and finally recrystallised in CH₃CN/ether. (63.3 mg, 69%).

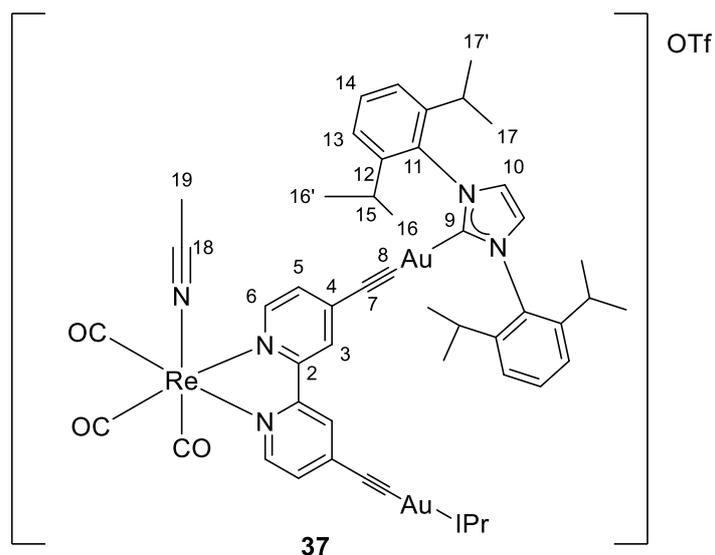
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ 9.59 (dd, *J* = 5.2, 1.1 Hz, 1H, H₂ or H_{2'}), 9.58 (dd, *J* = 5.1, 1.1 Hz, 1H, H₂ or H_{2'}), 9.34 (dd, *J* = 8.7, 1.1 Hz, 1H, H₃ or H_{3'}), 9.04 (dd, *J* = 8.7, 1.1 Hz, 1H, H₃ or H_{3'}), 8.14 (dd, *J* = 8.7, 5.2 Hz, 1H, H₄ or H_{4'}), 8.11 (dd, *J* = 8.7, 5.2 Hz, 1H, H₄ or H_{4'}), 8.11 – 8.06 (m, 1H, H_{JohnPhos}), 7.68 – 7.63 (m, 2H, H_{JohnPhos}), 7.38 – 7.30 (m, 6H, H_{JohnPhos}), 7.29 – 7.24 (m, 8H, H_{ortho}), 7.02 – 6.96 (m, 8H, H_{meta}), 6.86 – 6.81 (m, 4H, H_{para}), 4.79 – 4.73 (m, 2H, H₈+H_{8'}), 4.39 (s, 3H, H₁₃), 1.94 – 1.83 (m, 2H, H₉+ H_{9'}), 1.56 – 1.42 (m, 1H, H₁₀ or H_{10'}), 1.55 (s, 9H, H₂₈ or H_{28'}), 1.51 (s, 9H, H₂₈ or H_{28'}), 1.39 – 1.28 (m, 3H, H₁₀ or H_{10'}+H₁₁+H_{11'}), 0.87 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H₁₂). **³¹P NMR (162 MHz, CD₃CN):** δ 64.18 (s). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO):** δ 196.50 (s, C₁₄), 196.19 (s, CO), 195.08 (s, CO), 188.53 (s, CO), 163.35 (q, ¹J_{P-B} = 49.3 Hz, 4C, *ipso*-C, BPh₄), 153.44 (s, C₂ or C_{2'}), 153.35 (s, C₂ or C_{2'}), 148.70 (d, ¹J_{P-C} = 14.1 Hz, C₁₅), 144.64 (s, 2C, C₆ + C_{6'}), 144.61 (s, 2C, C₆ + C_{6'}), 143.01 (d, *J*² = 6.1 Hz, C₂₀), 135.51 (s, 8C, *meta*-C, BPh₄), 134.75 (s, C_{JohnPhos}), 134.09 (s, C₃ or C_{3'}), 133.47 (s, C₃ or

C_3'), 132.61 (d, $^2J_{P-C} = 7.7$ Hz, C_{16}), 131.33 (s, $C_{JohnPhos}$), 129.21 – 128.88 (m, 6C, $C_{JohnPhos}$), 127.87 (d, $^3J_{P-C} = 6.3$ Hz, C_{17}), 127.22 (s, $C_{4'}$), 127.11 (s, C_5 or $C_{5'}$), 126.66 (s, C_4), 125.58 (s, C_5 or $C_{5'}$), 125.26 (q, $^2J_{P-B} = 2.7$ Hz, 8C, *ortho*-C, BPh_4), 124.78 (s, C_{21}), 121.48 (s, 4C, *para*-C, BPh_4), 120.93 (s, C_7 or $C_{7'}$), 120.31 (s, C_7 or $C_{7'}$), 51.37 (s, C_8), 39.78 (s, C_{13}), 37.36 (d, $^1J_{P-C} = 23.4$ Hz, 2C, C_{27}), 30.49 (d, $^2J_{P-C} = 6.3$ Hz, 6C, C_{28}), 29.43 (s, C_9), 28.32 (s, C_{11}), 13.81 (s, C_{12}). **IR** (cm^{-1}): 3053 $\nu(C_{Ar-H})$ 2017, 1922, 1887 $\nu(CO)$. **HRMS** (m/z): 1105.2256 M^+ , $C_{42}H_{47}AuClN_4O_3Re$ (1105.2285).



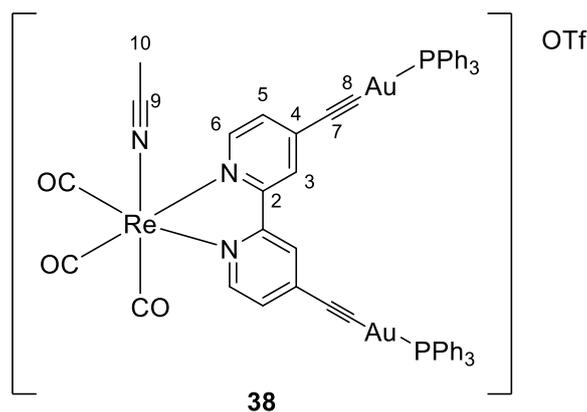
To a stirred solution of **26** (1 eq, 50 mg, 0.098 mmol) in acetonitrile (5 mL), was added $AgOTf$ (1.1 eq, 27.8 mg, 0.108 mmol) and the reaction mixture was allowed to react overnight at 65 °C. The suspension was then filtrated over celite, concentrated and ether was added to precipitate a yellow solid (49.6 mg, 76%).

1H NMR (400 MHz, CD_3CN): δ 8.98 (dd, $J = 5.8, 0.6$ Hz, 1H, H_6), 8.58 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H, H_3), 7.74 (dd, $J = 5.8, 1.6$ Hz, 1H, H_5), 4.16 (s, 1H, H_8), 2.05 (s, 3H, H_{10}). **^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN):** δ 156.93 (s, C_2), 155.13 (s, C_6), 135.75 (s, C_4), 131.28 (s, C_5), 128.14 (s, C_3), 123.68 (s, C_9), 89.28 (s, C_8), 79.94 (s, C_7), 3.99 (s, C_{10}). **IR** (cm^{-1}): 3202 $\nu(C_{sp-H})$, 2104 $\nu(C\equiv C)$, 2034, 1917 $\nu(CO)$, 1609 $\nu(C_{Ar=N})$. **HRMS** (m/z): 516.0341 M^+ , $C_{19}H_{11}N_3O_3Re$ (516.0353).



To a stirred solution of **28** (1eq, 22.6 mg, 0.013 mmol) in acetonitrile (5 mL), was added AgOTf (1.1 eq, 3.7 mg, 0.014 mmol) and the reaction mixture was allowed to react at 40°C overnight. The suspension was then filtrated over celite, and the solvent was evaporated. The crude was washed with ether three times to afford an orange solid (18.4 mg, 75%).

¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ 8.64 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, H₆), 8.11 (d, *J* = 1.6 Hz, 2H, H₃), 7.64 (t, *J* = 7.8 Hz, 4H, H₁₄), 7.54 (s, 4H, H₁₀), 7.46 (d, *J* = 7.8 Hz, 8H, H₁₃), 7.28 (dd, *J* = 5.8, 1.6 Hz, 2H, H₅), 2.62 (quint, *J* = 6.9 Hz, 8H, H₁₅), 2.13 (s, 3H, H₁₉), 1.37 (s, 12H, CH₃-IPr), 1.36 (s, 12H, CH₃-IPr), 1.29 (s, 12H, CH₃-IPr), 1.28 (s, 12H, CH₃-IPr). **¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN):** δ 189.34 (s, 2C, C₉) 156.58 (s, 2C, C₂), 153.84 (s, 2C, C₆), 148.49 (s, C₈), 147.01 (s, 8C, C₁₂), 139.47 (s, 2C, C₄), 135.17 (s, 4C, C₁₁), 131.66 (s, 4C, C₁₄), 130.47 (s, 2C, C₅), 127.54 (s, 2C, C₃), 125.28 (s, 4C, C₁₀), 125.17 (s, 8C, C₁₃), 101.68 (s, 2C, C₇), 29.63 (s, 8C, C₁₅), 24.82 (s, 8C, CH₃-IPr), 23.99 (s, 8C, CH₃-IPr). **IR (cm⁻¹):** 2961 ν(C_{sp³}-H), 2107 ν(C≡C), 2032, 1917 ν(CO), 1602 ν(C_{Ar}=N). **MALDI (m/z):** 1643.4, C₇₁H₇₈Au₂N₆O₃Re (1643.5).



To a stirred solution of **36** (1 eq, 20 mg, 0.03 mmol) in acetonitrile (5 mL) was added Au(acac)PPh₃ (2 eq, 33.6 mg, 0.06 mmol) with a change in the colour of the solution from yellow to brown. After 3 hours of reaction the solution was filtered over celite, concentrated and ether was added to precipitate a light brown solid corresponding to **38** (39.3 mg, 83%).

¹H NMR (300 MHz, CD₃CN): δ 8.80 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H, H₆), 8.40 (s, 2H, H₃), 7.65 – 7.50 (m, 16H, H_{Ar} + H₅), 2.06 (s, 3H, H₁₀). **³¹P NMR (121 MHz, CD₃CN):** δ 40.88 (s). **¹³C NMR (75 MHz, CD₃CN):** δ 194.98 (s, CO), 191.73 (s, CO), 156.88 (s, 2C, C₂), 154.12 (s, 2C, C₆), 138.81 (s, 2C, C₄), 135.19 (d, ²*J*_{P-C} = 13.9 Hz, 12C, *ortho*-C, Ph), 133.08 (s, 6C, *para*-C, Ph), 130.86 (s, 2C, C₅), 130.57 (d, ³*J*_{P-C} = 11.2 Hz, 12C, *meta*-C, Ph), 130.00 (d, ¹*J*_{P-C} = 58.3 Hz, 6C, *ipso*-C, Ph) 127.69 (s, 2C, C₃), 123.31 (s, C₉), 100.82 (s, 2C, C₇), 4.14 (s, C₁₀). **IR (cm⁻¹):** 3053 ν(C_{sp²}-H), 2108 ν(C≡C), 2029, 1905 ν(CO), 1600 ν(C_{Ar}=N). **MALDI (m/z):** 1391.0, C₅₃H₃₆Au₂N₂O₃P₂Re (1391.1).

4.11.6 References

- ¹ V. Fernández-Moreira, I. Marzo, M. C. Gimeno, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 4434 – 4446.
- ² a) H.-Y. Wang, G. Si, W.-N. Cao, W.-G. Wang, Z.-J. Li, F. Wang, C.-H. Tung, L.-Z. Wu, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 8406 – 8408. b) I. E. Pomestchenko, D. E. Polyansky, F. N. Castellano, *Inorg. Chem.*, **2005**, *44*, 3412 – 3421. c) Y Yamamoto, M. Shiotsuka, S. Onaka, *J. Org. Chem.*, **2004**, *689*, 2905 – 2911. d) R. Packheiser, P. Ecorchard, T. Ruffer, B. Walfort, H. Lang, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, 4152 – 4165. e) R. Packheiser, T. Ruffer, P. Ecorchard, B. Walfort, H. Lang, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, **2010**, *636*, 2607 – 2616.
- ³ a) H.-J. Park, K. Kim, Y. K. Chung, *Inorg. Chim. Acta*, **2014**, *410*, 214 – 220. b) A. A. Webster, S. K. K. Prasad, J. M. Hodgkiss, J. O. Hoberg, *Dalton Trans.*, **2015**, *44*, 3728 – 3736.
- ⁴ D. Chen, R. De, D. L. Mohler, *Synthesis*, **2009**, *2*, 211 – 216.
- ⁵ L. Li, I. Vorobyov, T. W. Allen, *J. Phys. Chem. B.*, **2013**, *117*, 11906 – 11920.
- ⁶ a) A. Battisti, O. Belina, P. Diversi, S. Losi, F. Marchetti, P. Zanello, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2007**, *6*, 865 – 875. b) I. Holmes, A. Naylor, Gold (I)-phosphine compounds as anti-bacterial agents, G.B. Patent, 181550 A1, December 3, 2015.
- ⁷ V. Grosshenny, F. M. Romero, R. Ziessel, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 1491 – 1500.
- ⁸ *Handbook of Chemistry and Physics*, ed. R. C. Weast, CRC Press.
- ⁹ V. Fernández-Moreira, I. Marzo, M. C. Gimeno, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 4434 – 4446.
- ¹⁰ M. C. Jahnke, T. Pape, F. E. Hahn, *Z. Naturforsch.*, **2013**, *68b*, 467 – 473.
- ¹¹ L. Jafarpour, E. D. Stevens, S. P. Nolan, *J. Organomet. Chem.*, **2000**, *606*, 49 – 54.
- ¹² A. Johnson, M. C. Gimeno, *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, 9664 – 9667.
- ¹³ A. Vogler in *Isonitrile Chemistry*, ed. I. Ugi, Academic Press, New York, London, 1971, 217 – 233.
- ¹⁴ D. S. Surry, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 6338 – 6361.
- ¹⁵ A. Johnson, I. Marzo, M. C. Gimeno, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 11693 – 11702.
- ¹⁶ E. Hatem, S. Azzi, N. El Banna, T. He, A. Héneman-Masurel, L. Vernis, D. Baille, V. Masson, F. Dingli, D. Loew, B. Azzarone, P. Eid, G. Baldacci, M. Er-Huang, *J. Natl. Cancer Inst.*, **2019**, *111*, 1 – 12.
- ¹⁷ K. M. Knopf, B. L. Murphy, S. N. MacMillan, J. M. Baskin, M. P. Barr, E. Boros, J. J. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 14302 – 14314.
- ¹⁸ V. Fernández-Moreira, H. Sastre-Martín, *Inorg. Chim. Acta*, **2017**, *460*, 127 – 133.

- ¹⁹ M. C. Blanco, J. Cámara, M. C. Gimeno, A. Laguna, S. L. James, M. C. Lagunas, M. D. Villacampa, *Ang. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 9777 – 9779.
- ²⁰ a) O. M. Abu-Salah, A. R. Al-Ohaly, *Inorg. Chim. Acta Lett.*, **1983**, *77*, L159 – L160.
 b) O. M. Abu-Salah, A. R. Al-Olahy, *J. Organomet. Chem.*, **1983**, *255*, C39 – C40. c) O. M. Abu-Salah, *J. Organomet. Chem.*, **1984**, *270*, C26 – C28.
- ²¹ L. A. Worl, R. Duesing, P. Chen, L. D. Ciana, T. J. Meyer, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **1991**, 849 – 858.
- ²² M. Gottschaldt, D. Koth, D. Müller, I. Klette, S. Rau, H. Görls, B. Schäfer, R. P. Baum, S. Yano, *Chem. Eur. J.*, **2007**, *13*, 10273 – 10280.
- ²³ H.-T. Liu, X.-G. Xiong, P. D. Dau, Y.-L. Wang, D.-L. Huang, J. Li, L.-S. Wang, *Nat. Commun.*, **2013**, *4*, 2223.
- ²⁴ P. Galán-Malo, L. Vela, O. Gonzalo, R. Calvo-Sanjuán, L. Garcia-Fleta, J. Naval, I. Marzo, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2012**, *258*, 384 – 393.
- ²⁵ C. C. Konkankit, B. A. Vaughn, S. N. MacMillan, E. Boros, J. J. Wilson, *Inorg. Chem.*, **2019**, *58*, 3895 – 3909.
- ²⁶ a) R. Usón, A. Laguna, M. Laguna, D. A. Briggs, H. H. Murray, J. P. Fackler Jr. in *Inorganic Syntheses*, ed. H. D. Kaesz, 1989, 85 – 90. b) G. Brauer, *Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1978, p. 1014.
- ²⁷ L. K. Batchelor, E. Paunescu, M. Soudani, R. Scopelliti, P. J. Dyson, *Inorg. Chem.*, **2017**, *56*, 9617 – 9633.
- ²⁸ D. Gibson, B. F. G. Johnson, J. Lewis, *J. Chem. Soc. A*, **1970**, 1730 – 1735.
- ²⁹ G. M. Sheldrick, *SADABS, Program for adsorption correction*, University of Göttingen, Göttingen, Germany, **1996**.
- ³⁰ *CrysAlisPro, Agilent Technologies, Version 1.171.35.11 Multi-scans absorption correction with SCALE3 ABSPACK scaling algorithm.*
- ³¹ G. M. Sheldrick, *SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement*, University of Göttingen, Göttingen, Germany, **1997**.

Capítulo 5

Bioconjugados de iridio y oro

5.1 Objetivos

En los capítulos precedentes, se han sintetizado diferentes complejos heterometálicos de renio(I) y oro(I) en donde se han encontrado ciertas limitaciones. Mientras que en el capítulo 2 la principal limitación tuvo que ver con una luminiscencia algo limitada, en el capítulo 3 la baja solubilidad junto con una escasa capacidad de traspasar la membrana celular han constituido el principal escollo para obtener buenos resultados en las pruebas biológicas.

En este capítulo, se plantea la síntesis de complejos teragnósticos intercambiando el fragmento luminiscente de renio(I) por un complejo de iridio(III) de la forma $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$ en donde $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ representa un ligando ciclotetralado, en este caso representado por una fenilpiridina, y $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ representa un ligando diimina que vendrá encarnado por una fenantrolina funcionalizada. Con esta sustitución se espera que los mayores rendimientos cuánticos asociados a los complejos de iridio frente a los de renio permitan solventar los problemas de baja intensidad de emisión. Además, la unión entre iridio(III) y oro(I) se efectuará por medio de secuencias peptídicas de longitud intermedia para mejorar la solubilidad en el medio biológico y explorar si permite una acumulación específica o una potenciación de la actividad biológica. Se variará el tipo de conexión al oro, bien por un enlace alquino-oro, bien por un enlace tiolato-oro, para comparar la influencia del entorno del oro en la actividad (figura 5.1). Asimismo se compararán las propiedades del derivado heterometálico con su precursor basado en iridio para confirmar si la aproximación teragnóstica, en donde cada metal ejerce su función por separado, está teniendo lugar.

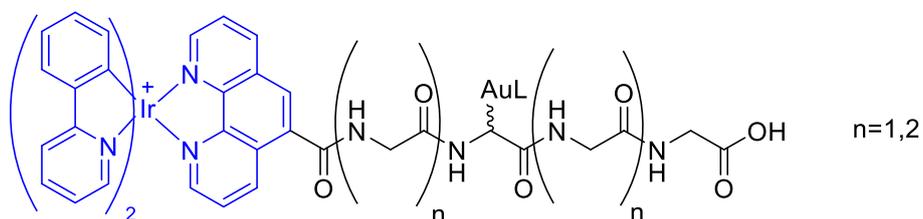


Figura 5.1 Compuestos heterometálicos a sintetizar

5.2 Introducción

5.2.1 Sistemas $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$ luminiscentes

Mientras que en los sistemas luminiscentes de renio, del tipo *fac*- $[\text{Re}(\text{N}^{\wedge}\text{N})(\text{CO})_3\text{X}]^{+0}$ en donde $(\text{N}^{\wedge}\text{N})$ representa un ligando diimina y X un halógeno o un ligando de tipo piridina, las transiciones responsables de la luminiscencia se deben esencialmente a transiciones MLCT que parten de los electrones d del metal hacia un orbital π^* del ligando diimina, en los sistemas $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$ la presencia de varios ligandos aromáticos coordinados al metal condicionan el tipo de transiciones responsables de la excitación y emisión. Así pues, el comportamiento general comprende la excitación hacia una mezcla de estados MLCT y LLCT en donde existe una excitación de los electrones del metal hacia el ligando bisimina y desde el ligando ciclometalado hacia el ligando bisimina respectivamente.¹ La modulación de la luminiscencia en estos sistemas (color, rendimientos cuánticos,...) es mucho más sencilla² que en los sistemas de renio y puede producir cambios en la naturaleza de las transiciones (pasando de MLCT a LLCT, o invirtiendo el sentido de la transición LLCT, ver ejemplo en figura 5.2).^{1,3} Por otro lado, al ser el iridio un átomo más pesado que el renio, el acoplamiento espín-órbita es más acusado y hace más eficiente el entrecruzamiento del sistema singlete a triplete, cuya última consecuencia es un aumento notable de los rendimientos cuánticos.⁴

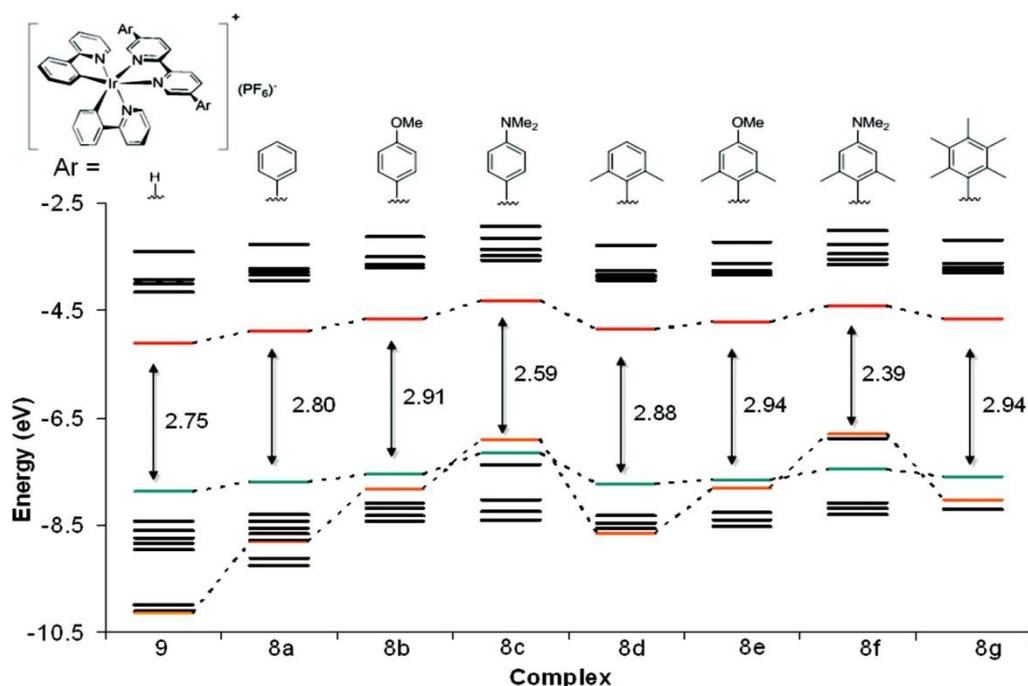


Figura 5.2 Ejemplo de la influencia de los sustituyentes del ligando diimina en la naturaleza de la excitación.¹ En naranja se representa el orbital π más energético del ligando bpy y en turquesa el correspondiente al ligando ppy. En todos los casos el LUMO se corresponde con el orbital π^* del ligando bpy (en rojo). En los complejos **8c** y **8f** de la figura se ha conseguido obtener una transición LC entre los orbitales de la bpy a diferencia de los otros casos en donde tiene lugar una transferencia de carga LLCT desde la ppy hasta la bpy.

5.2.2 Complejos de iridio(III) en imagen celular

Los complejos de iridio(III) luminiscentes del tipo $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})]^+$, y $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_3]$ en menor medida, han sido empleados como agentes de imagen celular por sus excelentes propiedades fotofísicas, siendo su mayor toxicidad y la tendencia acumularse en estructuras lipídicas del citoplasma sus mayores limitaciones.⁵ Las elevadas posibilidades de funcionalización tanto en los ligandos ciclometalados como en el ligando $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ permiten que en la actualidad exista una amplia variedad de estructuras enfocadas en la acumulación en todos los orgánulos celulares (figura 5.3). Hasta el momento no se ha determinado una relación clara entre la estructura y el destino intracelular, observando la clara preferencia de las mitocondrias por los complejos catiónicos,^{6,7} o la tendencia por parte de los lisosomas a atrapar en su interior complejos con sustituyentes protonables,⁸ empleados como sensores de pH por Aoki.⁹ En lo referido a la observación del núcleo, se suele optar por complejos de partida con una emisión poco intensa que se ve incrementada de manera espectacular al interactuar con el ADN, como ilustran ejemplos de los grupos de Li y Lo.¹⁰ Por otro lado, la estrategia a seguir para la observación del retículo endoplasmático o el aparato de

Golgi¹¹ consiste en incorporar grupos con facilidad para reaccionar con grupos amino de proteínas,¹² atendiendo al elevado contenido de estas macromoléculas en dichos orgánulos.¹³

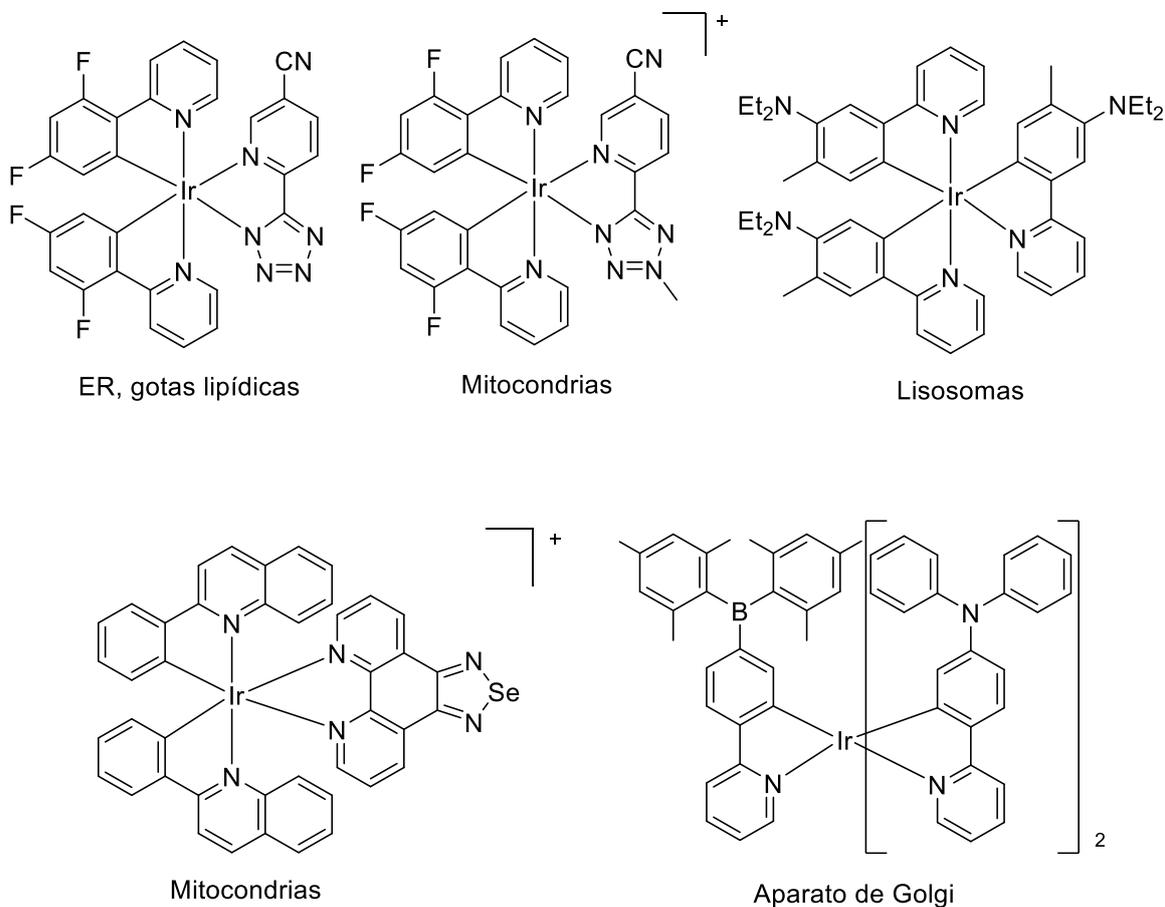


Figura 5.3 Ejemplos de complejos de iridio con acumulación específica en los diferentes orgánulos celulares.

5.2.3 Bioconjugados de iridio(III) y oro(I)

Se define como bioconjugado a aquel complejo metálico que está enlazado a una biomolécula, como ADN, hormonas, lípidos, aunque en general hace referencia al complejo metálico conectado a una o varias secuencias peptídicas. La restringida solubilidad en el medio biológico de ciertos complejos metálicos, así como una baja internalización por un balance lipofílico inadecuado, limitan a menudo su aplicación como potenciales fármacos. Es por ello que desde hace un tiempo se inició la idea de superar estas dificultades incorporando secuencias peptídicas expresamente diseñadas. Los ejemplos de bioconjugados de iridio(III) luminiscentes son escasos, pero son suficientes para ilustrar todas las mejoras que proporcionan los péptidos: reconocimiento de células cancerígenas al incorporar el antagonista del receptor

CXCR4,¹⁴ acumulación selectiva en diferentes orgánulos según la secuencia peptídica (figura 5.4),¹⁵ mejora de la solubilidad en agua y penetración,¹⁶ selectividad en la toxicidad hacia células cancerígenas.¹⁷

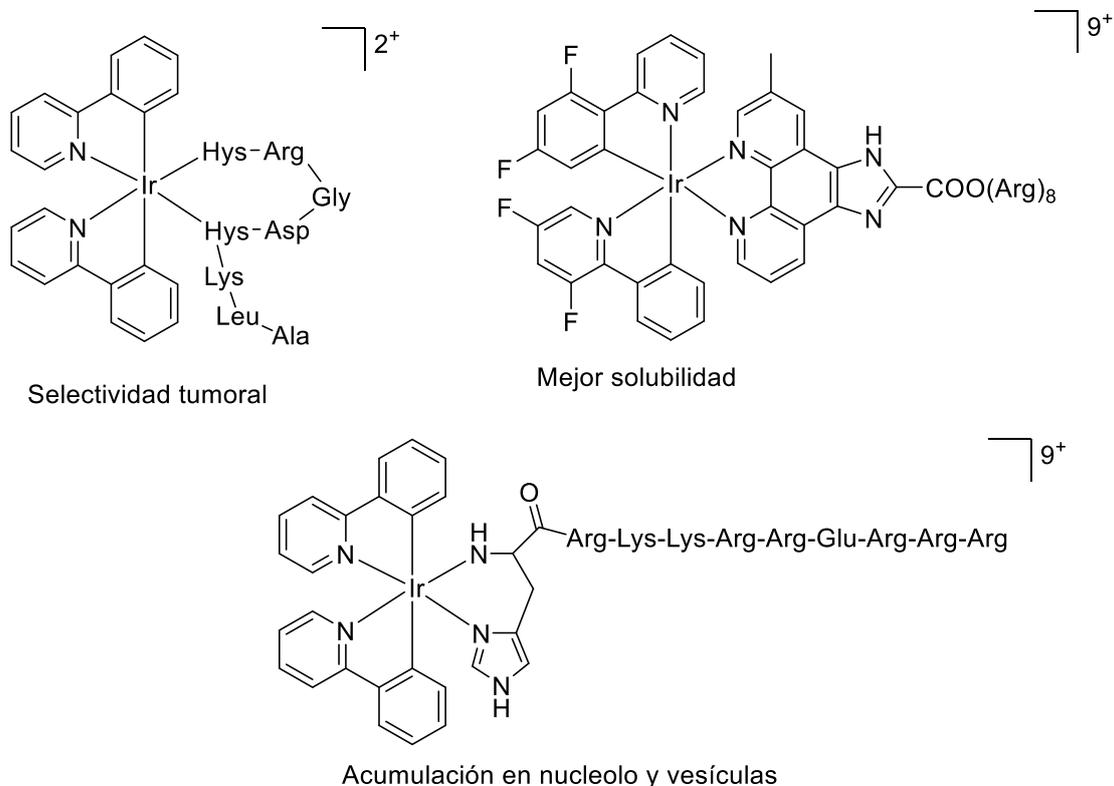


Figura 5.4 Ejemplos de bioconjugados de iridio luminiscentes.

En el caso del oro, los ejemplos son aún más escasos, con el grupo del Prof. Metzler-Nolte como máximo referente en el empleo de secuencias peptídicas de más de dos aminoácidos de longitud.^{18,19,20} Trabajos similares presentan complejos de oro unidos a uno o dos aminoácidos como máximo,²¹ por lo que se benefician de una mejora en la solubilidad causada por el aminoácido en concreto pero no de las propiedades intrínsecas a una secuencia peptídica (reconocimiento, acumulación específica, solubilidad, etc) (figura 5.5).

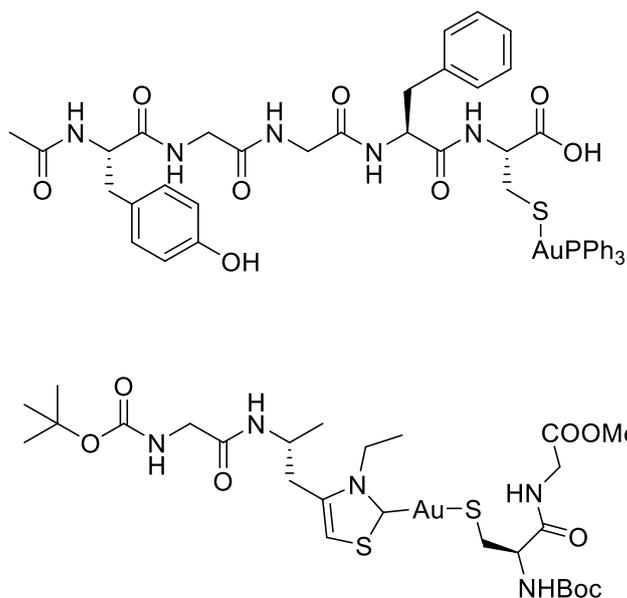


Figura 5.5 Ejemplos de bioconjugados de oro.

5.3 Síntesis de los bioconjugados

5.3.1 Síntesis del bioconjugado de iridio con el péptido encefalina

La encefalina es un pentapéptido producido por el cuerpo humano, que se une a receptores opioides del cerebro, participando en tareas como la respuesta al dolor, control de la función respiratoria, gastrointestinal, neuroendocrina y cardiovascular.²² Existen dos tipos de variantes estructurales: la Met-encefalina con metionina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) y la Leu-encefalina con leucina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu).

La síntesis de péptidos en disolución está limitada en la práctica a longitudes de 2-3 aminoácidos. Para longitudes mayores, se desarrolló lo que se conoce como síntesis peptídica en fase sólida (SPPS) que permite sintetizar cadenas peptídicas de una longitud intermedia (hasta unos 12 aminoácidos) de una manera mucho más rápida y eficaz. Esta técnica se basa en la inmovilización del péptido en un soporte sólido polimérico, y la incorporación de aminoácidos de manera secuencial. En este caso se ha empleado como soporte la resina Wang, una resina de poliestireno con un conector de tipo *para*-hidroxibencilo. La conexión con el aminoácido se hace a través de su extremo carboxilo, por lo que el péptido va creciendo desde el extremo carboxilo hasta el extremo amino. Todos los aminoácidos que se emplean durante la síntesis tienen el grupo amino protegido por el grupo Fmoc para evitar el autoacoplamiento. El

procedimiento consiste en la desprotección del grupo amino del aminoácido fijado al soporte sólido, que actuará como nucleófilo sobre el extremo carboxilo activado del aminoácido a incorporar. Esta etapa se repite según el número de aminoácidos a incorporar para finalmente desanclar el péptido de la resina y purificarlo por HPLC (figura 5.6).

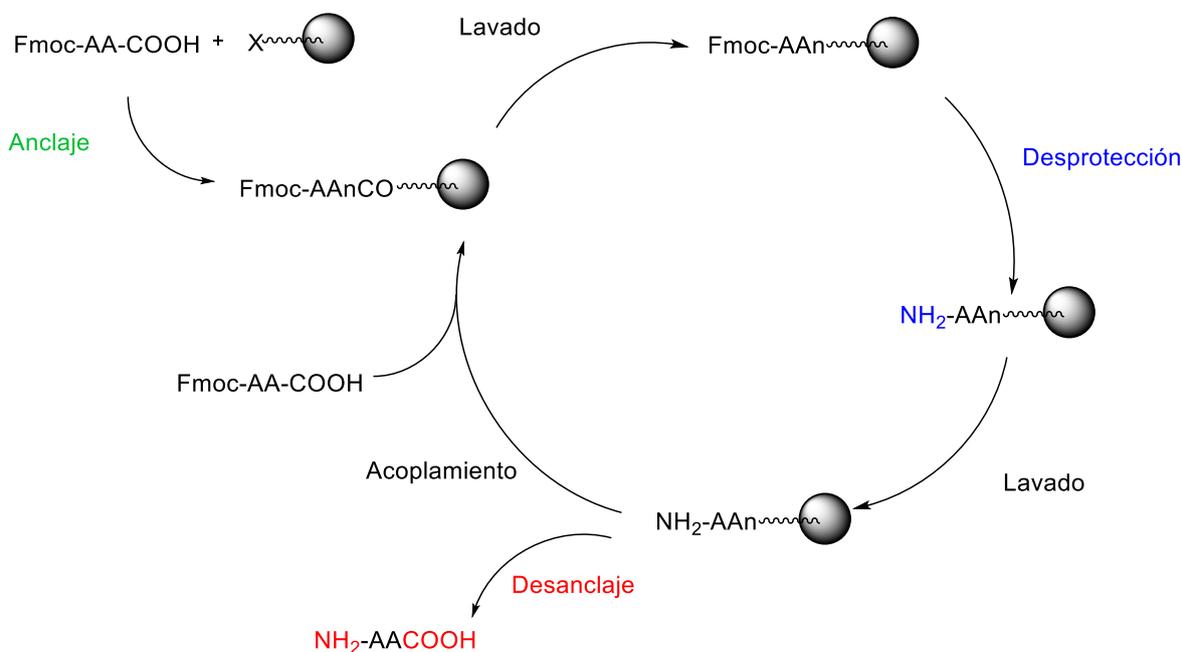
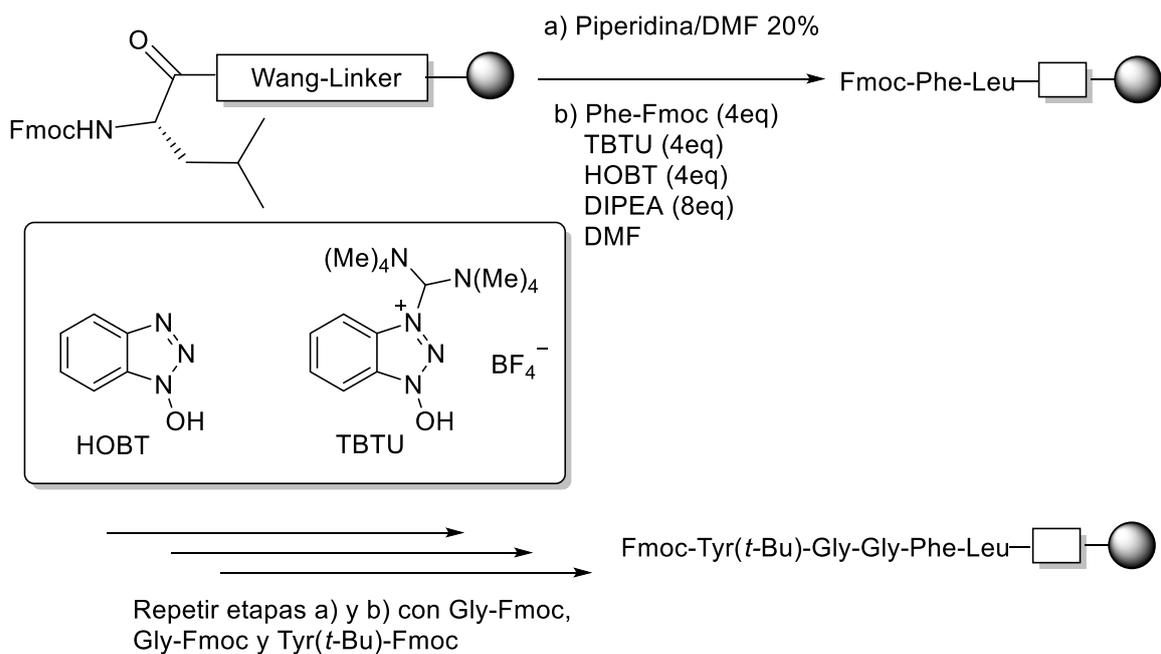


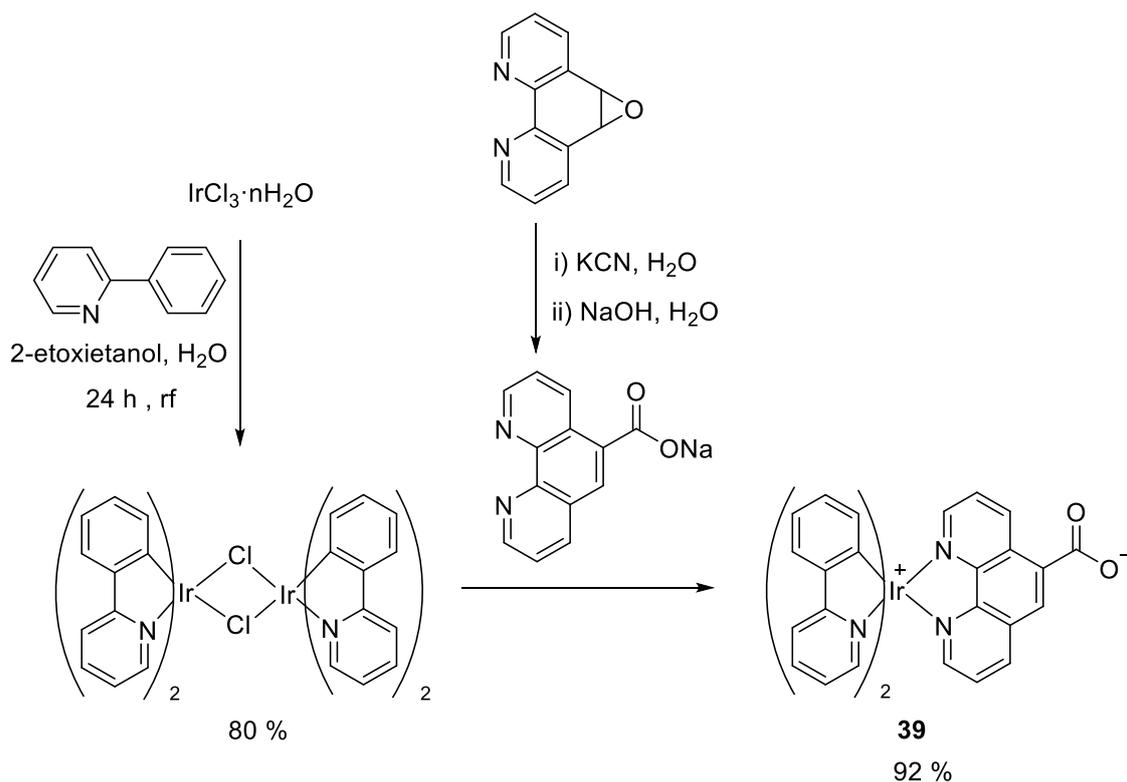
Figura 5.6 Etapas de la síntesis de péptidos en fase sólida

Se partió del aminoácido Leucina anclado a la resina Wang, y protegido por su grupo amino con el grupo Fmoc. La desprotección se efectuó empleando piperidina al 20% en DMF, tras lo cual se añadió conjuntamente un exceso del segundo aminoácido de la secuencia peptídica deseada, la fenilalanina (Phe). Este se añade también protegido por su grupo amino con Fmoc (Fmoc-Phe) así como los agentes activantes TBTU y HOBT y diisopropilamina como base. El acoplamiento se completó con éxito en 1 hora, comprobando que no quedaba leucina sin reaccionar por medio del test de Kaiser (esquema 5.1). Este procedimiento se repitió con los aminoácidos restantes (glicina, glicina y tirosina) para completar la síntesis del péptido anclado a la resina.



Esquema 5.1 Síntesis del péptido encefalina

A continuación se incorporó el fragmento luminiscente de iridio(III) **39**. Dicho fragmento se preparó por separado a partir de tricloruro de iridio(III). En primer lugar se accede al dímero $[\text{Ir}(\text{ppy})_2]_2\text{Cl}_2$ por reacción con la fenilpiridina, y en segundo lugar se coordina el ácido 1,10-fenantrolin-6-carboxílico, que se preparó a partir de la 5,6-epoxi-5,6-dihidro-[1,10]fenantrolina, por una modificación de la síntesis descrita previamente por DeGraff²³ (esquema 5.2).

Esquema 5.2 Preparación de **39**.

Se obtuvieron cristales adecuados para su análisis por difracción de rayos X (ver figura 5.7). La unidad asimétrica se compone de una molécula de **39** junto con dos moléculas de diclorometano que cristalizan en el grupo espacial $P2_1/n$. En lo referido a la celdilla unidad, se compone de cuatro moléculas de **39**, en concreto dos moléculas de cada enantiómero, debido a la asimetría del ligando fenantrolina. Como es común a este tipo de complejos de iridio,²⁴ la coordinación de los ligandos fenilpiridina se produce de forma que los carbonos quedan en *trans* uno respecto del otro.

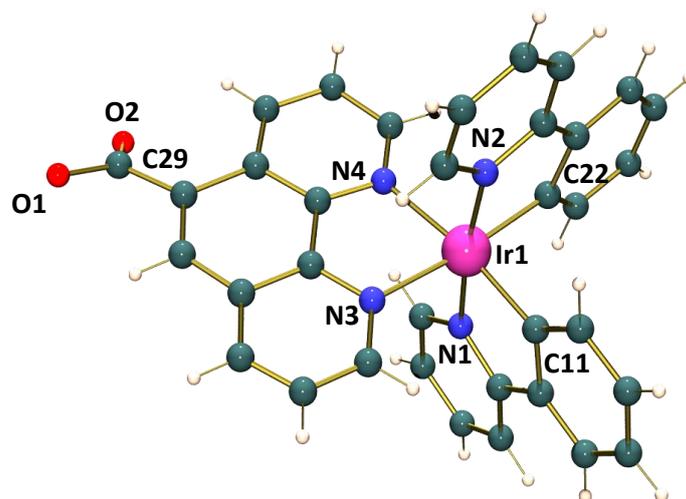
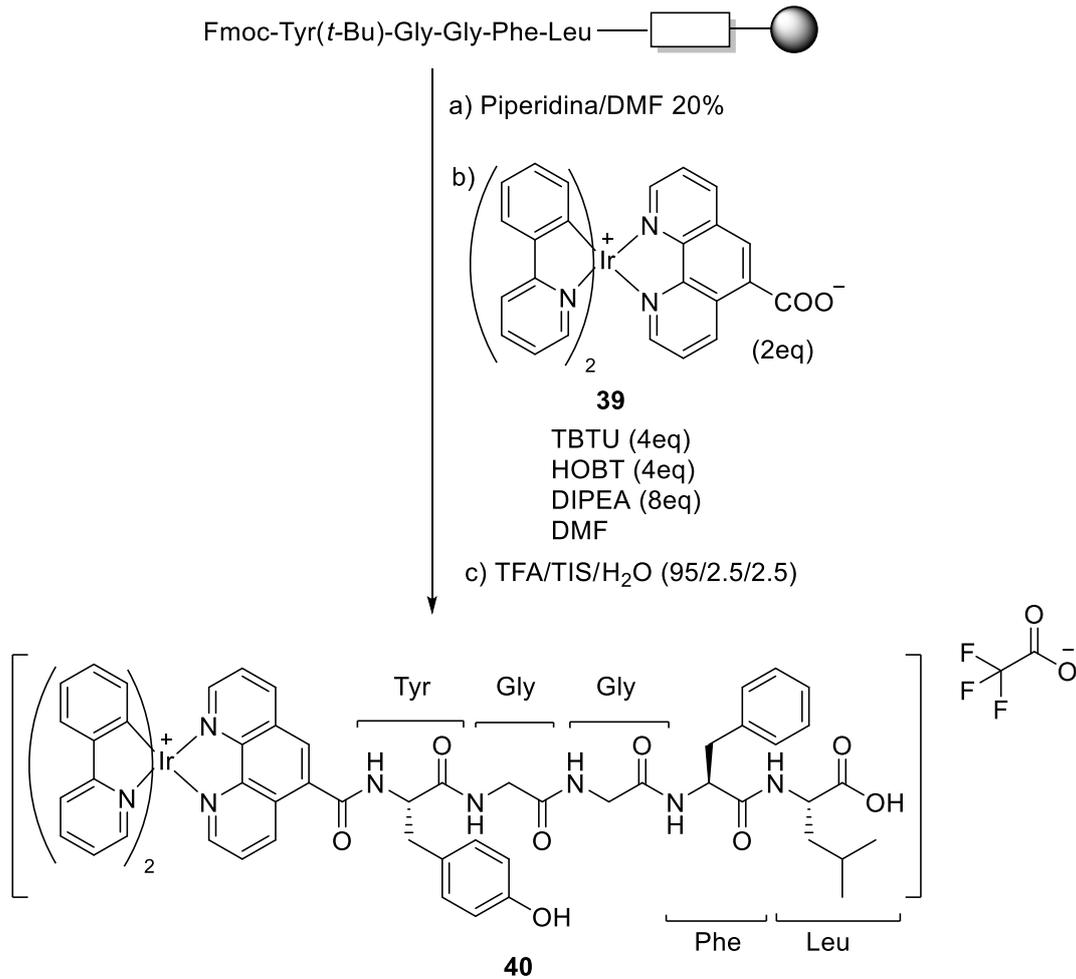


Figura 5.7 Estructura del complejo **39** en donde se han omitido las dos moléculas de diclorometano con las que cocrystaliza para mayor claridad.

El residuo carboxilato del complejo de iridio permite tratarlo como un aminoácido más, y se siguió el procedimiento habitual para su incorporación al péptido anclado a la resina. Es decir, previa desprotección del grupo amino del aminoácido anclado en la resina con piperidina se añade el compuesto de iridio **39** junto con los agentes activantes y una base. Finalmente, el bioconjugado resultante se desancló del soporte sólido empleando ácido trifluoroacético (TFA), en combinación con triisopropilsilano (TIS) y agua como secuestrantes de grupos protectores (ver esquema 5.3). La purificación por HPLC semi-preparativa en fase reversa, empleando una columna VP 125/10 Nucleodur 100-5 C18ec, con un gradiente desde 5/95 (CH₃CN/H₂O; 0.1 % TFA) a 95/5 (CH₃CN/H₂O; 0.1 % TFA) durante 20 minutos, condujo al producto deseado **40**. Se fijaron tres canales de detección a 214 nm, 254 nm (longitud a la que absorben los aminoácidos) y a 350 nm (longitud de onda a la que absorbe el complejo de iridio).

5.3 Síntesis de los bioconjugados



Esquema 5.3 Síntesis del bioconjugado **40**.

La traza de HPLC con absorbancia a 254 nm muestra la presencia de un solo pico reflejando la elevada pureza del bioconjugado **40** (ver figura 5.8).

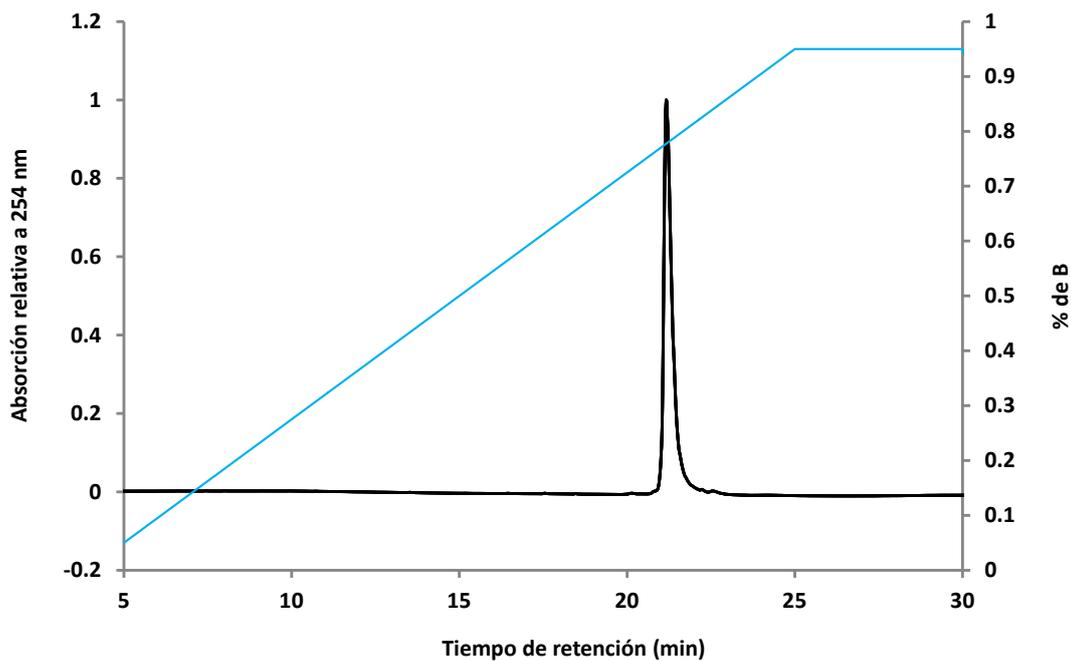


Figura 5.8 Traza de HPLC analítica del compuesto **40**. (Buffer A: H₂O con 0.1% de TFA, Buffer B: CH₃CN con 0.1% de TFA).

En el espectro de MALDI se observó el pico correspondiente al ión molecular (1262.4278 m/z) que termina por confirmar la presencia del producto deseado (figura 5.9). Dicho espectro se hizo en alta resolución utilizando PEG como calibrante interno (teórico C₆₃H₅₉IrN₉O₈⁺ 1262.4110 m/z).

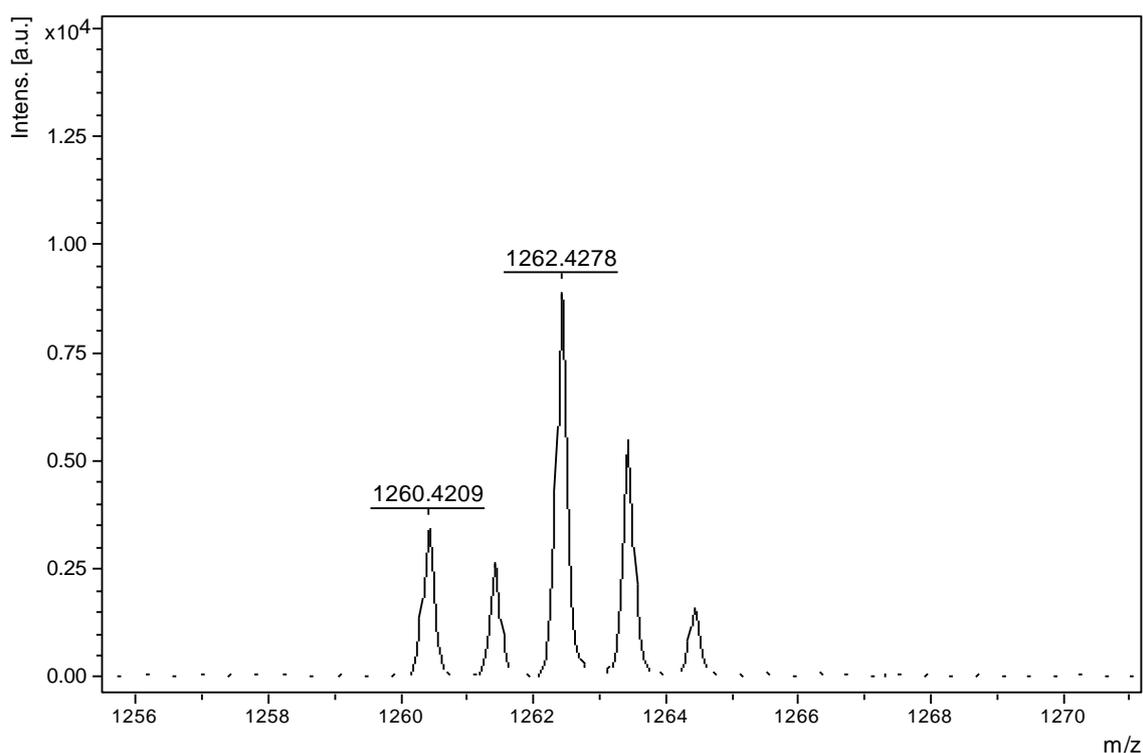
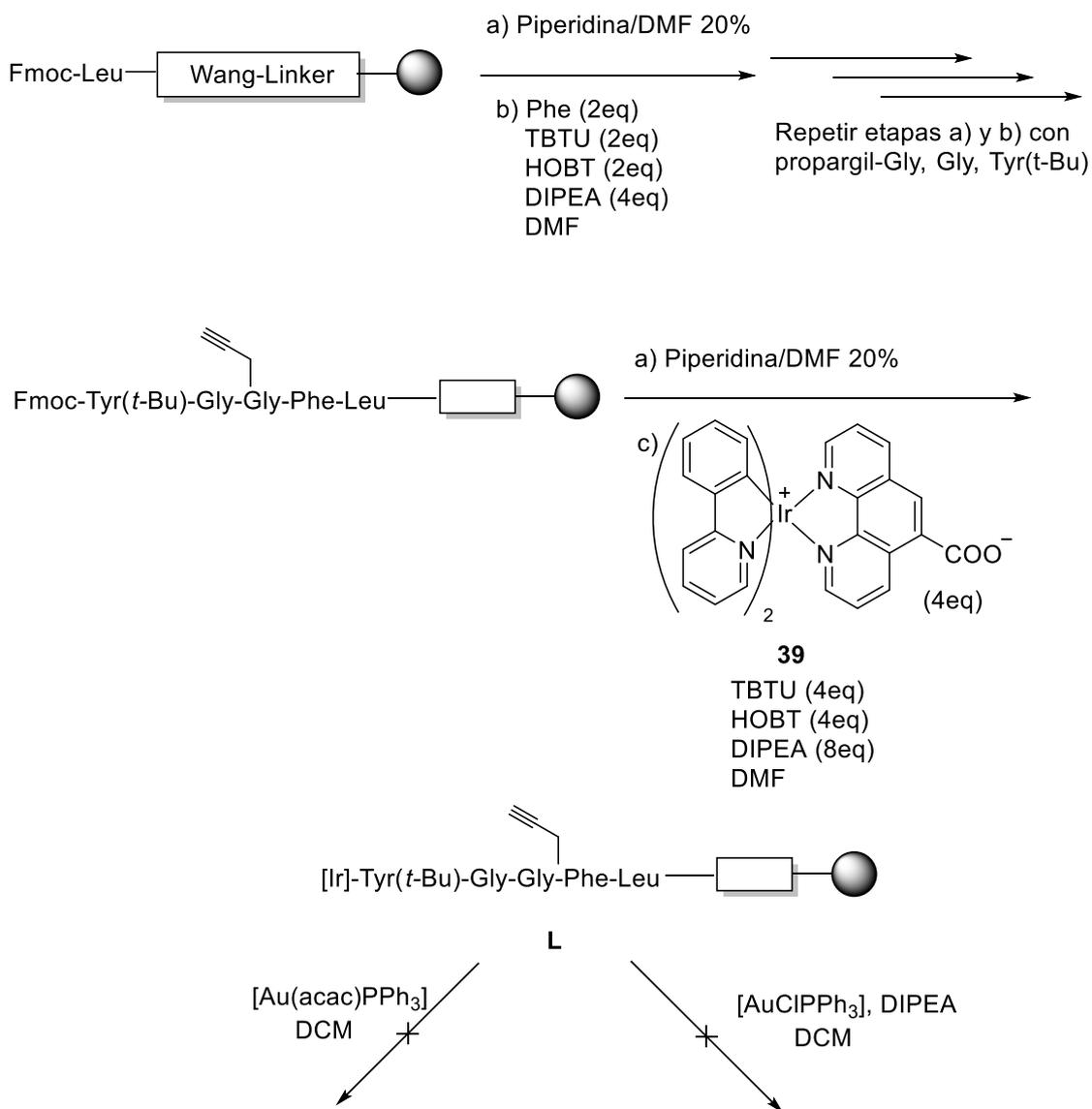


Figura 5.9 Espectro de masas de **40**.

5.3.2 Síntesis del bioconjugado de iridio y oro conectados por encefalina

Tras comprobar que el bioconjugado de iridio **40** poseía la suficiente solubilidad en las mezclas de acetonitrilo/agua empleadas para la purificación por HPLC, y que el complejo metálico sobrevive a las condiciones empleadas en el desanclaje (condiciones ligeramente ácidas), se sintetizó un derivado de encefalina empleando una glicina modificada con un grupo propargilo, para más tarde hacerlo reaccionar con un compuesto de oro(I), y así poder obtener el primer complejo heterobimetálico de la serie Ir(III)/Au(I). La síntesis del derivado de Ir(III) funcionalizado con un grupo propargilo (**41**) se realizó siguiendo el mismo esquema que en el caso anterior para el complejo **40**. Con el complejo de Ir(III) todavía anclado a la resina (**L**) se procedió a realizar el primer intento de coordinar el fragmento de Au(I). Este consistió en la reacción del derivado de Ir(III) con $[\text{AuClPPH}_3]$ y DIPEA como base en DCM durante 1 noche a temperatura ambiente. El desanclaje del bioconjugado y posterior análisis por HPLC analítica no permitió detectar la presencia del producto deseado. Como alternativa, se empleó el reactivo $[\text{Au}(\text{acac})\text{PPH}_3]$ que al contener ya el ligando acac evita la necesidad de emplear una base externa, pero tampoco permitió obtener el heterometálico (esquema 5.4). Las reacciones de coordinación de alquinos a complejos de oro tienen lugar con

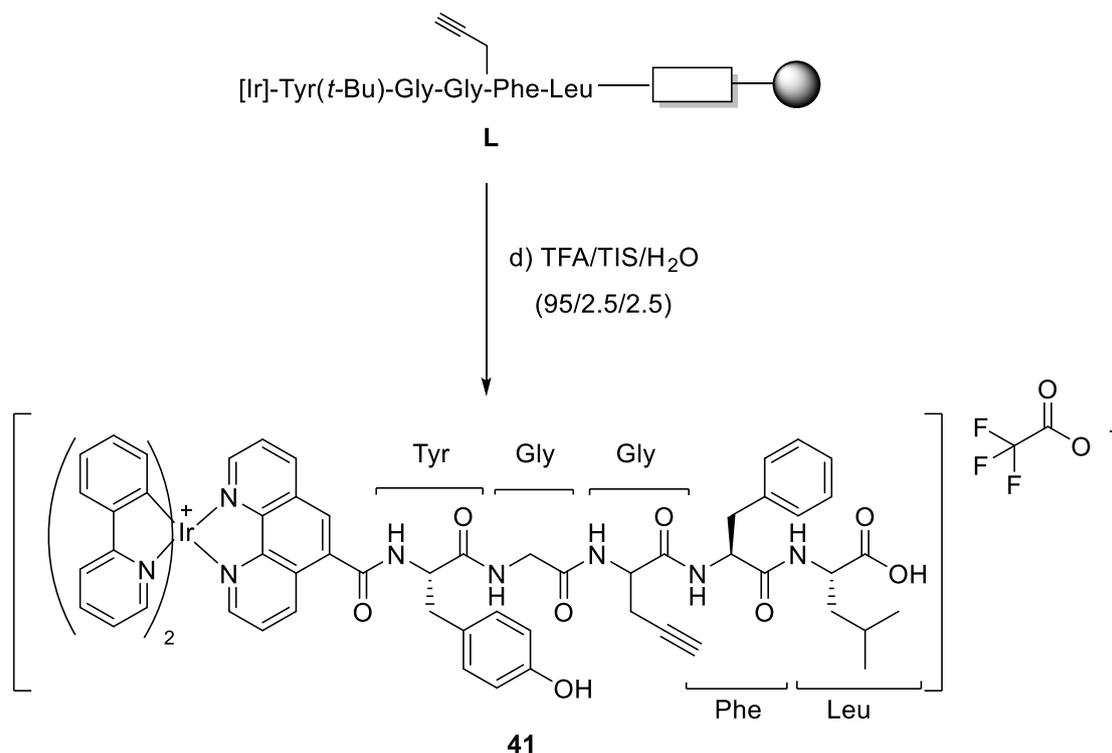
relativa facilidad, por lo que se especuló que la coordinación tenía lugar pero que las condiciones de desprotección producían su descomposición impidiendo su aislamiento.



Esquema 5.4 Síntesis de 41.

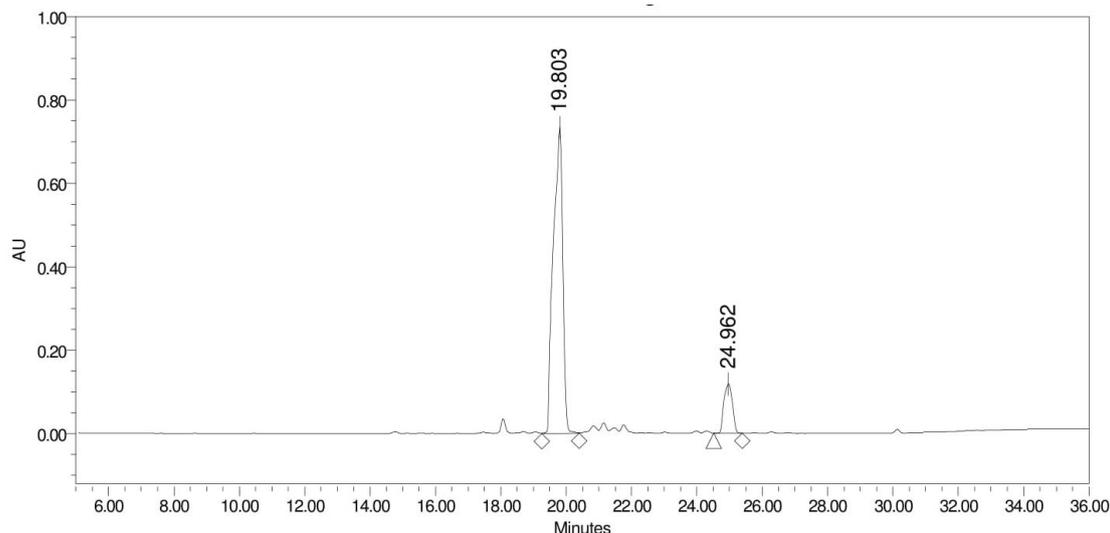
En consecuencia, se optó por desanclar el bioconjugado unido a iridio **L**, para acoplar el oro en disolución y no someterlo a la elevada acidez del ácido trifluoroacético (esquema 5.5). De este modo, se podría seguir la reacción por RMN de fósforo permitiendo identificar qué etapa fallaba en todo el proceso.

5.3 Síntesis de los bioconjugados



Esquema 5.5 Obtención de **41** por desanclaje.

La purificación tras desanclaje se llevó a cabo por cromatografía en columna de alúmina, empleando como eluyente una mezcla 10/2, DCM/MeOH. La traza de la HPLC analítica muestra que la pureza de **41** obtenida ronda el 90% (figura 5.10), que es aceptable teniendo en cuenta los bajos rendimientos que trae consigo la purificación por HPLC semi-preparativa.



Processed Channel: PDA 254.0 nm

Processed Channel	Retention Time (min)	Area	% Area	Height
1 PDA 254.0 nm	19.803	14555359	87.18	732269
2 PDA 254.0 nm	24.962	2140269	12.82	118448

Figura 5.10 Traza de HPLC analítica del compuesto **41**.

Prueba de la obtención del producto deseado es el espectro de masas MALDI empleando PEG como calibrante interno (teórico $C_{66}H_{61}IrN_9O_8^+$ 1300.4267 m/z) (figura 5.11).

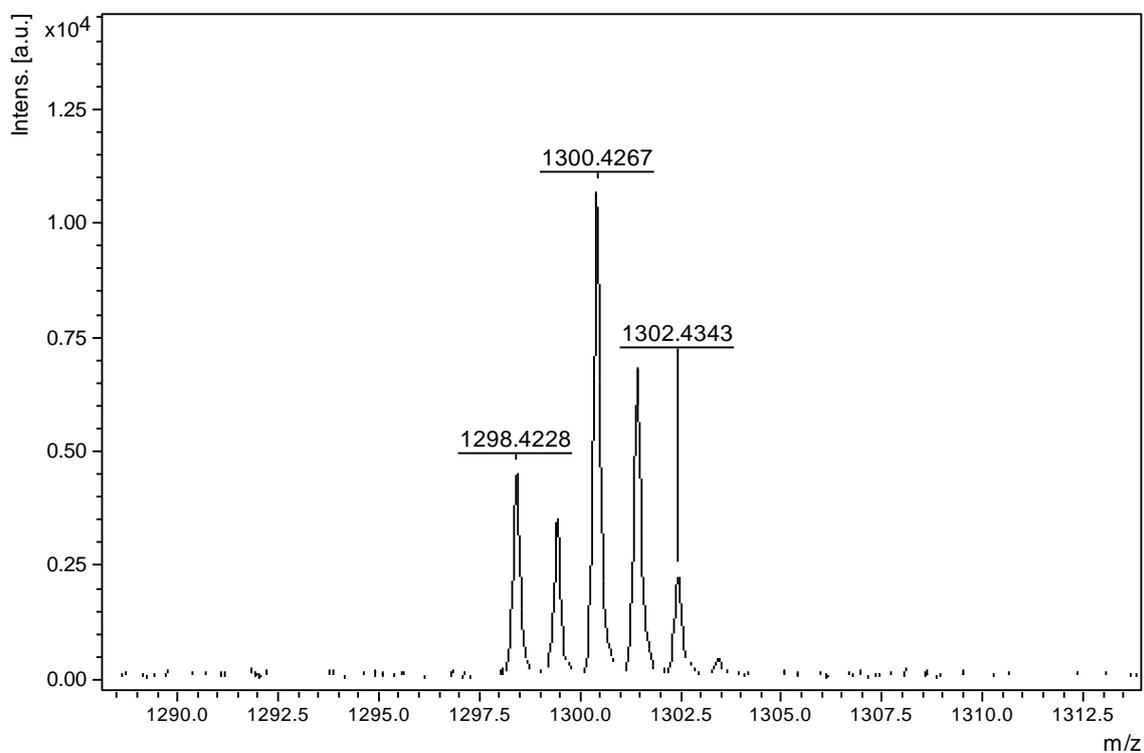


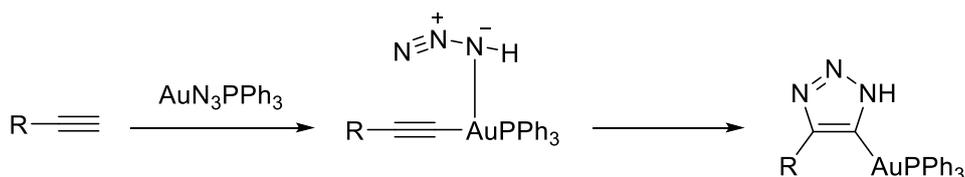
Figura 5.11 Espectro de masas de **41**.

Así pues, una vez desanclado el bioconjugado de Ir(III) **41** y caracterizado por MALDI, se comprobó que tenía una buena solubilidad en metanol, dimetilformamida y en mezclas acetonitrilo/agua siendo la proporción 1:1 la que mejor solubilidad presenta. Por otro lado, se sabe que los reactivos de oro [AuClPPh₃] y [Au(acac)PPh₃] son solubles en diclorometano y dimetilformamida, pero que el metanol no es capaz de disolver al [AuClPPh₃] y protona el acac unido al oro en el compuesto [Au(acac)PPh₃] impidiendo que este último desprotone al alquino. Por todo ello se procedió a ensayar distintas condiciones de reacción (ver tabla 5.1), pero lamentablemente ninguna dio un resultado satisfactorio. La ausencia de reacción se constató por espectroscopia ³¹P-RMN y espectrometría de masas. Se concluyó por tanto que no era posible acceder a este tipo de coordinación alquino-oro con el sustrato peptídico, posiblemente porque la propia cadena se comportaba de alguna manera que impedía su formación (coordinación de algún heteroátomo al oro de manera débil, al no observar la aparición de señal de fósforo tras los lavados, protección del alquino por parte de la propia cadena peptídica, impedimento estérico, etc.).

Tabla 5.1 Condiciones de reacción empleadas para la coordinación del alquino al oro.

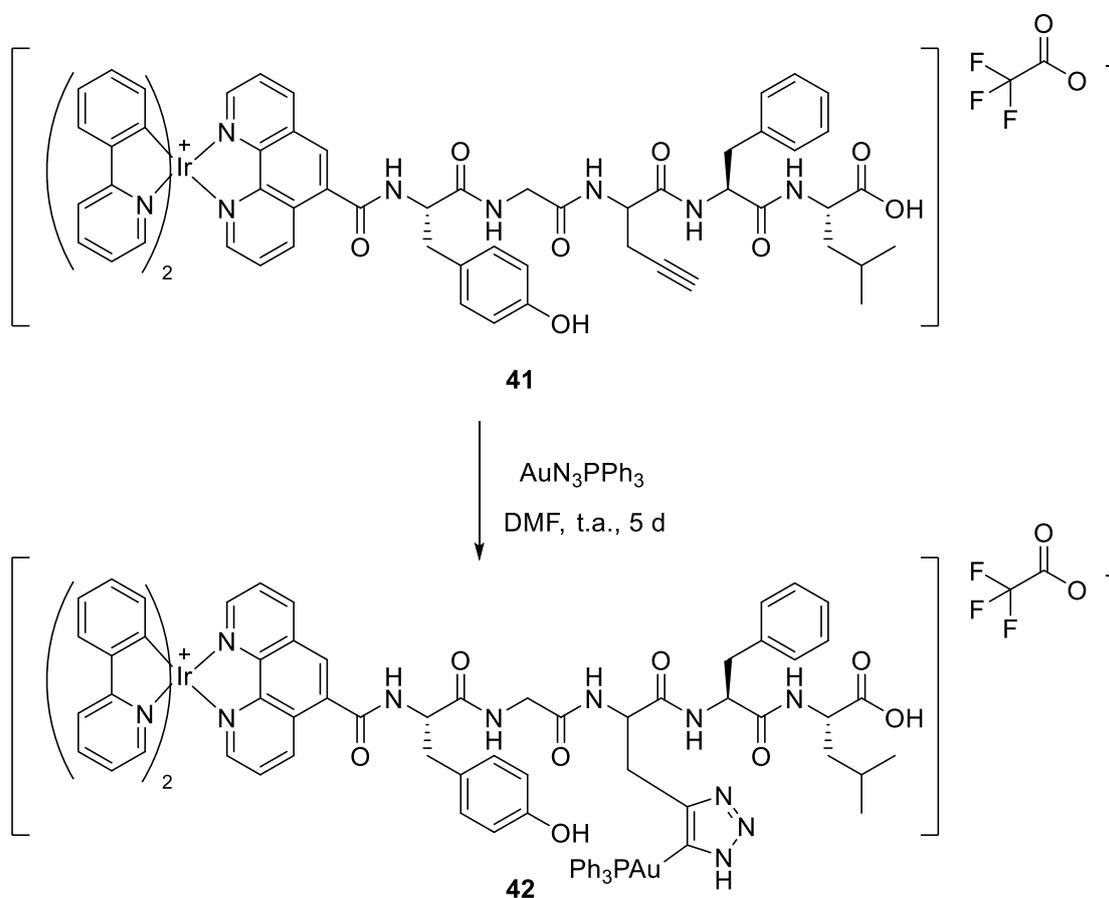
Reactivo	Base	Disolvente
[AuClPPh ₃]	K ₂ CO ₃	DCM
[AuClPPh ₃]	DIPEA	DCM
[AuClPPh ₃]	DIPEA	DMF
[AuClPPh ₃]	KOH	MeOH
[Au(acac)PPh ₃]	-	DCM
[Au(acac)PPh ₃]	-	MeOH

Se decidió entonces reproducir la reacción ya publicada por el grupo del Prof. Metzler-Nolte,¹⁹ en donde la funcionalización del alquino se realiza a través de la formación de una reacción click inusual dando lugar a un triazol en donde el oro queda finalmente coordinado a un átomo de carbono. El mecanismo de esta reacción no está completamente definido²⁵ y hasta el momento se ha propuesto que es análogo al seguido por el cobre.²⁶ En la reacción descrita por Sharpless y Fokin, el metal se enlaza al nitrógeno protonado de la azoimida y por un proceso concertado intramolecular se forma el derivado de triazol, con la diferencia en este caso de que la última etapa de protólisis no tiene lugar debido a la mayor estabilidad del enlace oro-carbono (esquema 5.6).



Esquema 5.6 Mecanismo simplificado de la formación de las especies carbono-oro.

La reacción se llevó a cabo en DMF durante 5 días a temperatura ambiente (esquema 5.7), observando la aparición de un pico en RMN de fósforo a 43.44 ppm que se corresponde con el valor observado para este tipo de análogos de oro (C-Au-PPh₃).¹²



Esquema 5.7 Síntesis de **42** mediante reacción click.

Se empleó un exceso de la azida de oro que gracias a la insolubilidad del bioconjugado en diclorometano pudo ser eliminado por lavados con este disolvente. Sin embargo, estos lavados no bastaron para obtener el compuesto puro. Se descartó su purificación por columna debido a la escasa separación observada en la capa fina y por la elevada retención del compuesto en la misma. Como recurso final el heterometálico **42** se purificó por HPLC semi-preparativa conociendo el riesgo de que el complejo no fuera

del todo estable a las condiciones de la columna (0.1% de TFA en el eluyente), además de la limitada solubilidad en las mezclas esencialmente acuosas provocando que se retenga el compuesto para mezclas de eluyentes a las que debería eluir. Finalmente se consiguió aislar una fracción correspondiente a un único pico en el cromatograma de la HPLC semi-preparativa. Al comprobar la pureza por HPLC analítica, aparecen algunos picos con baja intensidad (intensidad relativa menor de 0.1) que se justifican por la ligera descomposición que experimenta el compuesto al someterlo de nuevo a las condiciones de la columna (figura 5.12).

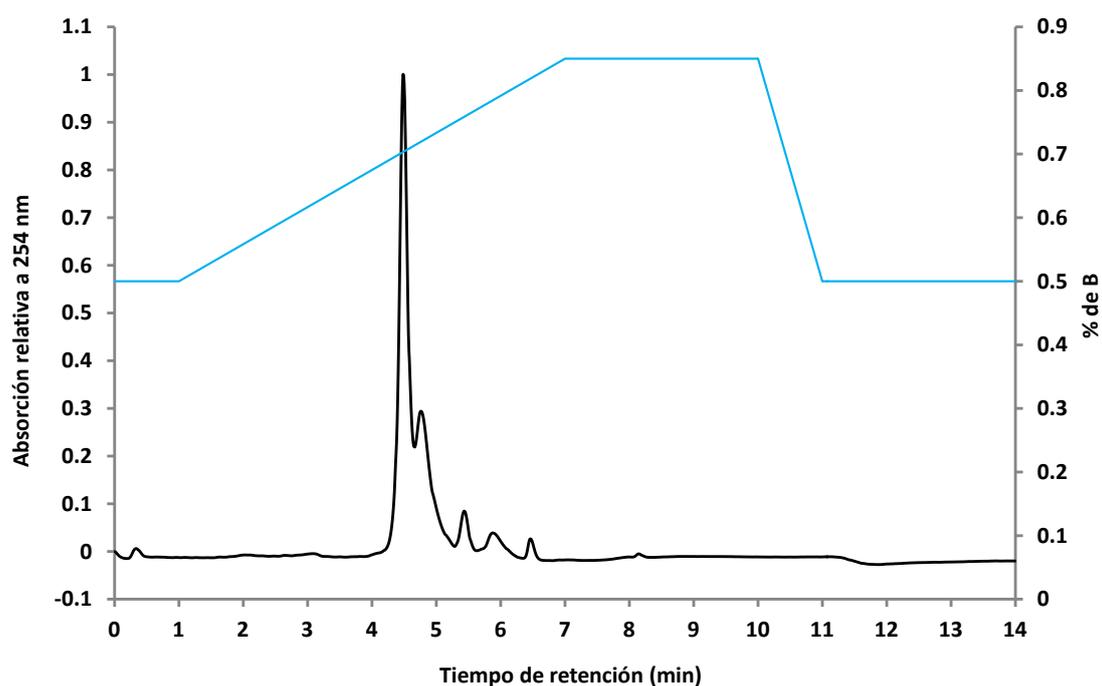


Figura 5.12 Traza de HPLC analítica del compuesto **42**. (Buffer A: H₂O con 0.1% de TFA, Buffer B: CH₃CN con 0.1% de TFA).

Los dos picos contiguos entre 4 y 5 minutos se corresponden con los dos diastereoisómeros del complejo deseado, como demostró el análisis por espectrometría de masas de ambas fracciones. En el espectro de MALDI, figura 5.13, se observa el pico del ión molecular (teórico C₈₄H₇₆AuIrN₁₂O₈P⁺ 1801.7648 m/z) confirmando la presencia del producto deseado **42**.

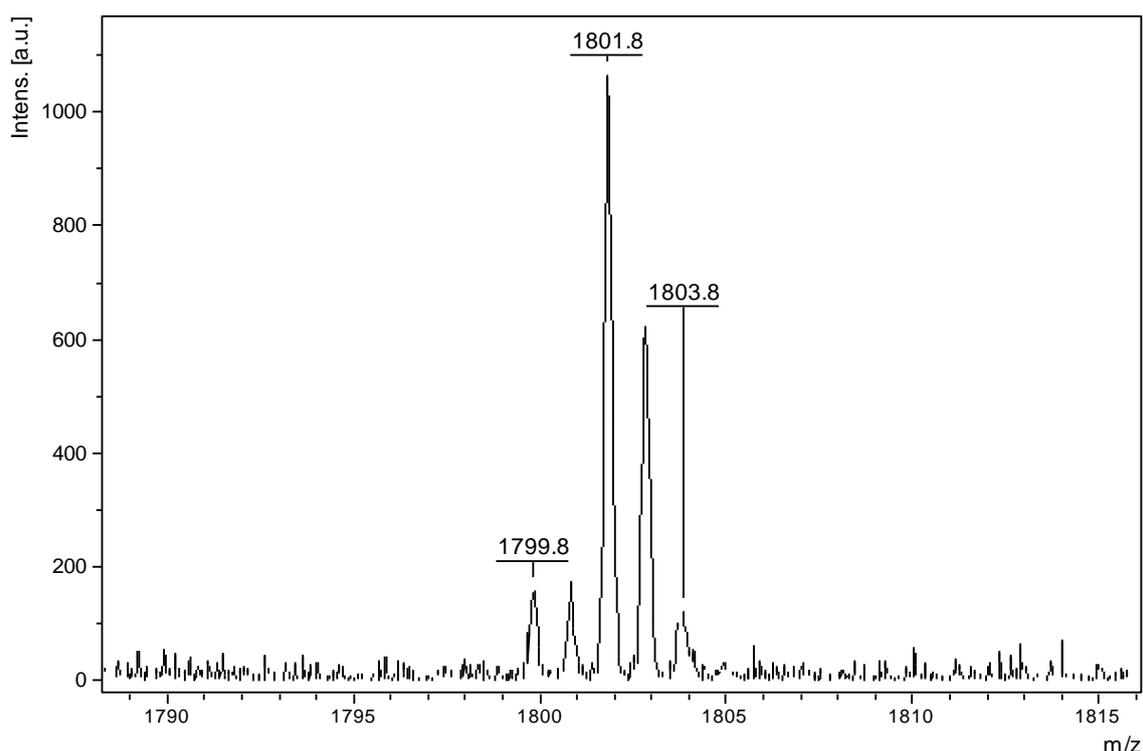
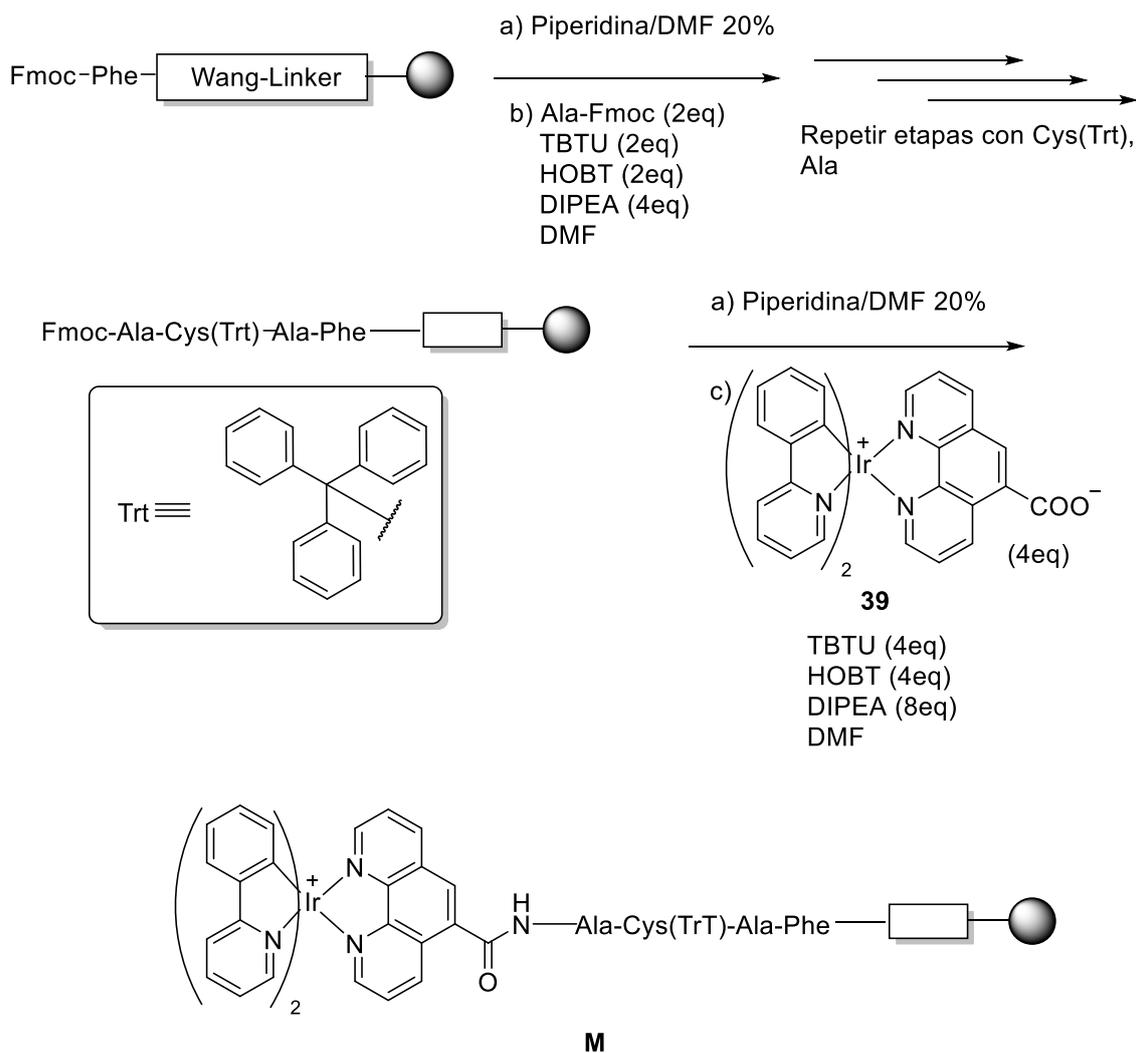


Figura 5.13 Espectro de masas MALDI de **42**.

5.3.3 Síntesis del bioconjugado de iridio y oro conteniendo cisteína

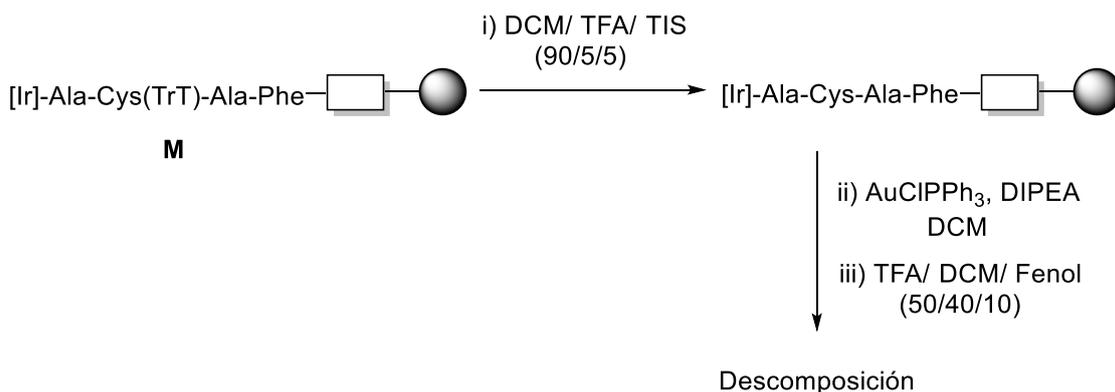
La síntesis de cadenas peptídicas conteniendo el aminoácido cisteína supone una dificultad añadida por la tendencia a la oxidación de este aminoácido formando puentes disulfuro con otro residuo cisteína, pero abre la puerta a la obtención de complejos de oro cuyo entorno de coordinación se asemeja a fármacos ya conocidos y con demostrada eficacia como agentes citotóxicos. Aunque el grupo tiol viene protegido por un grupo protector, en este caso el grupo tritilo, en el momento de la desprotección de este grupo o del desanclaje del péptido de la resina puede ocurrir la oxidación dando lugar a derivados disulfuros. Por estas razones, se decidió trabajar con una secuencia peptídica corta, que no responde a ninguna secuencia con relevancia biológica, pero que por la experiencia en el campo de la síntesis de bioconjugados, debería dar buenos resultados en términos de solubilidad. Esta secuencia se sintetizó nuevamente por síntesis peptídica en fase sólida acoplado en última instancia el complejo de iridio **39** para conducir al bioconjugado **M**. El esquema 5.8 muestra las condiciones y secuencia peptídica elegida.

5.3 Síntesis de los bioconjugados



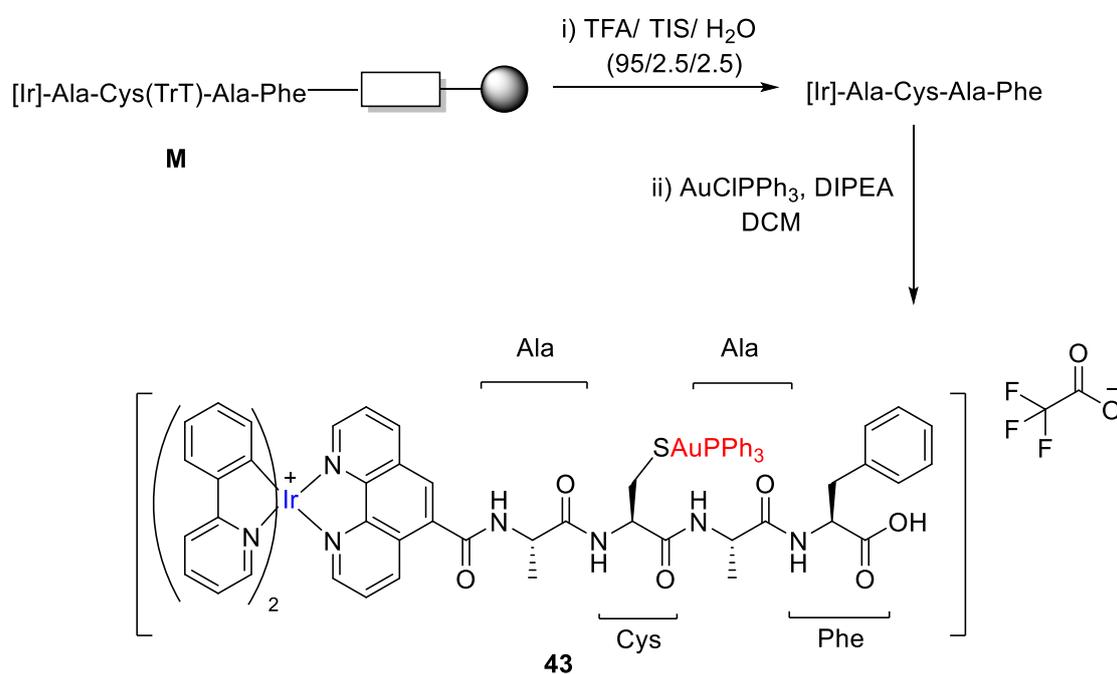
Esquema 5.8 Síntesis del bioconjugado de iridio que contienen cisteína.

Con el bioconjugado **M** aún anclado a la resina, dos opciones son posibles: la desprotección selectiva del grupo tiol para hacer reaccionar el azufre de la cisteína con el oro y después desanclar todo el bioconjugado, o bien el desanclaje total del bioconjugado (proceso durante el cual también tiene lugar la desprotección del grupo tritilo) y la coordinación de la cisteína al oro en disolución. La primera opción presenta la ventaja de una mayor protección del grupo tiol, que se oxida menos fácilmente cuando el péptido sigue anclado a la resina. Esta primera vía se intentó, pero tal y como se observó para el heterometálico conectado por la propargilglicina **L**, las condiciones de desanclaje son demasiado agresivas para el enlace oro-azufre por lo que no se obtuvo el producto deseado, esquema 5.9.



Esquema 5.9 Estrategia del síntesis del compuesto heterometálico por desprotección selectiva del grupo tritilo.

En consecuencia, el bioconjugado de iridio **M** se desancló de la resina en condiciones de atmósfera inerte y tras retirar la mezcla de desprotección por canulación, se añadió un exceso de [AuClPPh₃], DIPEA, y DCM desgasificado, esquema 5.10. Tras una noche a temperatura ambiente se eliminó el exceso de oro lavando con diclorometano y el crudo se purificó por HPLC. La estabilidad del producto en la columna de HPLC es moderada pero constituye la única manera de mejorar sustancialmente la pureza.



Esquema 5.10 Síntesis de **43**.

La traza de la HPLC analítica muestra que el **43** se obtiene con una pureza más que aceptable (figura 5.14) teniendo en cuenta trabajos similares en donde los

bioconjugados no han sido sometidos a purificación por HPLC aceptando purezas del 90 %.¹⁸

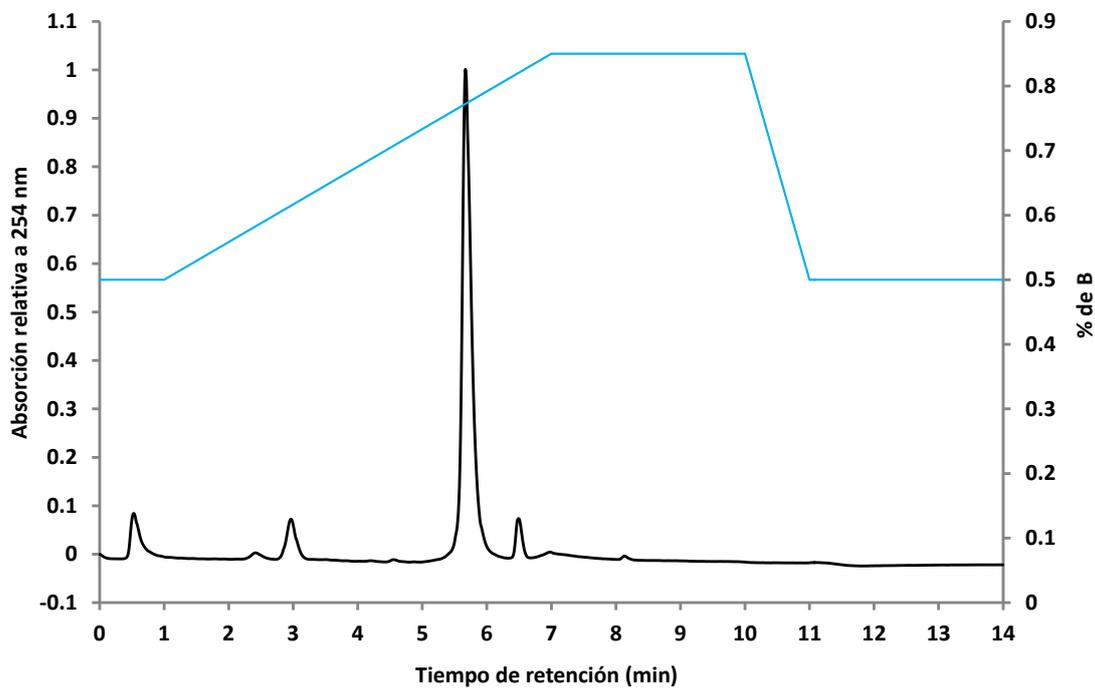


Figura 5.14 Traza de HPLC analítica del compuesto **43**. (Buffer A: H₂O con 0.1% de TFA, Buffer B: CH₃CN con 0.1% de TFA).

Se confirmó la obtención del producto deseado por espectrometría de masas (MALDI) al detectar el pico correspondiente al ión molecular a 1575.6 m/z (teórico C₇₁H₆₂AuIrN₈O₆PS⁺ 1575.4 m/z) (figura 5.15).

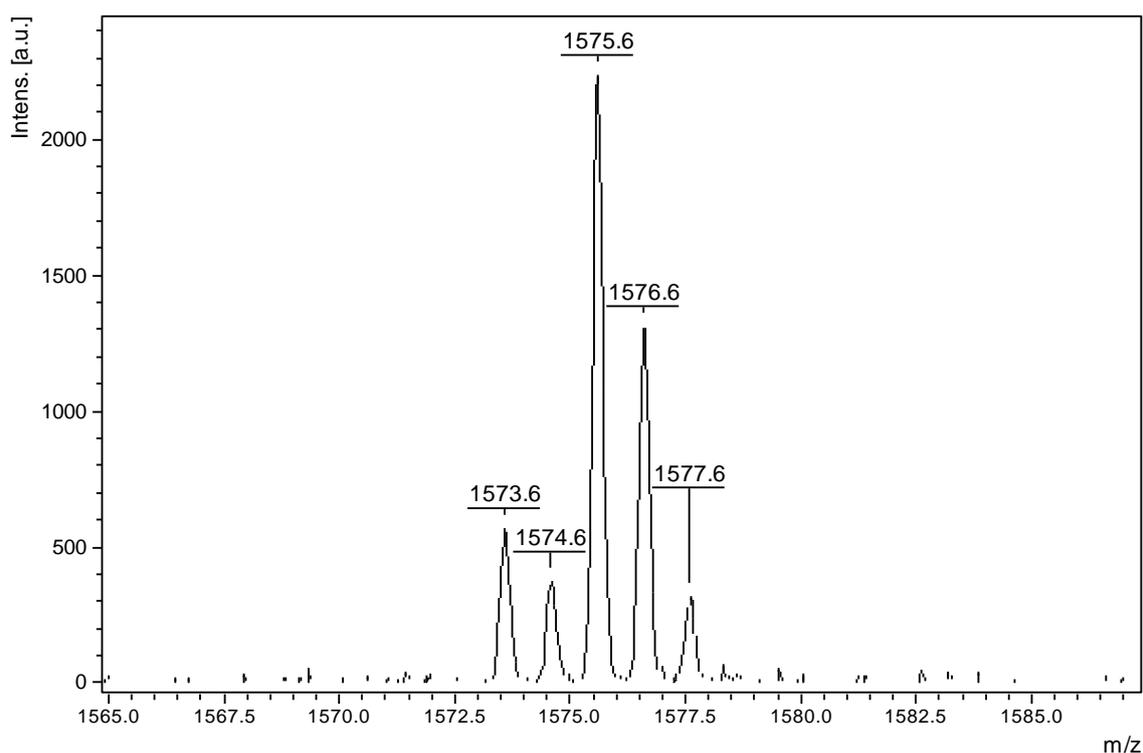


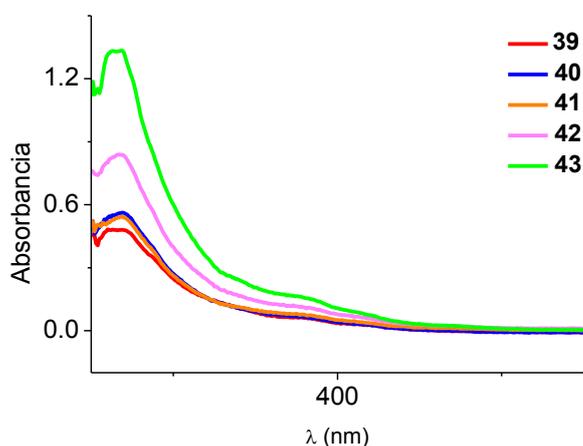
Figura 5.15 Espectro de masas MALDI de **43**.

5.4 Propiedades fotofísicas

Se han registrado los espectros de absorción UV-vis a temperatura ambiente en disoluciones de DMSO y se presenta un resumen en la tabla 5.2 así como su representación gráfica en la figura 5.16. Los espectros de absorción se componen de una banda intensa cuyo máximo de absorción se encuentra en 266 nm seguida de dos bandas de absorción de muy baja intensidad situadas en 375 nm y 415 nm respectivamente. La transición mayoritaria se ha catalogado como una transición 1LC entre los orbitales del ligando ppy, mientras que la transición a 374 nm se ha asociado a una transición de transferencia de carga entre ligandos 1LLCT de la ppy a la bpy. La transición centrada en 415 puede asociarse a la transición 1MLCT aunque también podría deberse a otra transición 1ILCT , por lo que también puede y debe asociarse a una transición mixta 1MLLCT .¹

Tabla 5.2 Resumen de las bandas de absorción registradas por espectroscopía UV-visible en disoluciones de DMSO aireado.

Compuesto	$^1\text{IL}, ^1\text{ILCT}$	$^1\text{MLLCT}, \lambda_{\text{abs}}/\text{nm} (\epsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1})$
39	266 (48300), 374 (6300)	415 (3200)
40	267 (56220), 375 (6900),	417 (3257)
41	269 (38570), 378 (5557)	416 (2928)
42	266(26680), 381 (3360)	416 (1840)
43	267(16880), 382 (2360)	416 (1260)

**Figura 5.16** Espectros de absorción UV-vis.

Adicionalmente se han obtenido los espectros de excitación y emisión del precursor de iridio **39** y del bioconjugado **40** en DMSO (tabla 5.3 y figura 5.17). Ambos complejos presentan una excitación muy similar (en el intervalo 433 – 443 nm) mientras que la emisión está centrada en 582 nm para **39** y en 615 nm para **40**. Este desplazamiento batocrómico se explica por el mayor comportamiento electroatractor de la amida del bioconjugado respecto al carboxilato del precursor de iridio. Como se ha explicado en el apartado 5.2.1, el LUMO viene habitualmente representado por orbitales π^* del ligando $\text{N}^{\wedge}\text{N}$, por lo que la presencia de un sustituyente electroatractor estabiliza dicho orbital produciendo una emisión menos energética. El largo desplazamiento de Stokes (entre 150 y 200 nm), sumado a una banda de emisión ancha y no estructurada, permiten

asignar la emisión a una transición desde una mezcla de estados $^3\text{MLCT}$ y $^3\text{LLCT}$ también catalogada como $^3\text{MLLCT}$.

Tabla 5.3 Resumen de las propiedades luminiscentes medidas en disoluciones de DMSO aireado.

Compuesto	Excitación _{max} (λ/nm)	Emisión _{max} (λ/nm)	Φ(%)
39	443	582	17
40	433	615	13
41	426	617	13
42	298, 378, 412, 469	613	21
43	317, 380, 414, 471	613	19

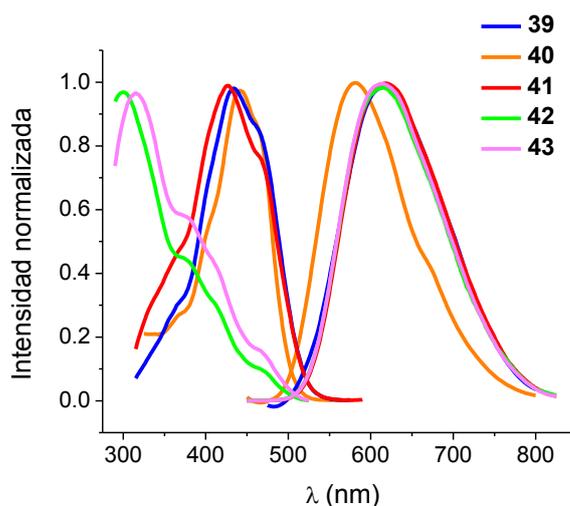


Figura 5.17 Espectros de excitación y emisión.

5.5 Actividad biológica sobre células tumorales humanas

5.5.1 Estudio de la actividad citotóxica. Método MTT

Se evaluó la actividad biológica de los bioconjugados **40**, **41** y **42**, así como del precursor de iridio **39**, en la línea de células tumorales de pulmón A549, incubando

dichas células con los complejos a estudio durante 24 horas. Como se aprecia en la tabla 5.4, tan sólo el bioconjugado **43**, en donde el oro se enlaza al péptido a través de un tiol, mostró actividad. Cabe destacar que mientras que el precursor de iridio se mostró bastante insoluble en la mezcla DMSO/ buffer acuoso que se emplea durante el ensayo MTT, los bioconjugados fueron notablemente más solubles.

Tabla 5.4 Valores de IC_{50} obtenidos en la línea celular A549.

Complejo	IC_{50} (μ M)
39	>50
40	>50
42	>50
43	12.3 \pm 1.83

5.5.2 Estudios de biodistribución. Medidas de microscopio confocal

Los estudios de biodistribución se realizaron empleando diferentes marcadores fluorescentes. En primer lugar, se empleó como agente de contraste Mitotracker Red CMXRos, un tinte específico de mitocondrias, cuyo máximo de excitación se encuentra en 579 nm, y su máximo de emisión en 599 nm. Las células tumorales A549 se incubaron con los compuestos **40** y **42** a una concentración igual a 25 μ M durante 24 horas, tras lo cual se excitó selectivamente los complejos a 473 nm, así como el tinte mitocondrial a 578 nm. Aunque la longitud de onda elegida para la excitación de **40** y **42** no se sitúa en su máximo de excitación, es la adecuada para que no exista absorción por parte de Mitotracker. En las imágenes de la figura 5.18, se puede observar como la emisión por parte de los compuestos sintetizados proviene de la zona correspondiente al citoplasma, cercana al núcleo, y que sin embargo no se corresponde con zona desde la que emite Mitotracker, descartando que exista acumulación mitocondrial. Adicionalmente, se observa algo de precipitado en el exterior de la célula, sugiriendo que la concentración empleada debería reducirse en futuras experiencias.

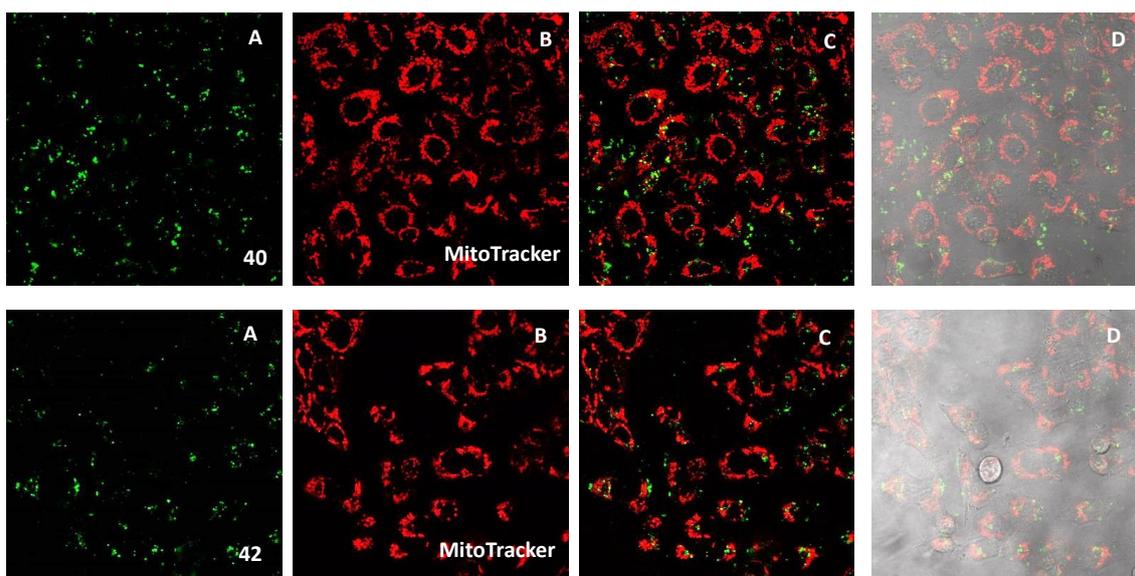


Figura 5.18 Imágenes de los complejos **40** (arriba) y **42** (abajo) incubados con las células A549 a 37 °C durante 24h. (A) Tras excitar a 473 nm. (B) Tras excitar a 578 nm. (C) Superposición de (A) y (B). (D) Imagen de contraste de fases.

Descartada la acumulación mitocondrial y nuclear, se realizaron estudios de colocalización con el tinte específico de lisosomas LysoTracker Red-DND, que posee el mismo perfil de excitación-emisión que Mitotracker Red CMXRos. Se incubaron las células A549 durante 24 h junto con los compuestos **40**, **42** y **43** a una concentración de 19 μM . En este caso sí se observó colocalización con el tinte empleado confirmando que existe acumulación lisosomal (figura 5.19). La acumulación en dichos orgánulos no es rara para los complejos de iridio existiendo ejemplos acerca de complejos neutros²⁷ o catiónicos,²⁸ muchos de ellos con sustituyentes protonables que una vez alcanzados el interior de los lisosomas a pH ácido quedan atrapados en su interior.²⁹

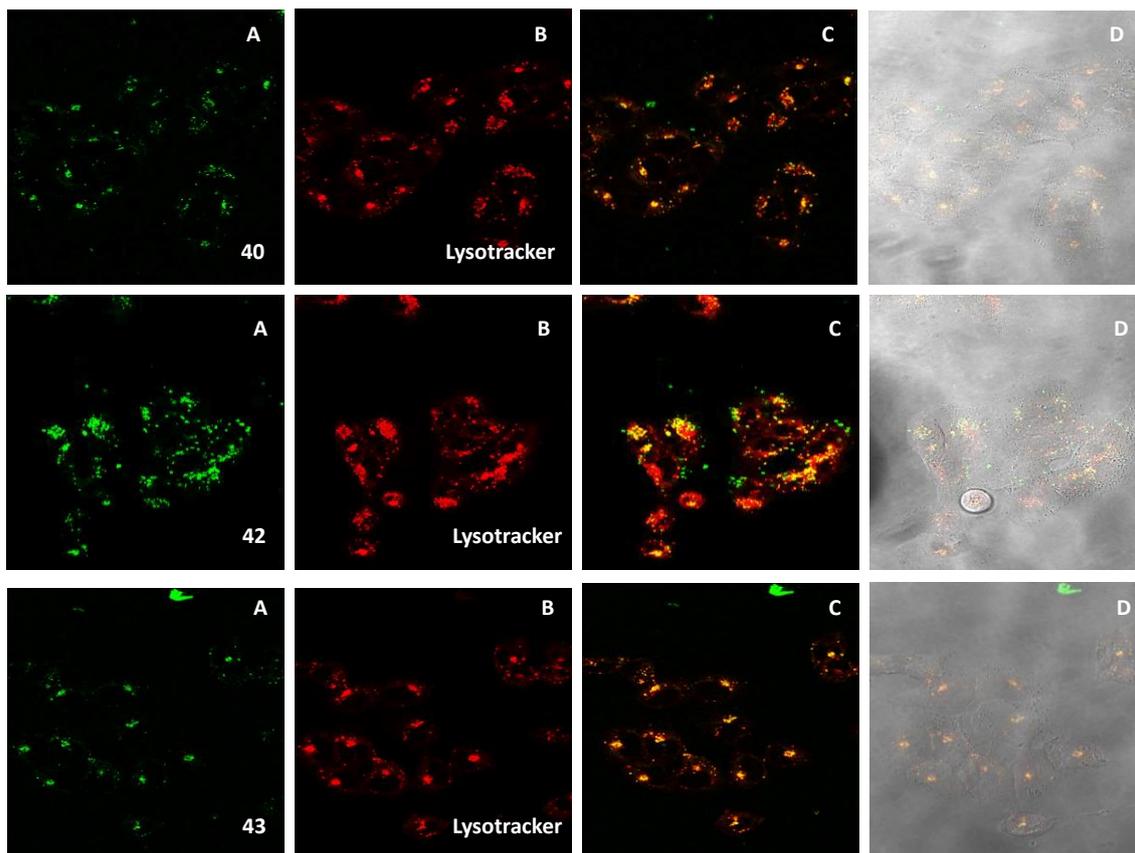


Figura 5.19 Imágenes de los complejos **40** (arriba), **42** (centro) y **43** (abajo) incubados con las células A549 a 37 °C durante 24h. (A) Tras excitar a 473 nm. (B) Tras excitar a 578 nm. (C) Superposición de (A) y (B). (D) Imagen de contraste de fases.

A la vista de los resultados obtenidos en la evaluación de la biodistribución, se constata que la internalización de los bioconjugados sintetizados es escasa, debido a la presencia de precipitado en el espacio celular, y a la baja intensidad de la señal proveniente del interior de la célula. Una baja internalización condiciona directamente la capacidad de ejercer algún tipo de actividad biológica, en este caso, hacia la muerte de las células tumorales. Como se ha comentado en el apartado 5.2.3, existen trabajos de bioconjugados de oro o iridio cuyo potencial biológico ha sido evaluado obteniendo buenos resultados. Sin embargo, una lectura más exhaustiva, permite extraer que a medida que aumenta el número de aminoácidos, o la longitud de la cadena del péptido empleado, la actividad decrece (valores de IC_{50} de [4.85,29.8] pasan a [23.0,49.5], en donde la fosfina del oro también muestra una elevada influencia)¹⁹ a causa de la creciente hidrofilia (el valor del logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua decae bruscamente al aumentar el número de aminoácidos desde 2-3 hasta -4 a -8,³⁰ cuando el valor óptimo se situaría entre 1 y 3³¹). Pudiendo parecer que la inclusión de cadenas peptídicas condensa las propiedades biológicas, otros autores han demostrado que el

efecto negativo de una excesiva hidrofilia puede ser contrarrestado por el uso de secuencias agonistas de macromoléculas,³² o por el uso conjunto de aminoácidos cargados positivamente y de espaciadores lipofílicos.³³ En ese sentido, se planteó que la utilización del péptido encefalina podría corregir un posible exceso de hidrofilia por el hecho de ser una secuencia endógena al cuerpo humano. Igualmente, la inclusión final del fragmento Au-PPh₃, altamente lipofílico, tenía como objetivo corregir un posible desbalance lipofílico. Como muestran los resultados, estas hipótesis no se han verificado, pero a la vez explican por qué el compuesto **43** es más activo que **42** pues su cadena presenta un aminoácido menos.

5.6 Conclusiones

Este capítulo ha consistido en la síntesis de derivados heterometálicos de iridio(III) y oro(I), conectados entre sí a través de un ligando fenantrolina conteniendo una cadena peptídica. En concreto, se ha combinado un fragmento [Ir(ppy)₂(phen)]⁺ con el residuo AuPPh₃, empleando como secuencias peptídicas la encefalina funcionalizada con un grupo propargilo en una de sus glicinas (compuesto **42**), o una secuencia artificial de cuatro aminoácidos conteniendo una cisteína (compuesto **43**). Además, durante el proceso de optimización y síntesis, se han aislado y caracterizado el complejo de iridio precursor **39** así como el bioconjugado de iridio con la secuencia encefalina **40**.

Los complejos sintetizados han mostrado unas excelentes propiedades fotofísicas, con rendimientos cuánticos comprendidos entre el 13 y 17%, desplazamientos de Stokes comprendidos entre 150 y 200 nm, y perfiles de excitación adecuados para ser empelados en imagen celular.

En lo respectivo a las propiedades biológicas, tan sólo el compuesto **43** ha mostrado comportamiento citotóxico hacia las células A549, demostrando que la conexión por medio de la funcionalidad tiol al oro, junto con la cadena peptídica escogida, constituyen una mejor opción en el camino hacia la obtención de agentes teragnósticos funcionales. Por otro lado, las pruebas de biodistribución han permitido observar que los complejos **40**, **42** y **43** tienden a acumularse en los lisosomas, aunque su internalización es baja. La naturaleza de la cadena peptídica (de longitud intermedia y sin cargas positivas), ha producido un aumento demasiado elevado de la hidrofilia, repercutiendo negativamente en la capacidad de los bioconjugados para atravesar la membrana celular. Tras esta primera aproximación en donde se ha podido establecer

una estrategia adecuada para la incorporación de ambos metales a una secuencia peptídica, la revisión de la cadena escogida, aumentando su carga positiva, recortando su longitud o incluyendo secuencias con alta capacidad de penetración, así como la incorporación de residuos lipofílicos (sustituyentes fluorados, cadenas alquílicas, sustituyentes aromáticos) para equilibrar el balance,³⁴ se postulan como las modificaciones clave para alcanzar las propiedades deseadas.

5.7 Experimental

5.7.1 Starting materials

The starting materials [AuCl(tht)],³⁵ [Au(acac)PPh₃],³⁶ [AuClPPh₃],³⁷ and [AuN₃PPh₃],²⁵ were prepared according to published procedures. IrCl₃·nH₂O was purchased from Strem Chemicals and used as received. Fmoc-protected aminoacids and resins for SPPS were purchased from Novabiochem. All other reagents were commercially available and were used without further purification. Solvents were dried with a SPS solvent purification system.

5.7.2 Instrumentation

Mass spectra were recorded on a Bruker Esquire 3000 PLUS, with the electrospray (ESI) technique and on a Bruker Microflex (MALDI-TOF). ¹H, ¹³C{¹H} and ³¹P{¹H} including 2D experiments, were recorded at room temperature on a Bruker Avance 400 spectrometer (¹H 400.0 MHz, ¹³C 100.6 MHz, ³¹P 162.0 MHz) or on a Bruker Avance II 300 spectrometer (¹H 300.0 MHz, ¹³C 75.5 MHz, ³¹P 121.5 MHz) with chemical shifts (δ, ppm) reported relative to the solvent peaks of the deuterated solvent. All *J* values are given in Hz. IR spectra were recorded in neat samples on a Perkin-Elmer Spectrum 100FT-IR spectrometer. Room temperature steady-state emission and excitation spectra were recorded with a Jobin-Yvon-Horiba Fluorolog FL3-11 spectrometer fitted with a JY TBX picosecond detection module. Nanosecond lifetimes were recorded with a Datastation HUB-B apparatus with a nanoLED controller and DAS6 software. The nanoLEDs employed for lifetime measurements had wavelengths of 370 and 390 nm. The lifetime data were fitted using the Jobin-Yvon software package and the Origin Pro 8 program. UV-vis spectra were recorded with 1 cm quartz cells on an Evolution 600

spectrophotometer. The quantum yields were measured in a Hamamatsu Photonics Quantaaurus-QY instrument at 300–950 nm. Measurements were performed by an ICP quadrupole mass spectrometer (Elan DRC-e, PerkinElmer, Shelton, CT, USA) equipped with a standard ICP torch, cross-flow nebulizer, nickel sampler and skimmer cones and DRC. PTFE vessels, micropipette tips, eppendorfs for digestion and polypropylene (PP) tubes were cleaned in 10% HNO₃ overnight and rinsed thoroughly with ultrapure water. Semi-preparative HPLC purifications and analysis were performed on a Knauer HPLC system using either one of the following columns: Macherey Nagel VP 125/10 Nucleodur 100-5 C18ec for purification and Macherey Nagel EC 125/4 Nucleodur C18 Pyramid 5µm or Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6 x 150 mm for analysis.

5.7.3 Crystallography

Crystals were mounted in inert oil glass fibres and transferred to the cold gas stream of an Xcalibur Oxford Diffraction diffractometer equipped with a low-temperature attachment. Data were collected using monochromated Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å). Scan type ω . Absorption corrections based on multiple scans were applied with the program SADABS³⁸ or using spherical harmonics implemented in SCALE3 ABSPACK scaling algorithm.³⁹ The structures were solved by direct methods and refined on F^2 using the program SHELXL-97.⁴⁰ All nonhydrogen atoms were refined anisotropically. In most of the cases, hydrogen atoms were included in calculated positions and refined using a riding model; some of the hydrogen atoms have been located in the diffraction map. Refinements were carried out by full-matrix least-squares on F^2 for all data.

5.7.4 Procedures

Antiproliferative Studies: MTT Assay.

Exponentially growing cells (A549) were seeded at a density of $\sim 1 \times 10^4$ cells per well in 96-well flat-bottomed microplates and allowed to attach for 24 h prior to addition of compounds. The complexes were dissolved in DMSO and added to cells in concentrations ranging from 1.25 to 50 µM in quadruplicate. Cells were incubated with the compounds for 24 h or 72 h at 37 °C. MTT (10 µL, 5 mg mL⁻¹) was added to each well, and plates were incubated for 2 h at 37 °C. Finally, the growth media was eliminated, and DMSO (100 µL per well) was added to dissolve the formazan

precipitates. The optical density was measured at 550 nm using a 96-well multiscanner autoreader (ELISA). The IC₅₀ was calculated by nonlinear regression analysis.

Cell Fluorescence Microscopy Study.

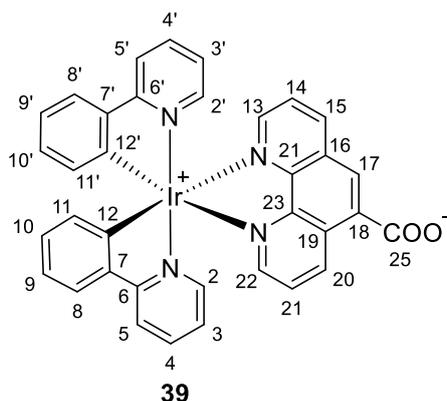
European Collection of Cell Cultures were maintained in 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid (Hepes) modified minimum essential medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin. A549 cells were detached from the plastic flask using trypsin–ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution and suspended in an excess volume of growth medium. The homogeneous cell suspension was then distributed into 24-well flat-bottomed microplates over a coverslip placed inside each well, and they were allowed to attach for 24 h prior to addition of compounds. Complexes were added (10 μ L) to the cells up to the desired final concentration (from 5 μ M to 25 μ M). After incubation for 4 h or 24 h at 37 °C, the growth medium was removed, and 0.5 mL of PBS was added for a washing step (three times). Thereafter, 0.5 mL of paraformaldehyde (4%) was added and allowed to stand for 15 min at room temperature. Eventually the paraformaldehyde was removed, and further washings with PBS were performed (3 \times 0.5 mL). The coverslips were collected from the 24-well plate, immersed for 1 or 2 s in distilled water, and let them to drip the water. Then, they are placed over a microscope slide, where a drop of fluoromount with 2 μ M DRAQ5 was previously placed. Preparations were viewed using an Olympus FV10-i oil-type compact confocal laser microscope using a 10 \times or 60 \times objective, with excitation wavelength at 405 and 650 nm.

Solid Phase Peptide Synthesis

The desired quantity (ca 200 mg) of the Fmoc-protected amino acid loaded in the resin (Wang resin) was placed in a 5 mL plastic syringe with a porous disc filter. The resin was swollen in DCM (3 mL, 1 min, three times), then DMF (3 mL, 1 min, three times then 3 mL over 30 min). Two steps of deprotection were then carried out with 3 mL of piperidine 20% in DMF over 10 minutes, followed by three washing steps with DMF (3 mL, 1 min). The solution containing the following Fmoc-protected amino acid (4 eq), HOBT (4 eq), TBTU (4 eq), DIPEA (8 eq) in DMF (3 mL) was added and the syringe was placed on a shaker for 1 h. The solution was removed and the resin was washed three times with DMF (3 mL, 1 min each). The deprotection and coupling steps were

repeated as many times as amino acids to add to the peptide and finally a de-swelling step was carried out by washing 3 times with DMF (3 mL, 1 min each), DCM (3 mL, 1 min each), and diethyl ether (3 mL, 1 min each). After drying in vacuo cleavage cocktail was added to the resin (TFA/ TIS/ H₂O (95/2.5/2.5), 3 mL) and the syringe was placed on a shaker for 3 h. The solution was filtered through the filter of the syringe into a 1/1 mixture of ice cold hexane and diethyl ether. The resulting suspension was centrifuged, decanted and washed again with fresh ice cold hexane/ether. The crude product was purified by semi preparative HPLC. Fractions containing the pure product were pooled, frozen in liquid nitrogen and lyophilized.

5.7.5 Syntheses

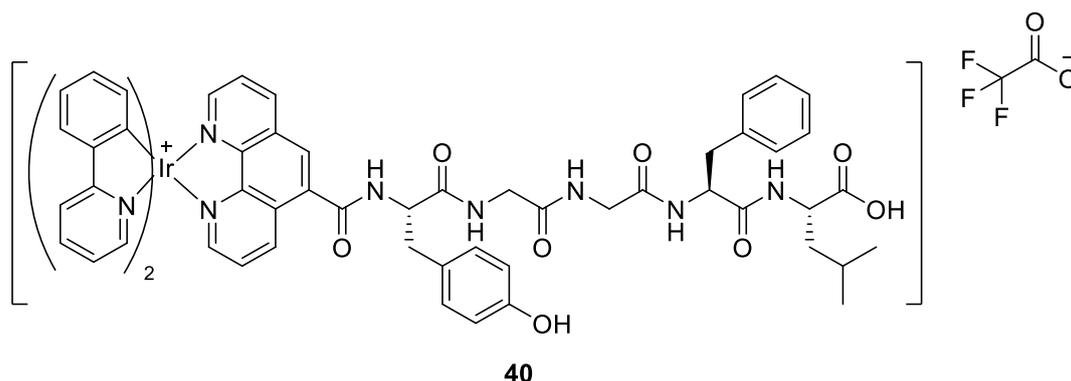


[Ir(ppy)₂]₂Cl₂ (1 eq, 536.5 mg, 0.499 mmol), sodium 1,10 phenanthroline-5-carboxylate (2.28 eq, 281 mg, 1.14 mmol) and sodium carbonate (19.1 eq, 780 mg, 9.51 mmol) were suspended in a 1:1 mixture of DCM and methanol (54 mL) and heated at 55°C until consumption of the limiting reagent (ca 2 h). The solvent was then evaporated and the crude redissolved in DCM, filtrated over celite and washed with water (2 × 15 mL). The organic phase was dried with anhydrous magnesium sulphate and evaporated (233.2 mg, 92%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 9.87 (dd, *J* = 8.6, 1.4 Hz, 1H, H₁₃ or H₂₂), 8.87 (dd, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 1H, H₁₃ or H₂₂), 8.53 (s, 1H, H₁₇), 8.25 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₂ + H_{2'}), 8.12 (dd, *J* = 5.0, 1.4 Hz, 2H, H₁₅ + H₂₀), 8.00 – 7.91 (m, 4H, H₈ + H_{8'} or H₁₁ + H_{11'}, + H₁₄ + H₂₁), 7.90 – 7.83 (m, *t*_{ap}, *J* = 7.9 Hz, 2H, H₃ + H_{3'}), 7.45 (*t*_{ap}, *J* = 6.0 Hz, 2H, H₉ + H_{9'} or H₁₀ + H_{10'}), 7.11 – 6.84 (m, 6H, H₄ + H_{4'} + H₅ + H_{5'} + H₉ + H_{9'} or H₁₀ + H_{10'}), 6.30

5.7 Experimental

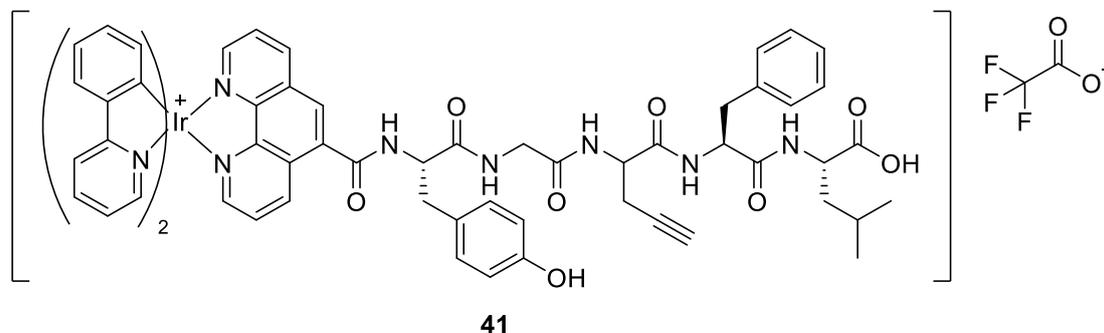
(d, $J = 7.5$ Hz, 2H, $H_8 + H_8'$ or $H_{11} + H_{11}'$). **^{13}C NMR (75 MHz, DMSO):** δ 166.88 (s, C_6 or C_6'), 166.86 (s, C_6 or C_6'), 166.55 (s, C_{25}), 150.59 (s, C_{12} or C_{12}' or C_7 or C_7'), 150.29 (s, C_{12} or C_{12}' or C_7 or C_7'), 149.71 (s, C_{15} or C_{20}), 149.58 (s, C_{15} or C_{20}), 148.99 (s, C_9 or C_9' or C_{10} or C_{10}'), 148.95 (s, C_9 or C_9' or C_{10} or C_{10}'), 146.23 (s, C_{23} or C_{24}), 145.66 (s, C_{23} or C_{24}), 144.07 (s, C_{12} or C_{12}' or C_7 or C_7'), 144.05 (s, C_{12} or C_{12}' or C_7 or C_7'), 141.63 (s, C_{17}), 139.53 (s, C_{13} or C_{22}), 138.77 (s, C_{13} or C_{22}), 138.61 (s, C_3 or C_3'), 138.58 (s, C_3 or C_3'), 131.30 (s, C_8 or C_8' or C_{11} or C_{11}'), 131.27 (s, C_8 or C_8' or C_{11} or C_{11}'), 130.71 (s, C_{16} or C_{19}), 130.66 (s, C_{16} or C_{19}), 130.16 (s, 2C, $C_9 + C_9'$ or $C_{10} + C_{10}'$), 126.74 (s, C_{14} or C_{21}), 126.59 (s, C_{14} or C_{21}), 125.99 (s, C_{17}), 125.03 (s, C_8 or C_8' or C_{11} or C_{11}'), 123.87 (s, C_4 or C_4'), 123.84 (s, C_4 or C_4'), 122.24 (s, 2C, $C_5 + C_5'$), 119.93 (s, 2C, $C_2 + C_2'$). **IR (cm^{-1}):** 3035 $\nu(\text{C}_{\text{Ar}}\text{-H})$, 1595, 1475 $\nu(\text{COO}^-)$. **HRMS (m/z):** 725.1490 $[\text{M}+\text{H}^+]$, $\text{C}_{35}\text{H}_{24}\text{IrN}_4\text{O}_2$ 725.1525.



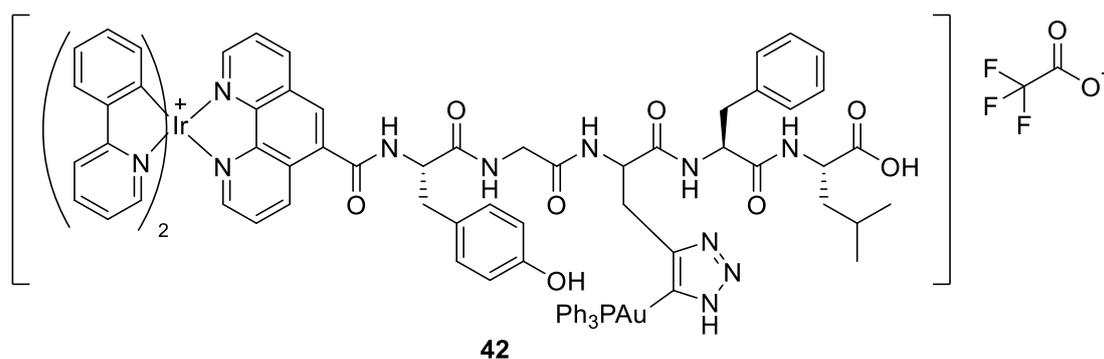
Solid-phase peptide synthesis was performed manually in 5 mL plastic syringes with a porous disc as filter. The peptide sequence (Tyr(*t*-Bu)-Gly-Gly-Phe) was assembled on Fmoc-protected Leucine loaded Rink amide resin (Novabiochem, 362 mg, loading 0.69 mmol g^{-1}) following general procedure. Then 211.2 mg (0.06 mmol) of the peptide-loaded resin were weighed and reacted with **39** (94 mg, 0.129 mmol), TBTU (41.7 mg, 0.129 mmol) and DIPEA (45.3 μL , 0.260 mmol) in DMF as an additional peptide coupling reaction for 4 h. The resin was then washed twice with fresh DMF and the coupling step was repeated with fresh reactives for 8 additional hours for 2 additional hours, when finally Kaiser Test confirmed that no free primary amines were present on the resin. Cleavage was performed with TFA/TIS/ H_2O (95/2.5/2.5) for 3 h, then precipitation in a mixture 1:1 of ice-cold diethyl ether/hexane yielded the crude product,

which was purified by semi preparative HPLC. Fractions containing the pure product were pooled, frozen in liquid nitrogen and lyophilized. Yellow solid (11.21 mg, 7 %).

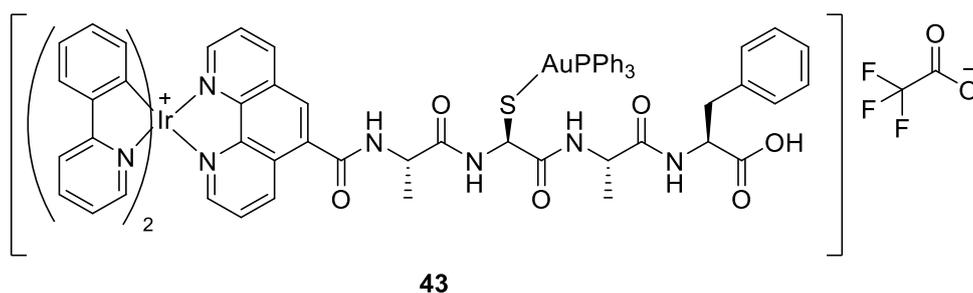
HR-MALDI (m/z): 1262.4278 [M-TFA], C₆₃H₅₉IrN₉O₈ 1262.4111.



41 was synthesized as described for **40**. The peptide sequence (Tyr(*t*-Bu)-Gly-(propargyl-Gly)-Phe) was assembled on Fmoc-protected Leucine loaded Rink amide resin (Novabiochem, 390.62 mg, loading 0.69 mmol g⁻¹) following general procedure for SPPS. Then 242.6 mg (0.205 mmol) of the peptide-loaded resin were weighed and reacted with **39** (148.38 mg, 0.205 mmol), TBTU (65.83 mg, 0.205 mmol), HOBT (27.7 mg, 0.205 mmol) and DIPEA (71.4 μL, 0.41 mmol) in DMF as an additional peptide coupling reaction overnight. The resin was then washed twice with fresh DMF, and the coupling step was repeated with fresh reactives for 8 additional hours, when finally Kaiser Test confirmed that no free primary amines were present on the resin. Cleavage was performed with TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) for 4 h 30, then precipitation in a mixture 1:1 of ice-cold diethyl ether/hexane yielded the crude product, which was purified by alumina column chromatography using CH₂Cl₂/MeOH (10:2) as eluent. Yellow solid (21.65 mg, 11%). **HR-MALDI (m/z):** 1300.4267 [M-TFA], C₆₆H₆₁IrN₉O₈ 1300.4267.



40 (13.66 mg, 0.01 mmol) was dissolved in DMF (2 mL) and DIPEA (1.7 μ L, 0.01 mmol) followed by AuN₃PPh₃ (24.2 mg, 0.048 mmol) were added. The solution was stirred for 2 days, then the solvent was evaporated and the resulting solid was washed twice with DCM. The crude product was purified by semi preparative HPLC. Fractions containing the pure product were pooled, frozen in liquid nitrogen and lyophilized. Yellow solid (3.81 mg, 20 %). **MALDI (m/z):** 1801.8 [M-TFA], C₈₄H₇₆AuIrN₁₂O₈P 1801.8.



The peptide sequence (Ala-Cys(Trt)-Ala) was assembled on Fmoc-protected Phenylalanine loaded Rink amide resin (Novabiochem, 308 mg, loading 0.65 mmol g⁻¹) following general procedure for SPPS. Then 190 mg (0.09 mmol) of the peptide-loaded resin were weighed and reacted with **39** (124 mg, 0.17 mmol), TBTU (55.2 mg, 0.017 mmol), HOBT (23.2, 0.017 mmol) and DIPEA (60 μ L, 0.34 mmol) in DMF as an additional peptide coupling reaction overnight. The resin was then washed twice with fresh DMF and **39**, TBTU and DIPEA were added again in DMF and the syringe was placed on a shaker overnight, when finally Kaiser Test confirmed that no free primary amines were present on the resin. Cleavage was performed with 3 mL of TFA/TIS/H₂O (95/2.5/2.5) for 3 h in a two-necked round bottom flask under argon atmosphere. The resulting solution containing iridium bioconjugate was transferred to a weighed flask under argon via cannula. The solvent was evaporated, and the weight of the crude was calculated in order to add an equimolar quantity of AuClPPh₃ (20.4 mg, 0.041 mmol), DCM (10 mL) and K₂CO₃ in excess. After 1 night at r.t., the mixture was filtered over celite, concentrated and precipitated with ether. The crude was then purified by semi preparative HPLC. Fractions containing the pure product were pooled, frozen in liquid nitrogen and lyophilized. Yellow solid (6 mg, 2%).

5.7.5 References

- ¹ S. Ladouceur, D. Fortin, E. Zysman-Colman, *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 5625 – 5641.
- ² M. S. Lowry, W. R. Hudson, R. A. Jr. Pascal, S. J. Bernhard, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 14129 – 14135.
- ³ a) F. Neve, A. Crispini, S. Campagna, S. Serroni, *Inorg. Chem.*, **1999**, *38*, 2250 – 2258. b) I. Avilov, P. Minoofar, J. Cornil, L. De Cola, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 8247 – 8258.
- ⁴ M. Montalti, A. Credi, L. Prodi, M. T. Gandolfi, *Handbook of Photochemistry*, Taylor and Francis: Boca Raton, FL, 2006
- ⁵ M. P. Coogan, S. J. A. Pope, en *The Chemistry of Molecular Imaging*, eds. N. Long, W.-T. Wong, Wiley, 2015, ch 12, 275 – 298.
- ⁶ C. Caporale, C. A. Bader, A. Sorvina, K. D. M. MaGee, B. W. Skelton, T. A Gillam, P. J. Wright, P. Raiteri, S. Stagni, J. L. Morrison, S. E. Plush, D. A. Brooks, M. Massi, *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 15666 – 15679.
- ⁷ Y. Chen, L. Qiao, L. Ji, H. Chao, *Biomaterials*, **2014**, *35*, 2 – 13.
- ⁸ a) S.P.-Y. Li, T.S.-M. Tang, K.S.-M. Yiu, K.K.-W. Lo, *Chem. Eur. J.*, **2012**, *18*, 13342 – 13354. b) H. Yu, Y. Xiao, L. Jin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 17486 – 17489.
- ⁹ S. Moromizato, Y. Hisamatsu, T. Suzuki, Y. Matsuo, R. Abe, S. Aoki, *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 12697 – 12706.
- ¹⁰ C. Li, M. Yu, Y. Sun, Y. Wu, C. Huang, F. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 11231 – 11239. b) K. K.-W. Lo, C.-K. Chung, N. Zhu, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 1500 – 1512.
- ¹¹ C.-L. Ho, K.-L. Wong, H.-K. Kong, Y.-M. Ho, C. T.-L. Chan, W.-M. Kwok, K. S.-Y. Leung, H.-L. Tam, M. H.-W. Lam, X.-F. Ren, A.-M. Ren, J.-K. Feng, W.-Y. Wong, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 2525 – 2527.
- ¹² K.K.-W. Lo, S.-K. Leung, C.-Y. Pan, *Inorg. Chim. Acta*, **2012**, *380*, 343 – 349.
- ¹³ C. Wilson, R. Venditti, L.R. Rega, A. Colanzi, G. D'Angelo, M.A. De Matteis, *Biochem. J.*, **2011**, *433*, 1–9.
- ¹⁴ J. Kuil, P. Steunenbergh, P. T. K. Chin, J. Oldenburg, K. Jalink, A. H. Velders, F. W. B. van Leeuwen, *ChemBioChem*, **2011**, *12*, 1897 – 1903.
- ¹⁵ X. Wang, J. Jia, Z. Huang, M. Zhou, H. Feri, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 8028 – 8032.
- ¹⁶ C. Dolan, R. D. Moriarty, E. Lestini, M. Devocelle, R. J. Fosrter, T. E. Keyes, *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, *119*, 65 – 74.
- ¹⁷ X. Ma, J. Jia, R. Cao, X. Wang, H. Fei, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136*, 17734 – 17737.

- ¹⁸ J. Caddy, U. Hoffmanns, N. Metzler-Nolte, *Z. Naturforsch.*, **2007**, *62b*, 460 – 466.
- ¹⁹ S. D. Körster, H. Alborzinia, S. Can, I. Kitanovic, S. Wölfl, R. Rubbiani, I. Ott, P. Riesterer, A. Prokop, K. Merz, N. Metzler-Nolte, *Chem. Sci.*, **2012**, *3*, 2062 – 2072.
- ²⁰ U. Rychlewska, B. Warzajtis, B. D. Glisic, M. D. Zivkovic, S. Rajkovic, M. I. Djuran, *Dalton Trans.*, **2010**, *39*, 8906 – 8913.
- ²¹ a) A. Gutiérrez, I. Marzo, C. Catiuela, A. Laguna, M. C. Gimeno, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 11088 – 11095 b) A. Gutiérrez, M. C. Gimeno, I. Marzo, N. Metzler-Nolte, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2014**, *15*, 2512 – 2519 c) L. Ortego, M. Meireles, C. Kasper, A. Laguna, M. D. Villacampa, M. C. Gimeno, *J. Inorg. Biochem.*, **2016**, *156*, 133 – 144.
- ²² S. M. Gagné, M. Auger, F. Separovic, I. Marcotte, *Biophysical Journal*, **2004**, *86*, 1587 – 1600.
- ²³ B. Higgins, B. A. DeGraff, J. N. Demas, *Inorg. Chem.*, **2005**, *44*, 6662 – 6669.
- ²⁴ W. Jiang, C. Hong, H. Wei, Z. Wu, Z. Bian, C. Huang, *Inorg. Chim. Acta*, **2017**, *459*, 124 – 130.
- ²⁵ D. V. Partyka, J. B. Updegraff III, M. Zeller, A. D. Hunter, T. G. Gray, *Organometallics*, **2007**, *26*, 183 – 186.
- ²⁶ F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V. V. Rostovtsev, L. Noodleman, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 210 – 216.
- ²⁷ K. Qiu, H. Huang, B. Liu, Y. Liu, Z. Huang, Y. Chen, L. Ji, H. Chao, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, *8*, 12702 – 12710.
- ²⁸ L. He, Y. Li, C.-P. Tan, R.-R. Ye, M.-H. Chen, J.-J. Cao, L.-N. Ji, Z.-W. Mao, *Chem. Sci.*, **2015**, *6*, 5409 – 5418.
- ²⁹ C. Caporale, M. Massi, *Coord. Chem. Rev.*, **2018**, *363*, 71 – 91.
- ³⁰ P. Steunenberg, A. Ruggi, N. S. van den Berg, T. Buckle, J. Kuil, F. W. B. van Leuwen, A. H. Velders, *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 2105 – 2114.
- ³¹ E. H. Kerns, L. Di, in *Drug-Like Properties: Concepts, Structure, Design and Methods*, Academic Press, San Diego, 2008, cap. 5, 43 – 47.
- ³² K. Vellaisamy, G. Li, W. Wang, C.-H. Leung, D.-L. Ma, *Chem. Sci.*, **2018**, *9*, 8171 – 8177.
- ³³ Y. Hisamatsu, A. Shibuya, N. Suzuki, T. Suzuki, R. Abe, S. Aoki, *Bioconj. Chem.*, **2015**, *26*, 857 – 879.
- ³⁴ W. Jiang, Y. Gao, Y. Sun, F. Ding, Y. Xu, Z. Bian, F. Li, J. Bian, C. Huang, *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 3252 – 3260.

- ³⁵ a) R. Usón, A. Laguna, M. Laguna, D. A. Briggs, H. H. Murray, J. P. Fackler Jr. in *Inorganic Syntheses*, ed. H. D. Kaesz, 1989, 85 – 90. b) G. Brauer, *Handbuch der Präparativen Anorganischen Chemie*, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1978, p. 1014.
- ³⁶ D. Gibson, B. F. G. Johnson, J. Lewis, *J. Chem. Soc. A*, **1970**, 1730 – 1735.
- ³⁷ L. K. Batchelor, E. Paunescu, M. Soudani, R. Scopelliti, P. J. Dyson, *Inorg. Chem.*, **2017**, *56*, 9617 – 9633.
- ³⁸ G. M. Sheldrick, *SADABS, Program for adsorption correction*, University of Göttingen, Göttingen, Germany, **1996**.
- ³⁹ *CrysAlisPro, Agilent Technologies, Version 1.171.35.11 Multi-scans absorption correction with SCALE3 ABSPACK scaling algorithm.*
- ⁴⁰ G. M. Sheldrick, *SHELXL-97, Program for Crystal Structure Refinement*, University of Göttingen, Göttingen, Germany, **1997**.

CONCLUSIONES GENERALES

En primer lugar, se describe la síntesis de derivados trimetálicos que contienen dos complejos octaédricos de renio(I) de la forma $fac-[Re(CO)_3(bpy)(py)]^+$ enlazados a un complejo bisfosfina de oro(I). La piridina enlazada al renio, ha sido funcionalizada en las posiciones *meta* o *para* con un residuo amidofosfina que se enlaza al oro a través de su extremo fosfina. La tendencia del complejo precursor de renio $fac-[Re(CO)_3(bpy)(OTf)]$ a captar cloruros o tiolatos, que se encuentren en disolución o anclados a otras moléculas, limita las combinaciones de ligandos auxiliares anclados al oro, perfilándose el entorno bisfosfina como la mejor opción. El estudio de las propiedades luminiscentes en disolución a temperatura ambiente, ha revelado que la incorporación del oro no modifica sustancialmente dichas propiedades respecto de los precursores monometálicos de renio. Por otro lado, se ha podido comprobar que los compuestos heterometálicos presentan actividad frente a la línea de células tumorales A549. Los estudios de bioacumulación por microscopía de fluorescencia confocal permitieron observar una acumulación en el citoplasma y en el núcleo, tras lo cual por medio de espectroscopía UV-visible así como experimentos de electroforesis en gel de agarosa, se concluyó que existía interacción con el ADN.

En el tercer capítulo, se han sintetizado y explorado las propiedades luminiscentes de complejos de renio de la forma $fac-[Re(CO)_3(N^{\wedge}C)(L)]^+$ en donde $N^{\wedge}C$ representa un ligando piridina-carbeno NHC y L representa diferentes piridinas, imidazoles, así como la molécula trifenilfosfina. Se ha podido comprobar que la inclusión del carbeno dentro del ligando quelato ha traído consigo menores rendimientos cuánticos, así como perfiles de excitación-emisión más energéticos. La alta energía y estructuración de las bandas obtenidas sugieren que la naturaleza del estado excitado se corresponde a una mezcla de estados 3MLCT y 3LC , pudiendo observarse la transición desde el estado 3MLCT sólo en complejos con ligandos fuertemente electroattractores. Además, en los complejos con etinil-piridinas o imidazol, se han coordinado complejos fosfina de oro para la obtención de compuestos heterometálicos altamente citotóxicos frente a la línea de células tumorales A549. Aunque dicha actividad se vio aumentada al irradiar los compuestos a estudio, debido a la elevada toxicidad en ausencia de radiación no se puede considerar que dichos complejos sean aptos para su uso en terapia fotodinámica.

Los estudios de biodistribución revelaron una distribución a lo largo del citoplasma, sugiriendo una posible interacción con las mitocondrias. Por ello, se estudió el tipo de muerte celular, la interacción con la enzima mitocondrial tioredoxina reductasa, así como la generación de especies reactivas de oxígeno, sugiriendo un modo de acción a través de la necrosis y descartando la mitocondria como posible orgánulo diana.

En el cuarto capítulo se continúa el trabajo realizado en el primer capítulo, conectando esta vez renio y oro por funcionalización del ligando quelato, fijando la posición axial en el renio por un ligando cloruro. En concreto se presentan tres tipos de familias en función de la naturaleza del ligando quelato: etinilbipiridinas, metiltiolbipiridinas, e imidazolfenantrolinas. Los complejos obtenidos mostraron muy buena estabilidad química así como una mayor versatilidad en la naturaleza del ligando auxiliar enlazado al oro. Además, debido a la mayor conjugación del ligando quelato se observó el desplazamiento batocrómico en los perfiles de emisión y excitación haciendo más interesantes estos complejos para imagen celular. Sin embargo, la naturaleza neutra e hidrófoba de los derivados heterometálicos redujo excesivamente su solubilidad en el medio acuoso, impidiendo obtener buenos resultados de citotoxicidad. En consecuencia, se intercambió el ligando cloruro por una molécula de acetonitrilo en los compuestos conectados por alquinibipiridinas, obteniendo complejos catiónicos con mejores valores de actividad biológica, por una mejor internalización en las células como confirmaron los estudios por ICP-MS. Las pruebas de biodistribución mostraron la tendencia de los compuestos catiónicos a asociarse con la membrana celular sugiriendo su alteración como posible mecanismo de acción.

En el último capítulo se describe la síntesis de complejos heterometálicos de iridio(III) y oro(I), en donde se han combinado complejos de iridio(III) luminiscentes de la forma $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{phen})]^+$ con complejos fosfina de oro. Con el fin de mejorar la captación y solubilidad en medio acuoso de los derivados heterometálicos, se ha incluido en el ligando conector fenantrolina una cadena peptídica de corta longitud. En concreto, se han empleado dos cadenas diferentes: la encefalina en su versión leucina o un péptido de cuatro aminoácidos conteniendo una cisteína. Como resultado, se ha obtenido un bioconjugado únicamente basado en iridio, con la cadena encefalina, y dos bioconjugados heterometálicos cada uno con una secuencia peptídica diferente. Todos los bioconjugados sintetizados mostraron excelentes propiedades luminiscentes con

rendimientos cuánticos oscilando entre el 13 y el 17%. Sin embargo, tan sólo el bioconjugado con la cadena peptídica conteniendo la cisteína, que es a su vez la más corta de las dos empleadas, mostró actividad antitumoral frente a la línea de células tumorales A549, concluyendo que una cadena peptídica corta y una conexión al oro por medio de grupos tiolato permiten obtener los complejos más activos. Los estudios de biodistribución revelaron un mismo patrón de acumulación lisosomal para todos los derivados.

Como conclusión general, se ha observado que la combinación en una misma molécula de un centro de renio o iridio y otro de oro permite obtener potenciales agentes teragnóticos, en donde un balance entre carga y lipofilia resulta clave para su solubilidad en medio acuoso y su capacidad de atravesar la membrana celular. La conexión entre ambos metales que más libertad confiere en términos de derivatización, estabilidad y modulación de la luminiscencia es la que tiene lugar por funcionalización del esqueleto diimina, que ha mostrado mejores resultados que un quelato de tipo piridina-carbeno NHC. La inclusión de estructuras que mejoren la solubilidad en agua puede constituir una fuente de mejora como ha demostrado la presencia de péptidos en los complejos de iridio aunque la longitud de la cadena y su carga deberán ajustarse a las propiedades de cada complejo en particular. En lo referido al oro, la presencia de tiolatos en su entorno de coordinación se ha afianzado como la mejor herramienta para potenciar su citotoxicidad.

El complejo teragnóstico ideal según las conclusiones obtenidas en esta tesis respondería a la estructura dibujada en la figura C.1 en donde la conexión entre el renio y el oro tendría lugar por el esqueleto bipyridina, la presencia de ciclos aromáticos se vería reducida, y se incorporarían residuos que optimizan el balance carga/lipofilia. Sería recomendable incorporar ligandos tiolato en el oro siempre que no existiera competencia de coordinación con el renio.

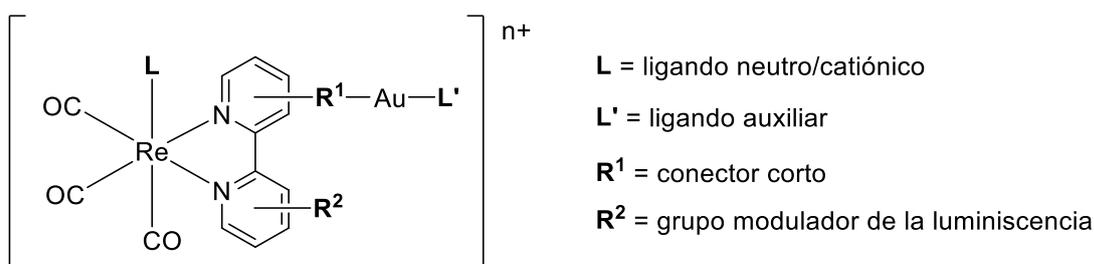


Figura C. 1 Complejo teragnóstico ideal basado en Re(I) y Au(I)

GENERAL CONCLUSIONS

The growing interest devoted to the development of theranostic agents is reflected in the increasing number of publications dealing with this subject. Au(I) derivatives have shown promising properties against cancer cells but the mechanism of its therapeutic action is still unclear. This PhD thesis focuses on the synthesis of heterometallic compounds combining rhenium or iridium luminescent probes with cytotoxic gold complexes as a solution for assessing the biodistribution live in the cells and understanding the mode of action.

In chapter 2, two luminescent rhenium complexes of the type $fac-[Re(CO)_3(bpy)(py)]^+$, were combined with bisphosphine gold complexes to afford heterotrimetallic compounds following the general formula $(fac-[Re(CO)_3(bpy)(pyCONH(CH_2)_2PPh_2)_2Au]$. The connection was made through derivatization of *meta* or *para* positions of the axial pyridine ligand by amidofosfine moieties. While the gold fragment did not affect the luminescent properties shown by the rhenium fragment $fac-[Re(CO)_3(bpy)(py)]^+$, the biological activity was severally increased over A549 lung cancer cells in comparison with heterobimetallic precursors, $fac-[Re(CO)_3(bpy)(pyCONH(CH_2)_2PPh_2AuCl)]$. Finally, biodistribution studies by confocal fluorescence microscopy showed cytoplasmic accumulation as well as nucleus penetration. As a result, studies of DNA interaction by gel electrophoresis and UV-vis were carried out confirming this fact.

In chapter 3, the properties of luminescent rhenium(I) containing a pyridine imidazole based carbene as the chelating ligand were studied, as well as their potential application as building blocks for Re(I)/Au(I) theranostic complexes. By replacement of one pyridine in the bipyridine chelate ligand by a five membered NHC ligand, a series of rhenium derivatives were synthesized employing different pyridyl or imidazolyl axial ligands, as well as a triphenylphosphine ligand. The presence of the NHC carbene as a strong σ donor led to more energetic transitions and lower quantum yields. The excited state was assigned to a combination of 3MLCT and 3LC states according with the highly structured bands. Alternatively, for compounds bearing electroattractor pyridines as the axial ligand, a transition from the 3MLCT was observed at much lower energies. The

complexes bearing alkynylpyridines or alkynylimidazole as the axial ligands were further complexed to gold triphenylphosphine to afford heterobimetallic compounds. Evaluation of cytotoxic activity on A549 lung cancer cells revealed that only gold-containing complexes showed activity, which was improved upon irradiation. Despite such increase upon irradiation the compounds cannot be considered suitable for photodynamic therapy due to their high toxicity in the dark. Finally, biodistribution in live cells was investigated and cytoplasmic accumulation was observed. In order to elucidate if the cell death mechanism and the action mechanism of the probes was through a mitochondrial pathway, different assays were performed: flow cytometry, analysis of ROS production and thioredoxin reductase inhibition. Results showed that a necroptotic type process was dominating and no ROS production neither TrxR inhibition were observed, concluding that a different organelle should be the biological target.

Following the work described in chapter 2, in the fourth chapter, the connection between gold and rhenium was carried out by functionalisation of the chelate ligand, blocking the axial position of the rhenium coordination sphere with a chloride atom. Three types of connecting ligands were synthesized: alkynylbipyridines, methylthiolbipyridines and imidazolephenanthrolines. By extending conjugation, bathochromic shifts were observed in the excitation/emission profiles. However, the resulting neutral complexes, bearing a high number of aromatic cycles, resulted in low water soluble compounds which did not show activity towards A549 lung cancer cells. Consequently, the chloride ligand was exchanged by an acetonitrile molecule in ethynylbipyridines Re(I)/Au(I) derivatives, obtaining cationic heterometallic complexes with improved cytotoxicity and cellular uptake, confirmed by ICP-MS. Finally, biodistribution studies revealed the tendency of cationic complexes to interact with cellular membrane pointing out its disruption as the mode of action of the cited compounds.

In chapter 5, the synthesis of heterometallic complexes by a combination of a luminescent Ir(III) complexes following the formula $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{phen})]^+$, with a gold phosphine complex, is described. A short peptidic sequence was included in the phenanthroline connecting ligand, to improve water solubility and cell internalization. The chosen sequences were the Leu-enkephalin, and a four aminoacid chain containing

cysteine. The complexes synthesized showed excellent photophysical properties, with quantum yields between 13 and 17%. However, only relevant cytotoxicity over A549 lung cancer cells was observed for bioconjugate bearing the cysteine sequence, pointing out that a short peptide containing a thiol moiety to further coordinate the gold fragment yields the best results. Finally, by fluorescence confocal microscopy, a lysosomal accumulation was found for all the bioconjugates, suggesting the iridium core as the directing structure.

As a general conclusion, the combination of a rhenium or iridium luminescent complex with a gold cytotoxic compound allows the synthesis of heterometallic theranostic compounds, where maintaining an appropriate lipophilic balance and water solubility is key for delivering the best outcomes. When it comes to stability and photophysical properties, functionalization of the bisimine chelating ligand gives better results than modification on the axial ligand showed the best. In order to improve water solubility, peptides arise as a appropriate solution. Regarding to the gold coordination sphere, the thiol link has shown the best results for improving biological activity.

According to the results of this thesis, the ideal theranostic compound is represented in figure C.2, in which rhenium and gold are connected through the bipyridine chelating ligand, functionalized with a non-aromatic moiety. In addition, the axial ligand should be neutral or cationic in order not to reduce the water solubility of the final probe. Finally, other luminescent modulating groups could be attached to the bipyridine, and if possible, thiol ligands should be part of the coordination sphere of the gold fragment.

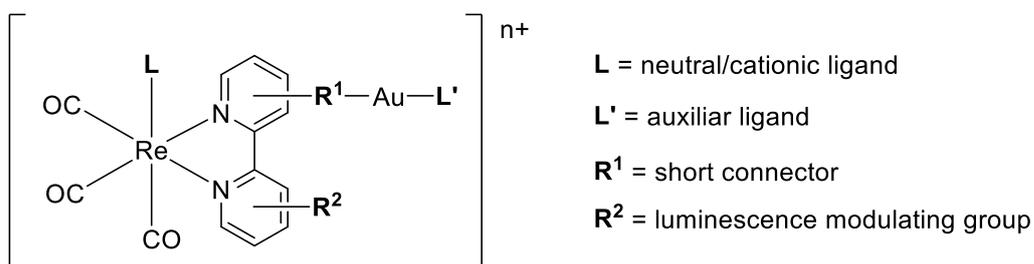
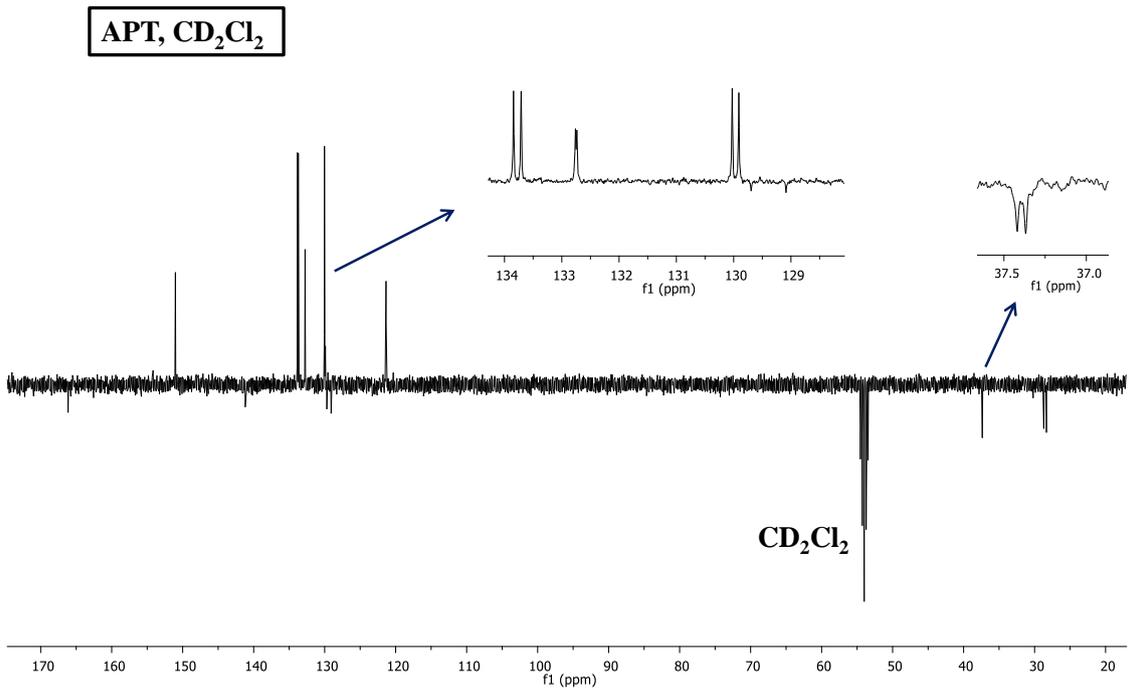
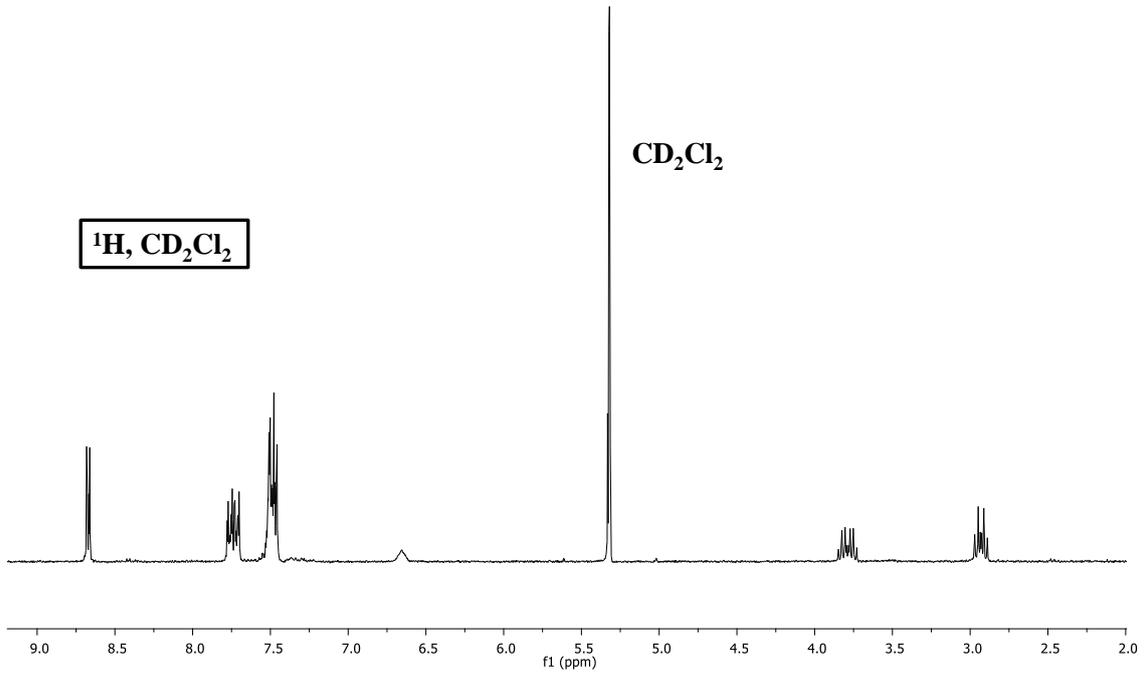
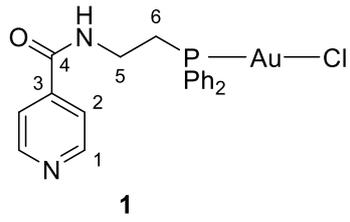
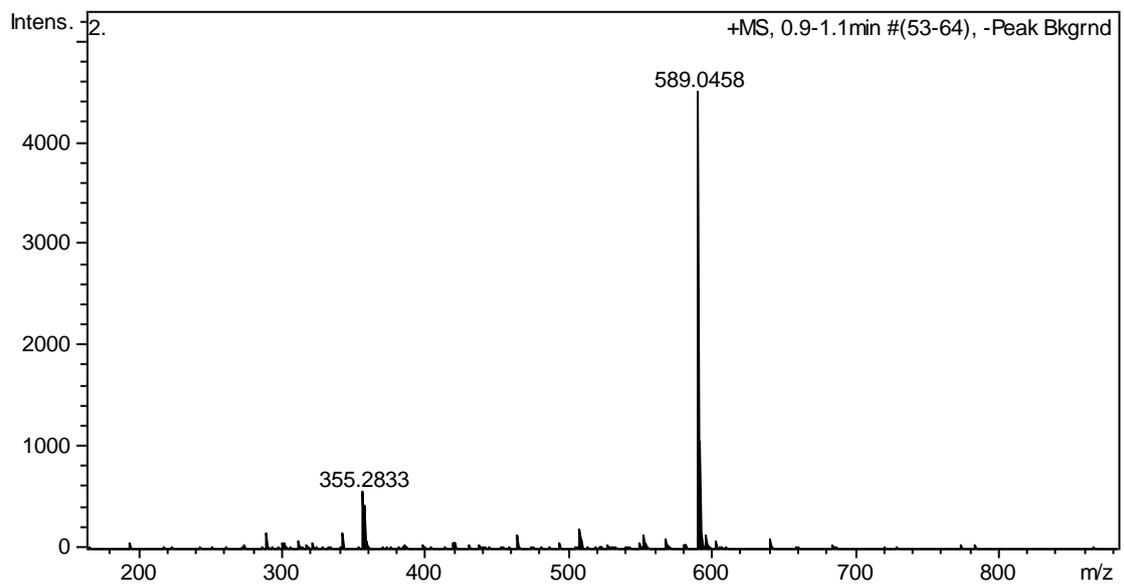
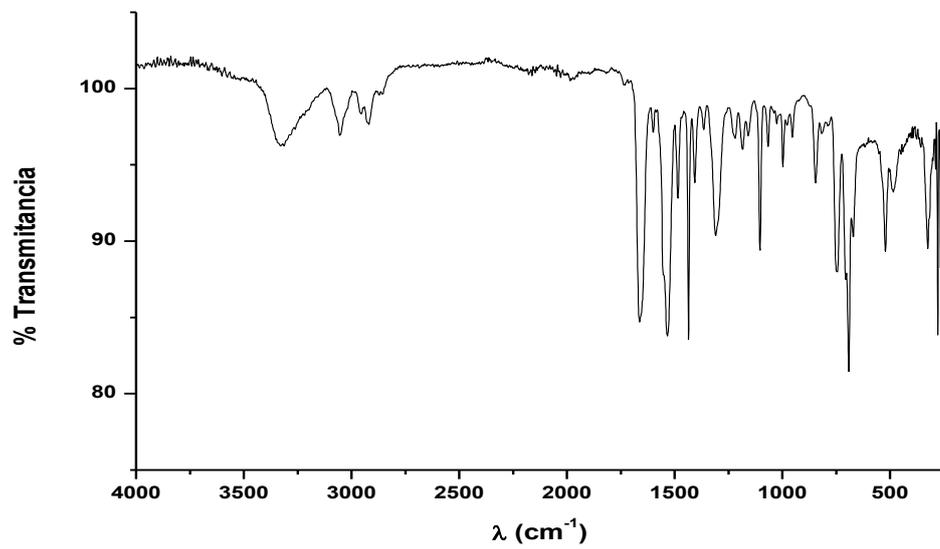
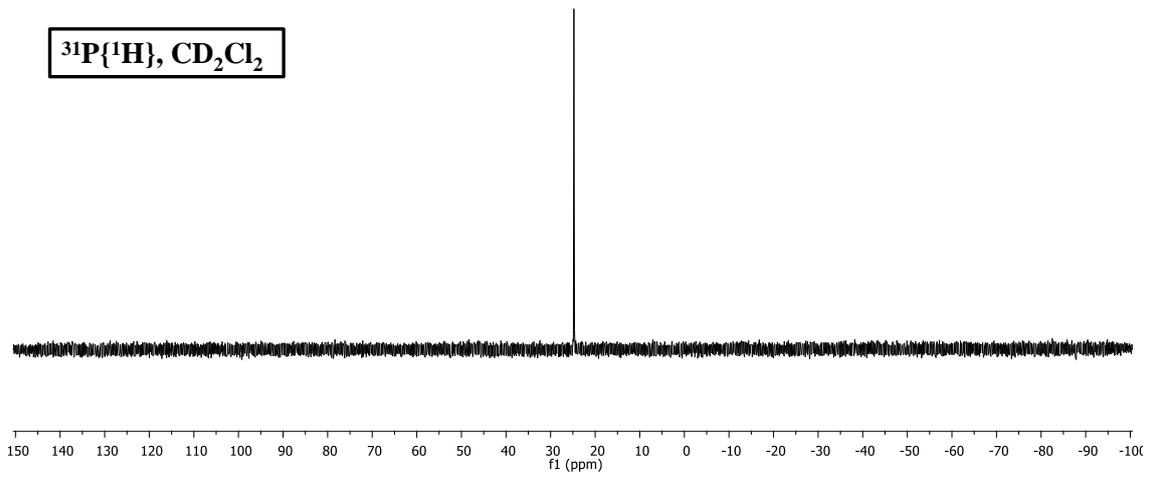
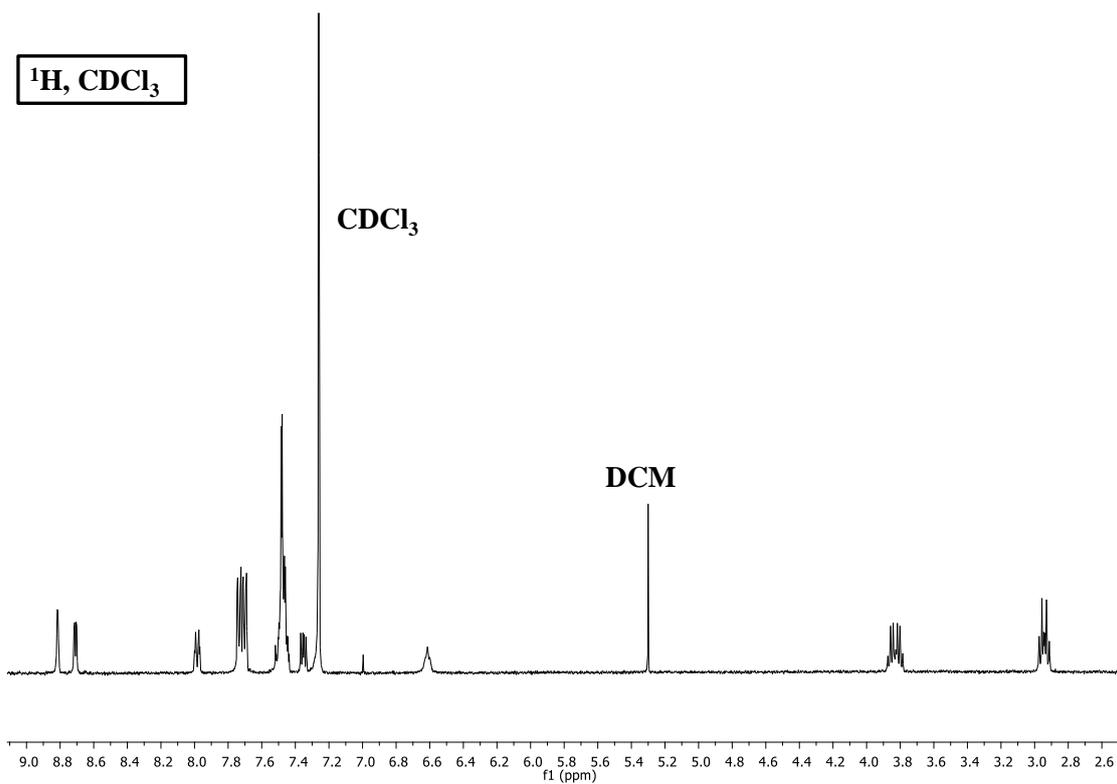
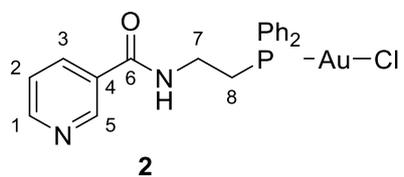
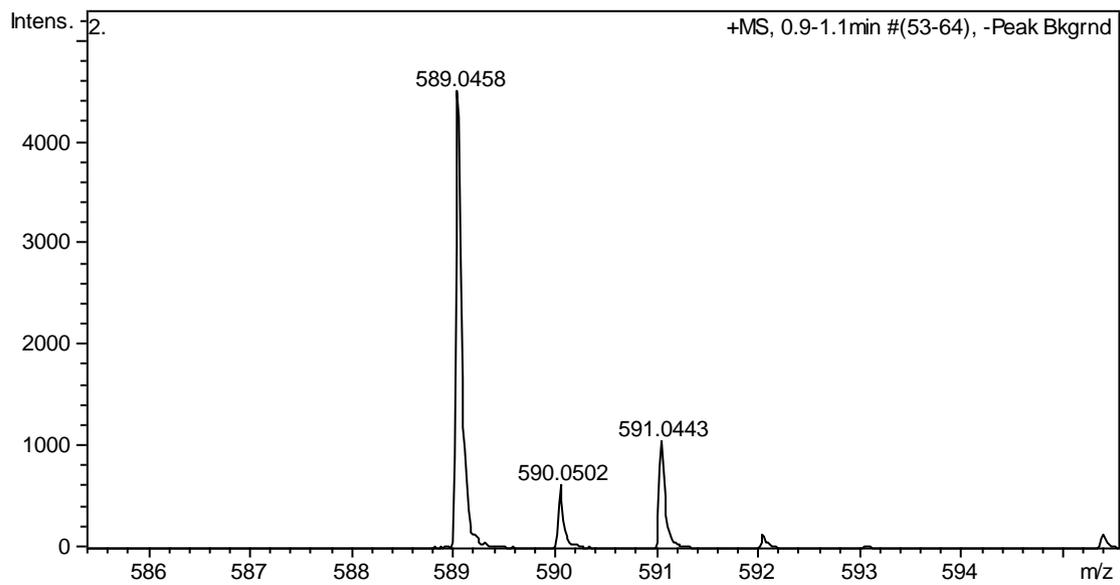
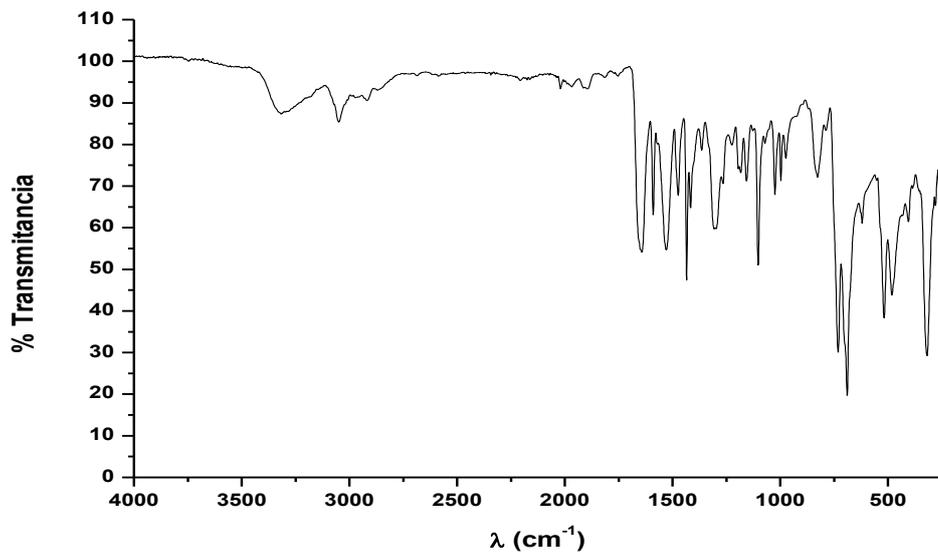
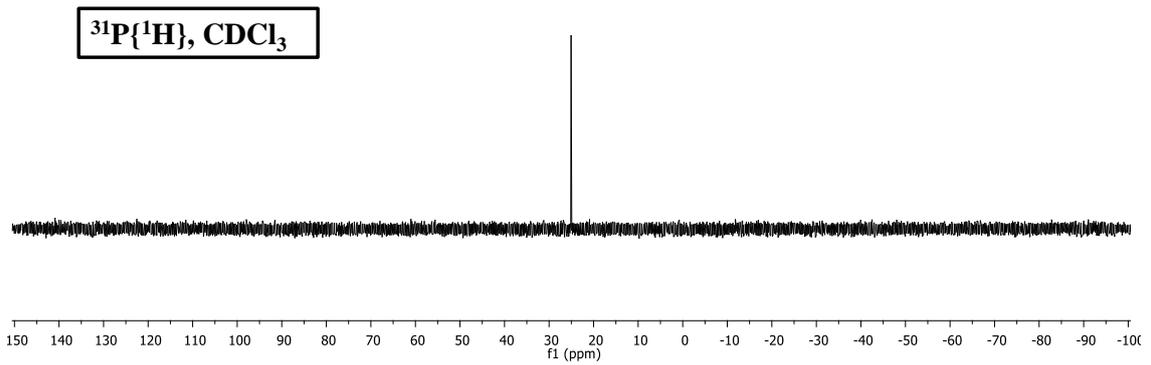
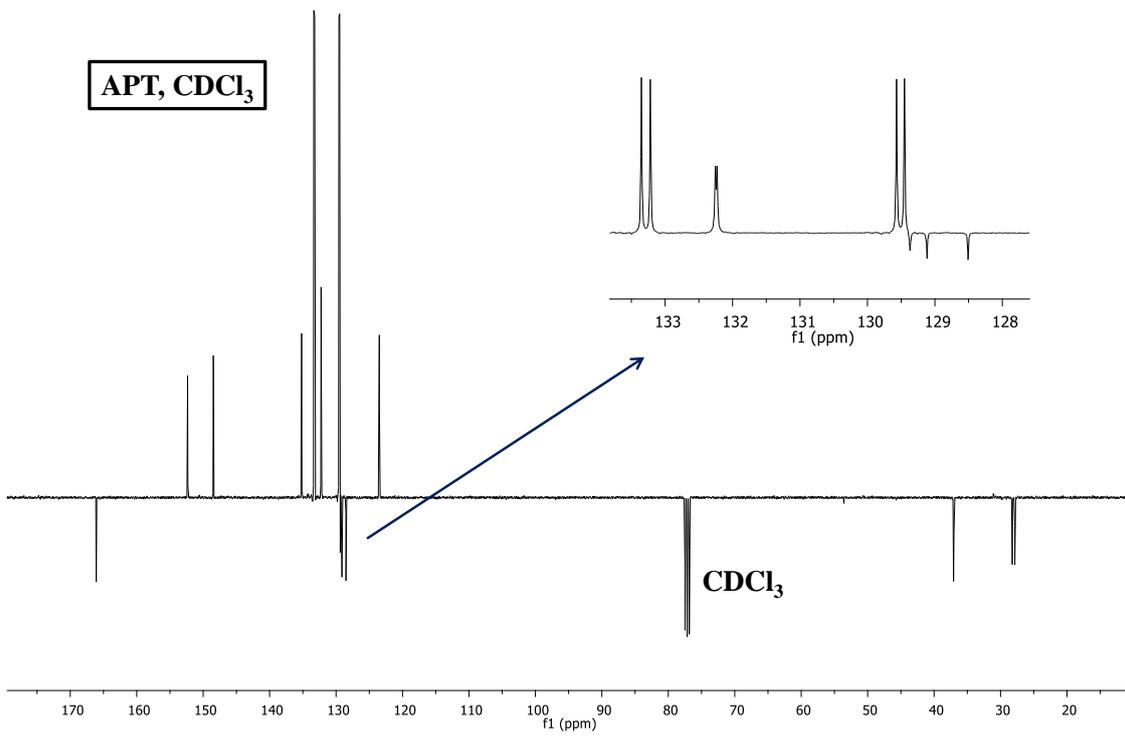


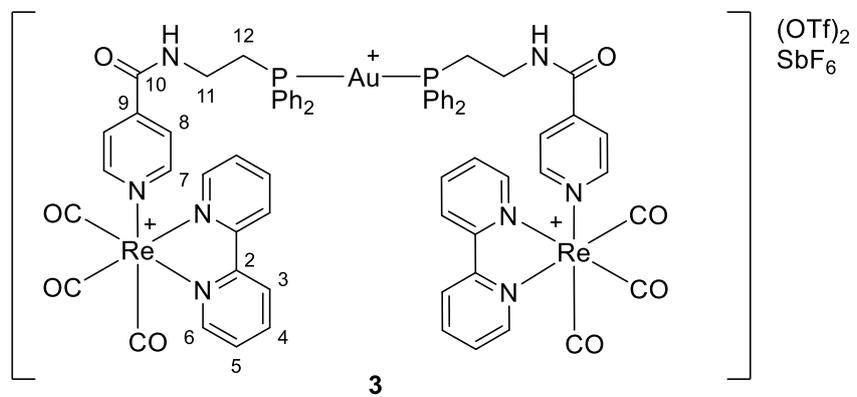
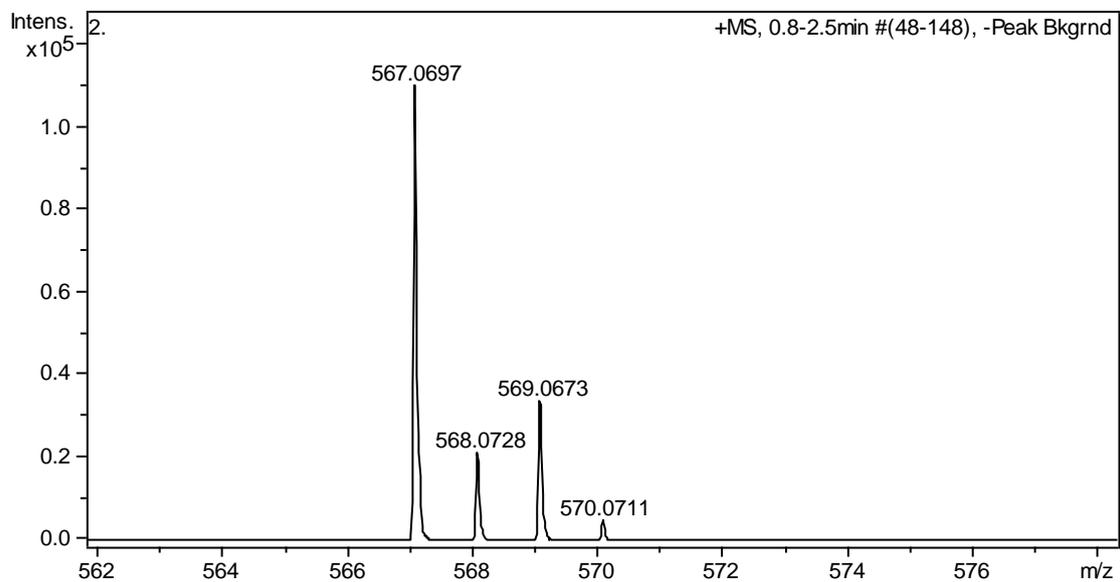
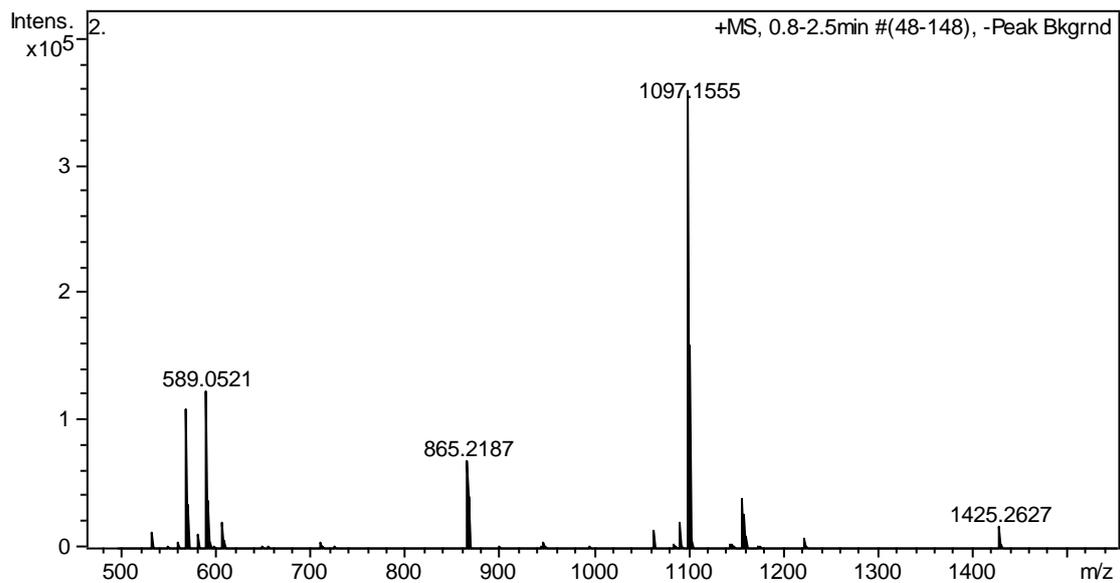
Figure C.2 Structure of the ideal theranostic Re(I)-Au(I) complex

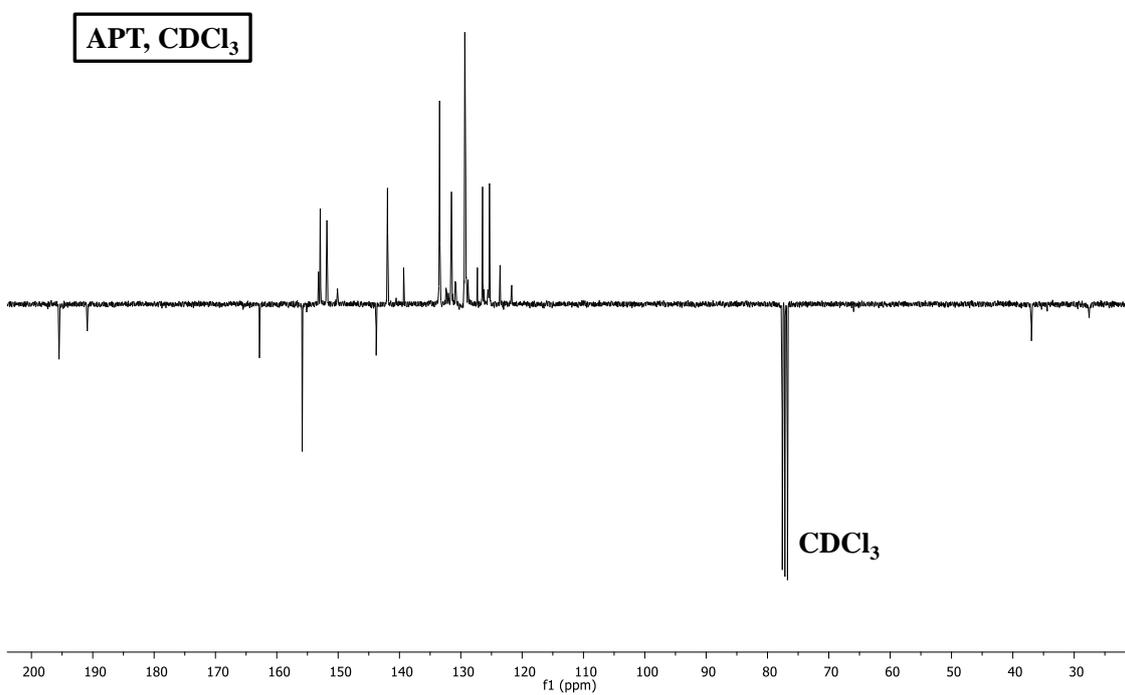
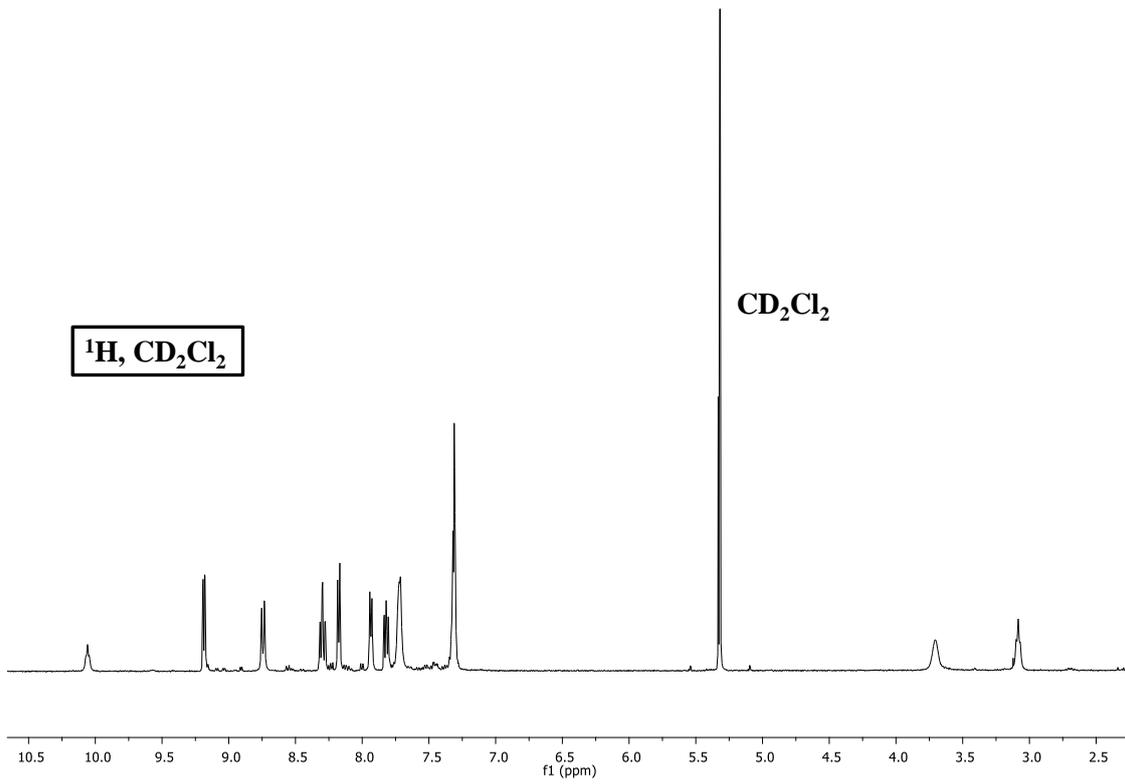




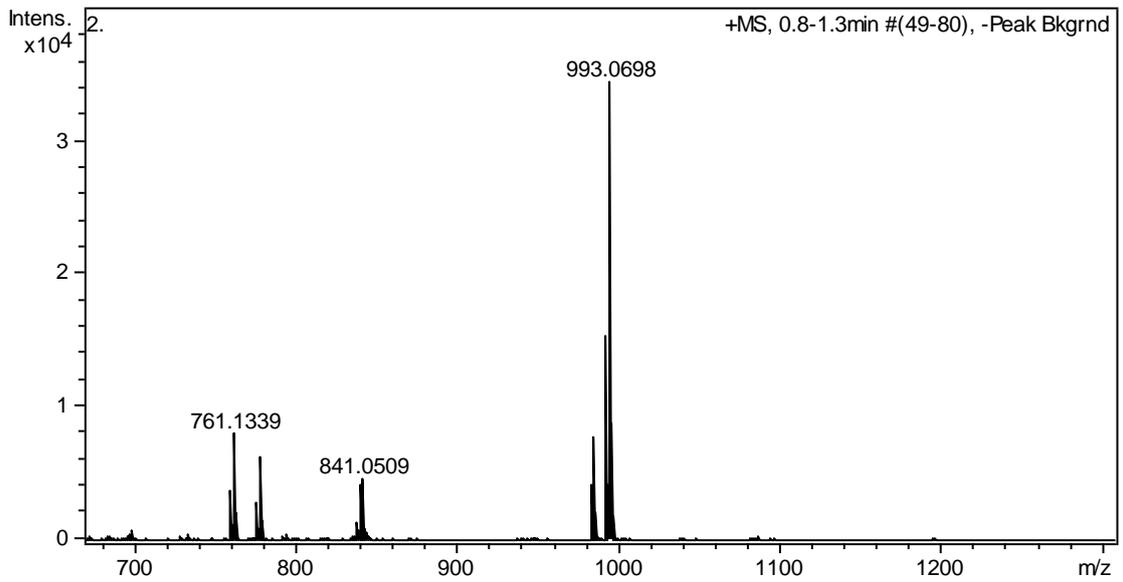
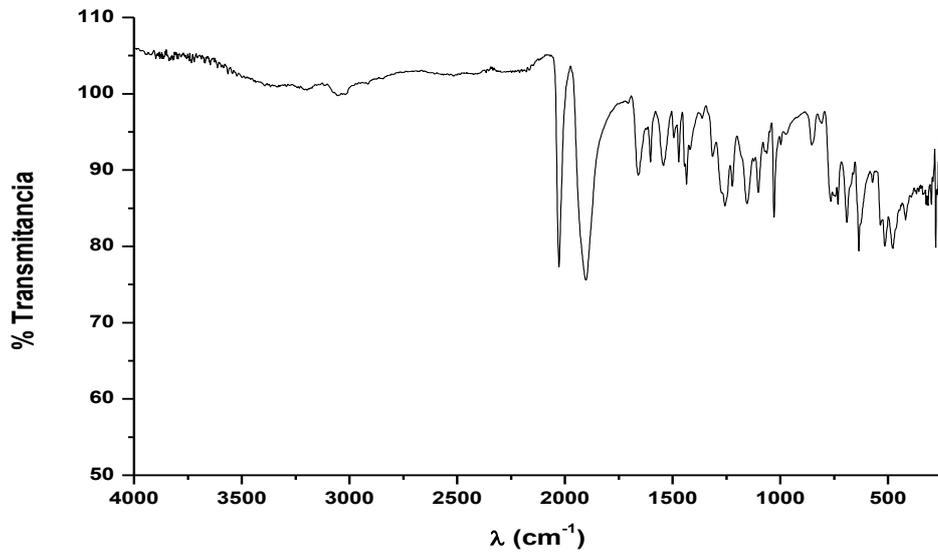
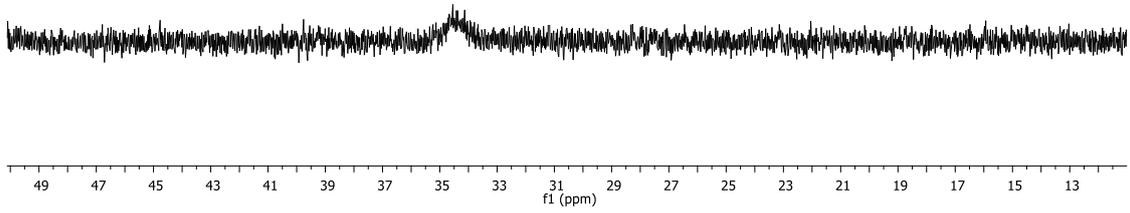


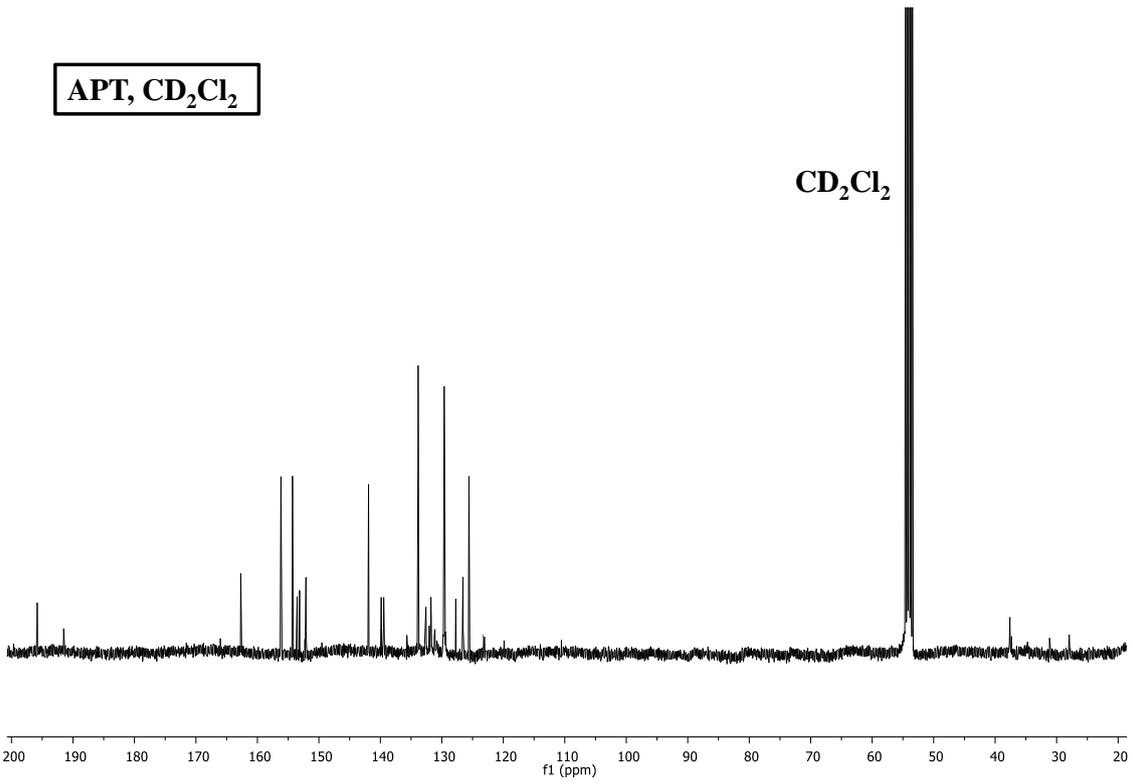
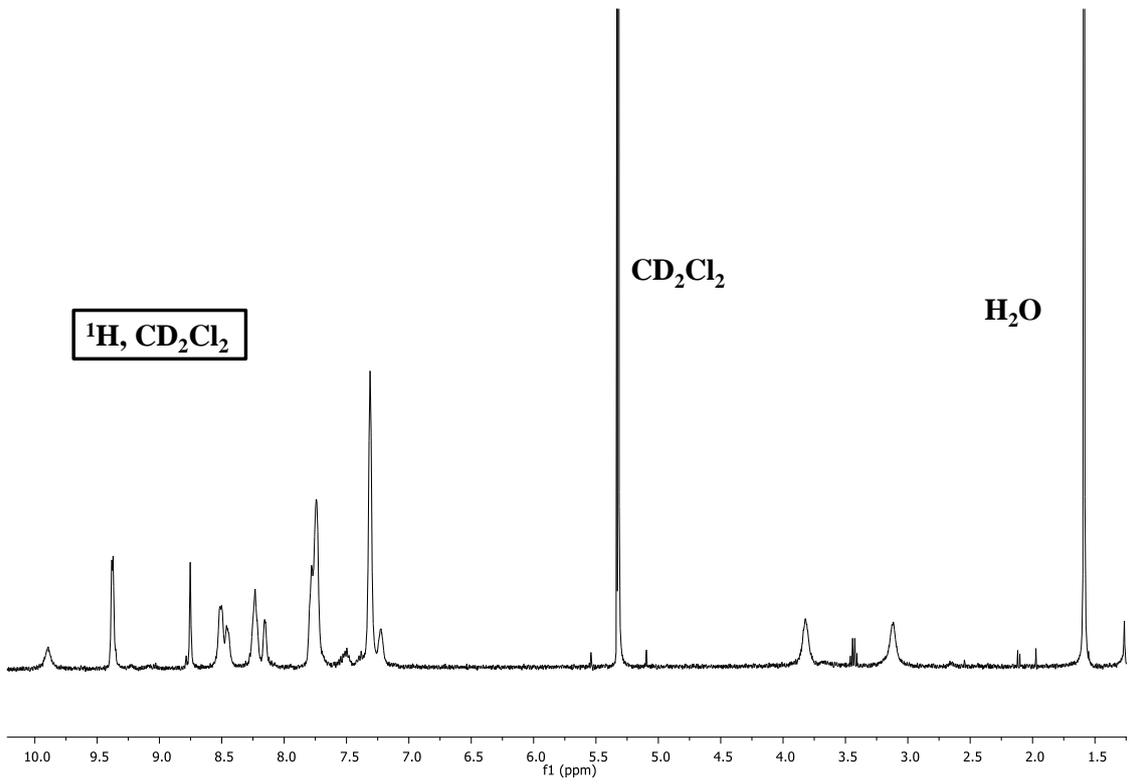




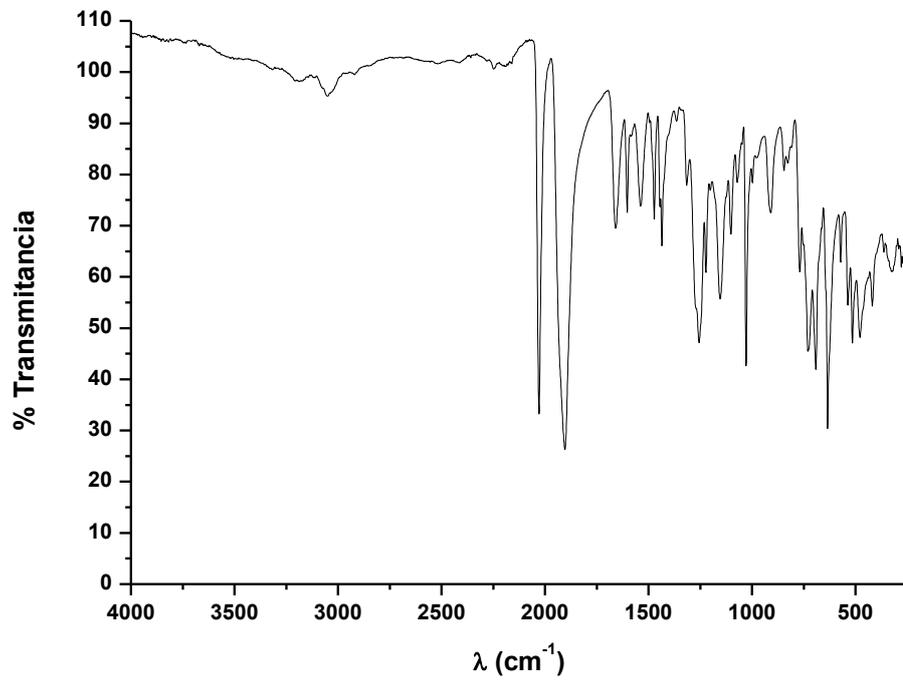
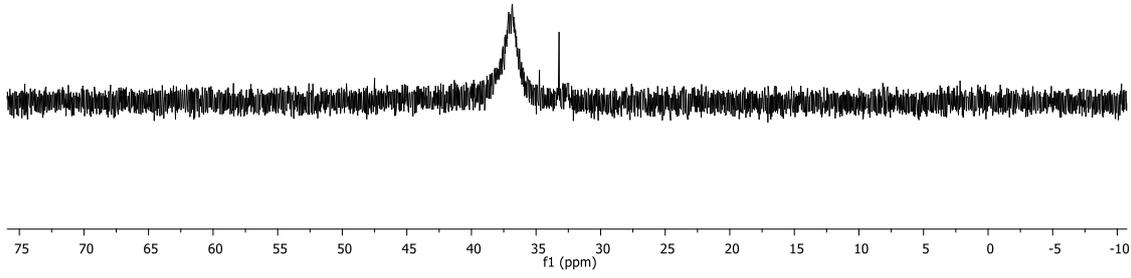


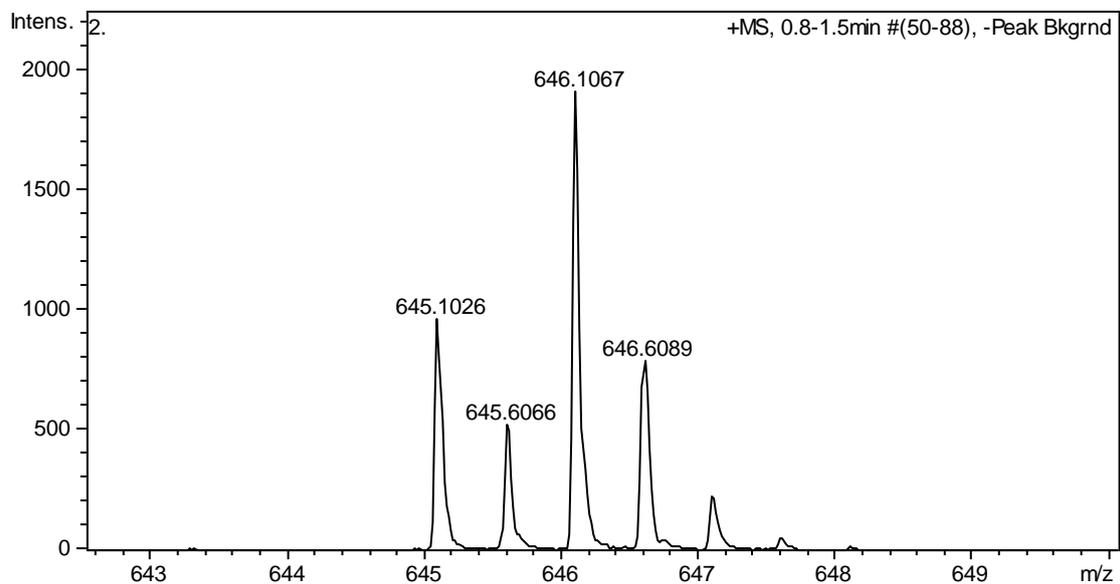
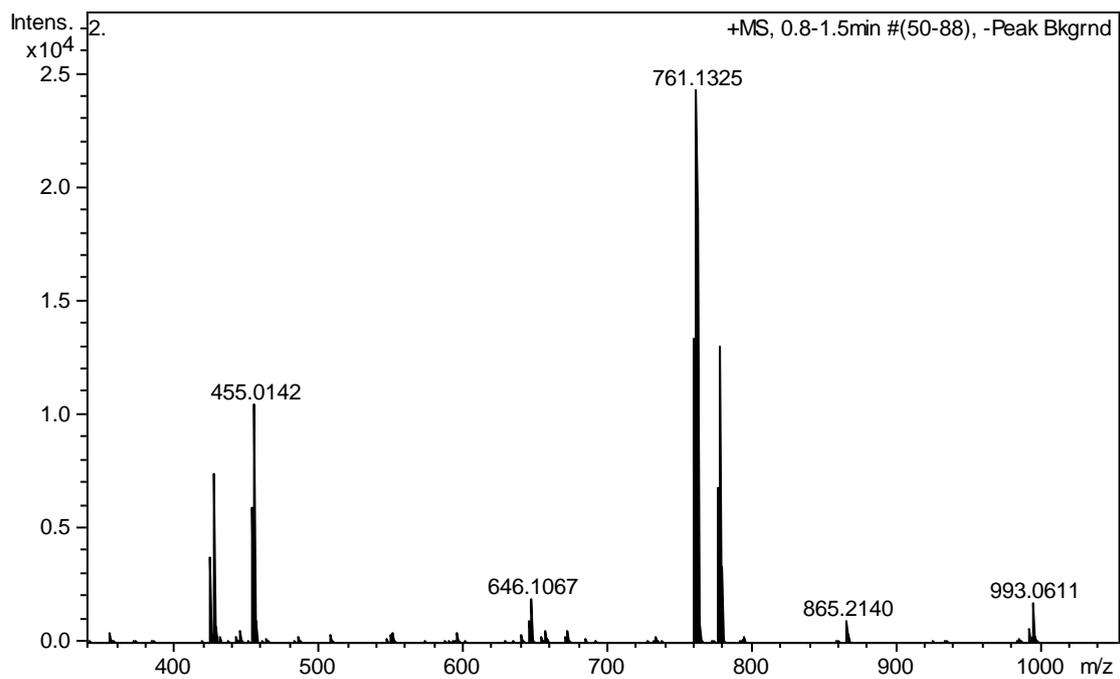
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}, \text{CDCl}_3$

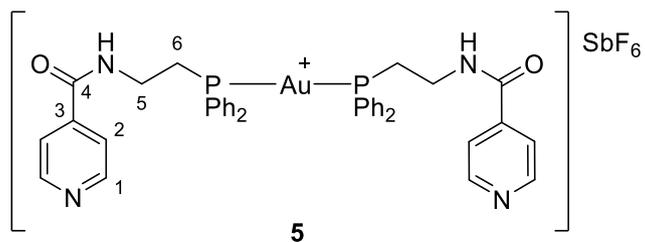




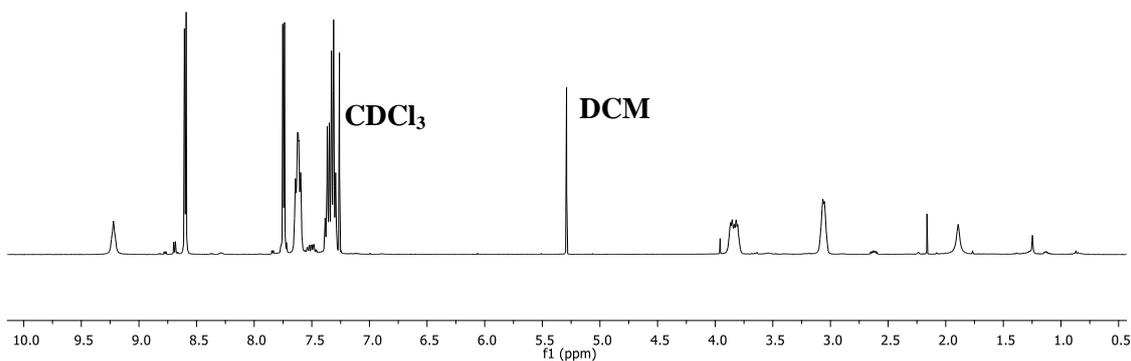
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}, \text{CD}_2\text{Cl}_2$



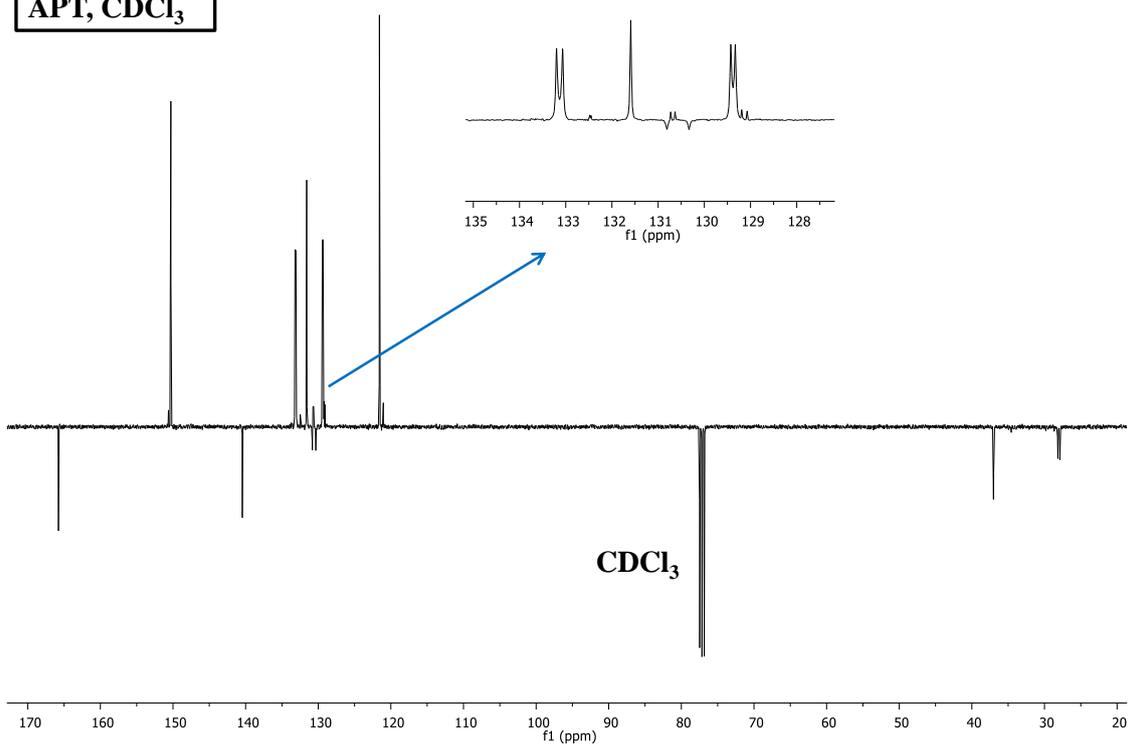




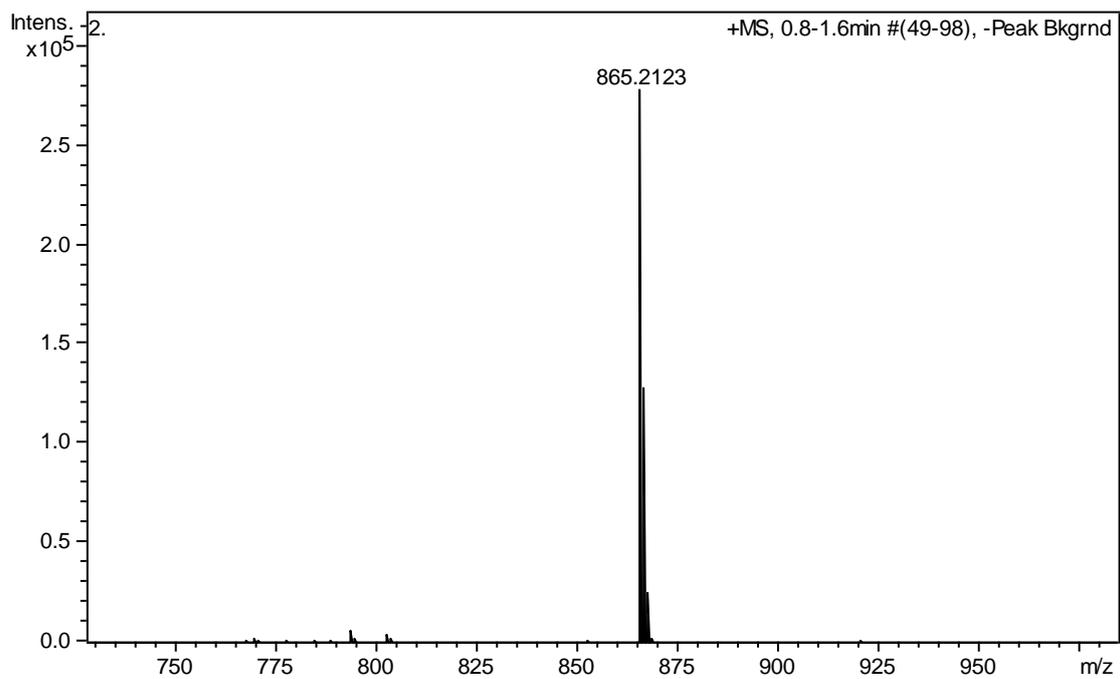
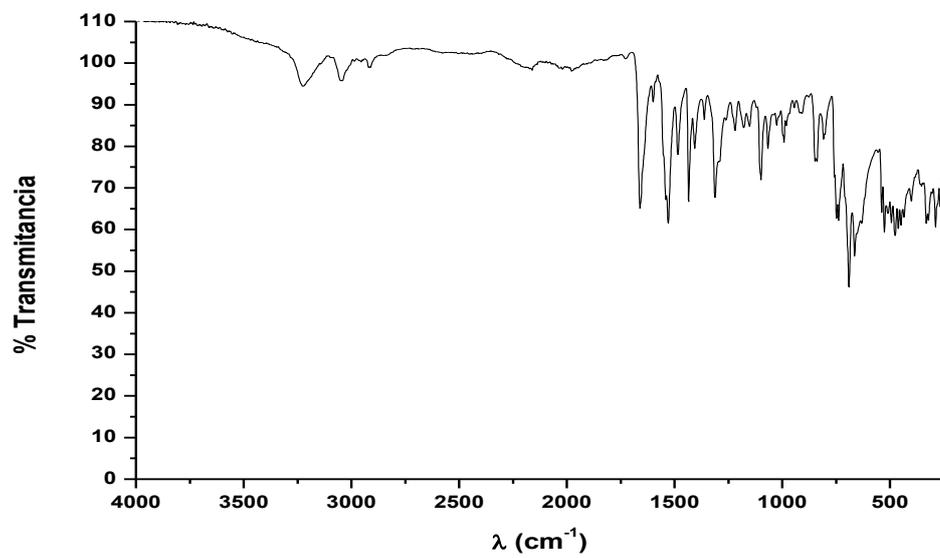
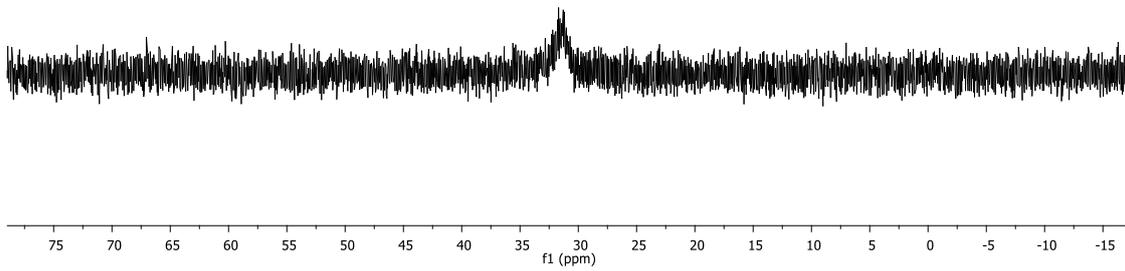
^1H , CDCl_3

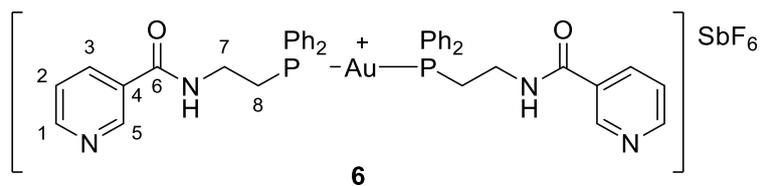
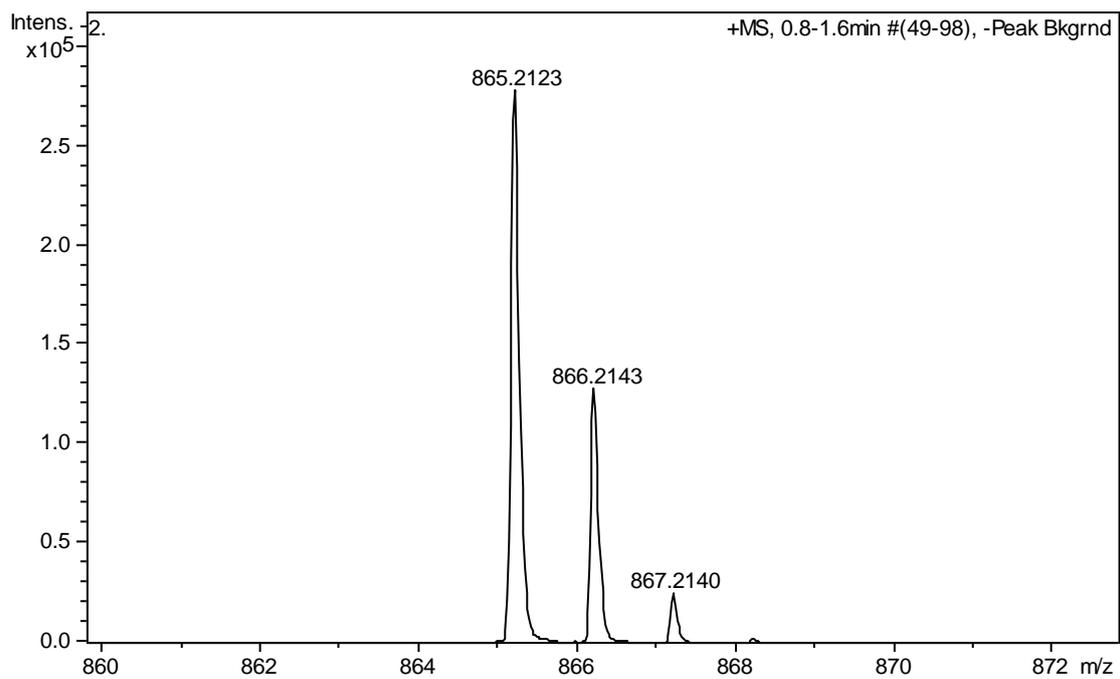


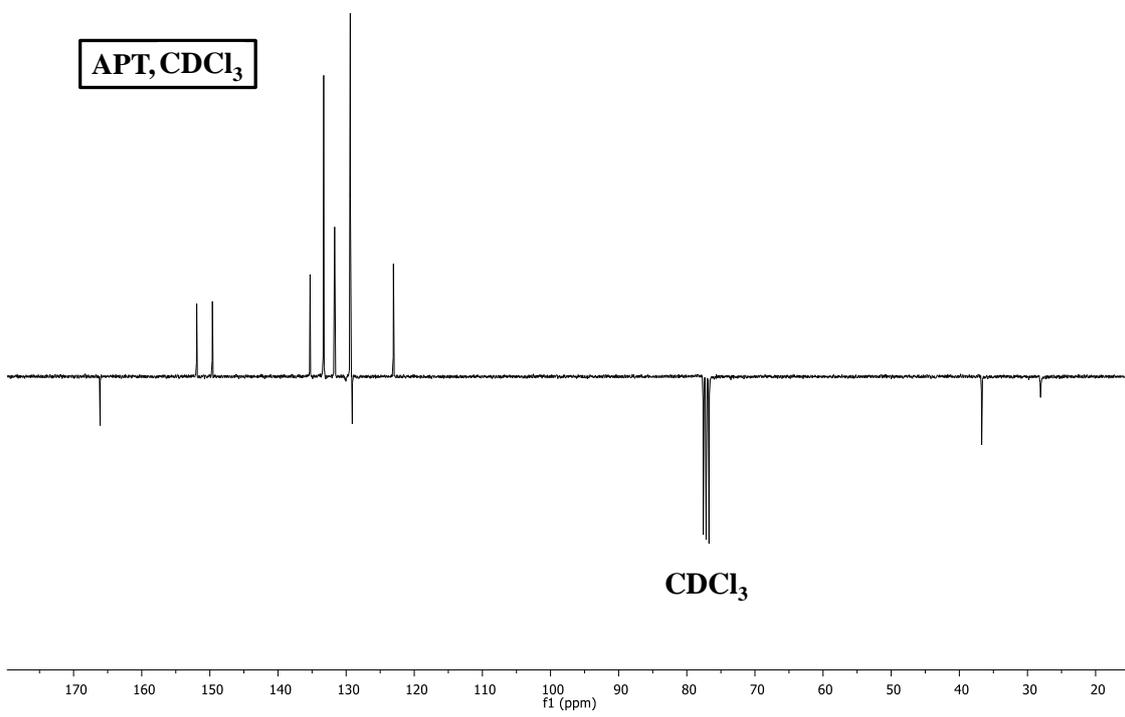
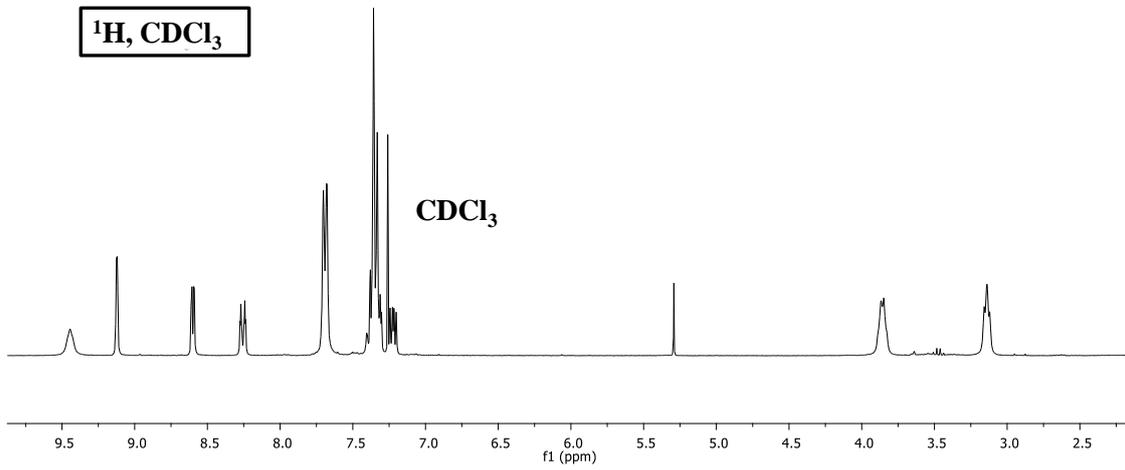
APT, CDCl_3

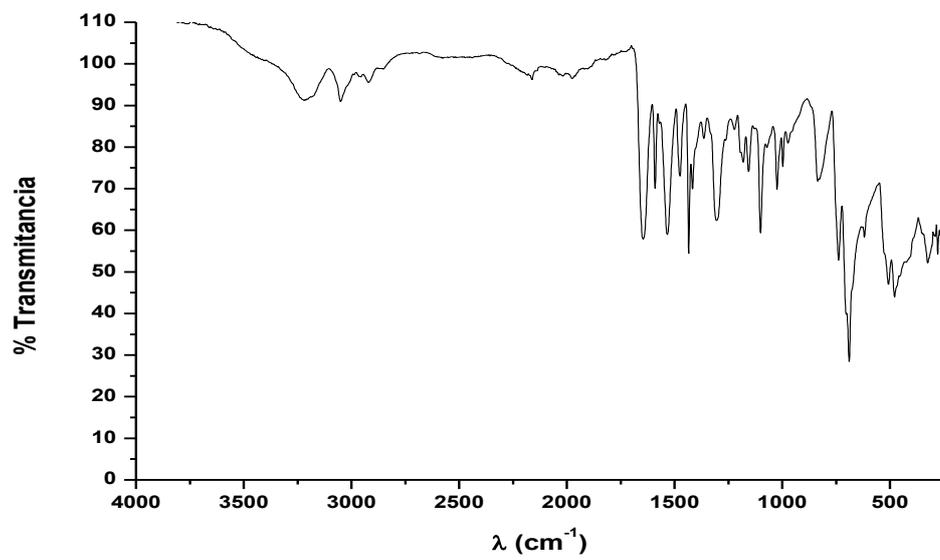
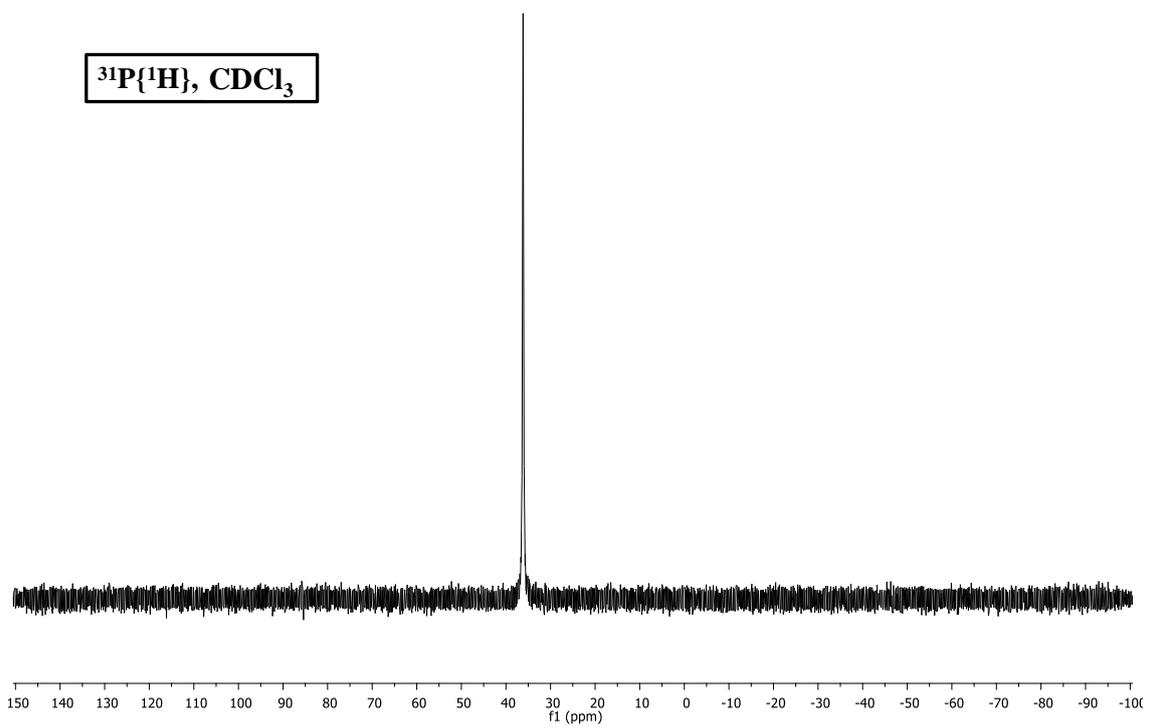


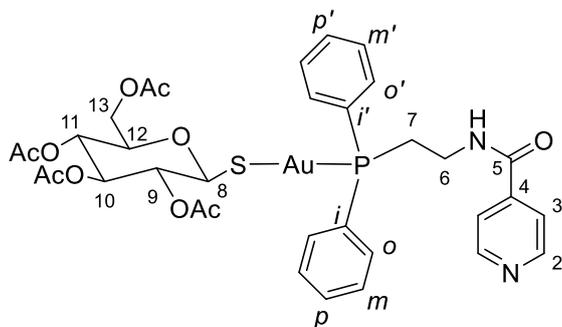
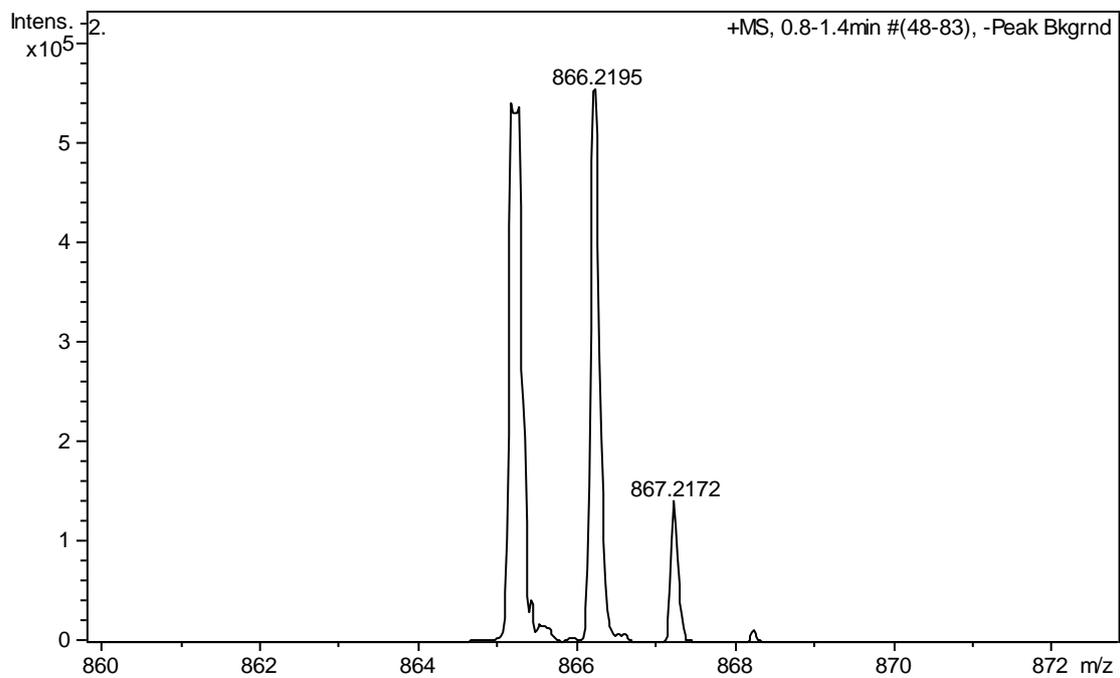
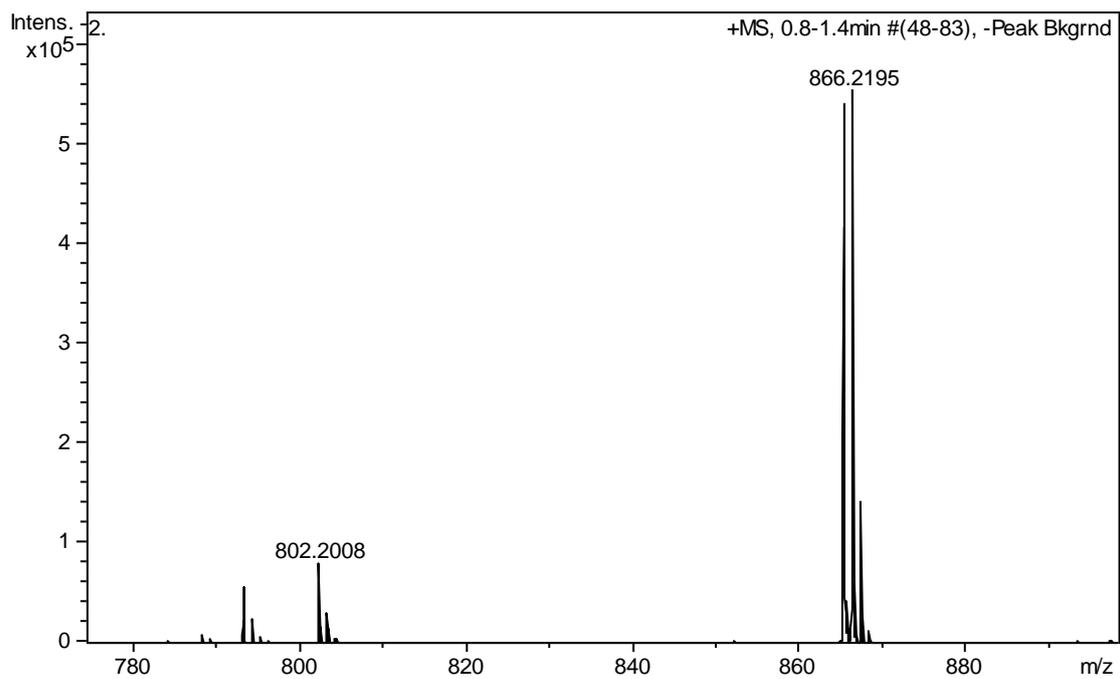
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, CDCl_3





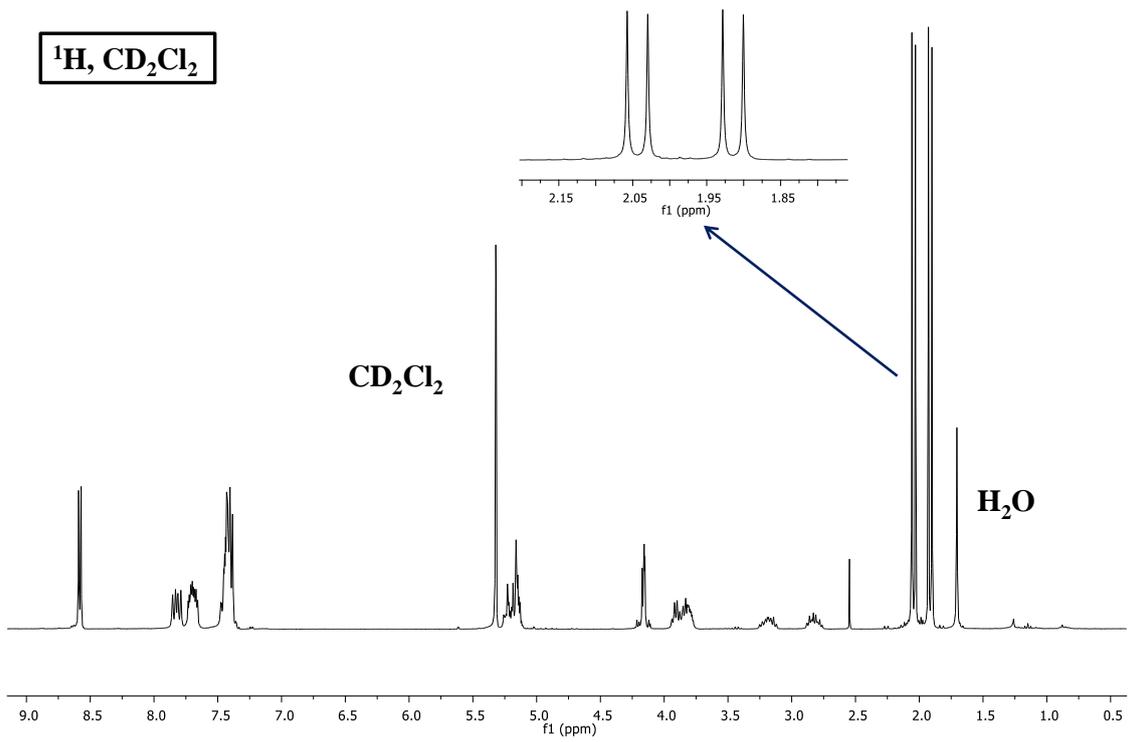




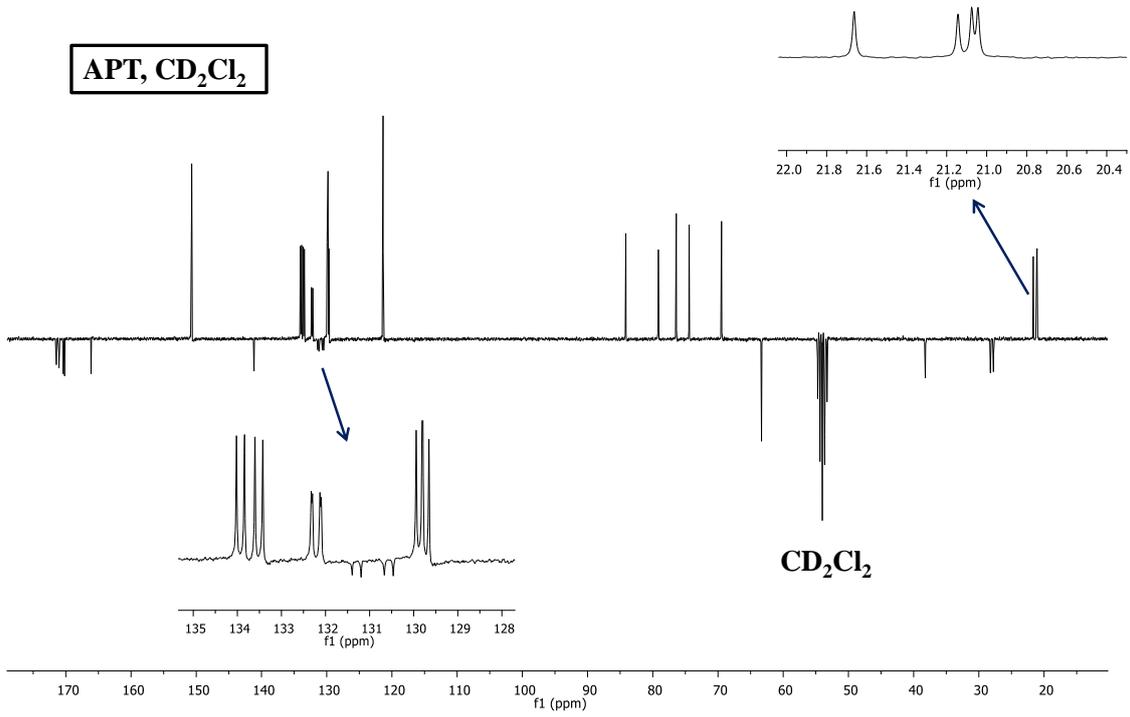


7

^1H , CD_2Cl_2



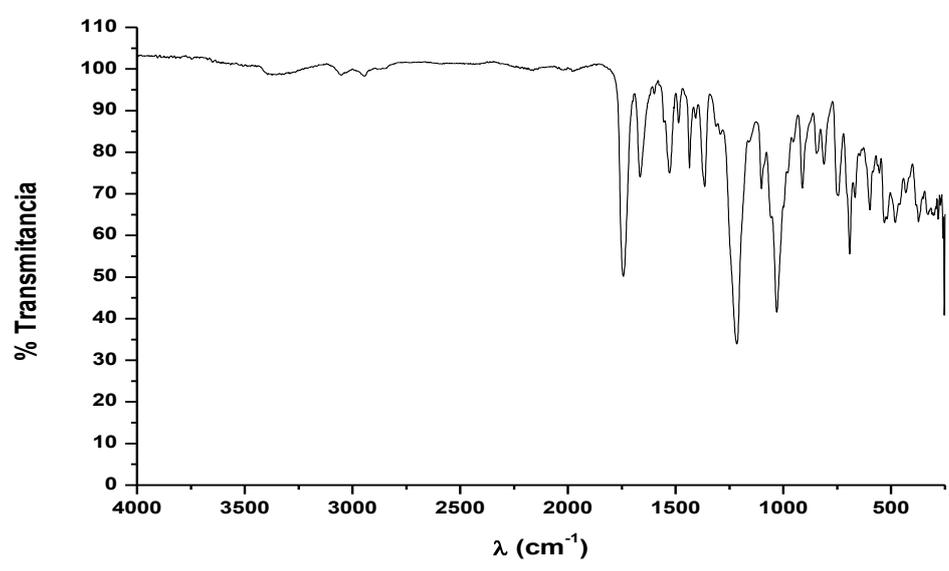
APT, CD_2Cl_2

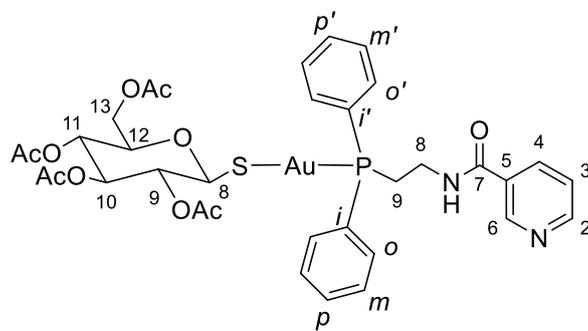
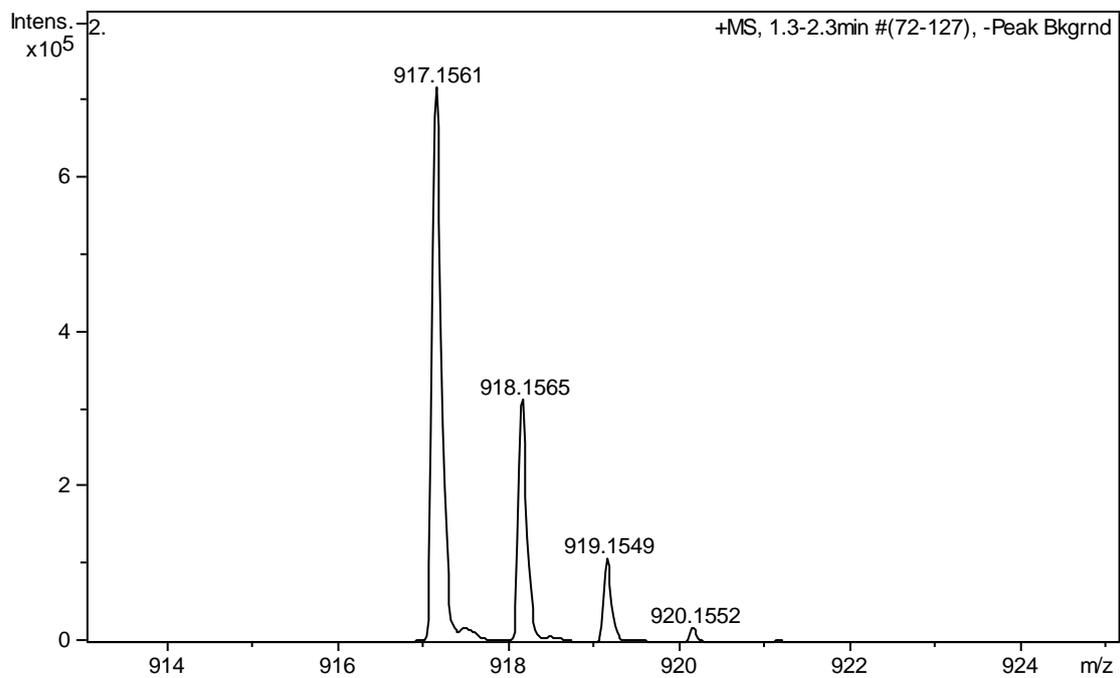
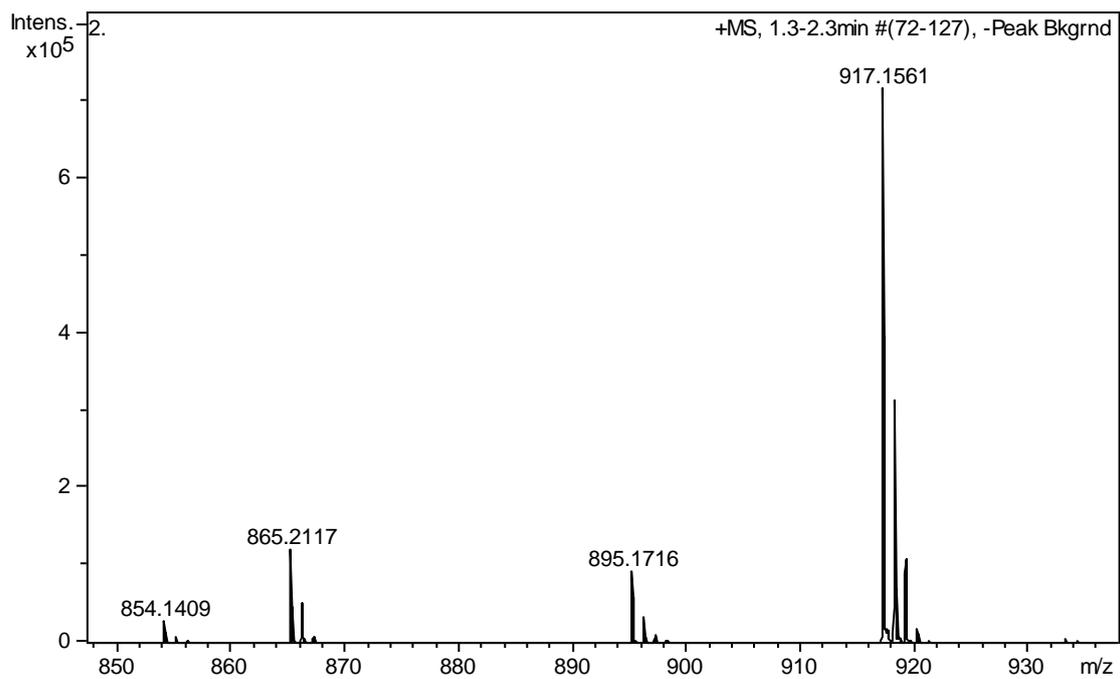


$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}, \text{CD}_2\text{Cl}_2$



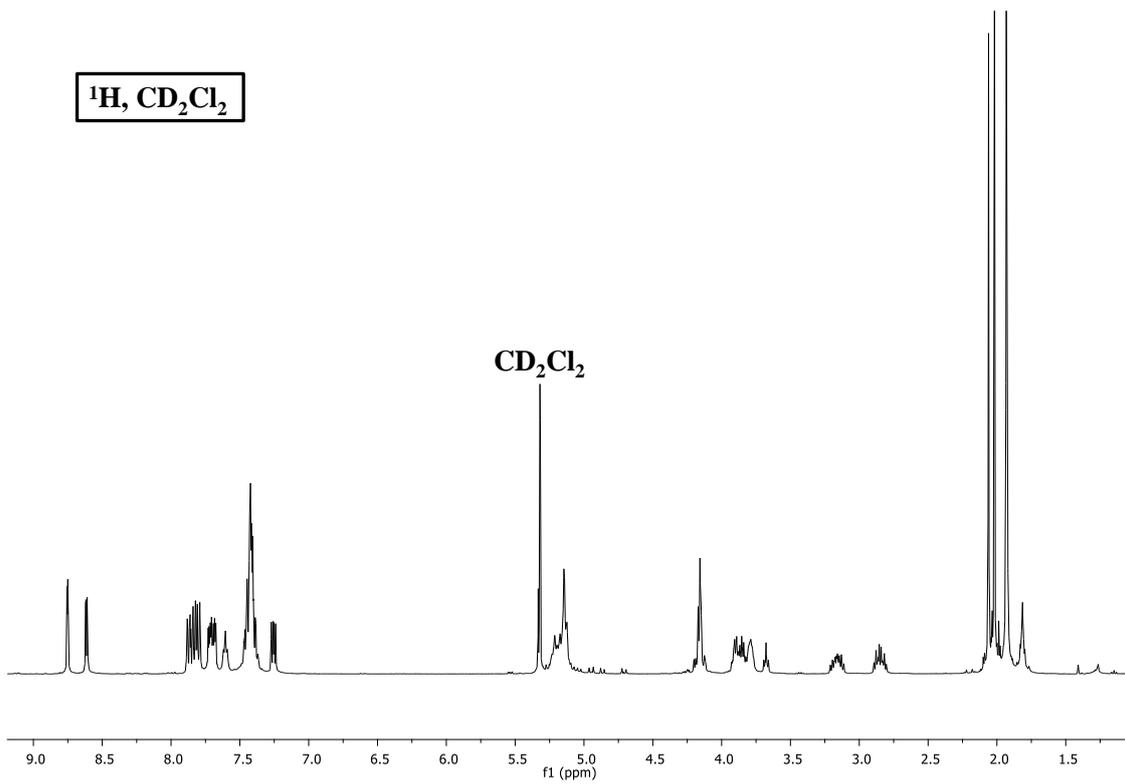
150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10 -20 -30 -40 -50 -60 -70 -80 -90 -100
f1 (ppm)



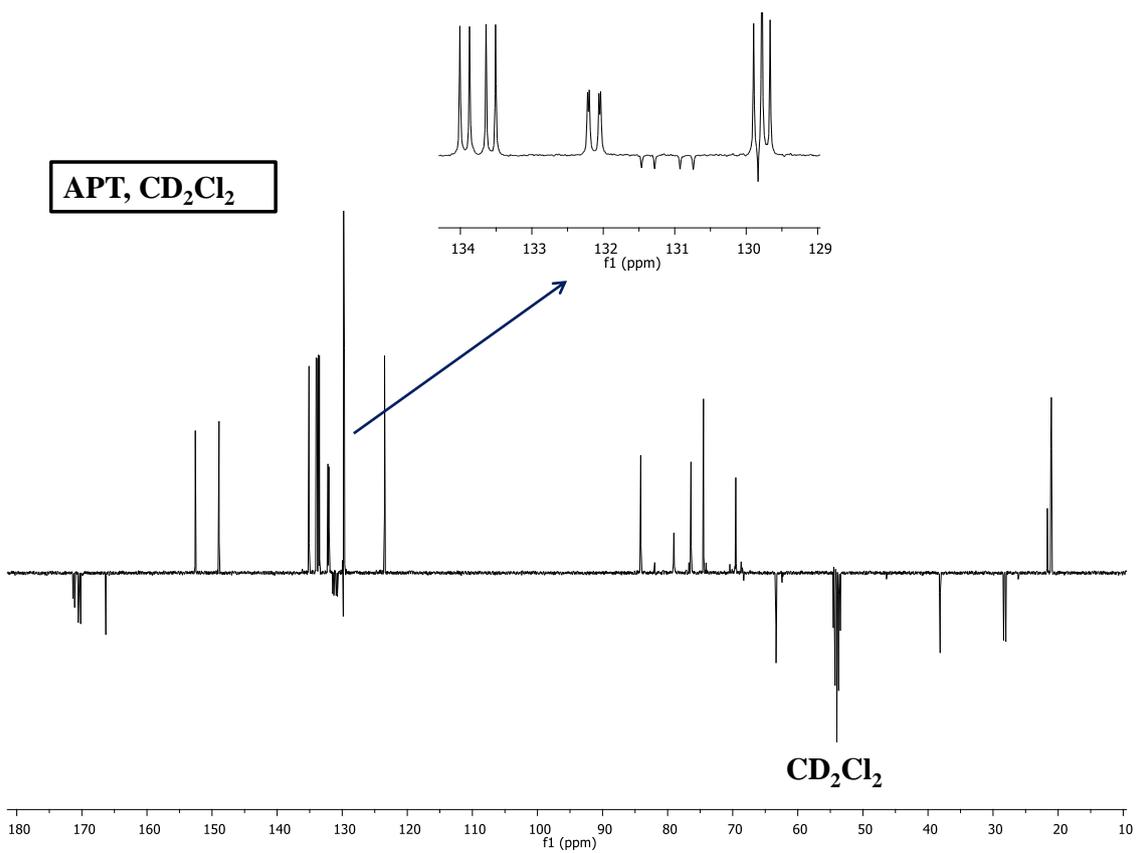


8

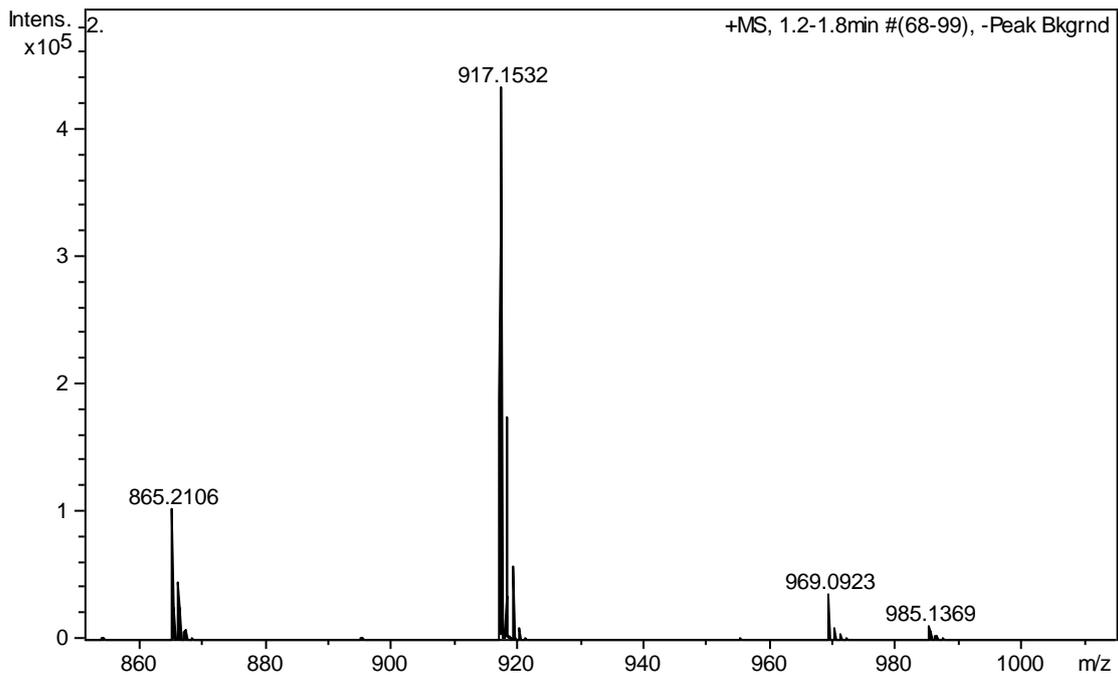
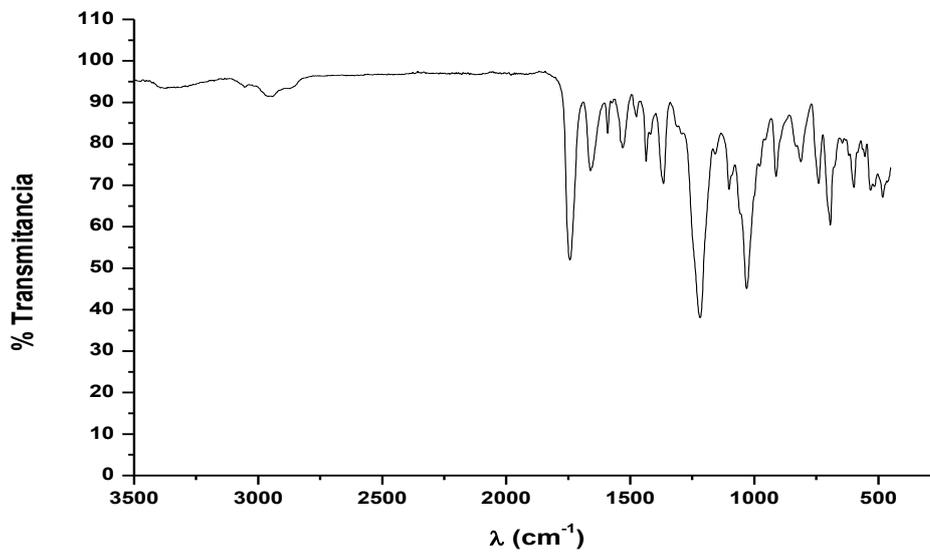
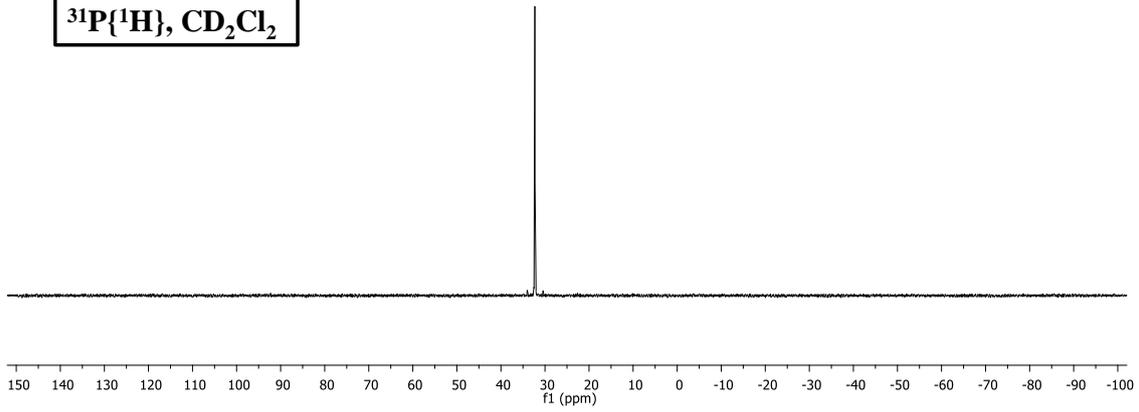
^1H , CD_2Cl_2

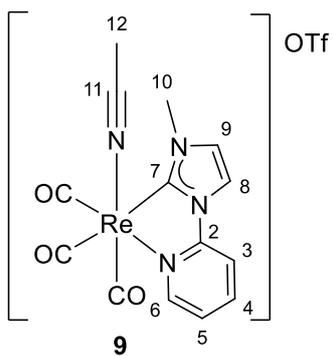
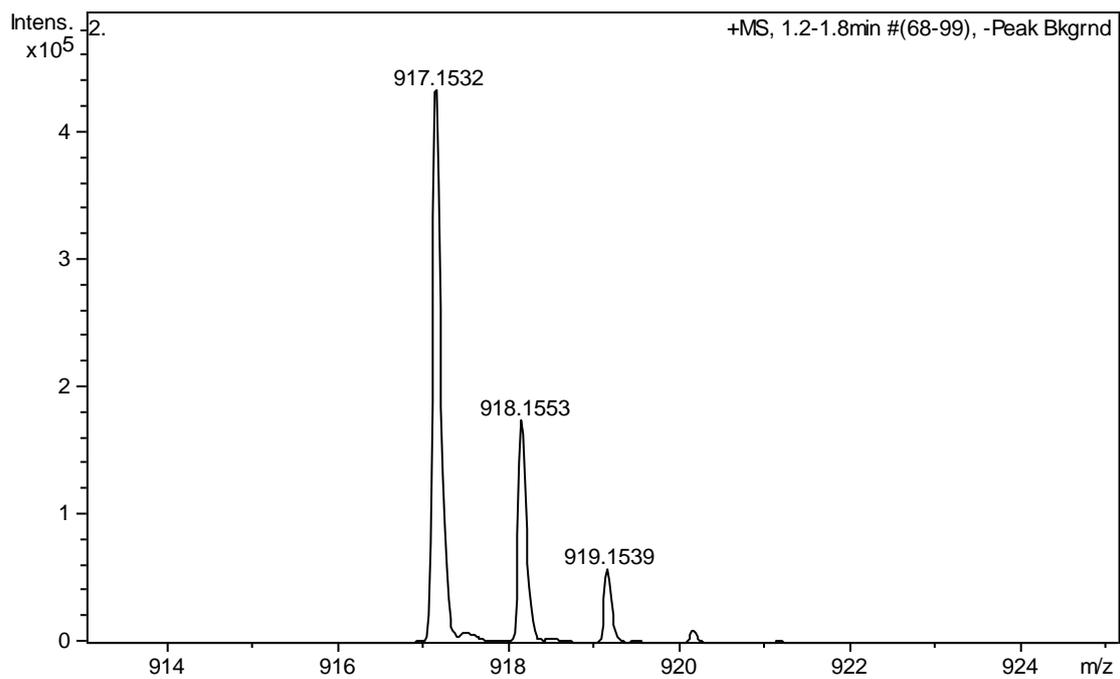


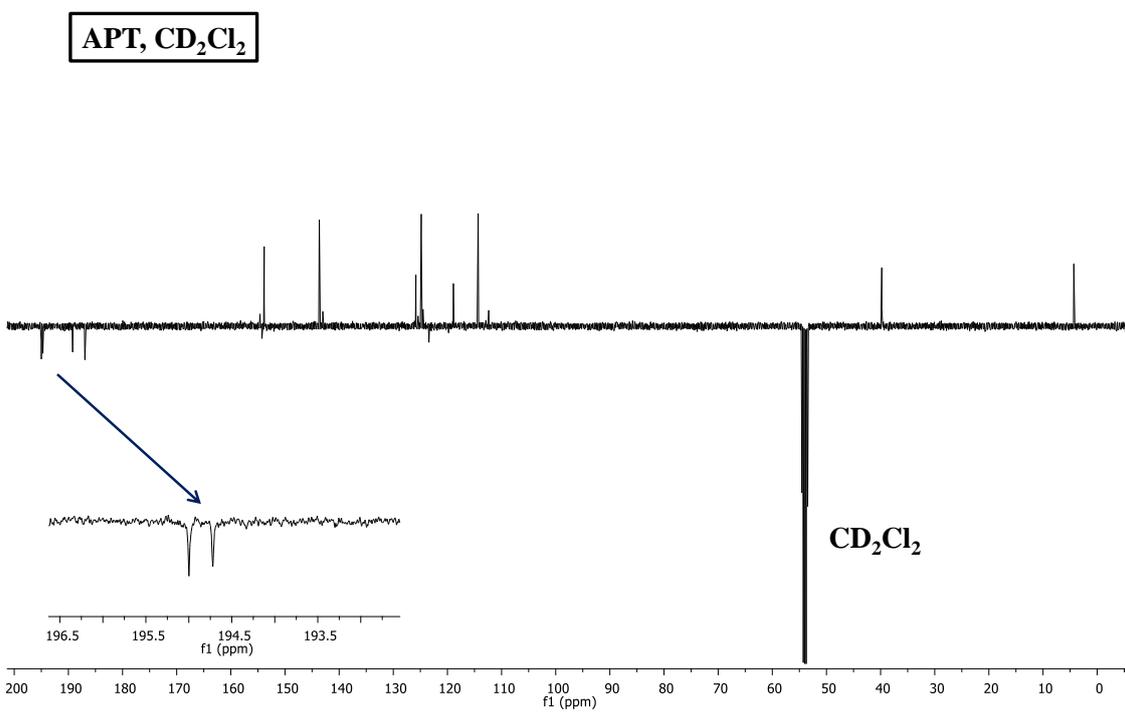
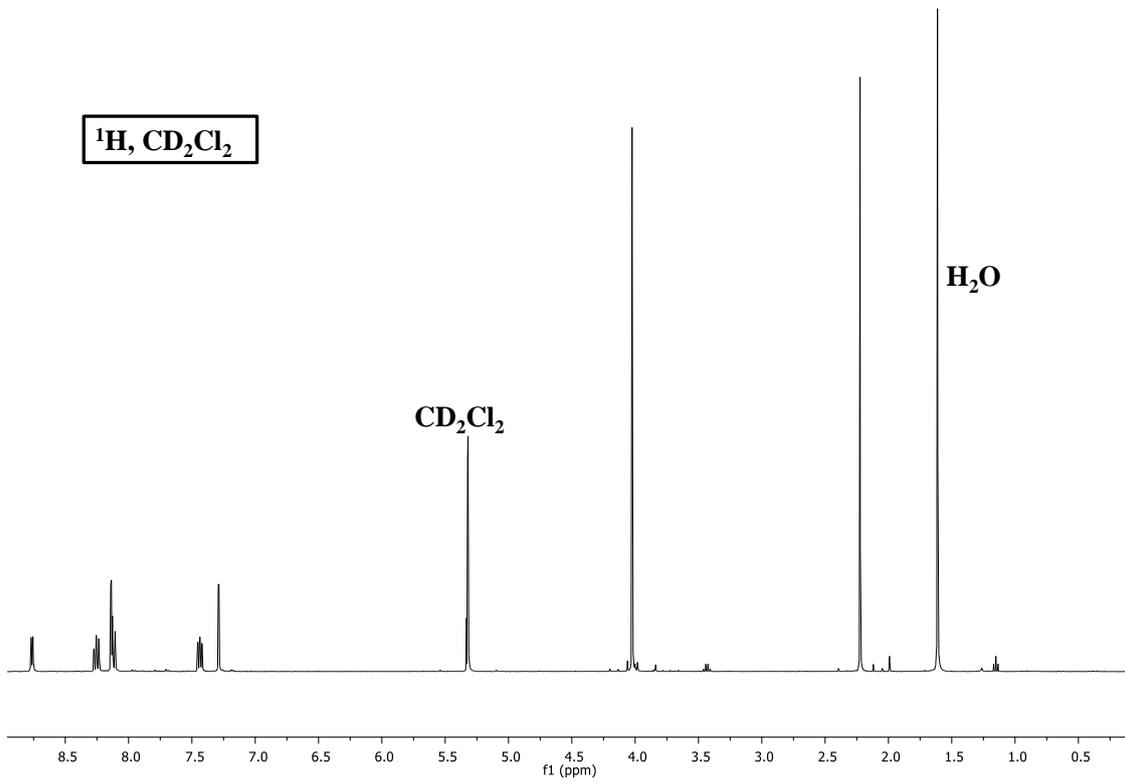
APT, CD_2Cl_2

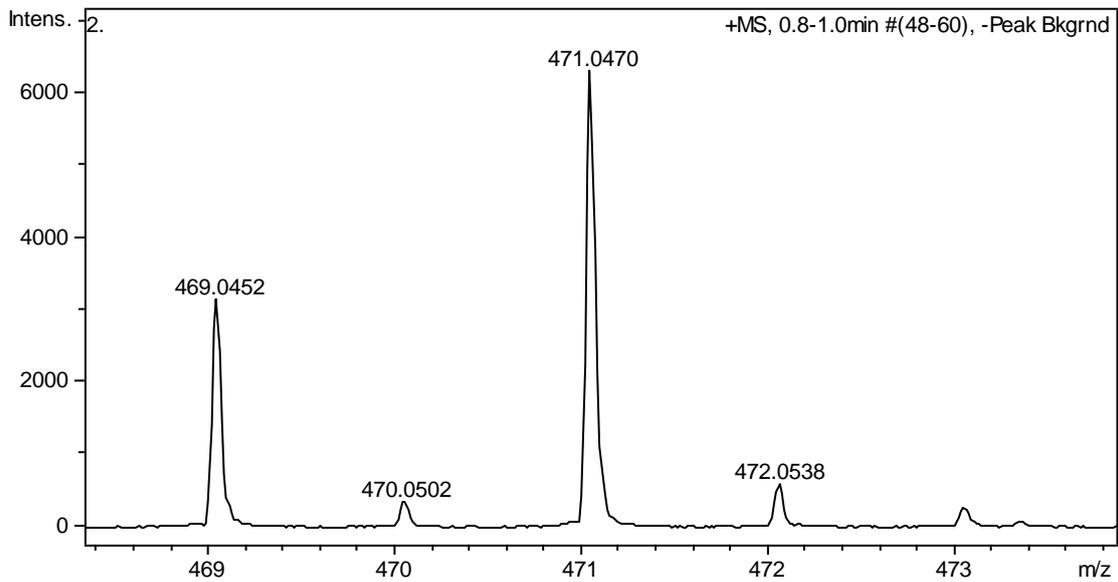
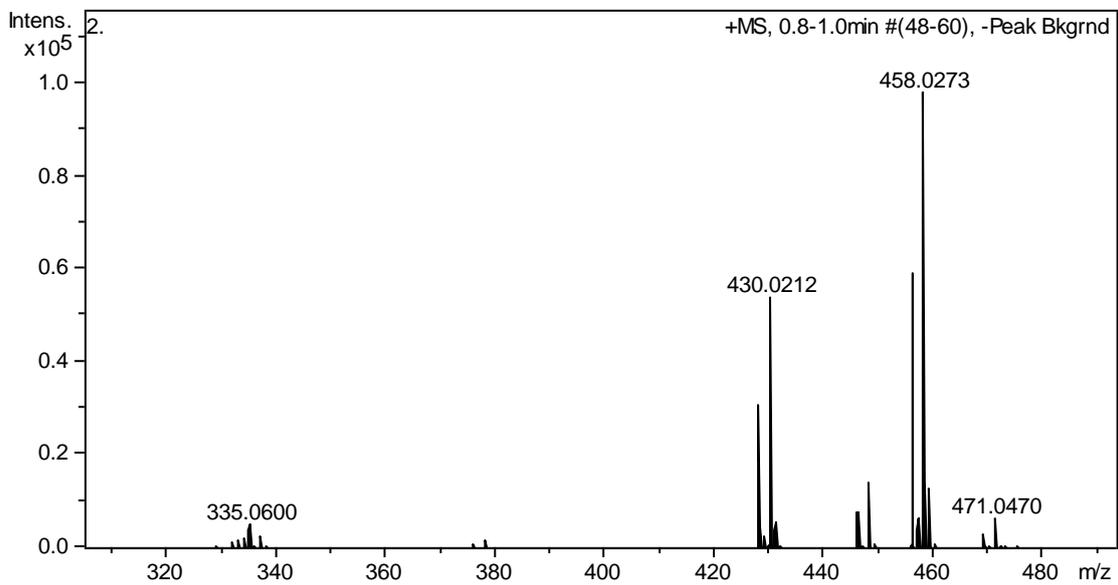
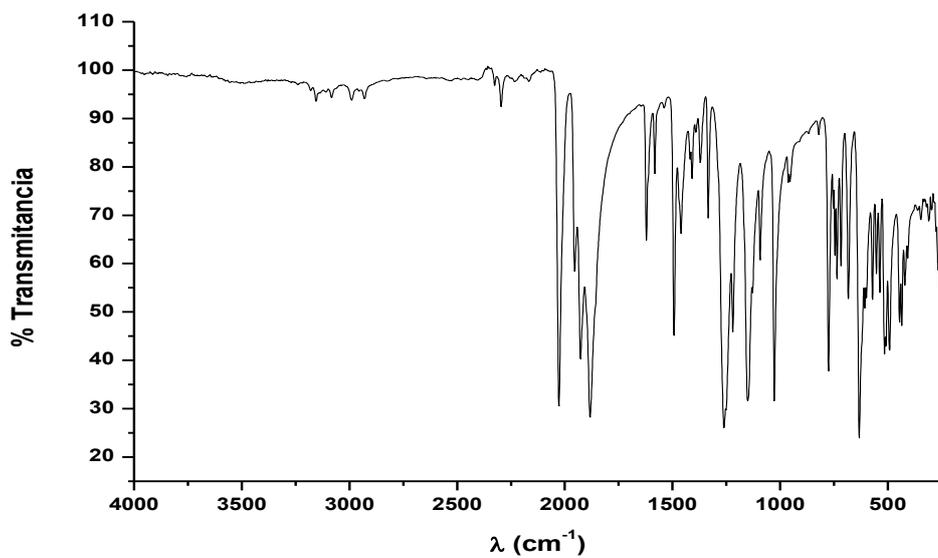


$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}, \text{CD}_2\text{Cl}_2$









Datos cristalográficos para el complejo 9.

Empirical formula	C ₁₅ H ₁₂ F ₃ N ₄ O ₆ Re S	
Formula weight	619.55	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Monoclinic, Pc	
Unit cell dimensions	a = 8.2173(16) Å b = 11.587(2) Å c = 10.004(2) Å	alpha = 90 deg. beta = 90.65(3) deg. gamma = 90 deg.
Volume	952.458 Å ³	
Z	2	
Calculated density	2.160 Mg/m ³	
Absorption coefficient	6.560 mm ⁻¹	
F(000)	592	
Crystal size	0.170 x 0.160 x 0.080 mm ³	
Theta range for data collection	4.75 to 25.24°	
Limiting indices	-9<=h<=9, -14<=k<=14, -12<=l<=12	
Reflections collected / unique	19674 / 3498 [R(int) = 0.0301]	
Completeness to theta = 25.24	99.3 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	1.0000 and 0.6833	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3498 / 2 / 273	
Goodness-of-fit on F ²	1.074	
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0129, wR2 = 0.0131	

R indices (all data)

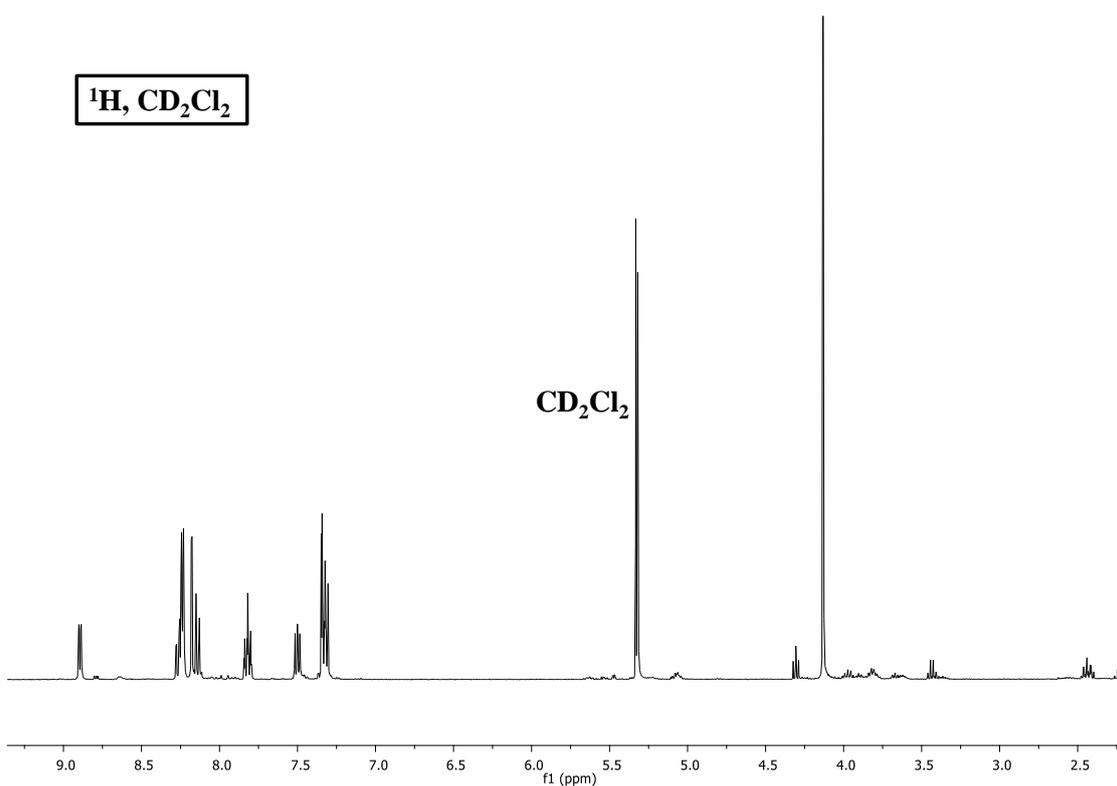
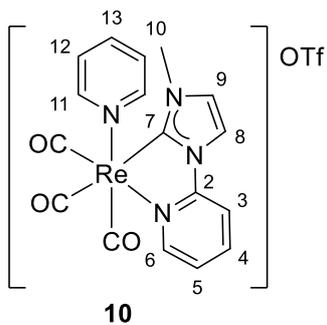
R1 = 0.0296, wR2 = 0.0298

Largest diff. peak and hole

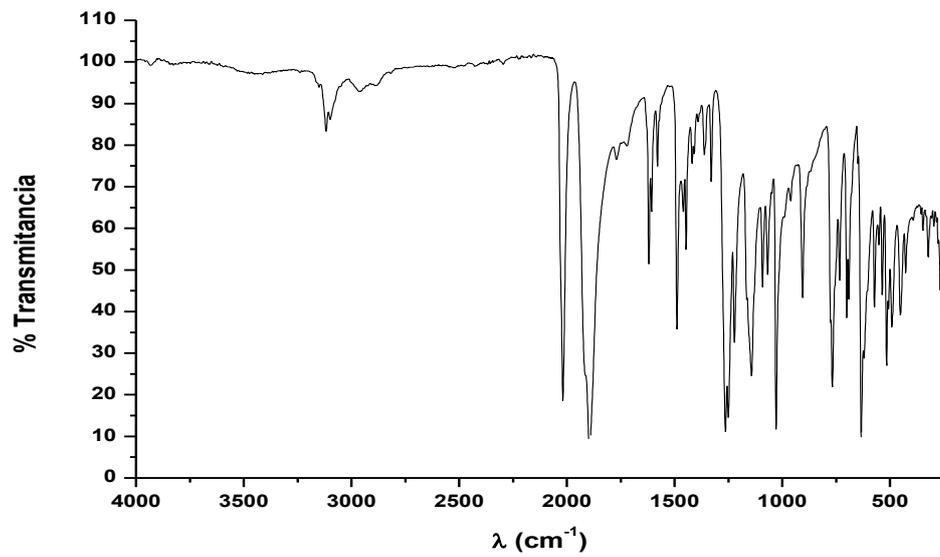
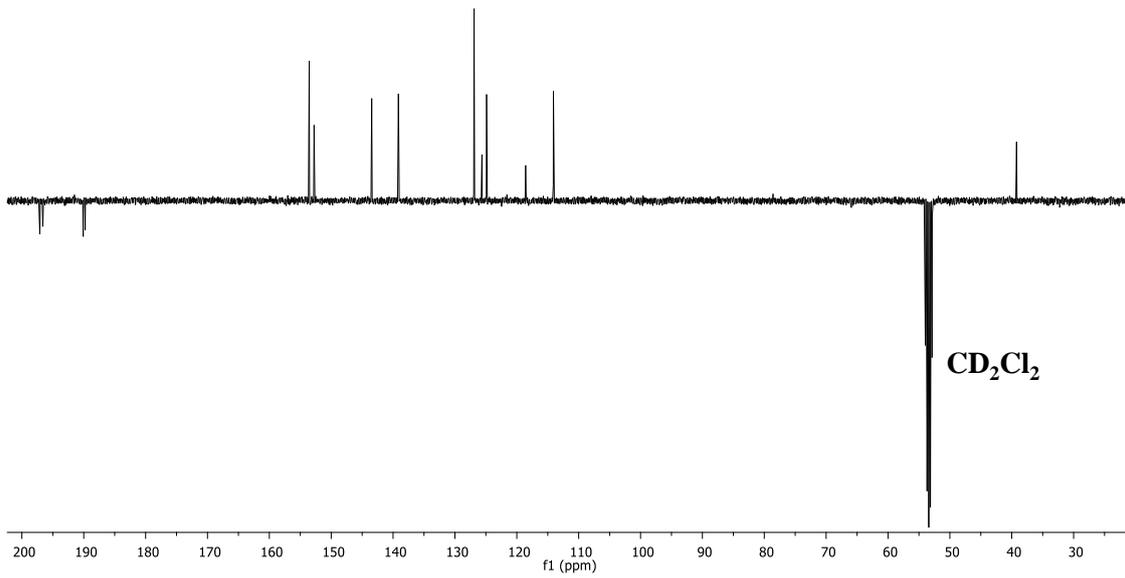
0.783 and -0.283 e. Å⁻³

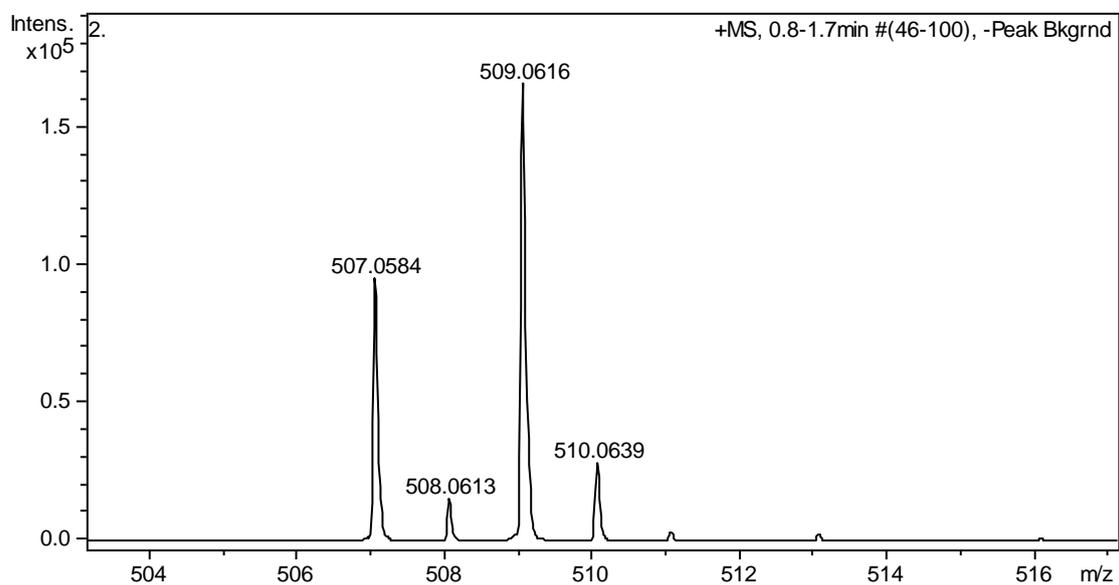
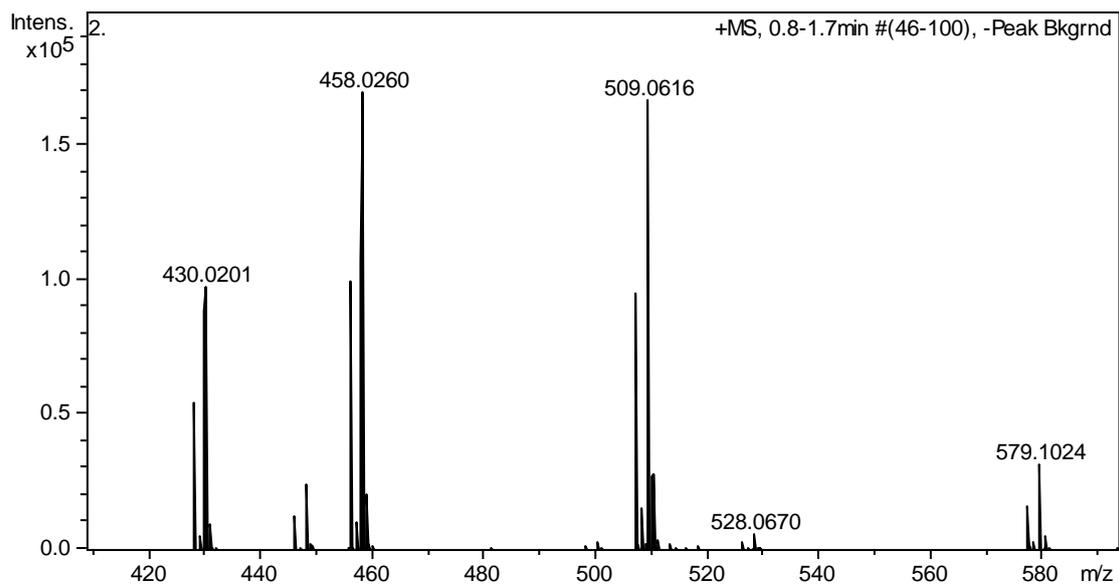
Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] seleccionados para el complejo 9.

Re(1)-C(1)	1.911(5)	C(16)-Re(1)-C(17)	172.3(3)
Re(1)-C(2)	1.972(6)	C(3)-Re(1)-N(4)	175.7(2)
Re(1)-C(3)	1.906(6)	C(4)-Re(1)-N(3)	74.6(2)
Re(1)-C(4)	2.125(5)	O(1)-C(1)-Re(1)	178.7(4)
Re(1)-N(3)	2.202(4)	O(2)-C(2)-Re(1)	177.3(5)
Re(1)-N(4)	2.144(5)	O(3)-C(3)-Re(1)	179.6(5)
O(1)-C(1)	1.156(6)		
O(2)-C(2)	1.140(7)		
O(3)-C(3)	1.159(7)		



APT, CD₂Cl₂





Datos cristalográficos para el complejo 10.

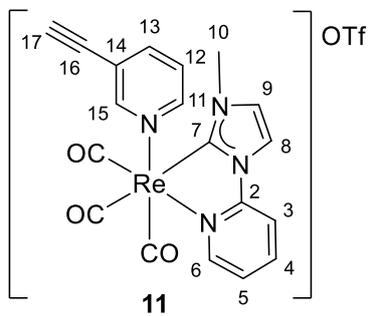
Empirical formula	C ₁₈ H ₁₄ F ₃ N ₄ O ₆ Re S	
Formula weight	657.59	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Monoclinic, P2 ₁ /c	
Unit cell dimensions	a = 12.316(3) Å	alpha = 90°
	b = 12.222(2) Å	beta = 95.13(3)°

	$c = 14.087(3) \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$
Volume	$2112.0(7) \text{ \AA}^3$	
Z	4	
Calculated density	2.068 Mg/m^3	
Absorption coefficient	5.923 mm^{-1}	
F(000)	1264	
Crystal size	$0.30 \times 0.08 \times 0.06 \text{ mm}^3$	
Theta range for data collection	4.67 to 25.50°	
Limiting indices	$-14 \leq h \leq 14$, $-14 \leq k \leq 14$, $-17 \leq l \leq 17$	
Reflections collected / unique	45544 / 3901 [R(int) = 0.0321]	
Completeness to theta = 25.50	99.3 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.7176 and 0.2695	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2	
Data / restraints / parameters	3901 / 0 / 299	
Goodness-of-fit on F^2	1.076	
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0389, wR2 = 0.0953	
R indices (all data)	R1 = 0.0488, wR2 = 0.1014	
Largest diff. peak and hole	2.040 and $-1.269 \text{ e. \AA}^{-3}$	

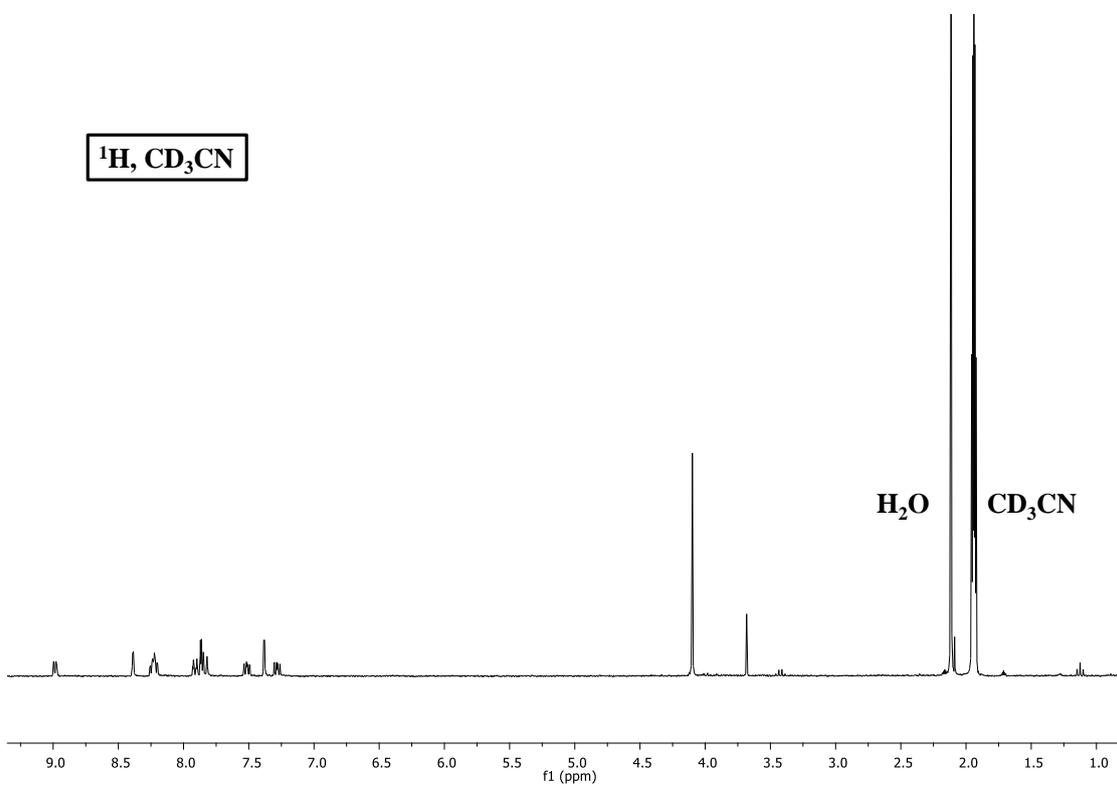
Longitudes de enlace [\AA] y ángulos [$^\circ$] seleccionados para el complejo 10

Re(1)-C(14)	1.920(8)	C(16)-Re(1)-C(17)	172.3(3)
Re(1)-C(15)	1.932(8)	C(15)-Re(1)-N(1)	179.2(2)
Re(1)-C(16)	1.968(7)	C(17)-Re(1)-N(2)	73.8(2)
Re(1)-C(17)	2.139(6)	O(3)-C(14)-Re(1)	177.2(7)
Re(1)-N(1)	2.204(6)	O(2)-C(15)-Re(1)	178.0(6)
Re(1)-N(2)	2.205(6)	O(1)-C(16)-Re(1)	175.1(7)

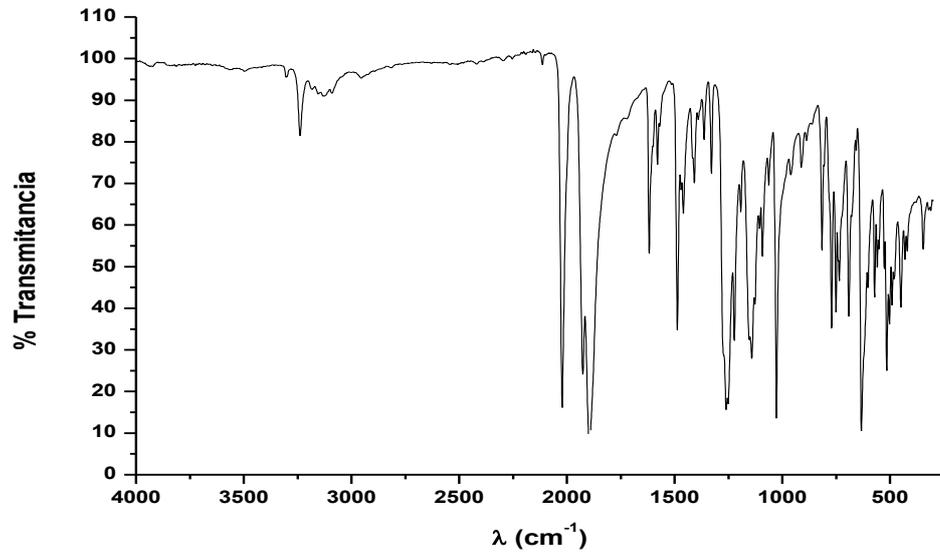
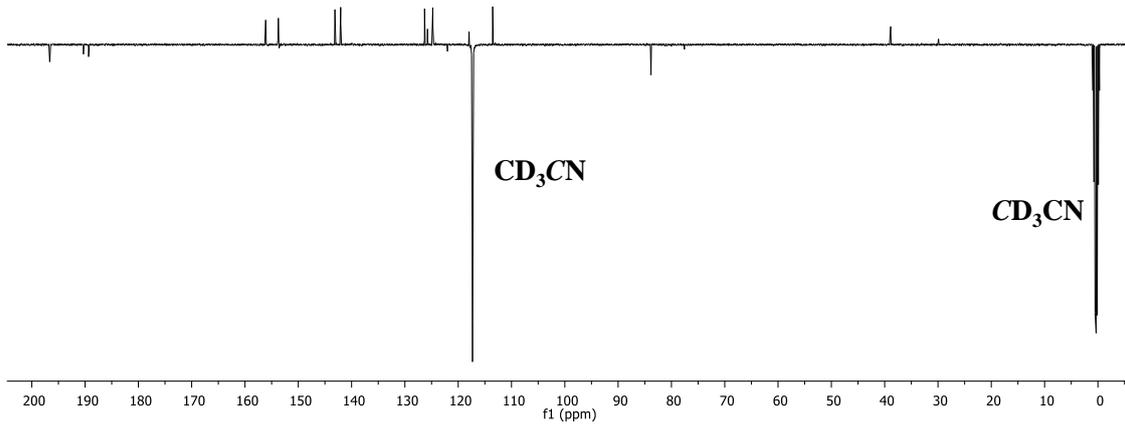
O(1)-C(16) 1.132(8)
O(2)-C(15) 1.134(9)
O(3)-C(14) 1.144(9)

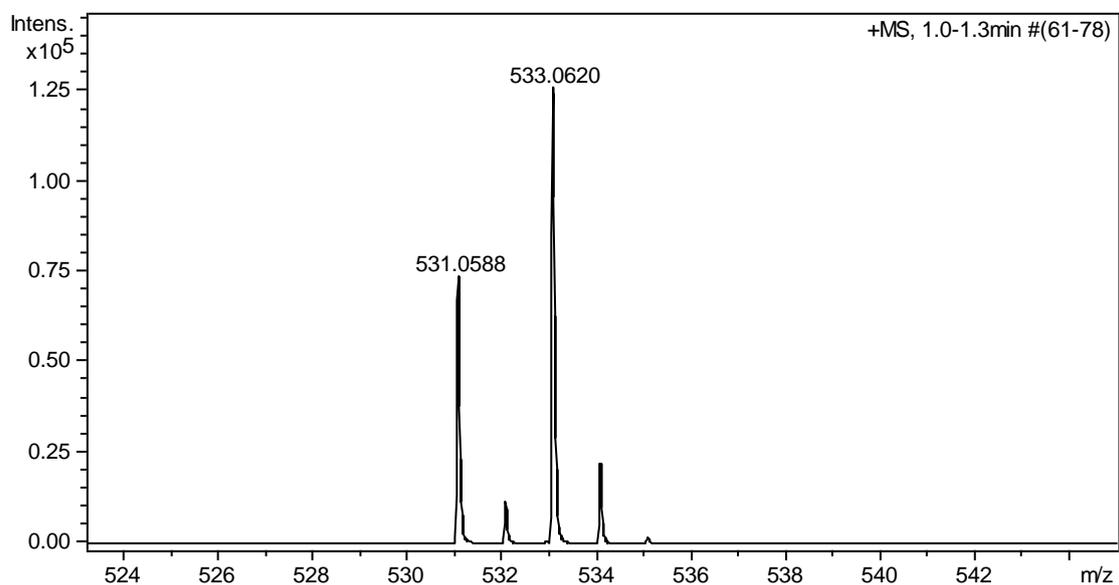
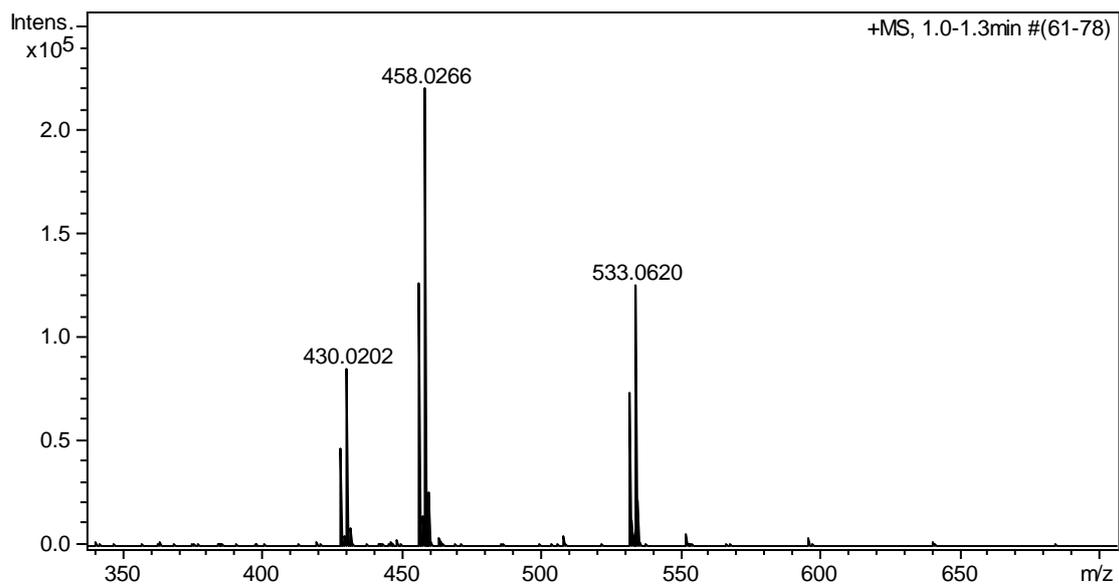


^1H , CD_3CN



APT, CD₃CN





Datos cristalográficos para el complejo 11.

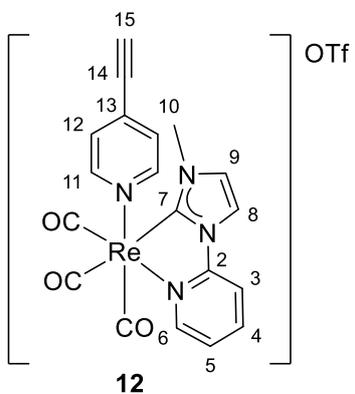
Empirical formula	C ₂₀ H ₁₄ F ₃ N ₄ O ₆ Re S	
Formula weight	681.62	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Monoclinic, P2 ₁ /c	
Unit cell dimensions	a = 13.406(3) Å	alpha = 90°
	b = 13.474(3) Å	beta = 114.76(3)°

	$c = 13.531(3) \text{ \AA}$	$\text{gamma} = 90^\circ$
Volume	2219.45 \AA^3	
Z	4	
Calculated density	2.040 Mg/m^3	
Absorption coefficient	5.641 mm^{-1}	
F(000)	1312	
Crystal size	0.220 x 0.170 x 0.110 mm^3	
Theta range for data collection	4.49 to 25.24°	
Limiting indices	$-16 \leq h \leq 16, -16 \leq k \leq 16, -16 \leq l \leq 16$	
Reflections collected / unique	21669 / 4100 [R(int) = 0.0322]	
Completeness to theta = 25.24	99.4 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	1.0000 and 0.56788	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2	
Data / restraints / parameters	4100 / 0 / 317	
Goodness-of-fit on F^2	1.016	
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0216, wR2 = 0.0250	
R indices (all data)	R1 = 0.0532, wR2 = 0.0549	
Largest diff. peak and hole	1.092 and -0.632 e. \AA^{-3}	

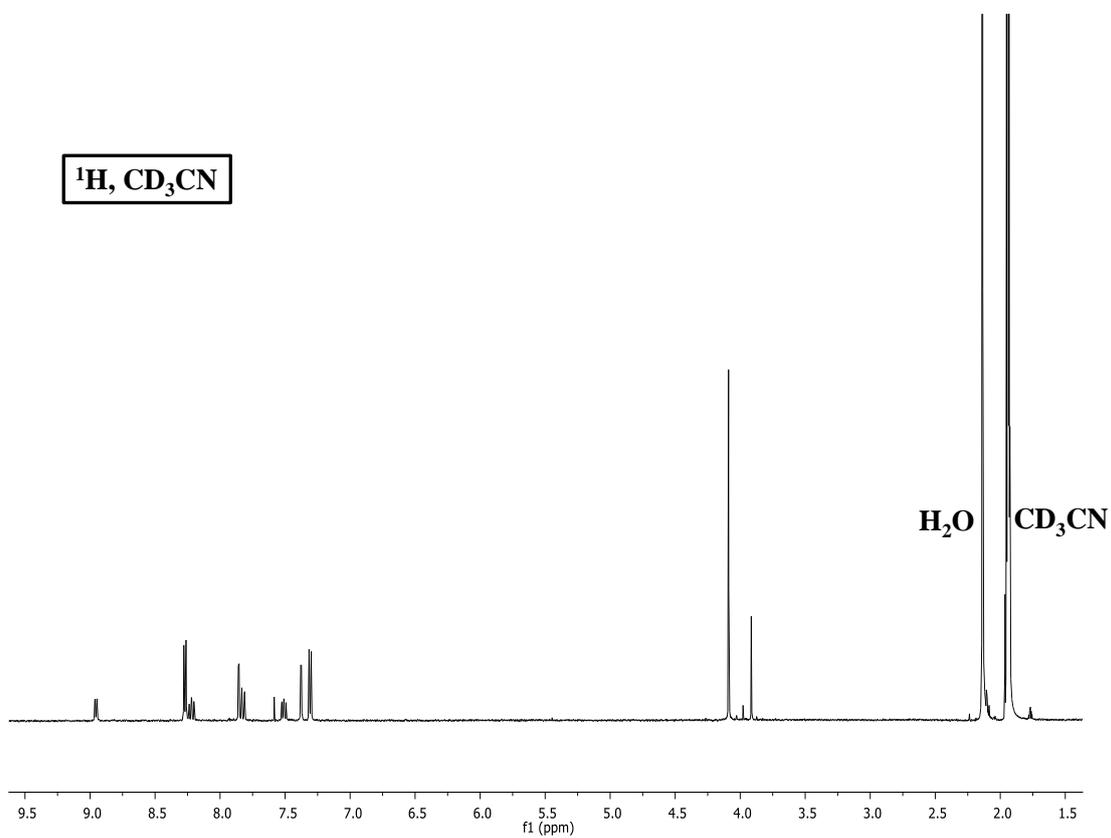
Distancias de enlace [\AA] y ángulos [$^\circ$] seleccionados para el complejo 11.

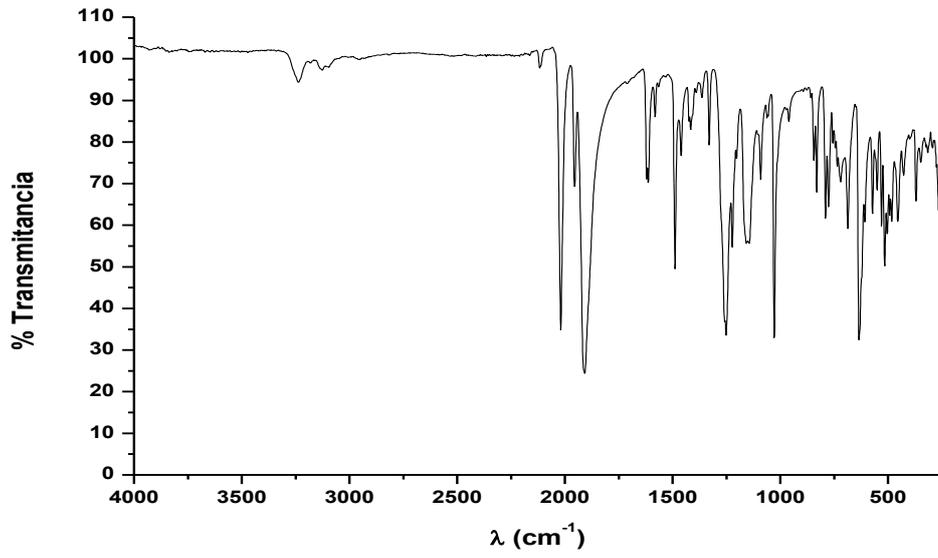
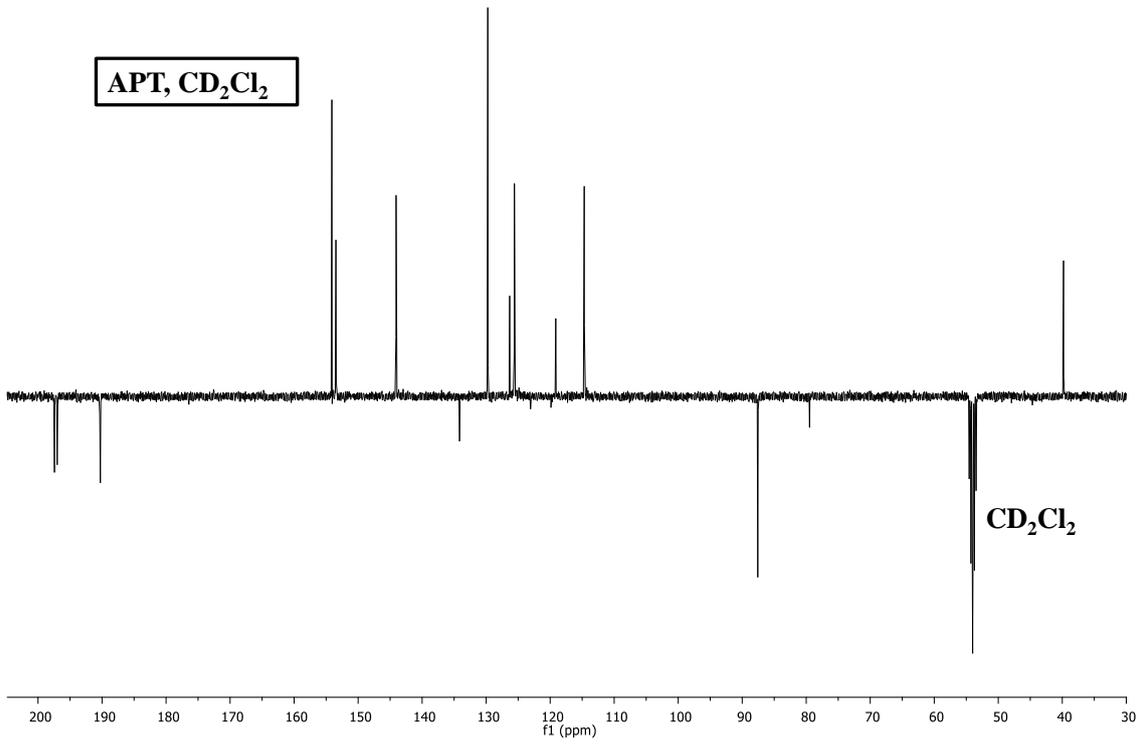
Re(1)-C(14)	1.920(8)	C(16)-Re(1)-C(17)	172.3(3)
Re(1)-C(1)	1.968(4)	C(9)-Re(1)-N(1)	74.5(1)
Re(1)-C(2)	1.911(4)	C(19)-C(18)-Re(1)	177.2(4)
Re(1)-C(3)	1.935(4)	O(3)-C(3)-Re(1)	178.1(3)
Re(1)-C(9)	2.130(4)	C(16)-C(18)-C(19)	177.2(4)
Re(1)-N(1)	2.212(3)	O(2)-C(2)-Re(1)	177.3(3)

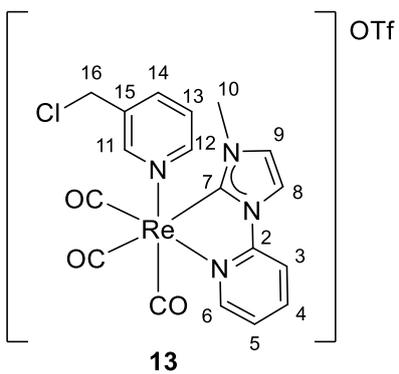
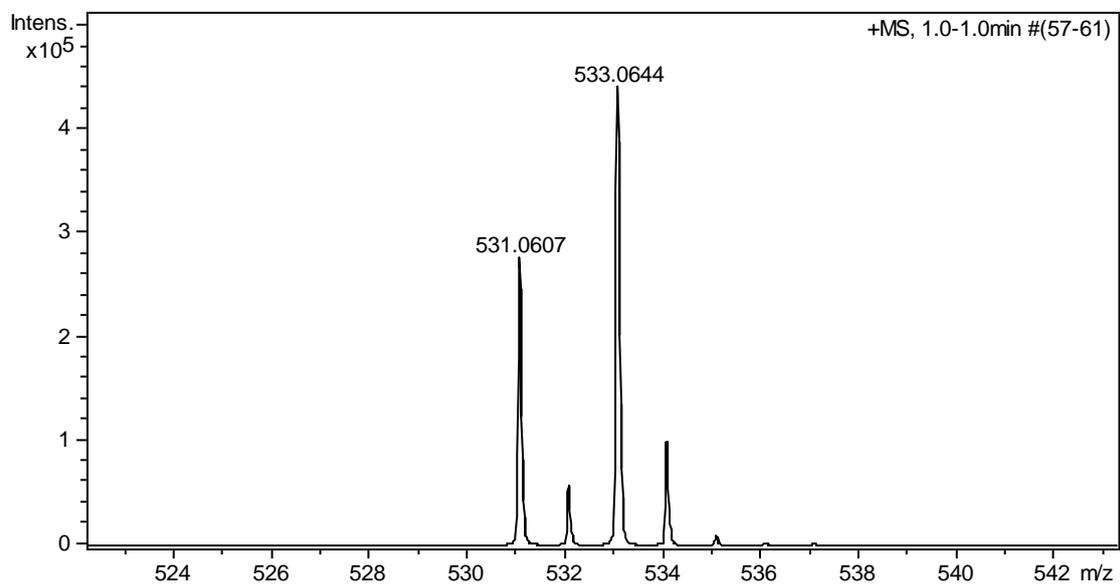
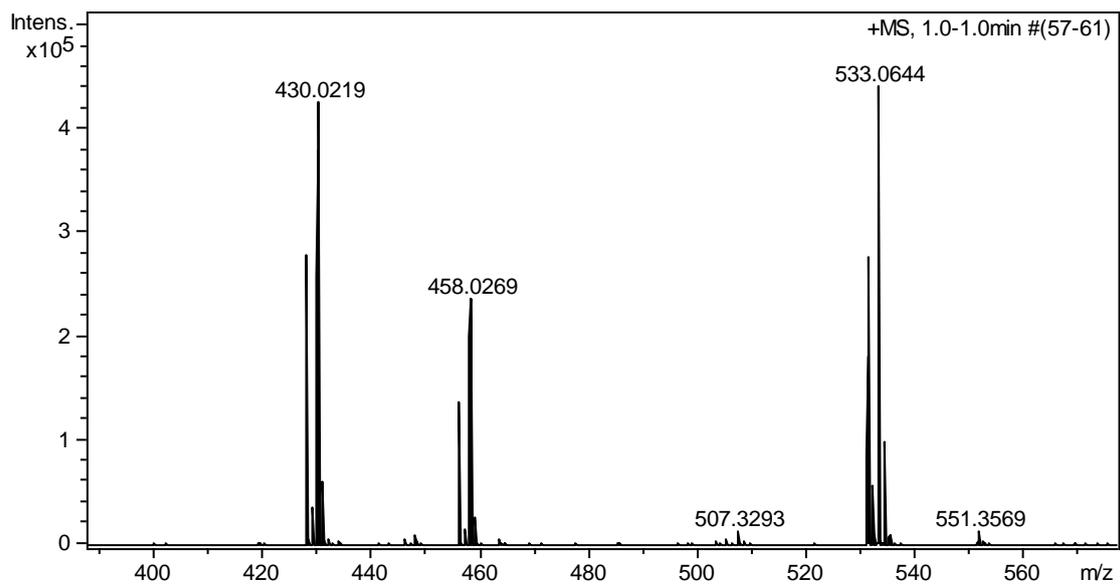
O(1)-C(1)	1.144(4)	O(1)-C(1)-Re(1)	175.6(3)
O(2)-C(2)	1.149(5)		
O(3)-C(3)	1.149(5)		



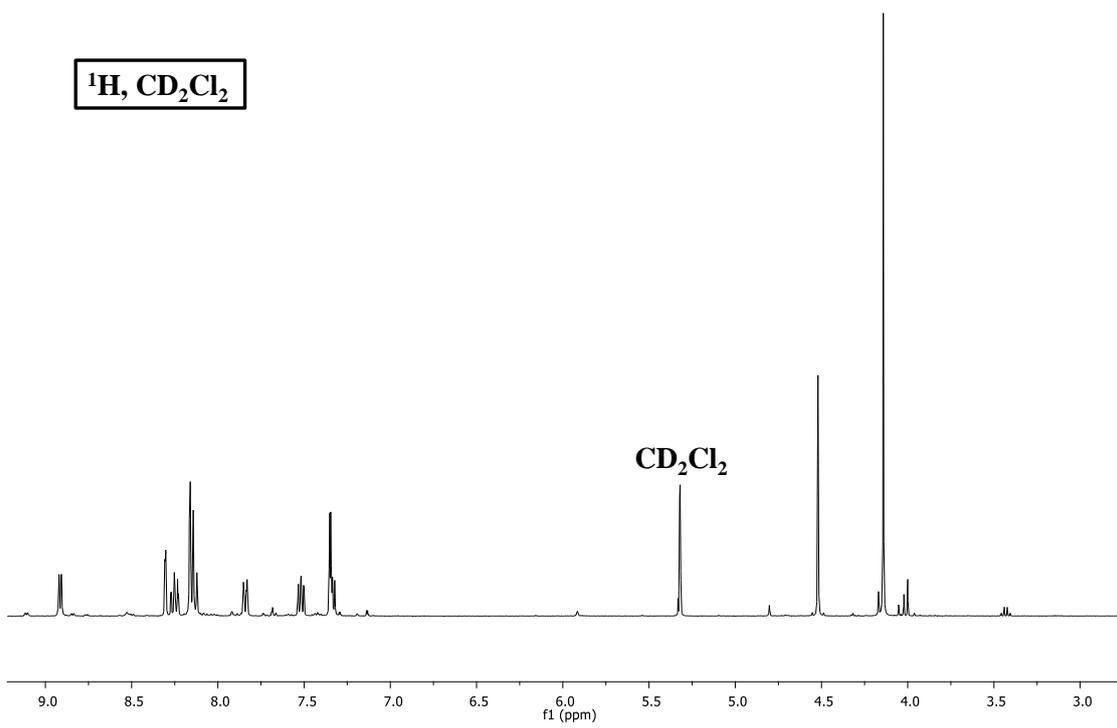
¹H, CD₃CN



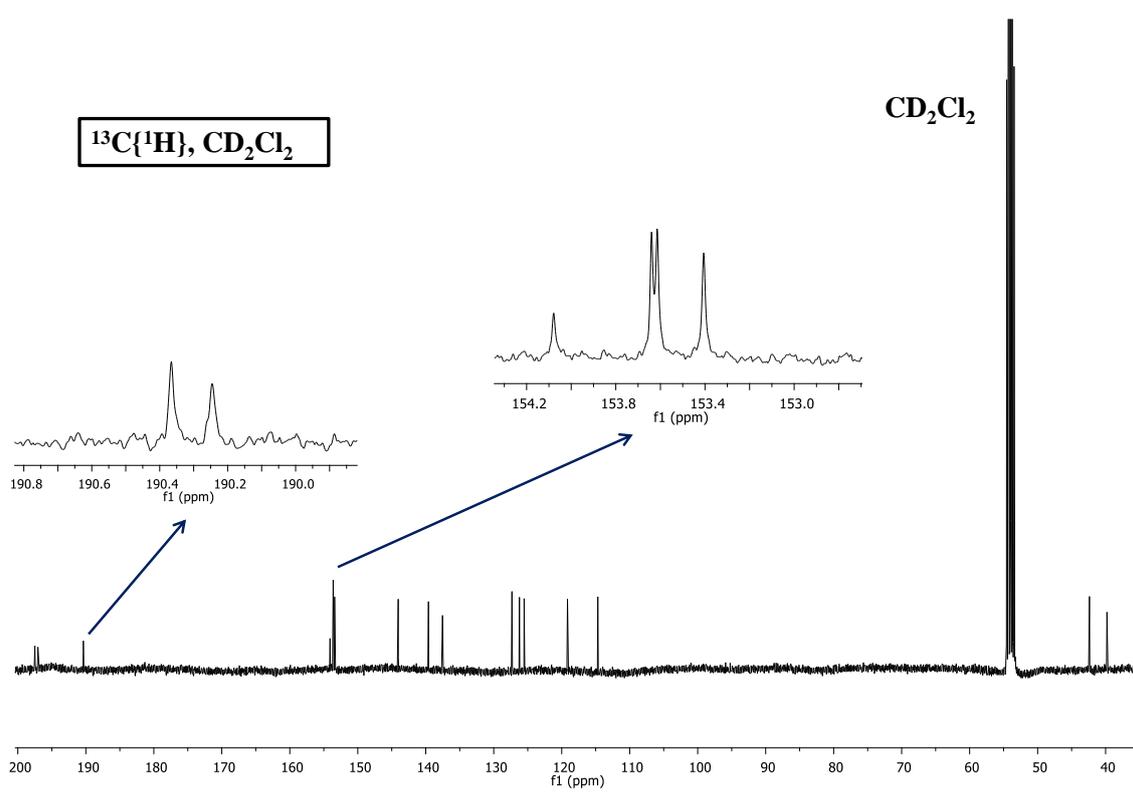


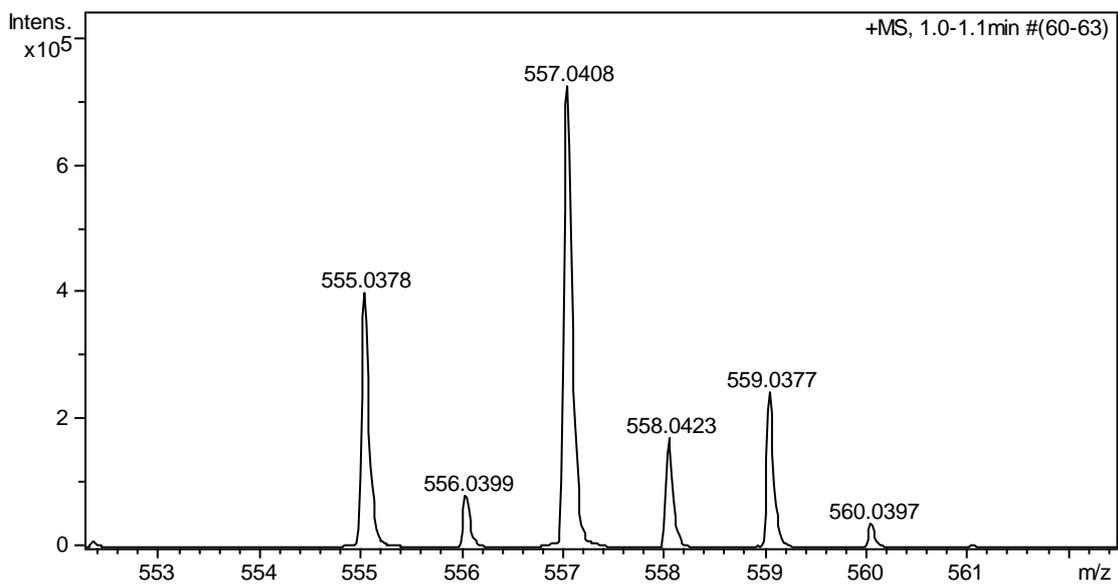
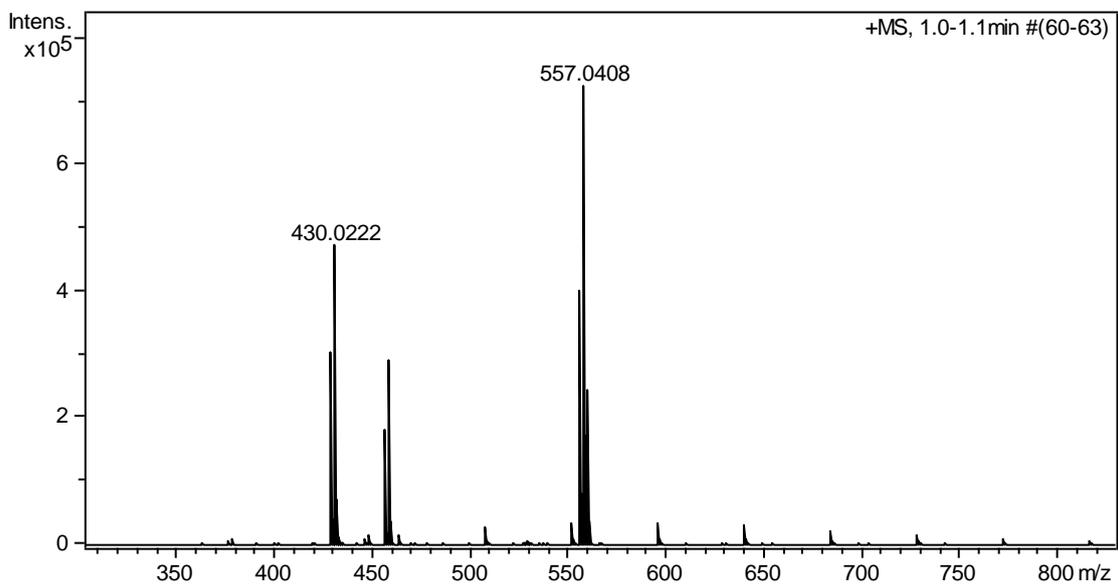
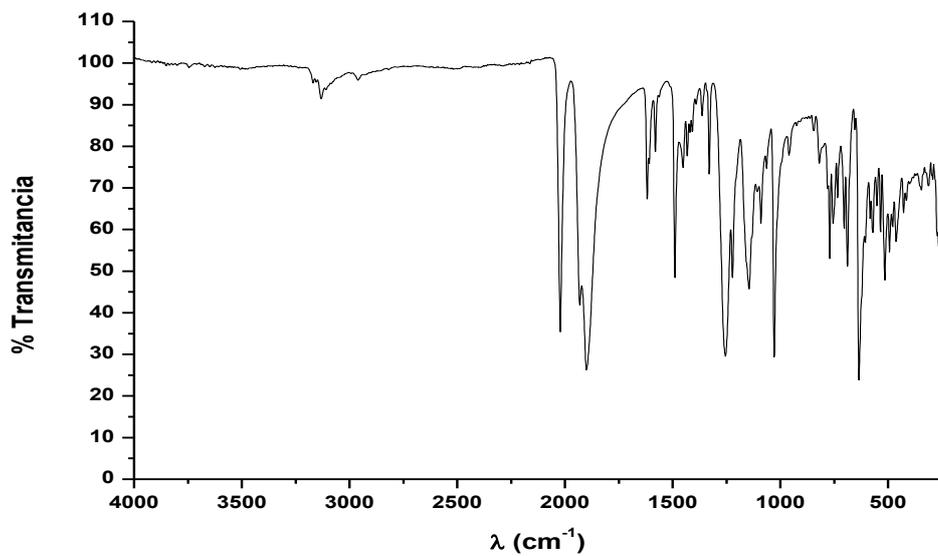


^1H , CD_2Cl_2



$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, CD_2Cl_2





Datos cristalográficos para el complejo 13.

Empirical formula	C ₁₉ H ₁₅ ClF ₃ N ₄ O ₆ ReS	
Formula weight	706.06	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Triclinic, P-1	
Unit cell dimensions	a = 8.7317(2) Å b = 10.2031(2) Å c = 13.2038(3) Å	alpha = 94.591(2) deg. beta = 93.480(2) deg. gamma = 108.429(2) deg.
Volume	1107.81(4) Å ³	
Z	2	
Calculated density	2.117 Mg/m ³	
Absorption coefficient	5.771 mm ⁻¹	
F(000)	680	
Crystal size	0.22 x 0.20 x 0.16 mm	
Theta range for data collection	3.57 to 25.50 deg.	
Limiting indices	-10<=h<=10, -12<=k<=12, -15<=l<=15	
Reflections collected / unique	22308 / 4122 [R(int) = 0.0373]	
Completeness to theta = 25.50	99.7 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.4587 and 0.3633	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	4122 / 27 / 317	
Goodness-of-fit on F ²	1.072	
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0706, wR2 = 0.1944	

R indices (all data)

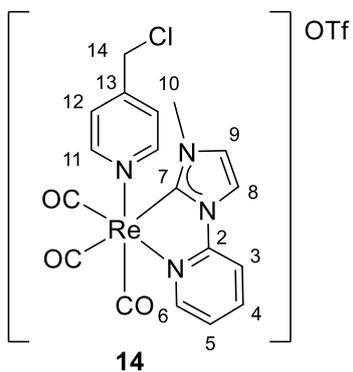
R1 = 0.0723, wR2 = 0.1962

Largest diff. peak and hole

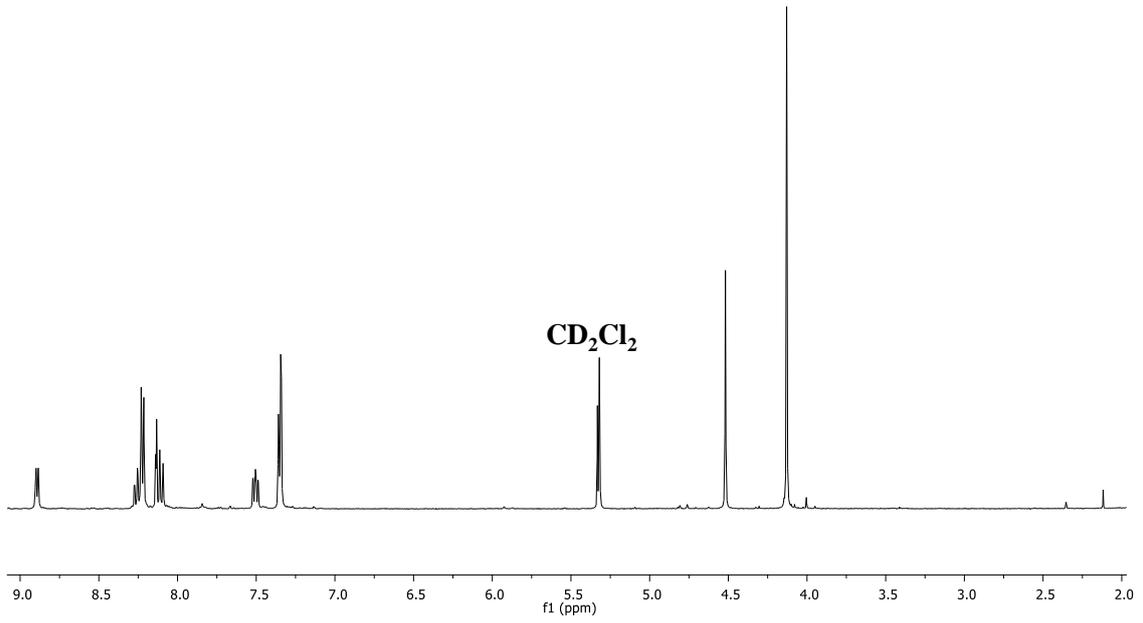
8.823 and -1.325 e. Å⁻³

Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] seleccionados para el complejo 13.

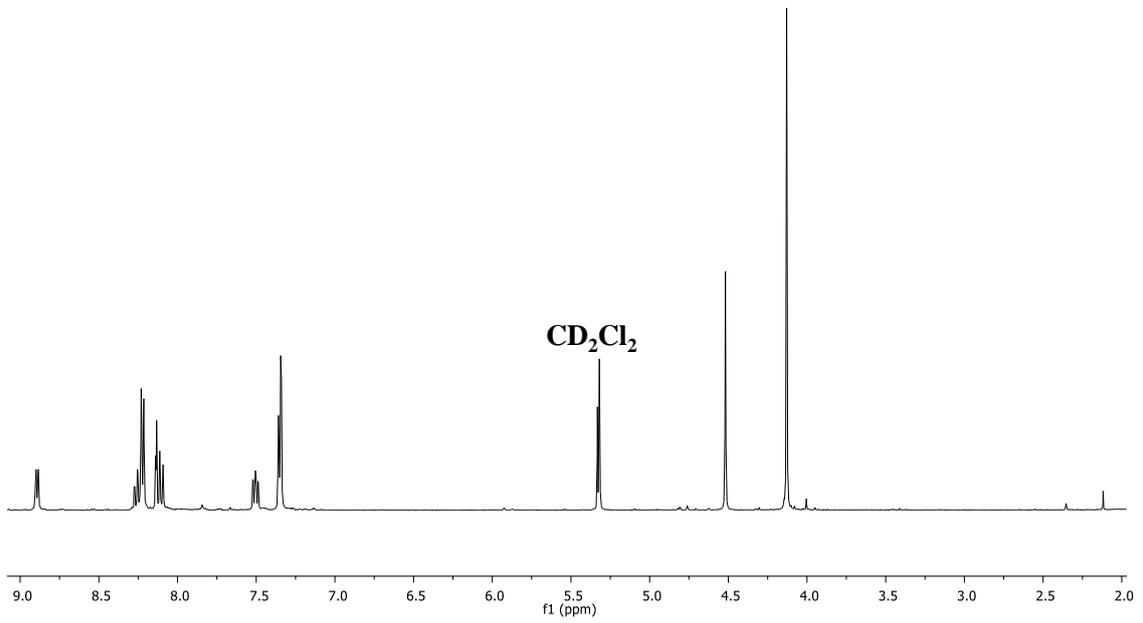
Re(1)-C(1)	1.945(13)	N(3)-Re(1)-C(4)	74.2(3)
Re(1)-C(2)	1.954(14)	O(1)-C(1)-Re(1)	176.4(11)
Re(1)-C(3)	1.942(13)	O(2)-C(2)-Re(1)	177.0(12)
Re(1)-C(4)	2.172(11)	O(3)-C(3)-Re(1)	173.5(12)
Re(1)-N(3)	2.176(11)		
Re(1)-N(4)	2.201(10)		
C(1)-O(1)	1.114(16)		
C(2)-O(2)	1.155(17)		
C(3)-O(3)	1.129(16)		
C(18)-Cl(1)	1.786(13)		

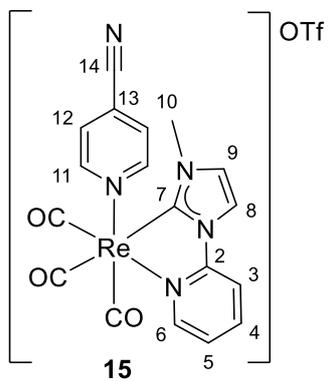
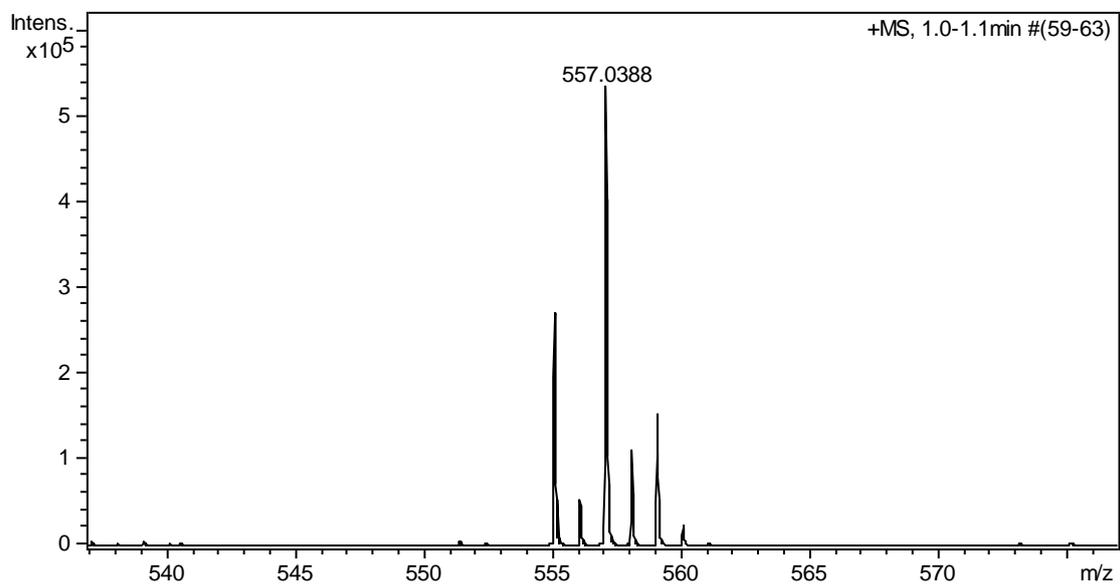
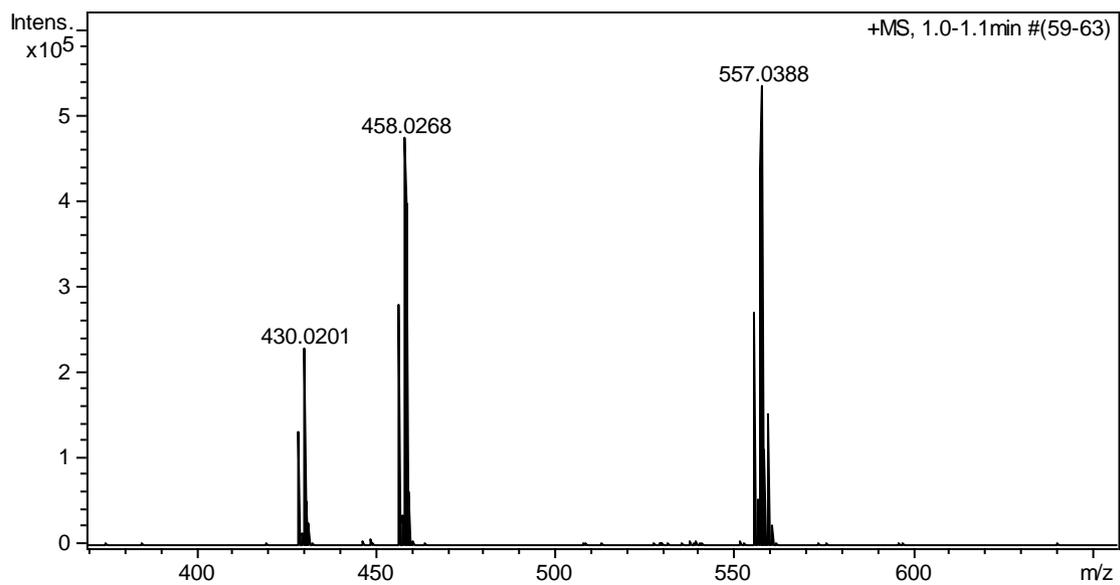


^1H , CD_2Cl_2

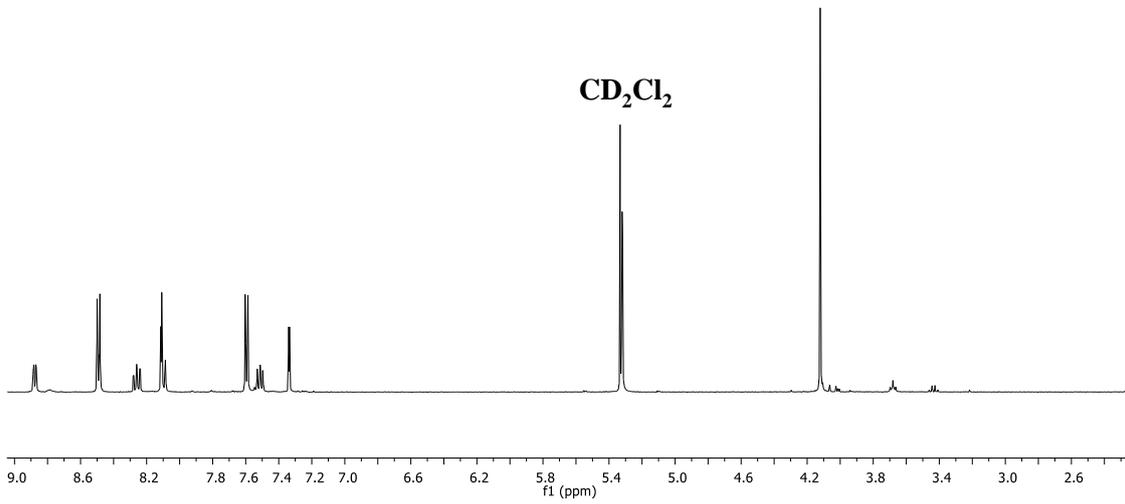


^1H , CD_2Cl_2

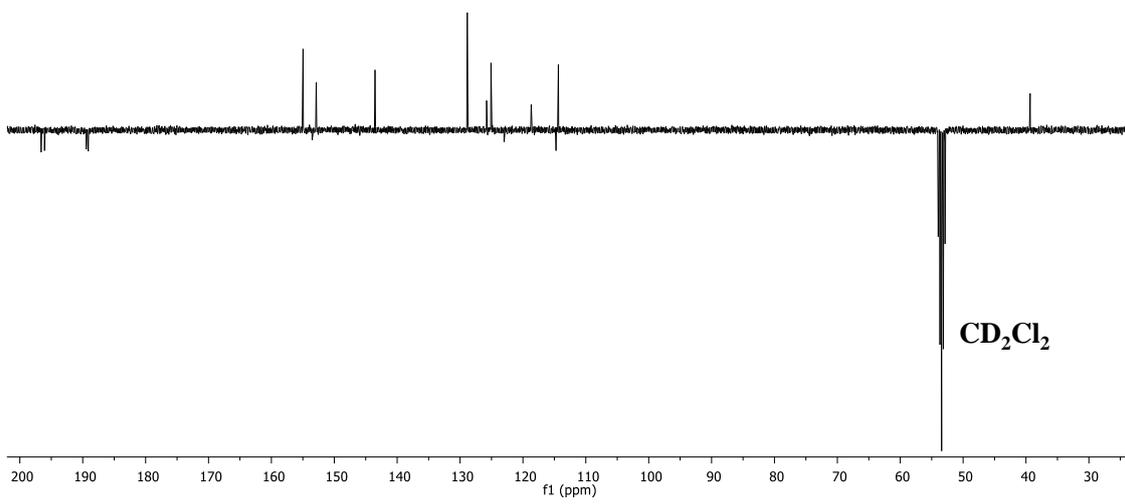


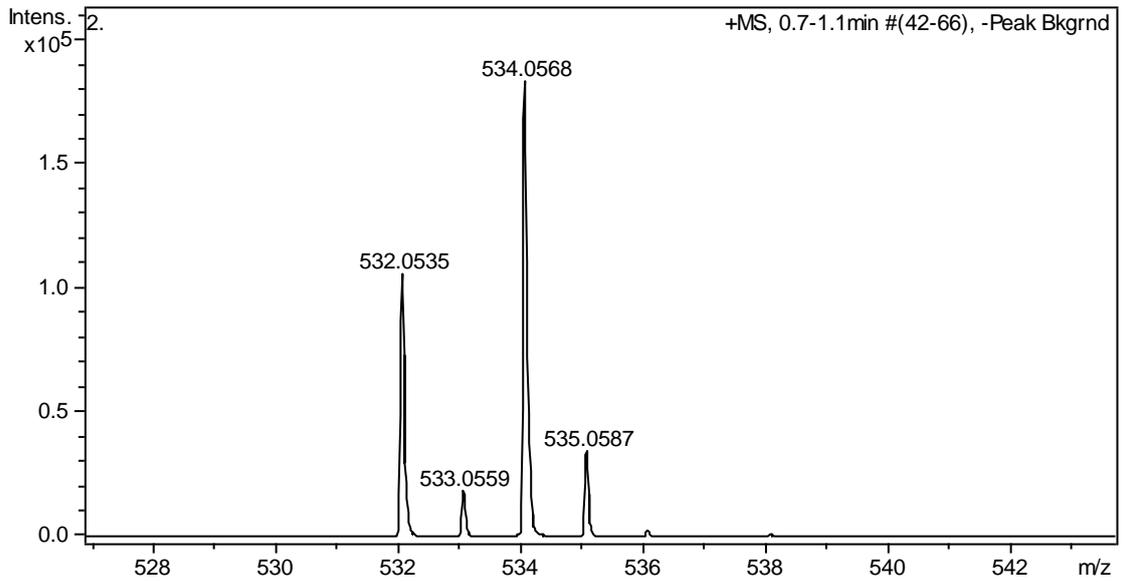
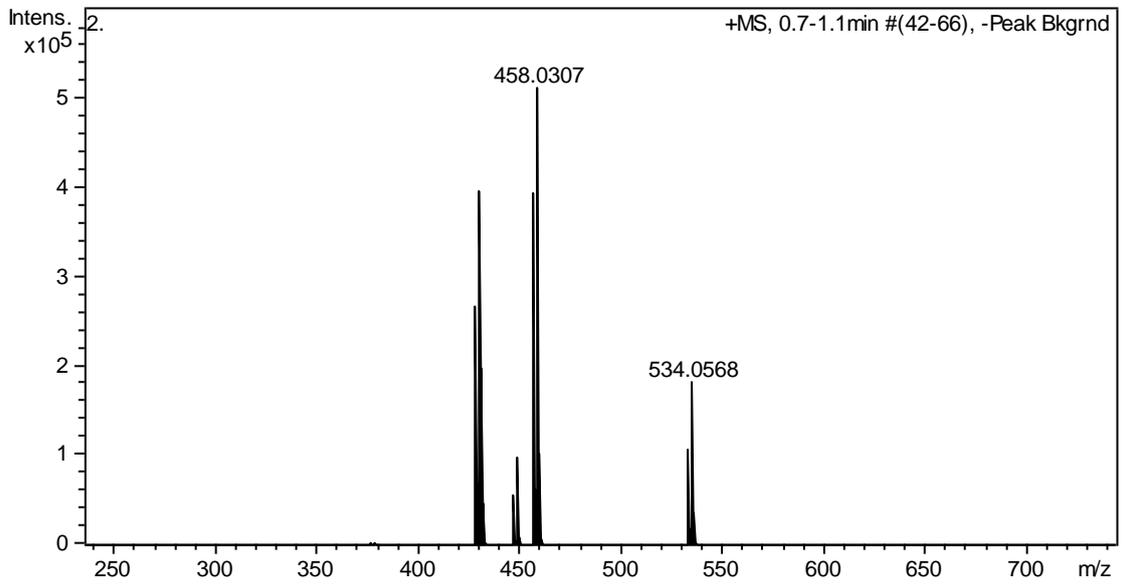
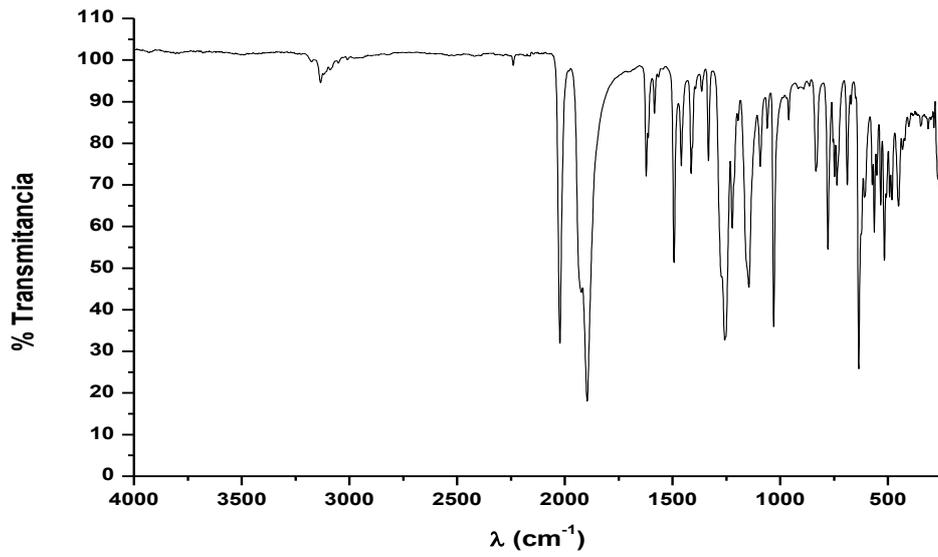


^1H , CD_2Cl_2



APT, CD_2Cl_2





Datos cristalográficos para el complejo 15

Empirical formula	C ₁₉ H ₁₃ F ₃ N ₅ O ₆ ReS	
Formula weight	682.60	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Triclinic, P-1	
Unit cell dimensions	a = 9.4731(2) Å b = 10.5912(2) Å c = 11.6819(3) Å	alpha = 84.075(2)° beta = 73.593(2)° gamma = 86.166(2)°
Volume	1117.46(4) Å ³	
Z	2	
Calculated density	2.029 Mg/m ³	
Absorption coefficient	5.603 mm ⁻¹	
F(000)	656	
Crystal size	0.10 x 0.08 x 0.07 mm	
Theta range for data collection	4.38 to 25.50°	
Limiting indices	-11<=h<=11, -12<=k<=12, -14<=l<=14	
Reflections collected / unique	20988 / 4149 [R(int) = 0.0497]	
Completeness to theta = 25.50	99.4 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.6951 and 0.6042	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	4149 / 0 / 317	
Goodness-of-fit on F ²	1.068	
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0257, wR2 = 0.0586	

R indices (all data)

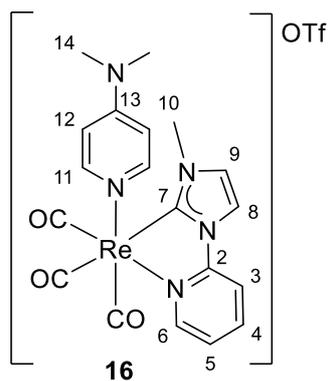
R1 = 0.0300, wR2 = 0.0602

Largest diff. peak and hole

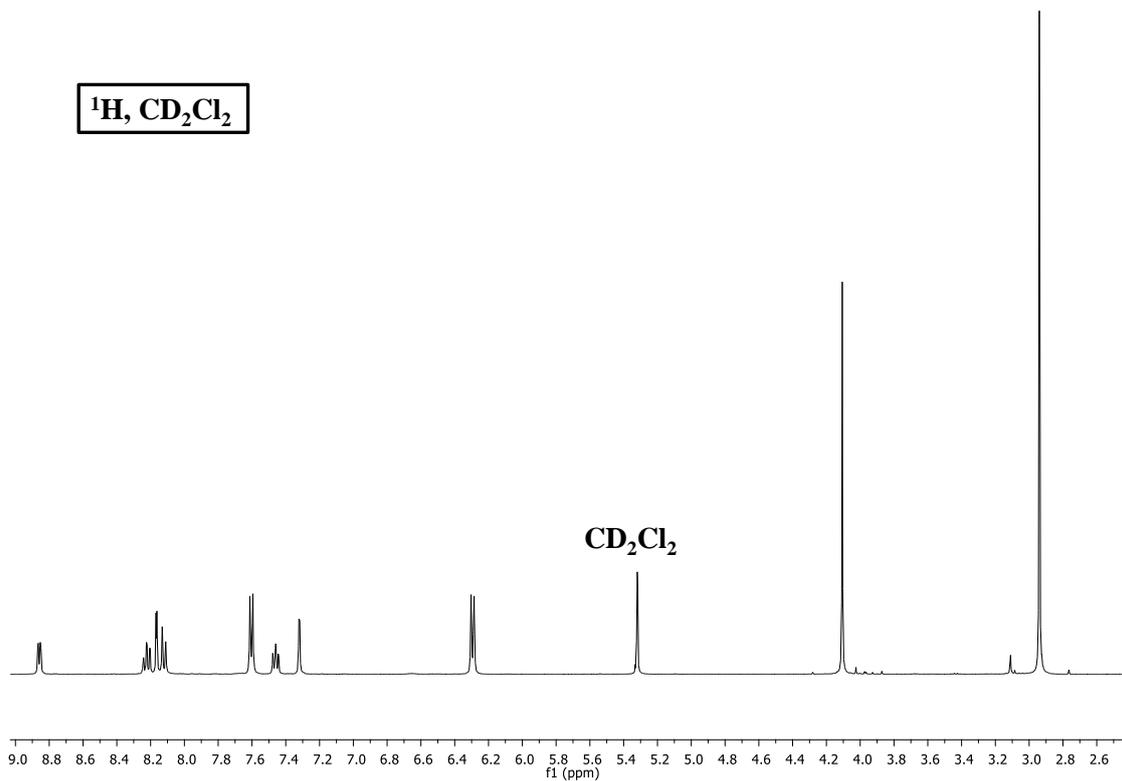
1.097 and -1.384 e. Å⁻³

Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] para el complejo 15.

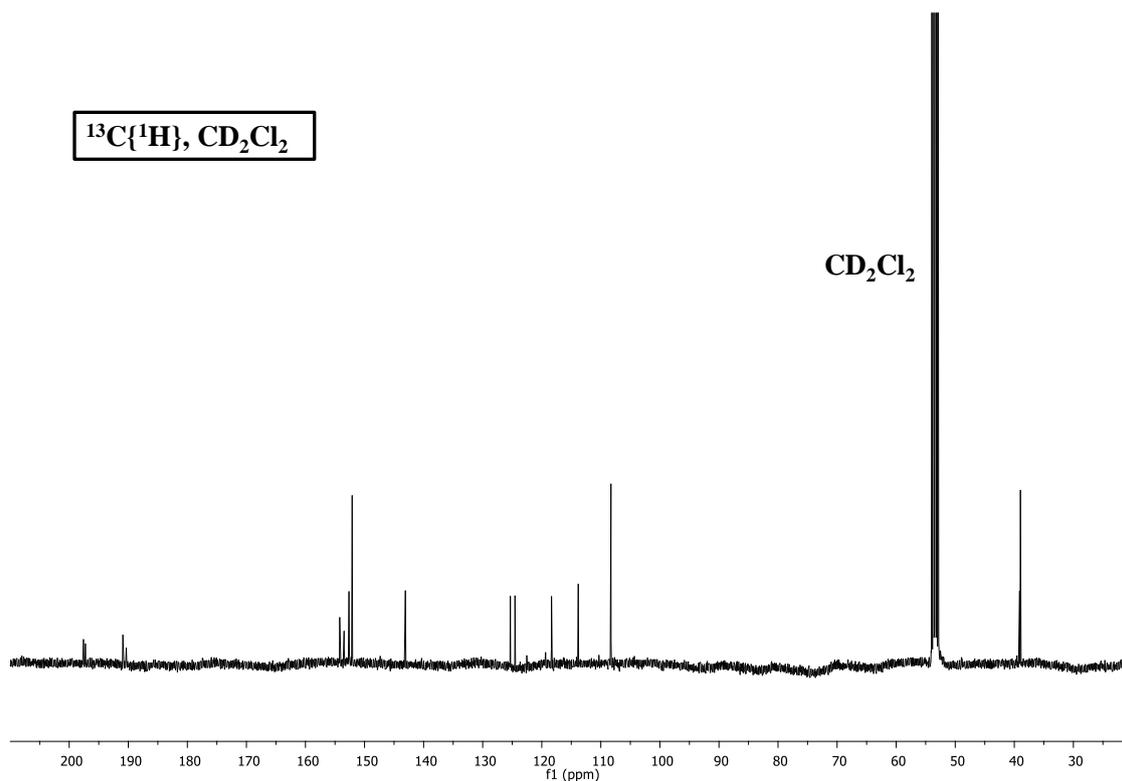
Re(1)-C(1)	1.904(4)	C(11)-Re(1)-N(1)	74.46(14)
Re(1)-C(2)	1.917(5)	O(1)-C(1)-Re(1)	178.4(4)
Re(1)-C(3)	1.969(5)	O(2)-C(2)-Re(1)	173.0(4)
Re(1)-C(11)	2.134(4)	O(3)-C(3)-Re(1)	177.7(4)
Re(1)-N(1)	2.194(3)	C(15)-C(18)-N(5)	178.3(5)
Re(1)-N(4)	2.203(3)		
C(1)-O(1)	1.156(5)		
C(2)-O(2)	1.147(5)		
C(3)-O(3)	1.155(5)		
C(18)-N(5)	1.139(6)		

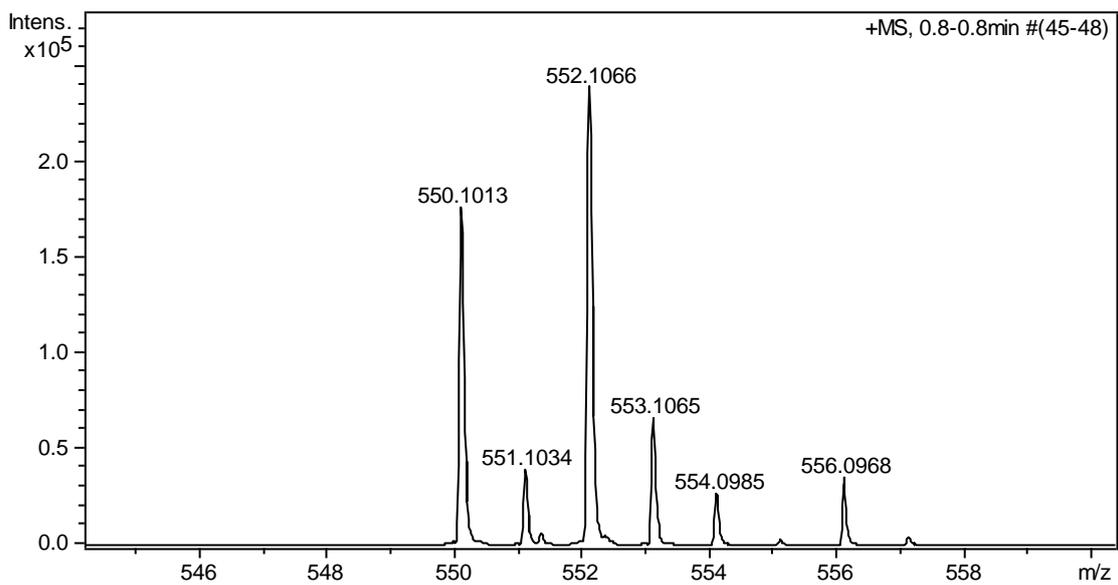
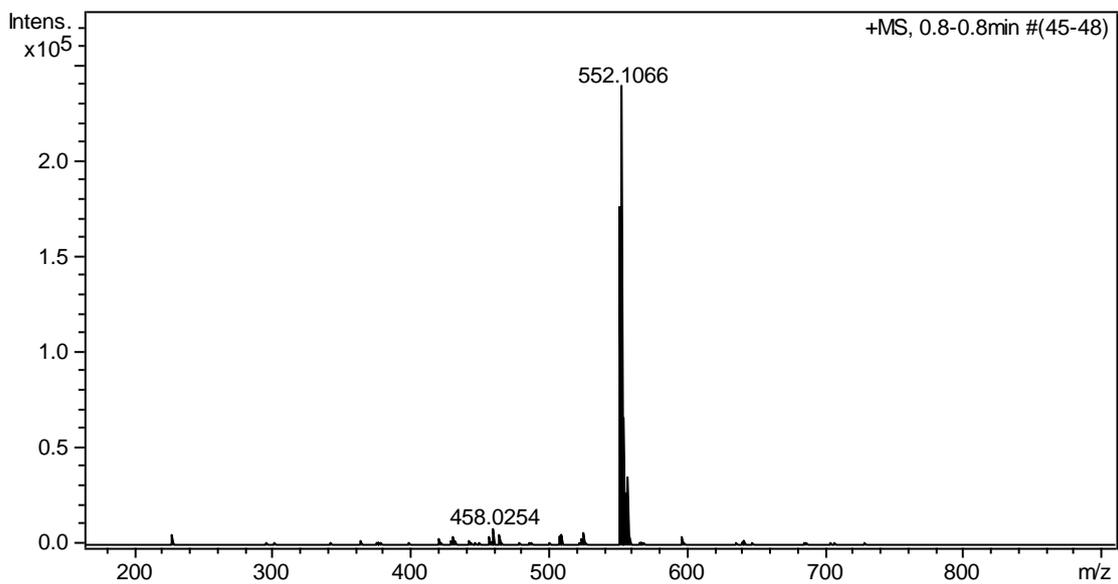
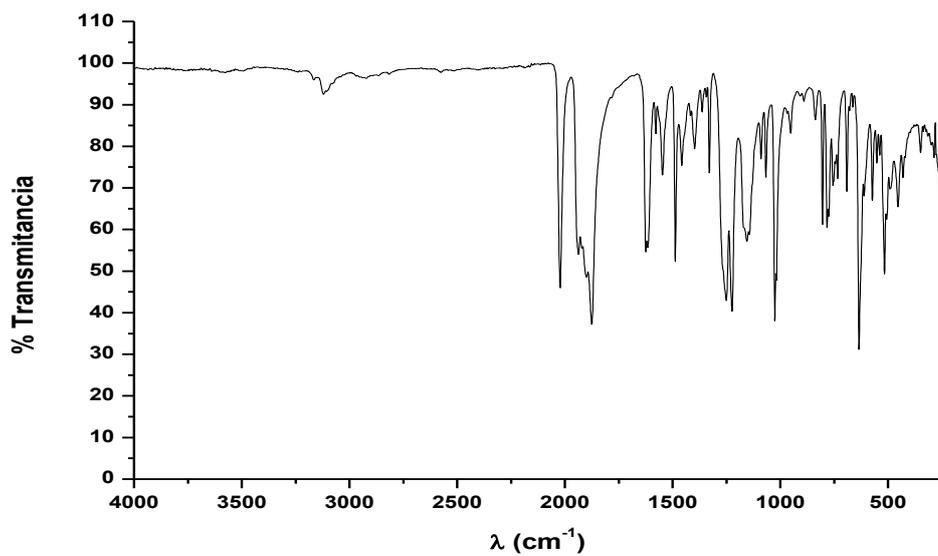


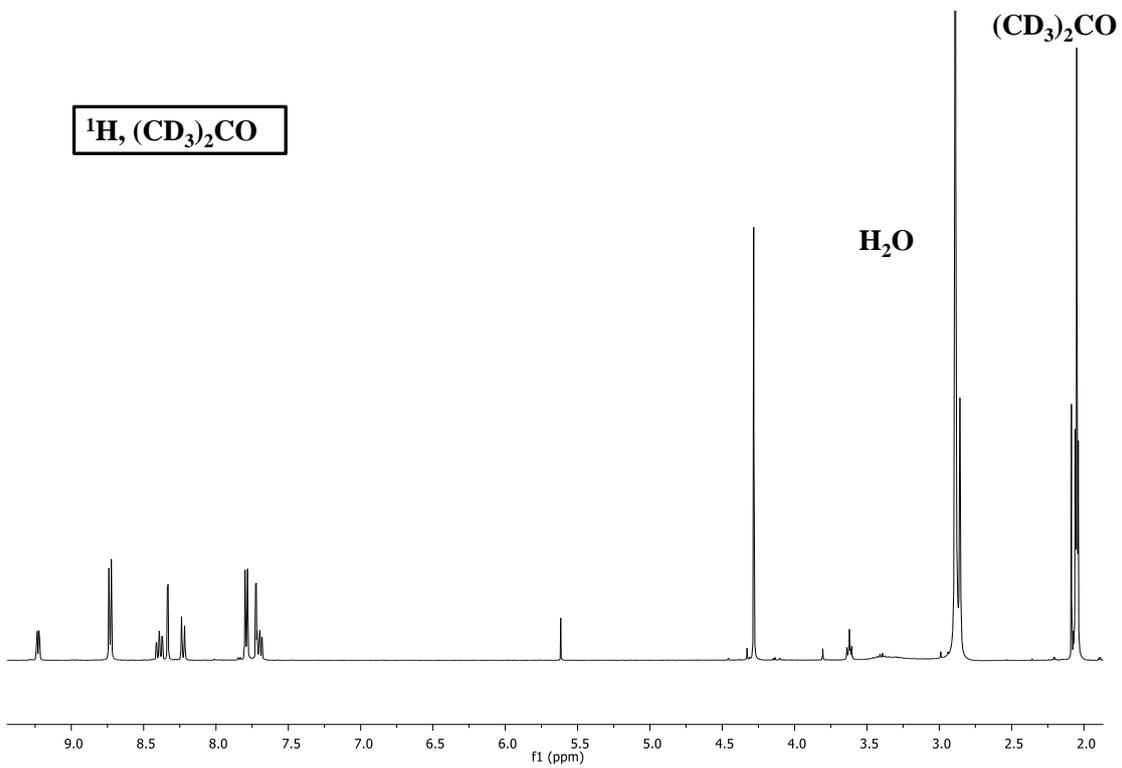
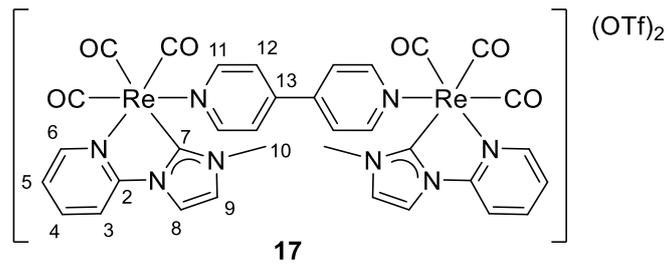
^1H , CD_2Cl_2



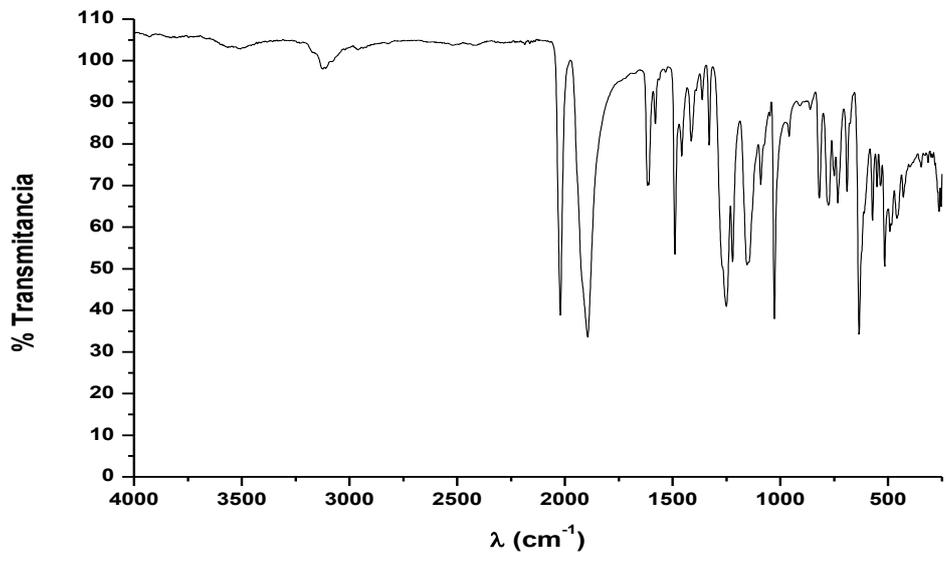
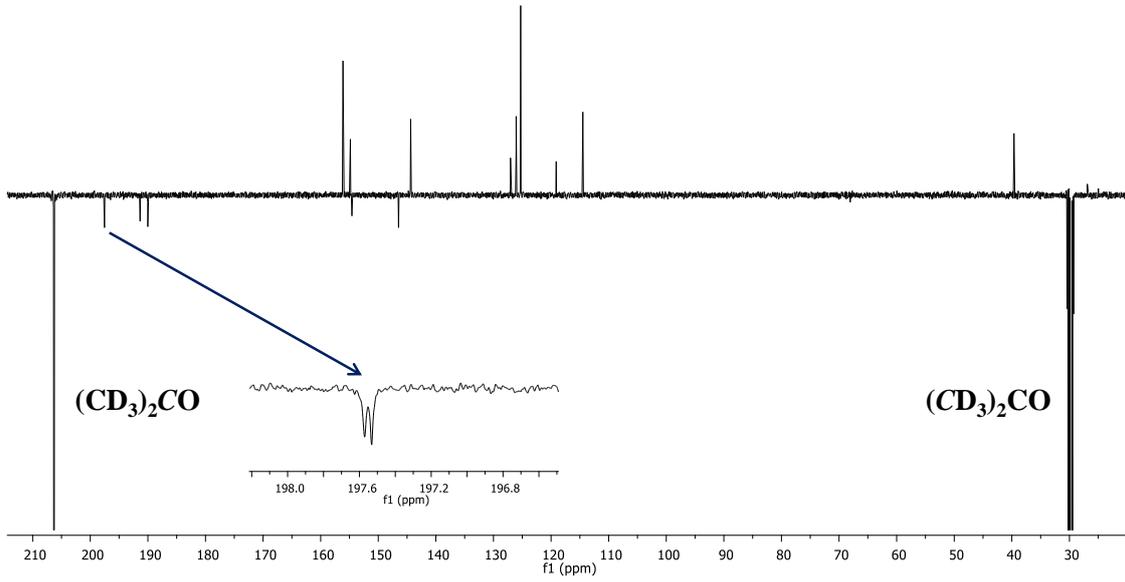
$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, CD_2Cl_2

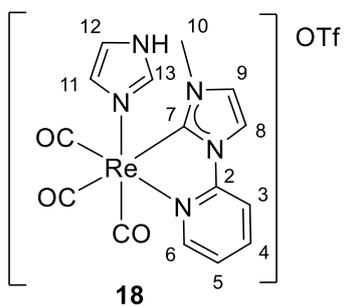
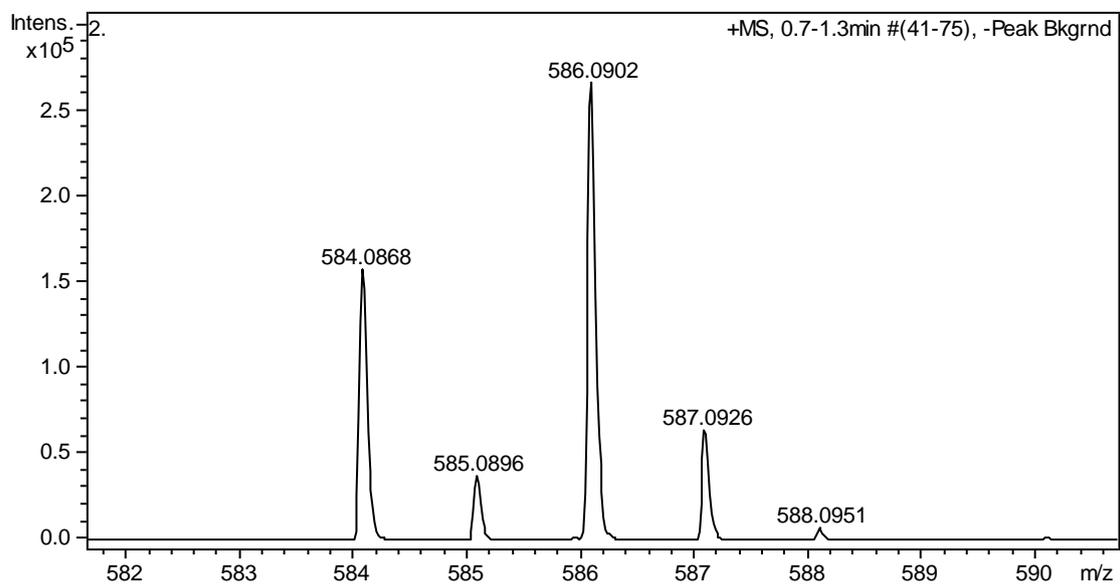
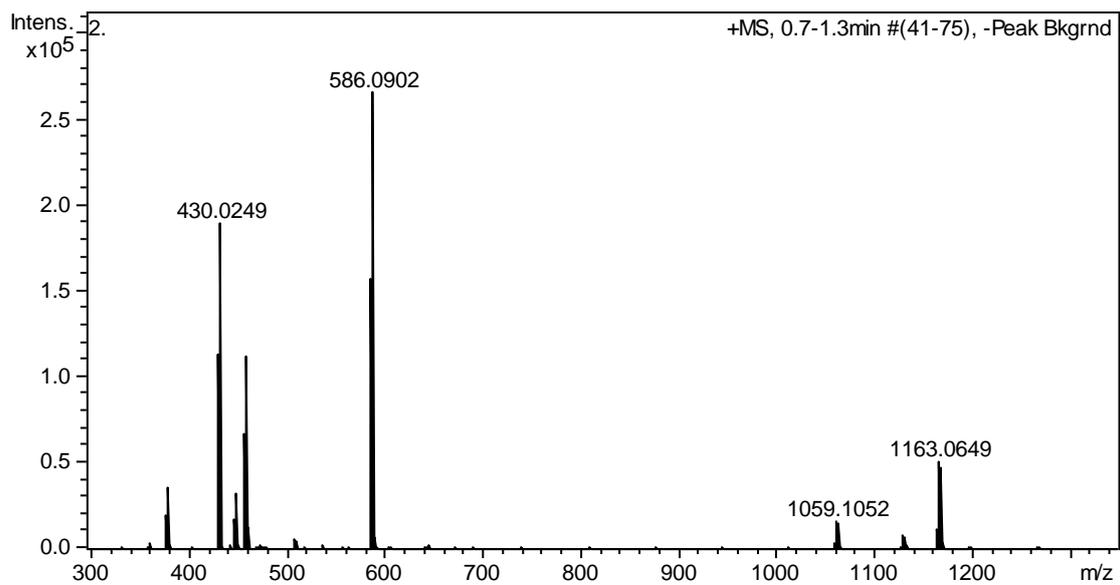


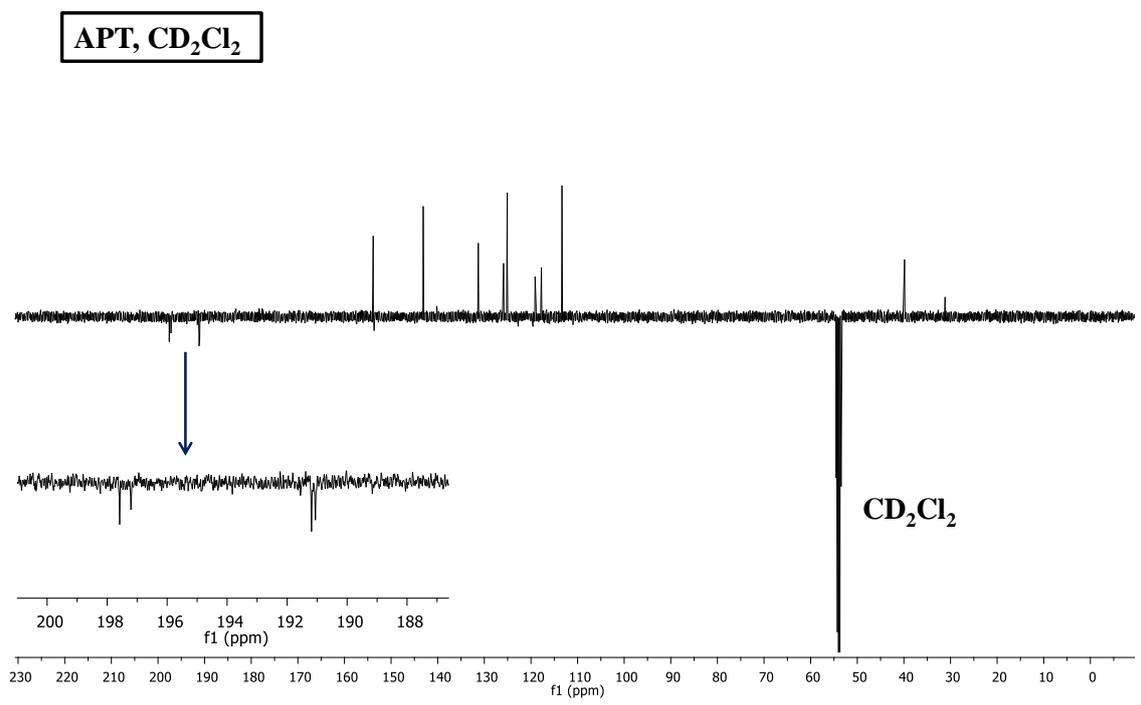
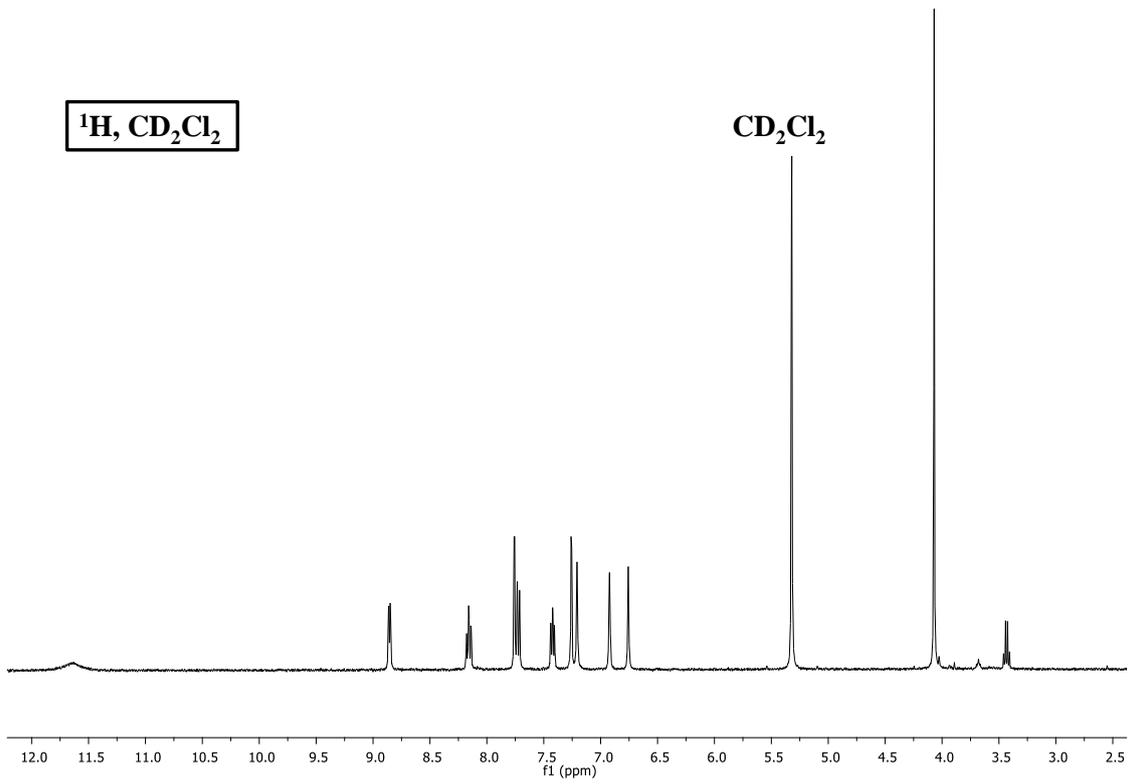


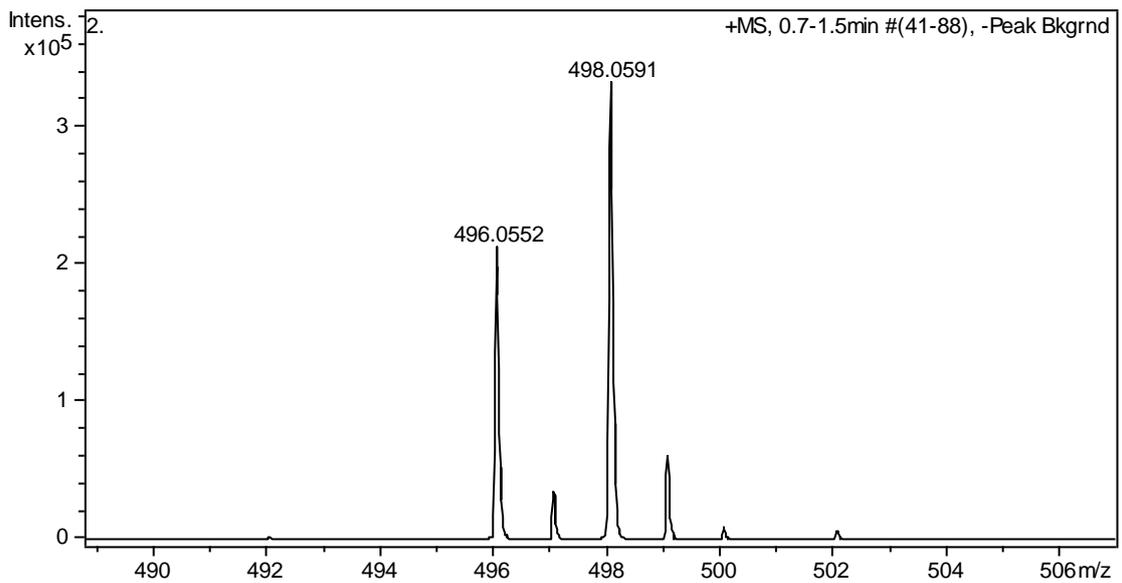
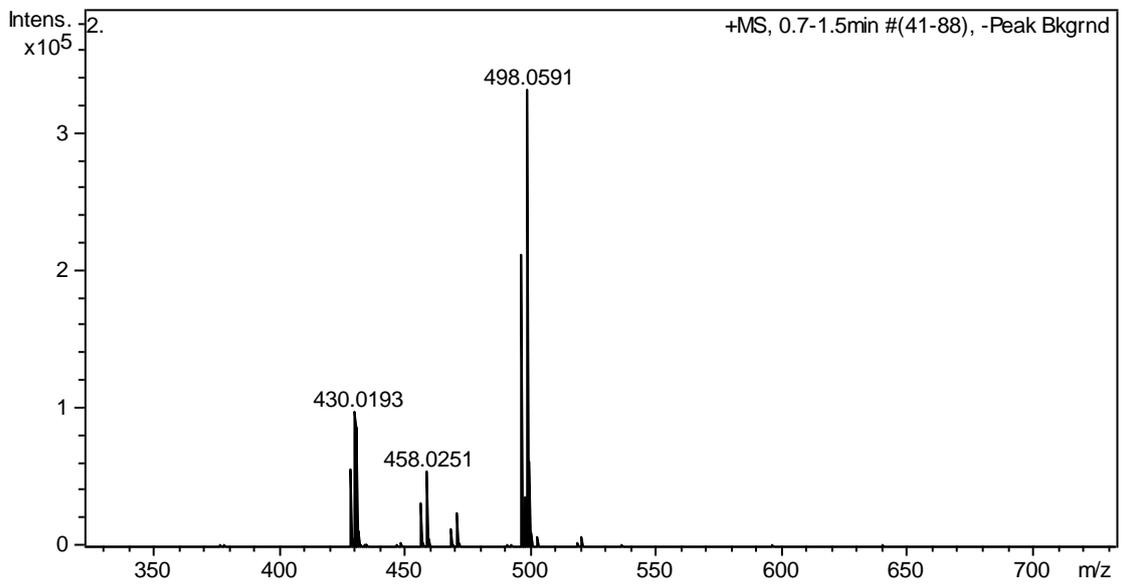
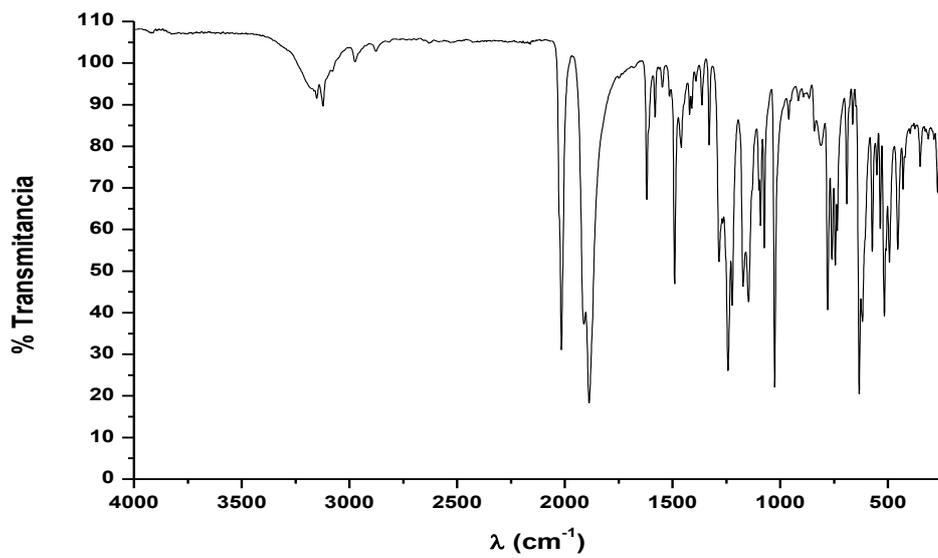


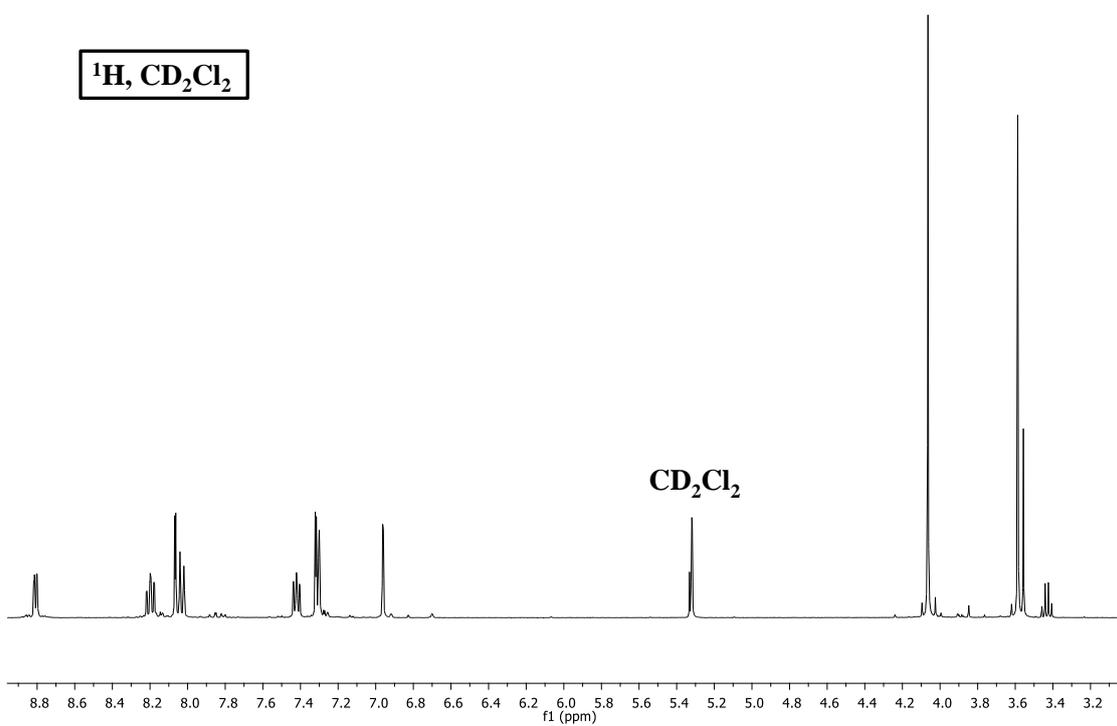
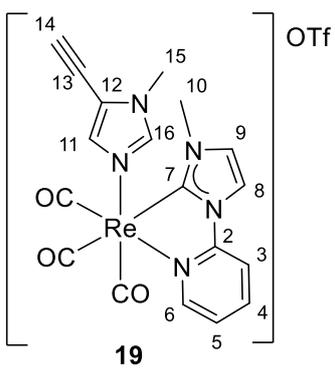
APT, (CD₃)₂CO

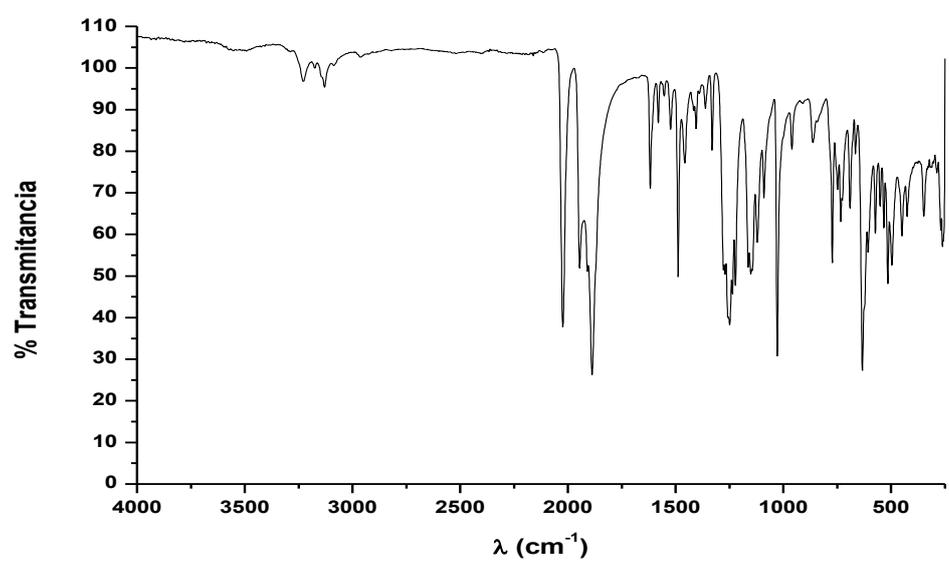
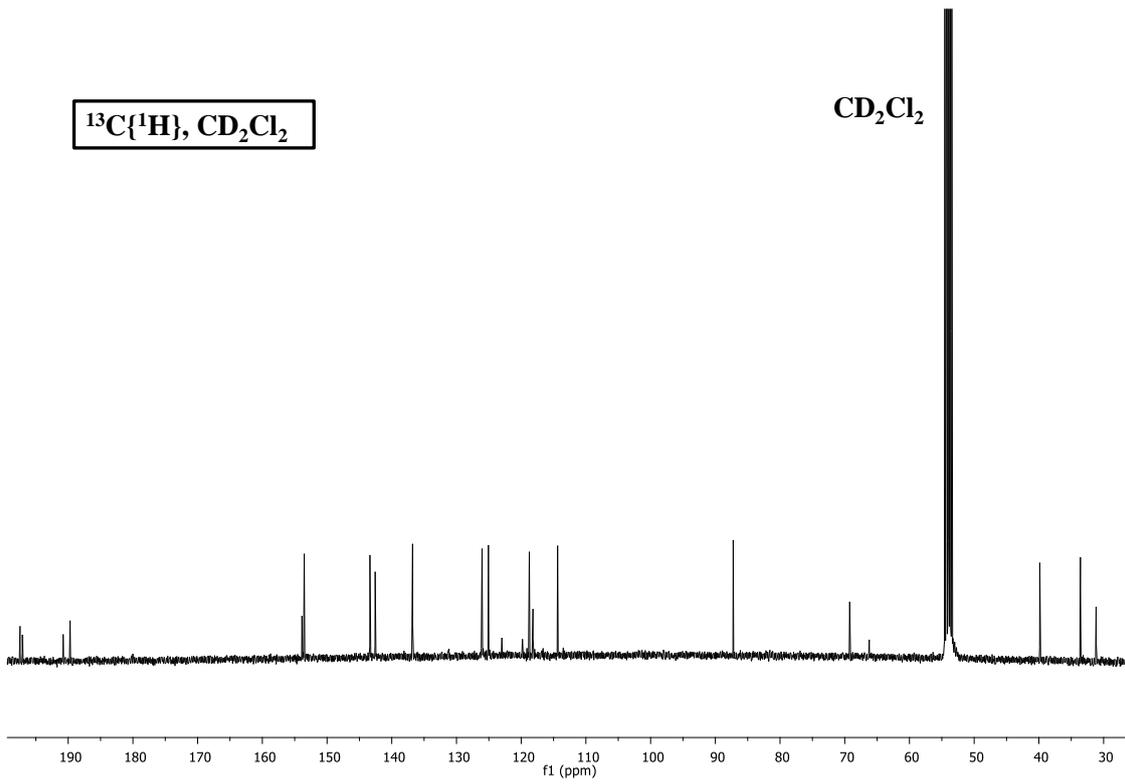


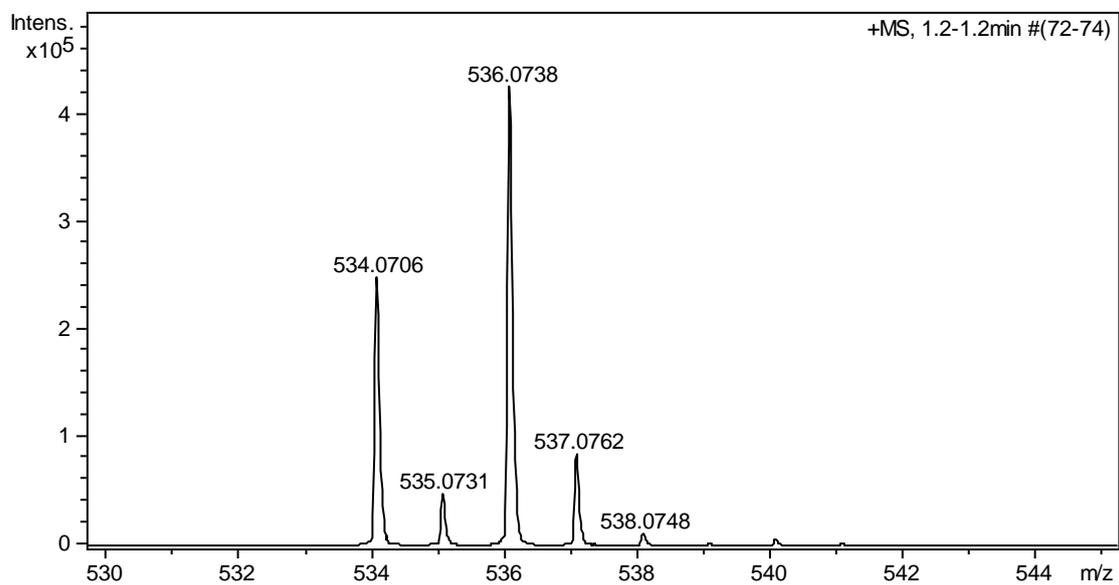
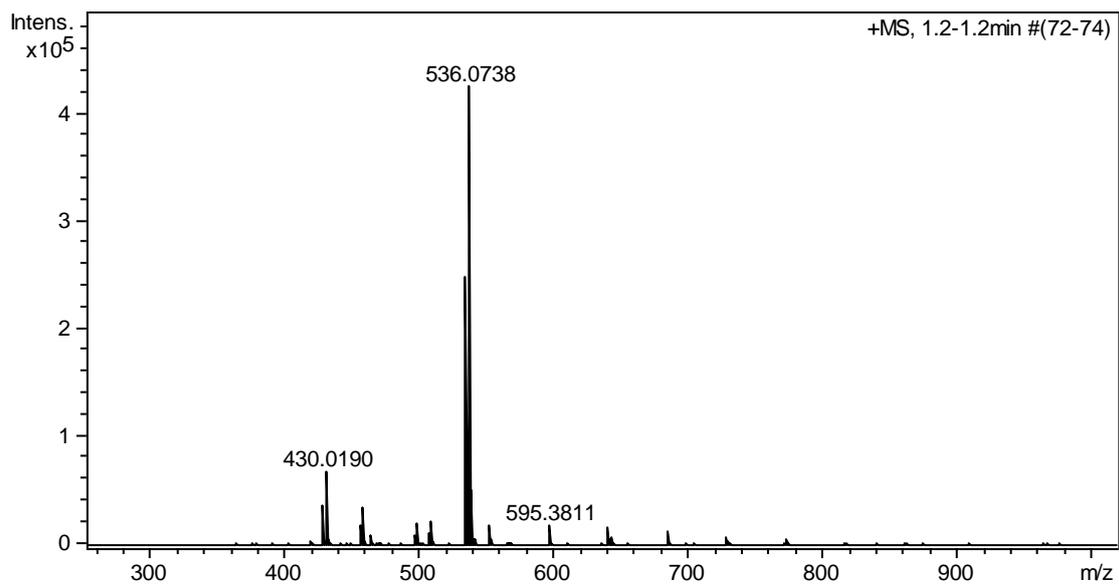












Datos cristalográficos para el complejo 19.

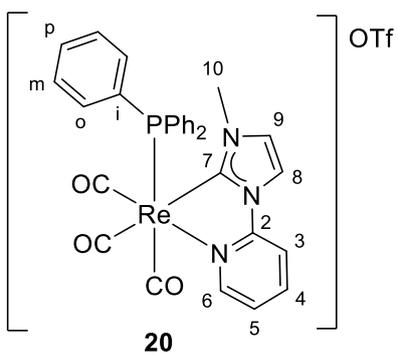
Empirical formula	C ₁₉ H ₁₅ F ₃ N ₅ O ₆ PReS	
Formula weight	684.62	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Monoclinic, P2 ₁ /c	
Unit cell dimensions	a = 15.378(3) Å	alpha = 90°
	b = 9.976(2) Å	beta = 128.841(18)°

	$c = 19.319(7) \text{ \AA}$	$\text{gamma} = 90^\circ$
Volume	2308.43 \AA^3	
Z	4	
Calculated density	1.970 Mg/m^3	
Absorption coefficient	5.425 mm^{-1}	
F(000)	1320	
Crystal size	0.210 x 0.170 x 0.120 mm	
Theta range for data collection	3.392 to 25.24°	
Limiting indices	$-18 \leq h \leq 18, -12 \leq k \leq 12, -22 \leq l \leq 23$	
Reflections collected / unique	12566 / 4278 [R(int) = 0.0224]	
Completeness to theta = 25.24	99.6 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	1.00000 and 0.49705	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F^2	
Data / restraints / parameters	4278 / 0 / 318	
Goodness-of-fit on F^2	1.098	
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0241, wR2 = 0.0265	
R indices (all data)	R1 = 0.0593, wR2 = 0.0602	
Largest diff. peak and hole	1.097 and -0.477 e. \AA^{-3}	

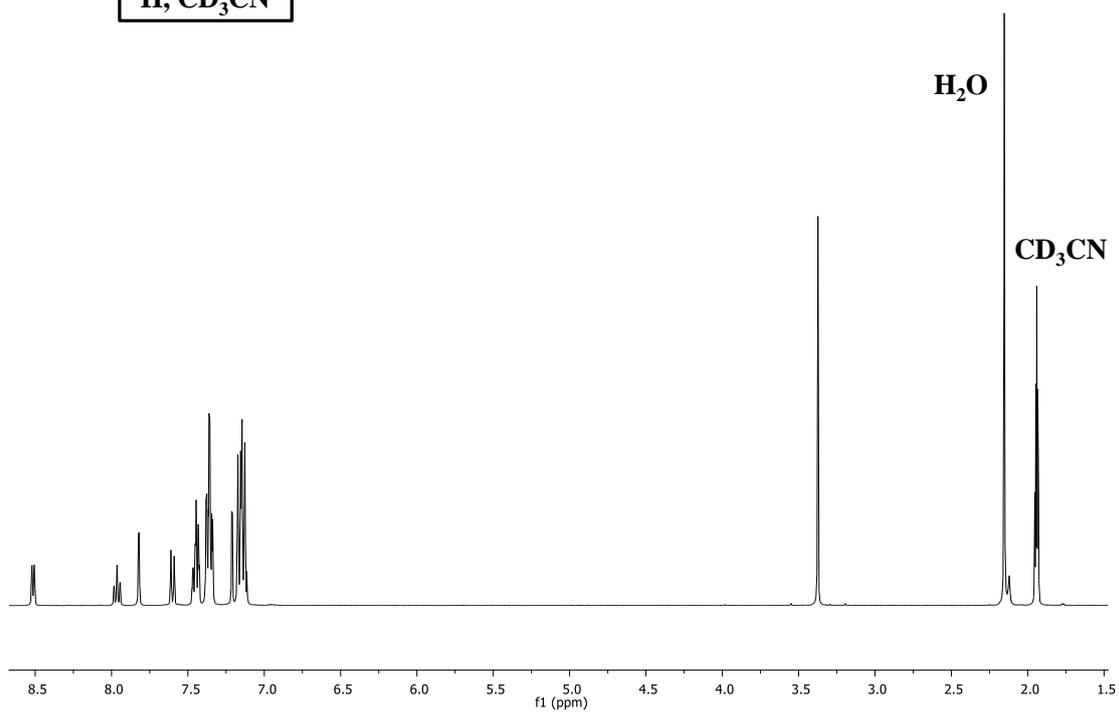
Distancias de enlace [\AA] y ángulos [°] seleccionados para el complejo 19.

Re(1)-C(1)	1.921(4)	C(4)-Re(1)-N(3)	74.9(2)
Re(1)-C(3)	1.906(4)	O(1)-C(1)-Re(1)	179.1(4)
Re(1)-C(2)	1.968(6)	O(2)-C(2)-Re(1)	176.7(4)
Re(1)-C(4)	2.135(6)	O(3)-C(3)-Re(1)	177.4(4)
Re(1)-N(3)	2.192(4)	C(15)-C(17)-C(18)	177.2(6)
Re(1)-N(4)	2.181(3)		
O(1)-C(1)	1.141(5)		
O(2)-C(2)	1.146(7)		

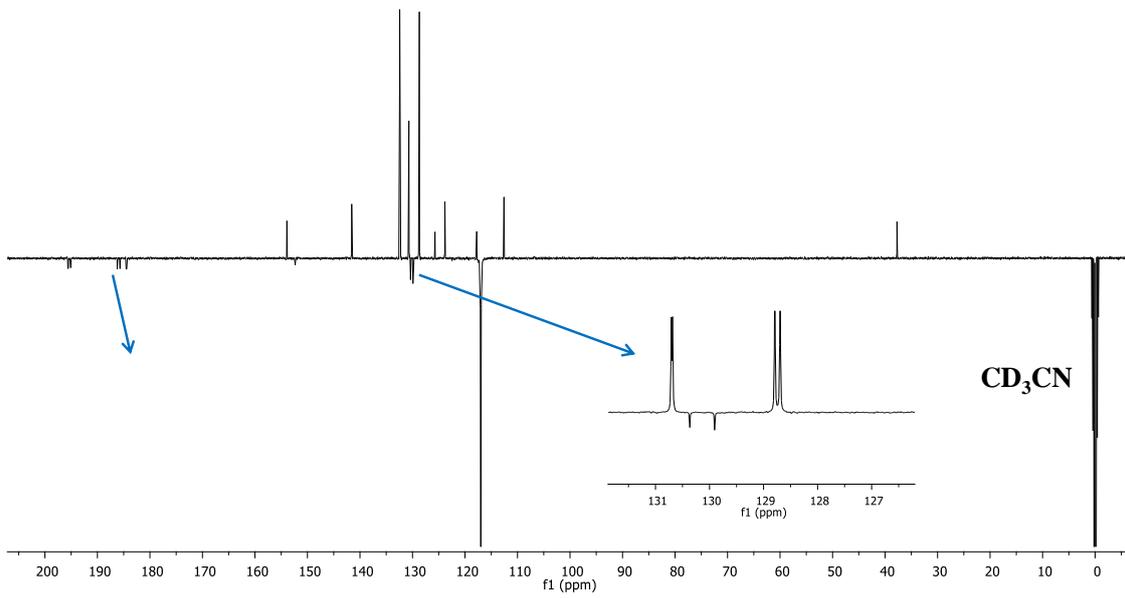
O(3)-C(3) 1.155(6)
C(17)-C(18) 1.18(1)



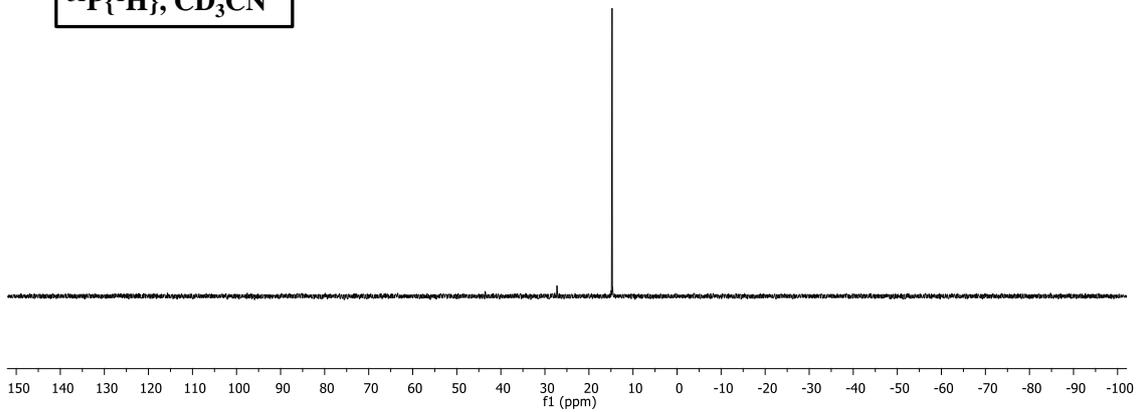
¹H, CD₃CN

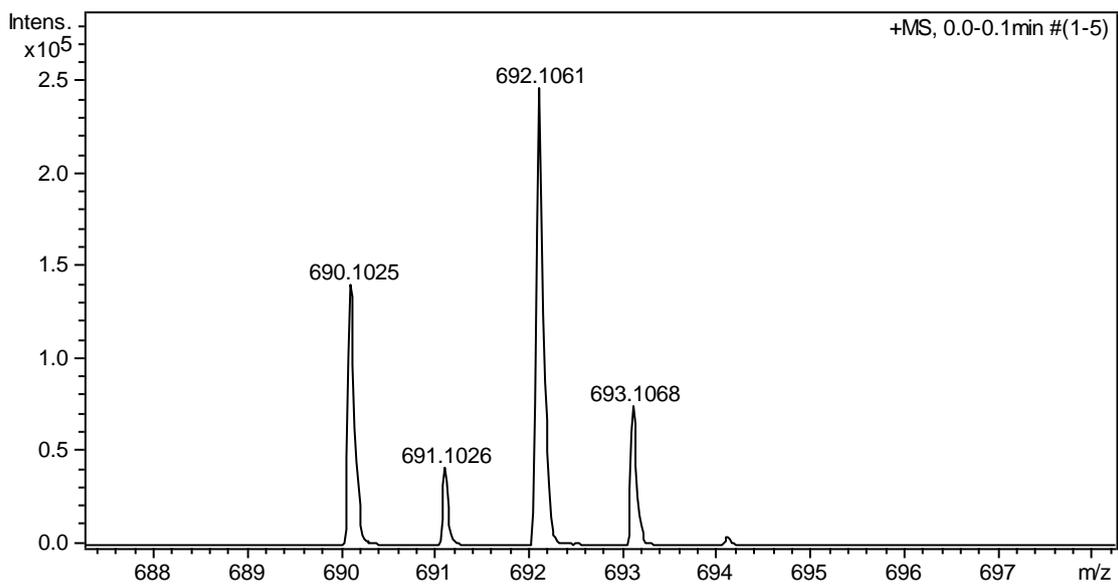
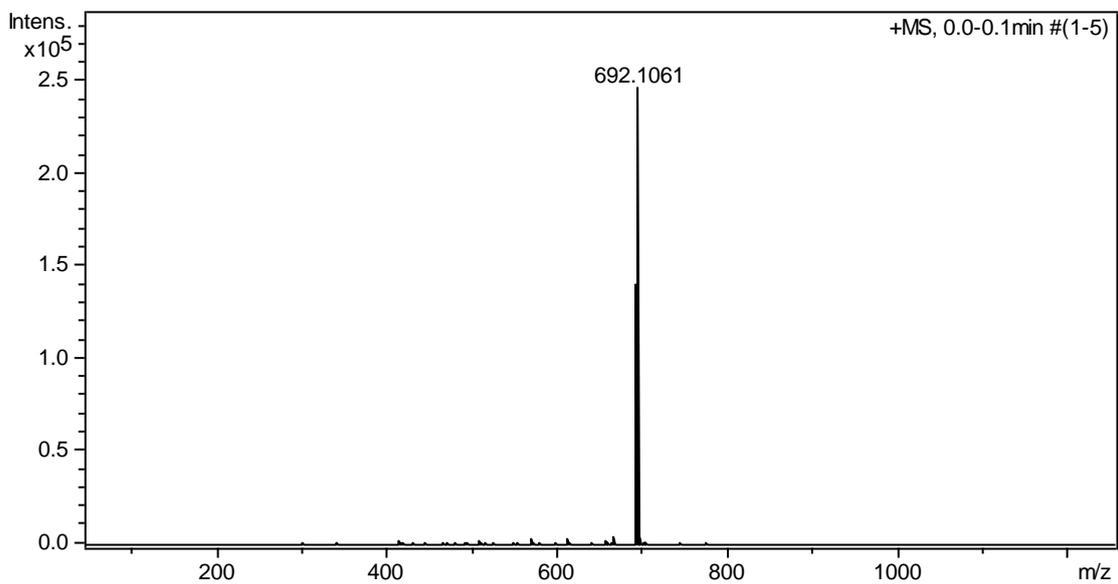
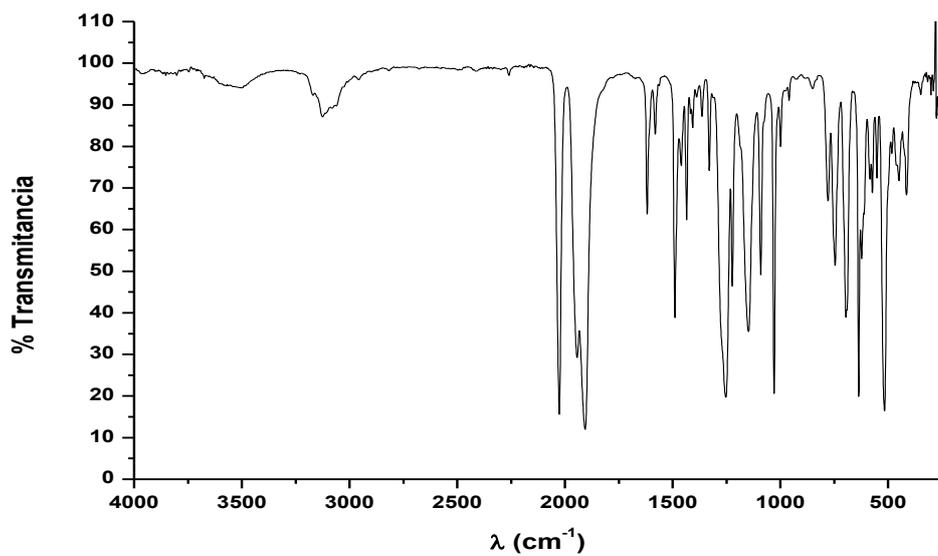


APT, CD₃CN



³¹P{¹H}, CD₃CN





Datos cristalográficos para el complejo 20.

Empirical formula	C ₃₁ H ₂₄ F ₃ N ₃ O ₆ PrES	
Formula weight	840.76	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Orthorhombic, Pca2 ₁	
Unit cell dimensions	a = 17.5445(13) Å b = 9.1090(7) Å c = 19.0835(15) Å	alpha = 90° beta = 90° gamma = 90°
Volume	3049.8(4) Å ³	
Z	4	
Calculated density	1.831 Mg/m ³	
Absorption coefficient	4.174 mm ⁻¹	
F(000)	1648	
Crystal size	0.32 x 0.22 x 0.05 mm	
Theta range for data collection	2.13 to 25.49°	
Limiting indices	-15 ≤ h ≤ 21, -11 ≤ k ≤ 11, -23 ≤ l ≤ 23	
Reflections collected / unique	25095 / 5663 [R(int) = 0.0427]	
Completeness to theta = 25.49	100.0 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.8185 and 0.3485	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	5663 / 1 / 416	
Goodness-of-fit on F ²	0.963	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0203, wR2 = 0.0425	

R indices (all data)

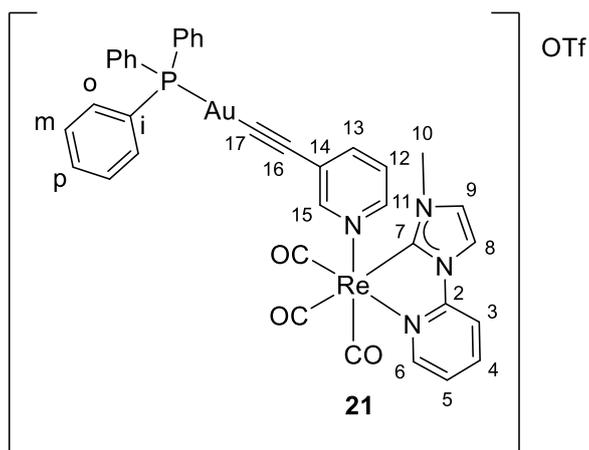
R1 = 0.0276, wR2 = 0.0448

Largest diff. peak and hole

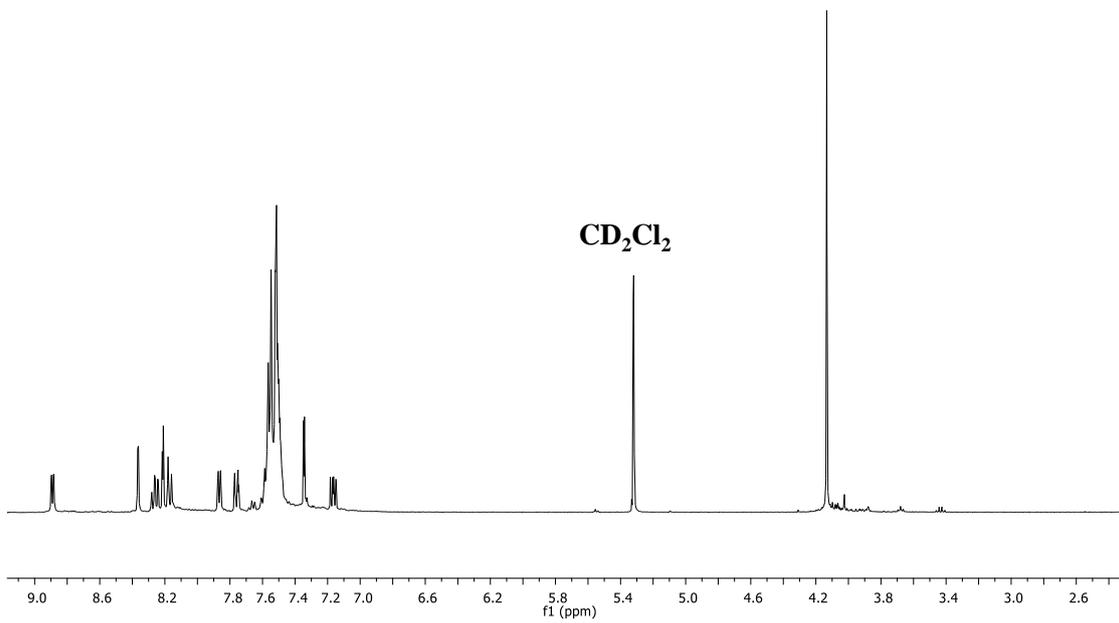
1.252 and -0.442 e. Å⁻³

Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] seleccionados para el complejo 20.

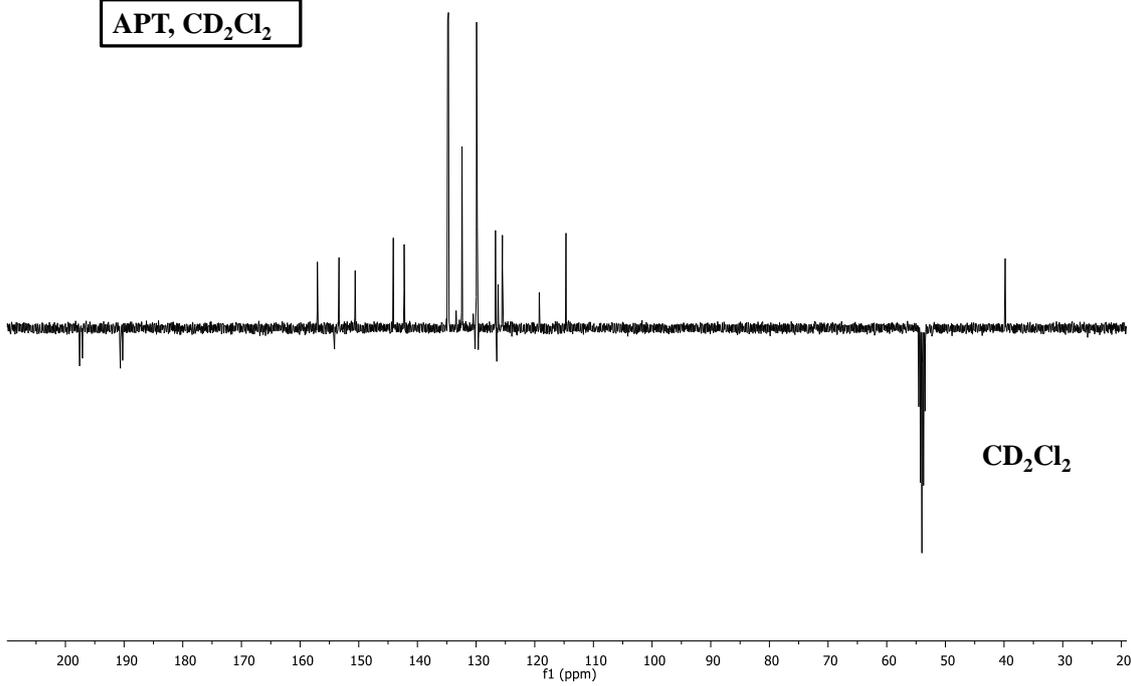
Re(1)-C(1)	1.926(4)	C(4)-Re(1)-N(3)	74.37(18)
Re(1)-C(3)	1.954(4)	O(1)-C(1)-Re(1)	175.1(4)
Re(1)-C(2)	1.955(4)	O(2)-C(2)-Re(1)	178.7(4)
Re(1)-C(4)	2.133(4)	O(3)-C(3)-Re(1)	176.5(3)
Re(1)-N(3)	2.198(3)		
Re(1)-P(1)	2.4848(11)		
O(1)-C(1)	1.154(5)		
O(2)-C(2)	1.153(5)		
O(3)-C(3)	1.139(5)		



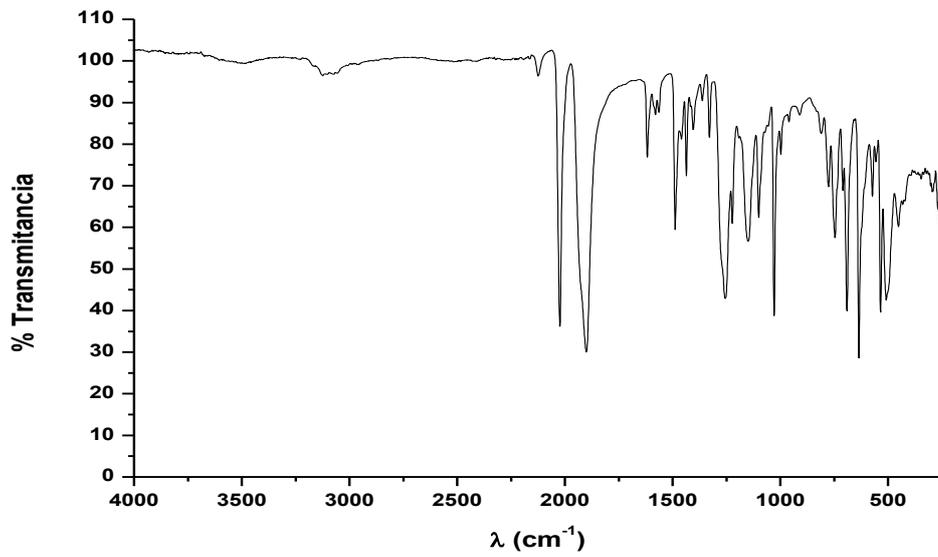
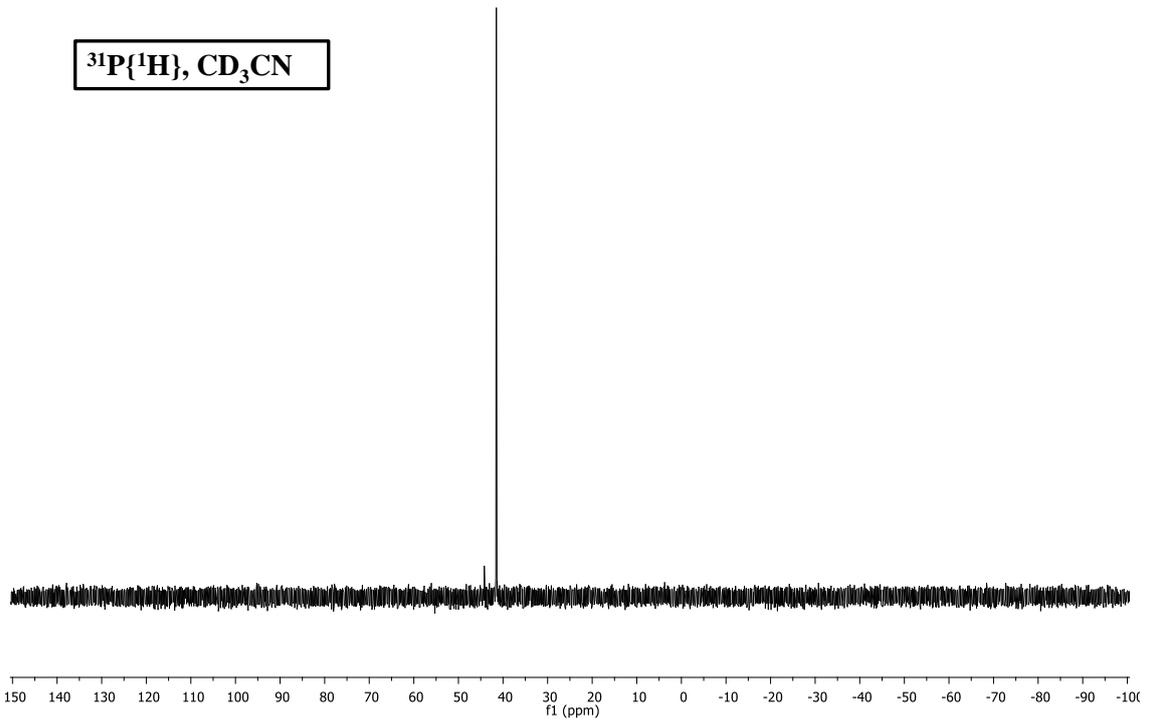
^1H , CD_2Cl_2



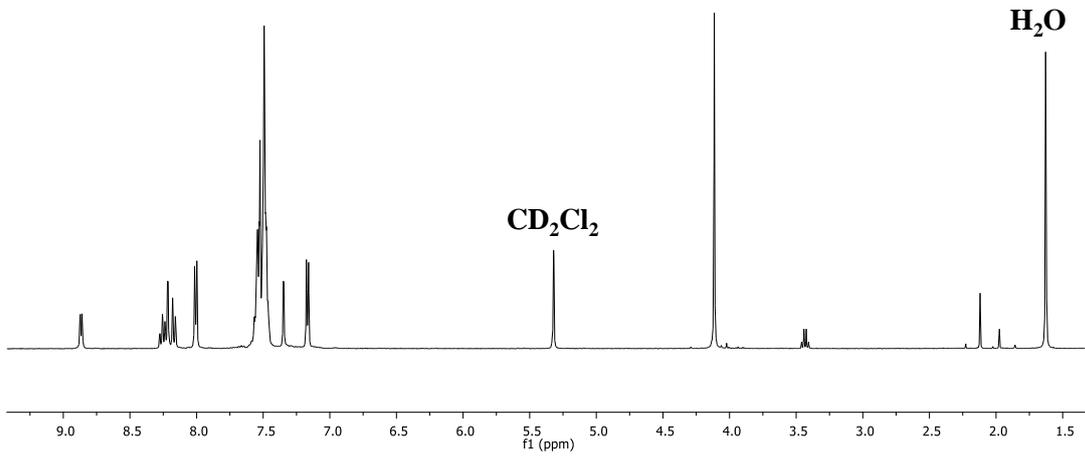
APT, CD_2Cl_2



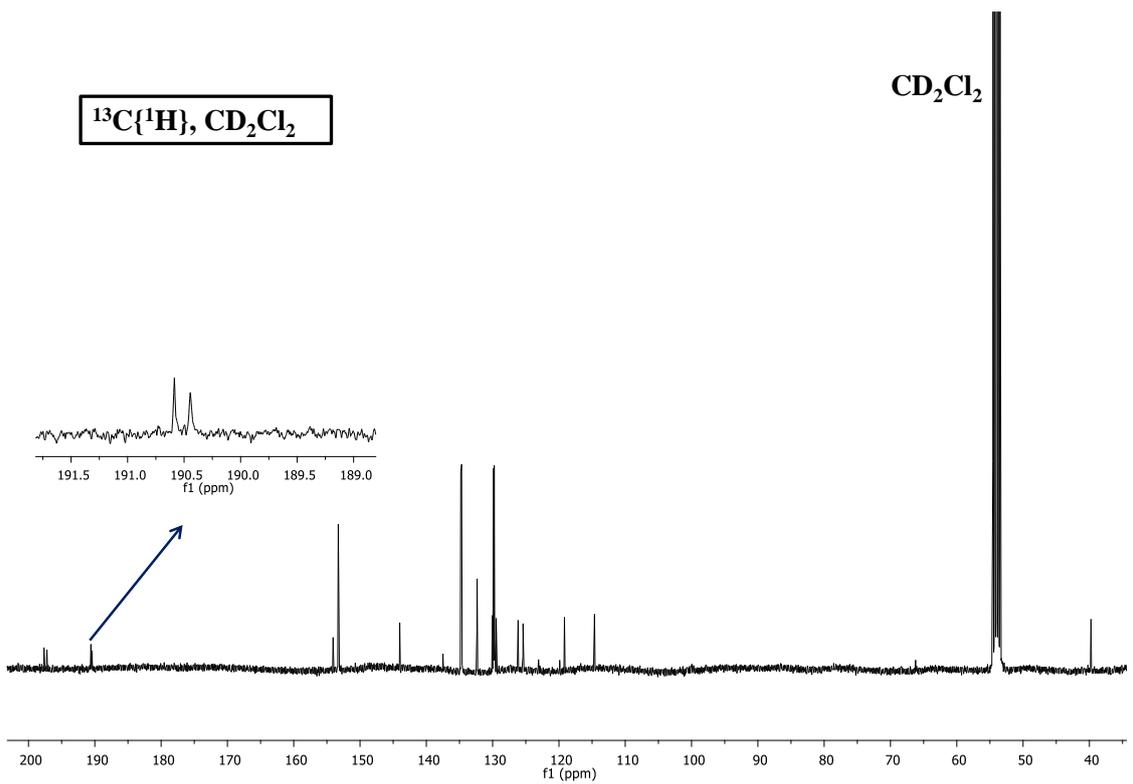
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}, \text{CD}_3\text{CN}$



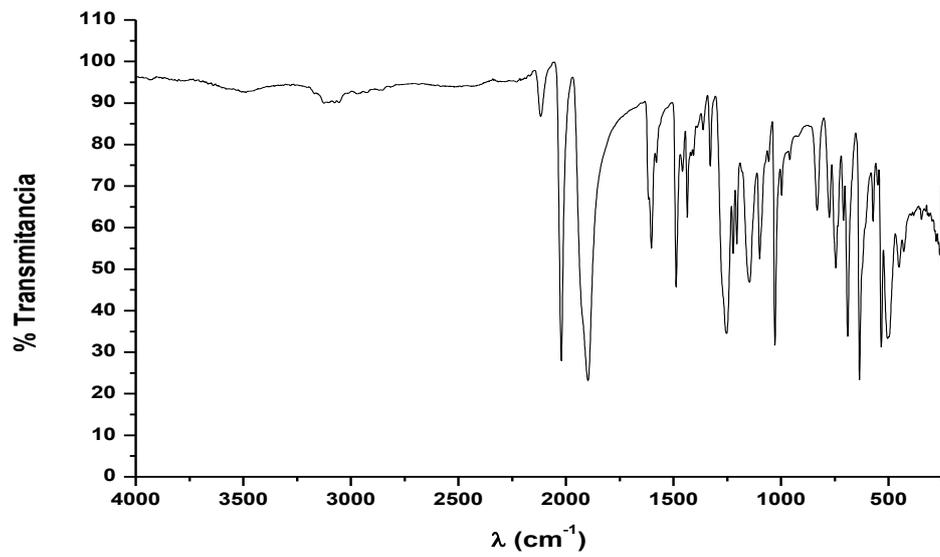
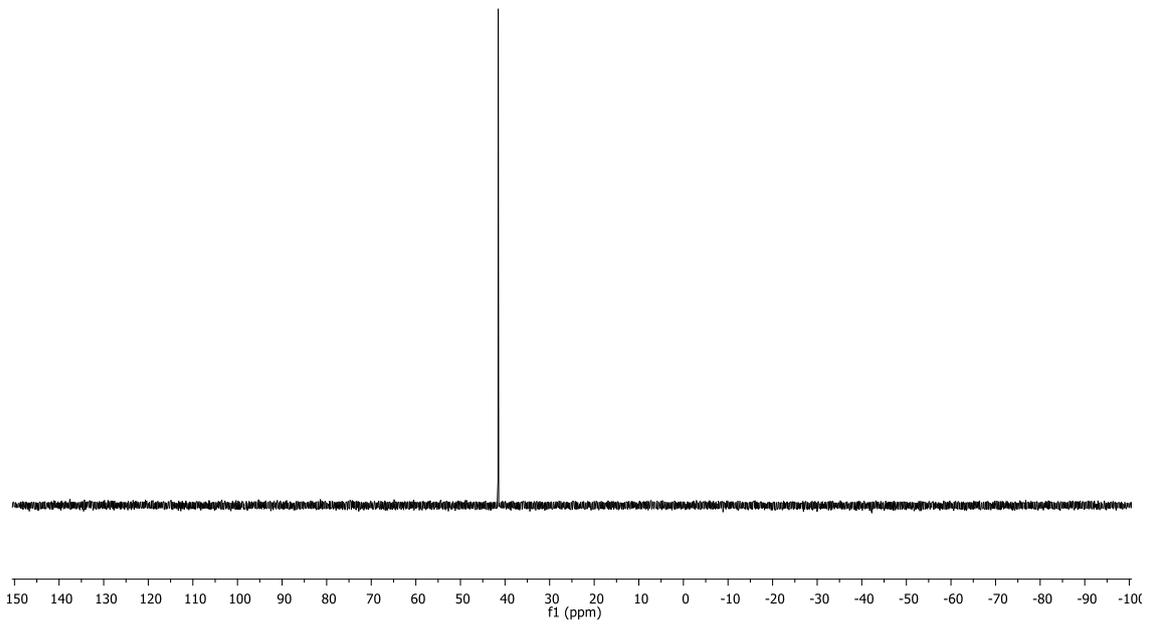
^1H , CD_2Cl_2

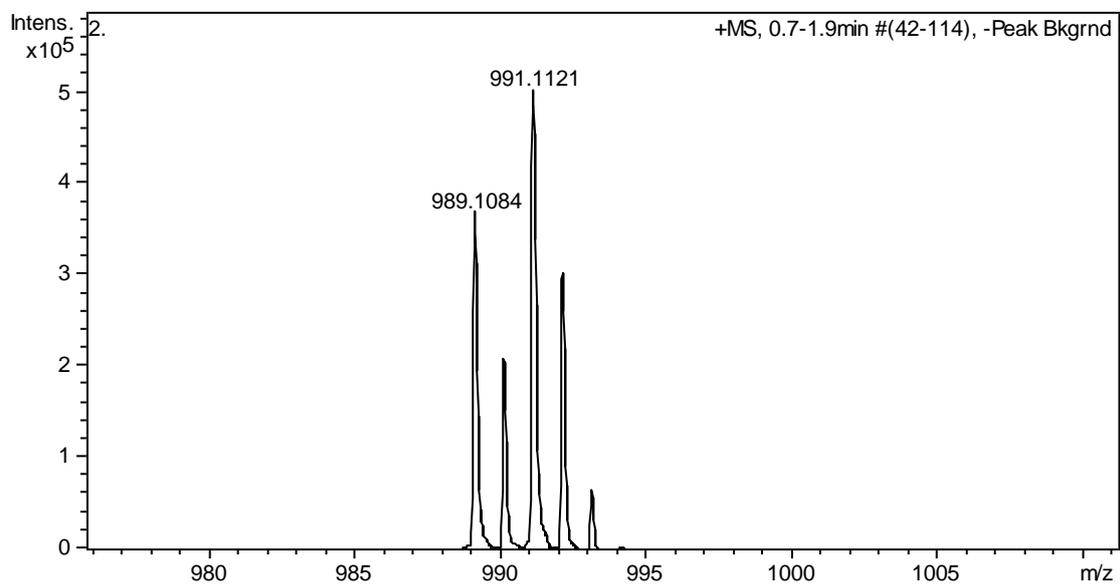
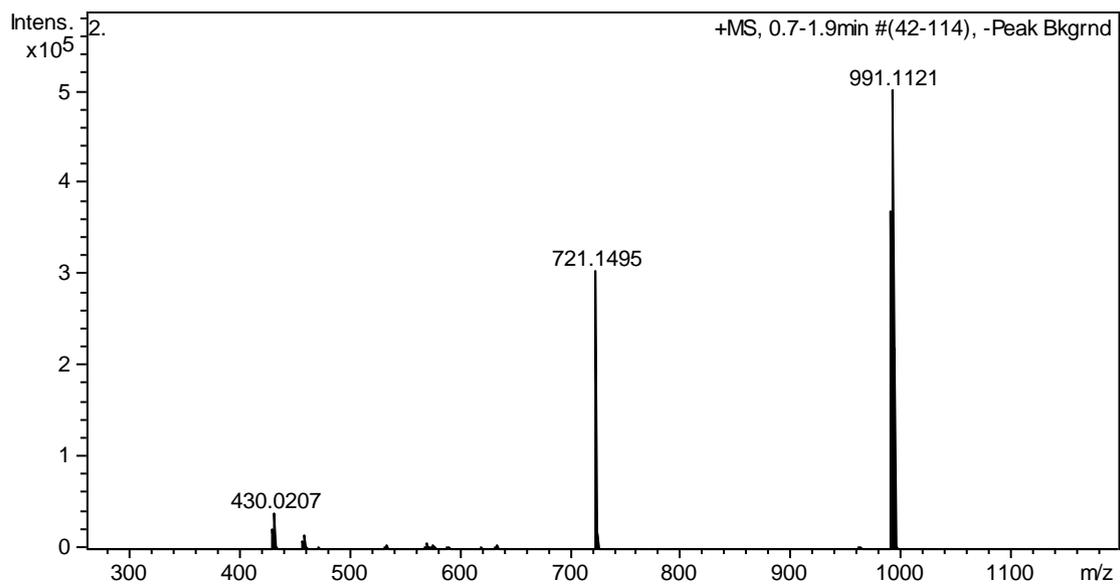


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, CD_2Cl_2

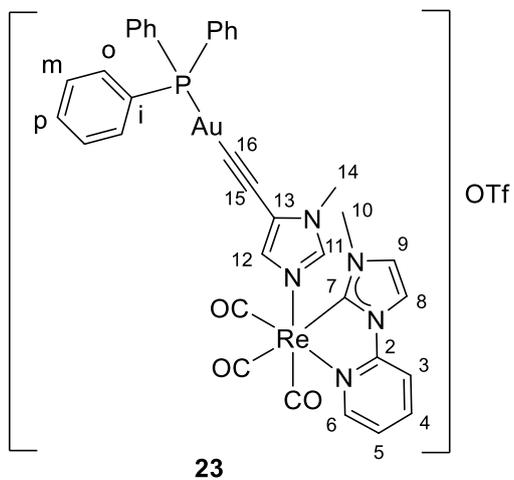


$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}, \text{CD}_2\text{Cl}_2$

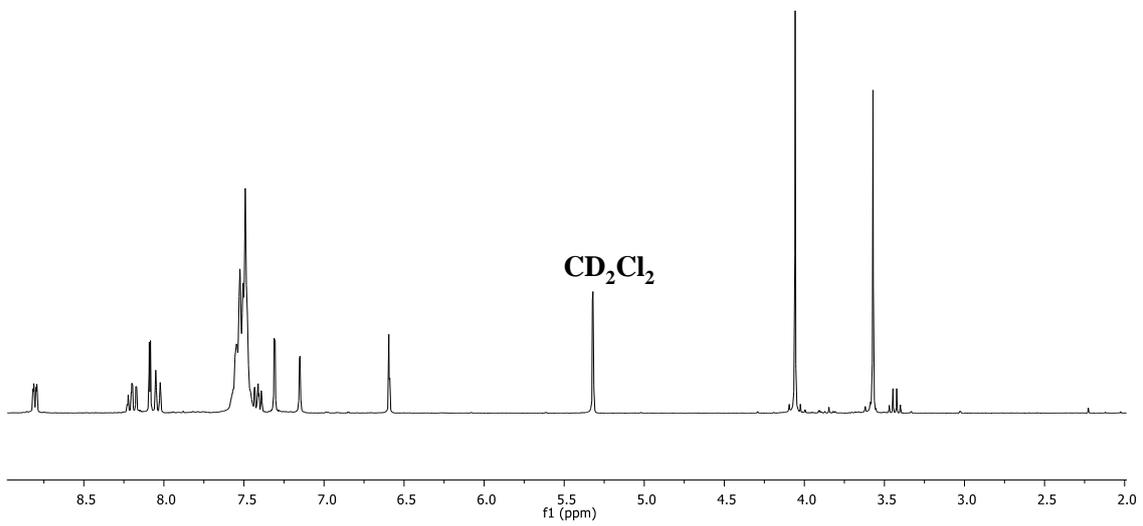




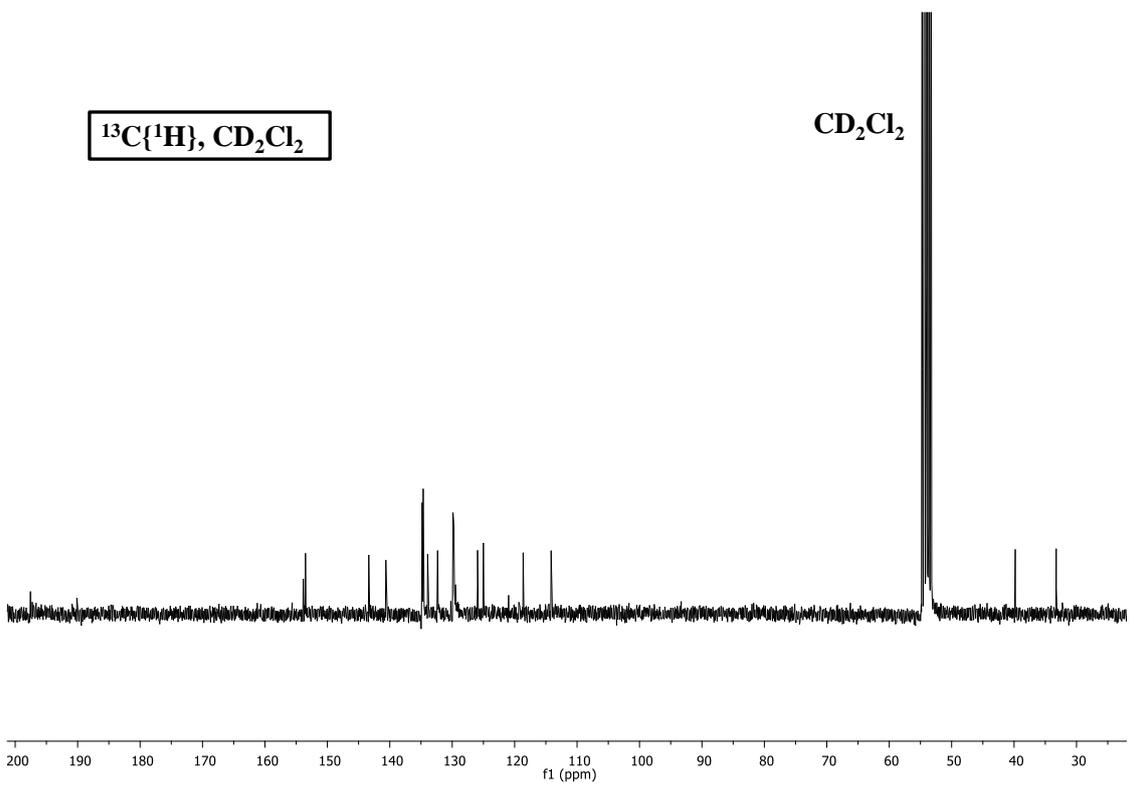
AL-075



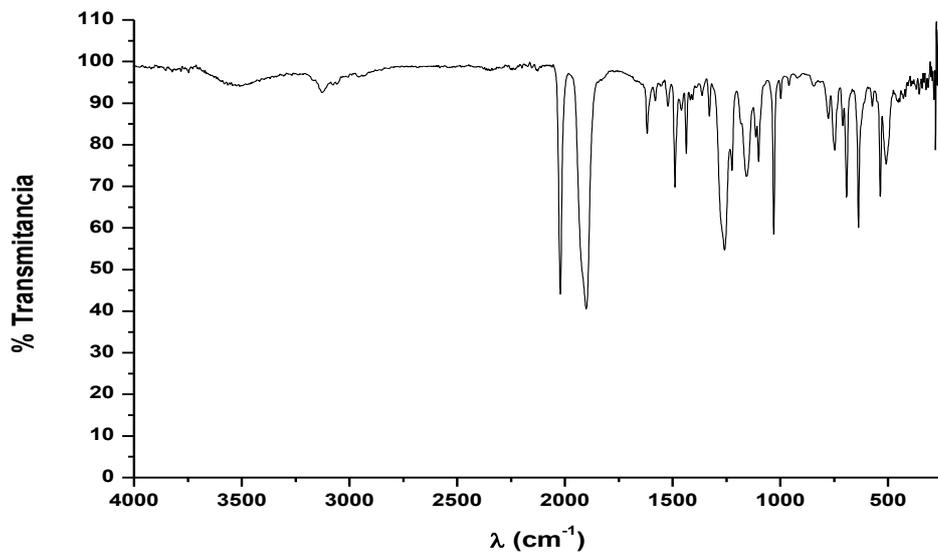
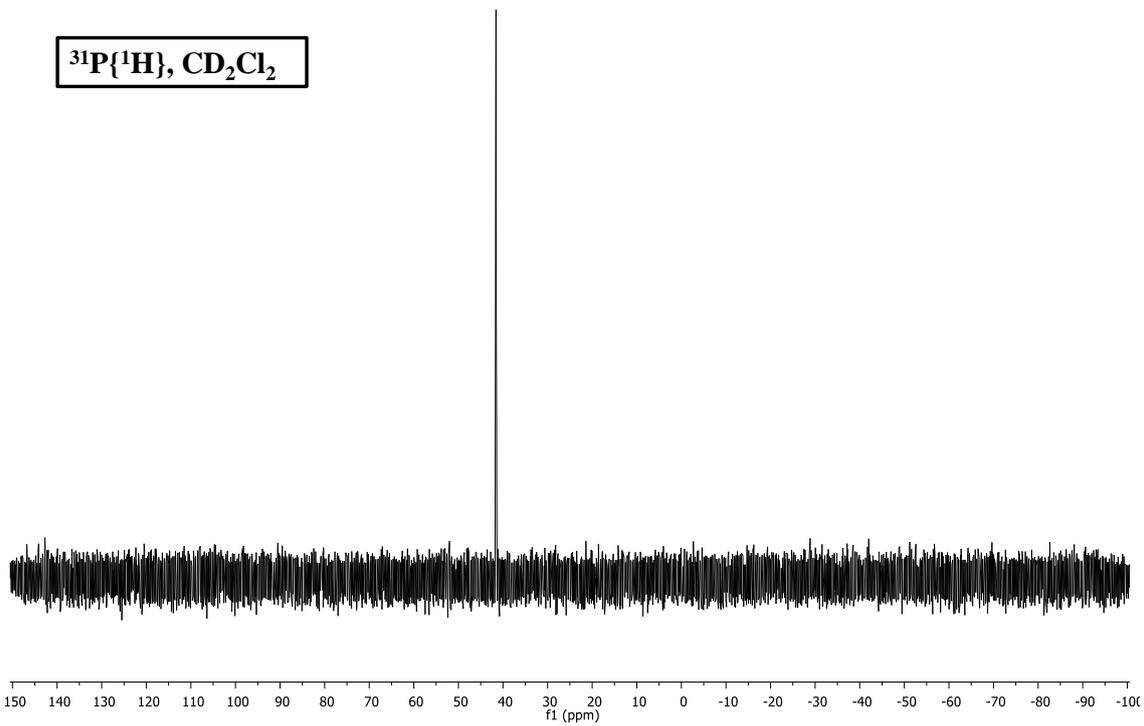
^1H , CD_2Cl_2

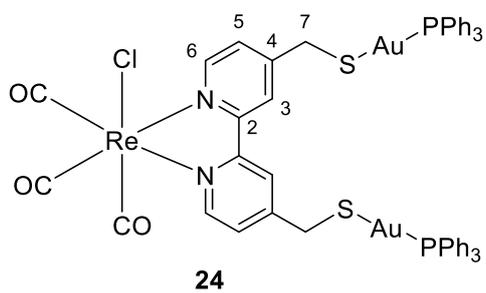
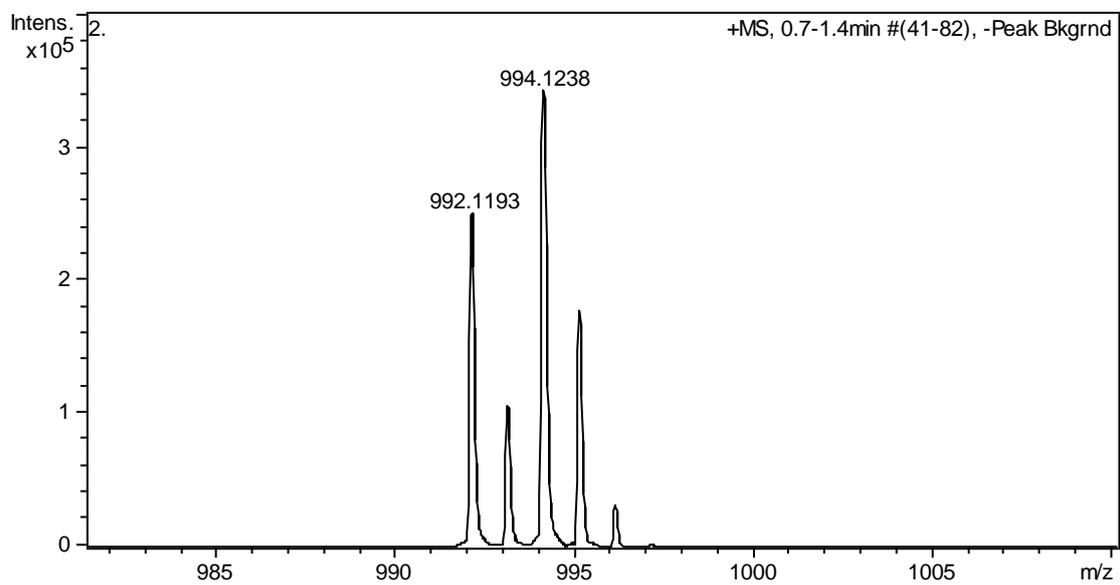
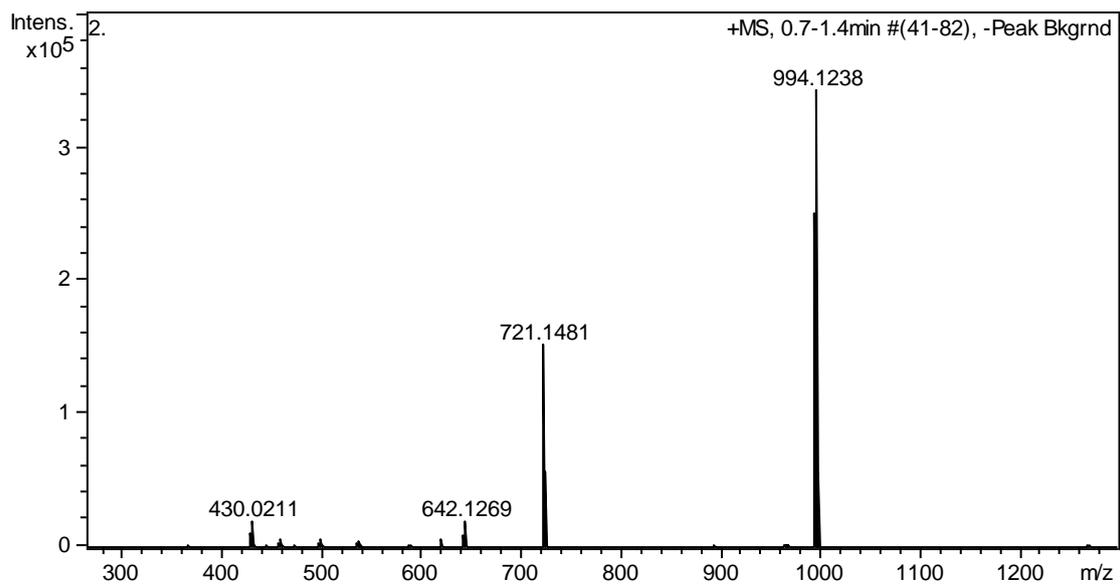


$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$, CD_2Cl_2

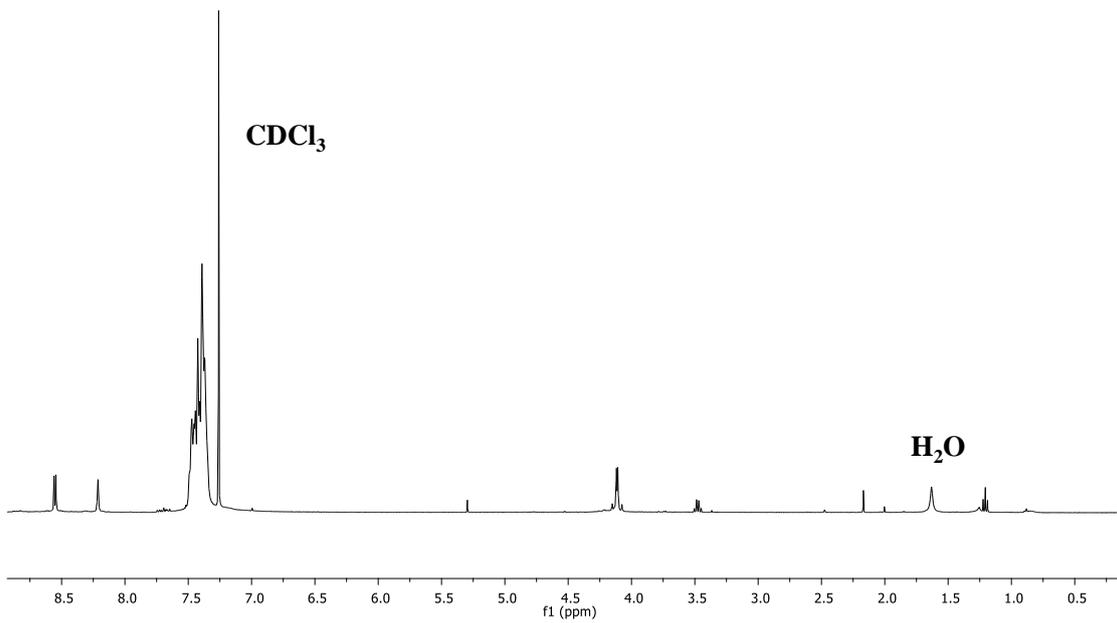


$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}, \text{CD}_2\text{Cl}_2$

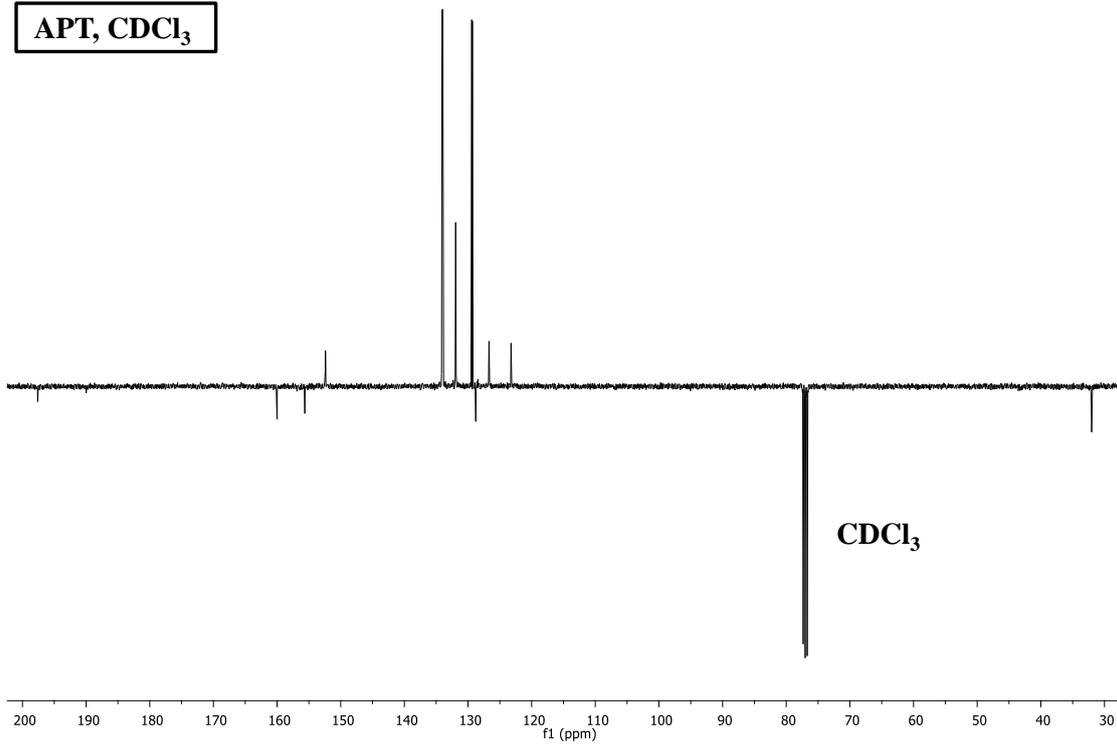




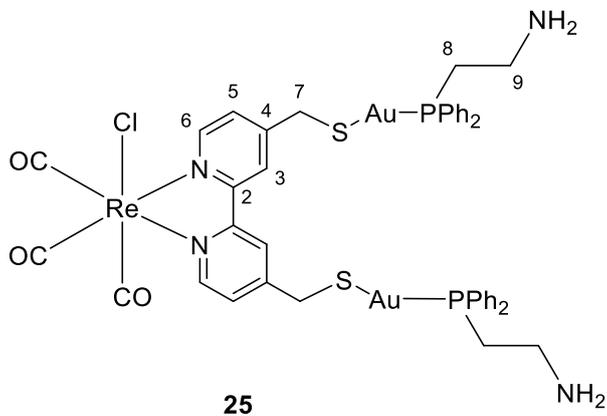
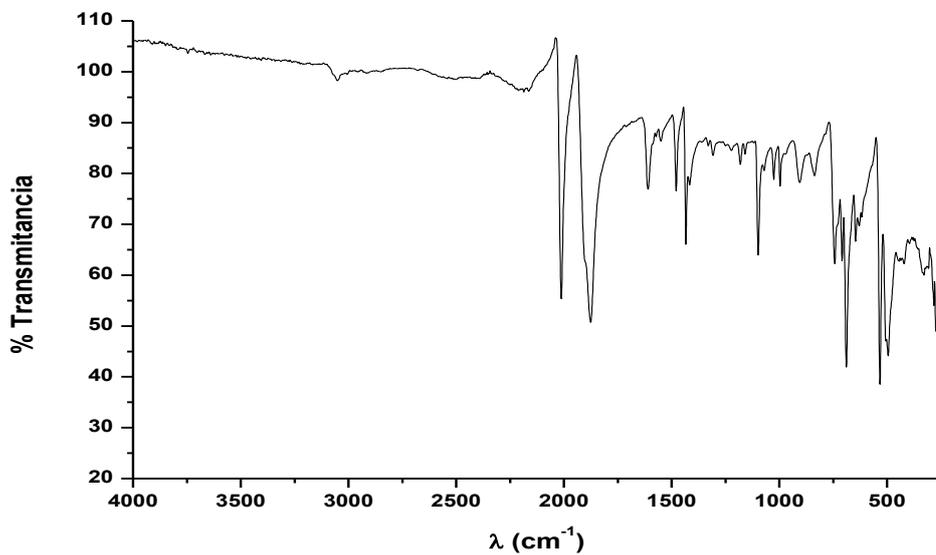
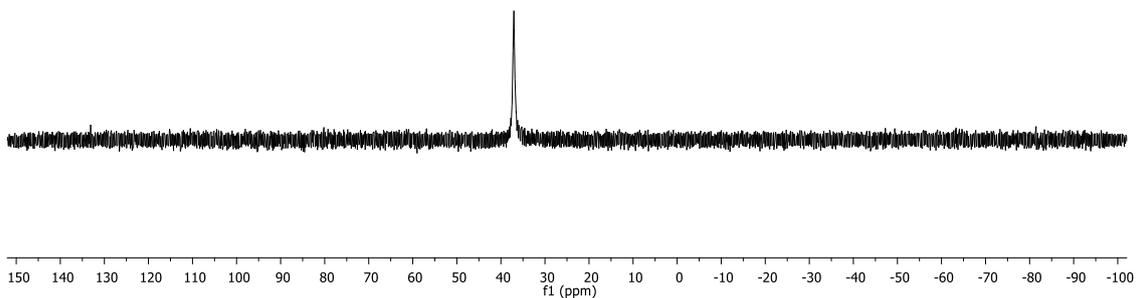
^1H , CDCl_3

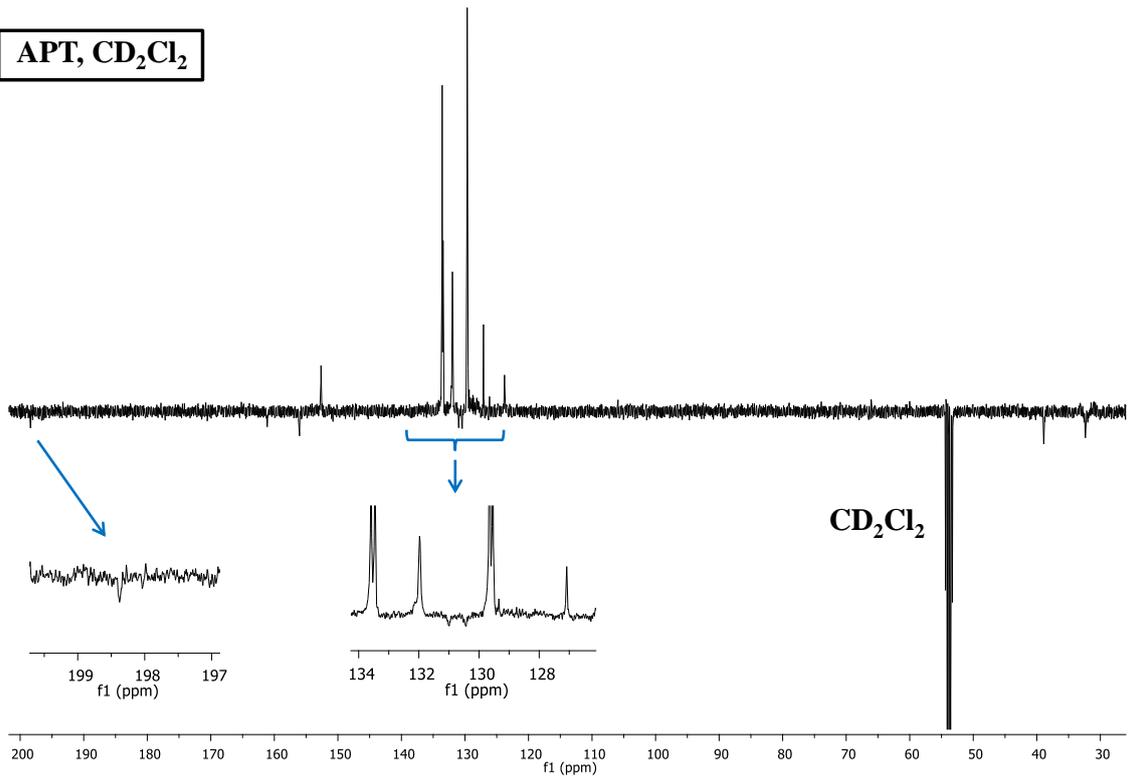
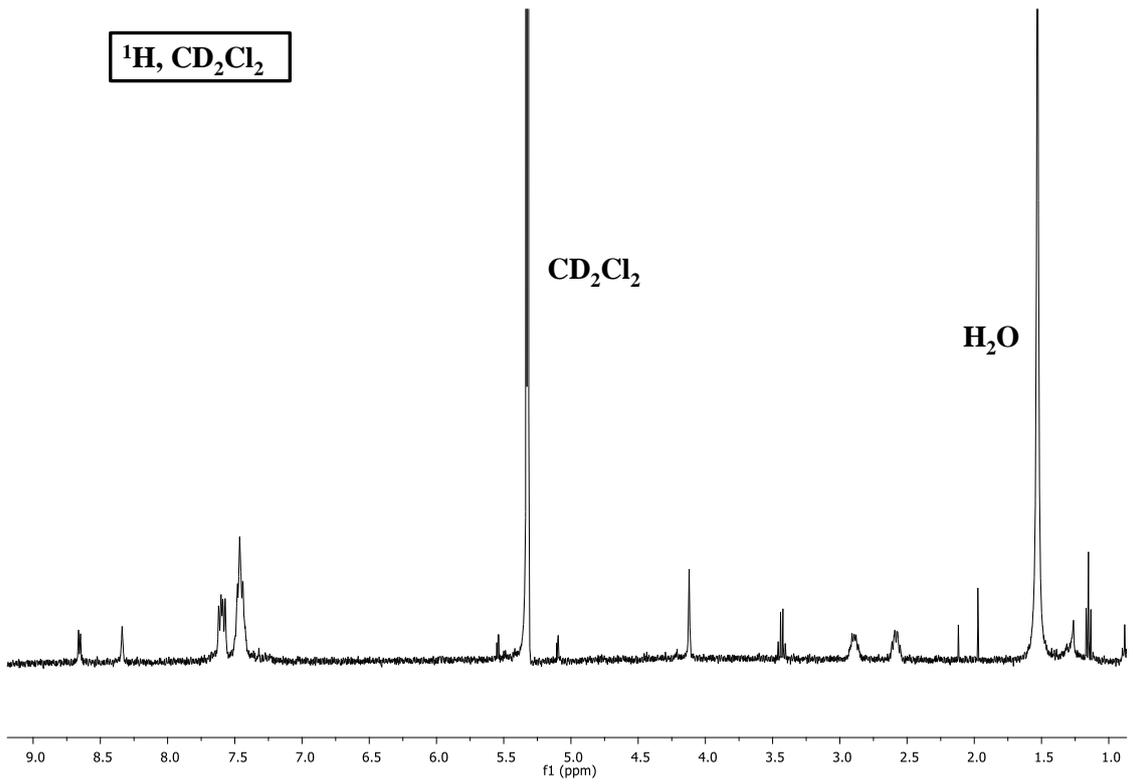


APT, CDCl_3

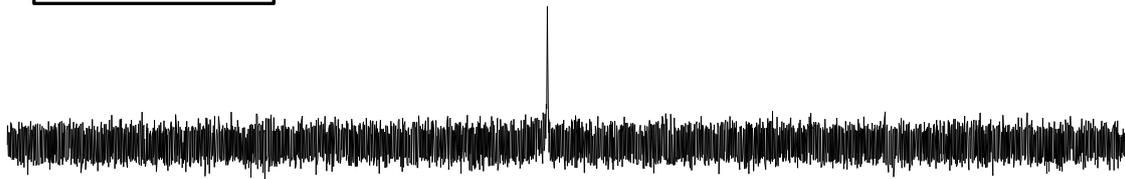


$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}, \text{CDCl}_3$

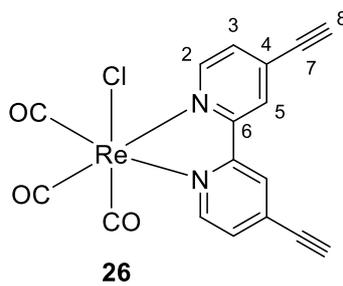
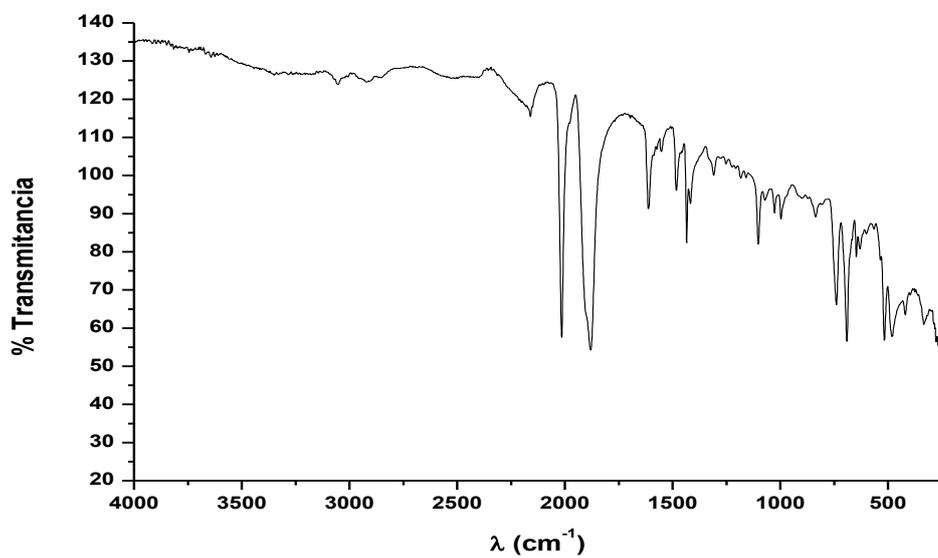


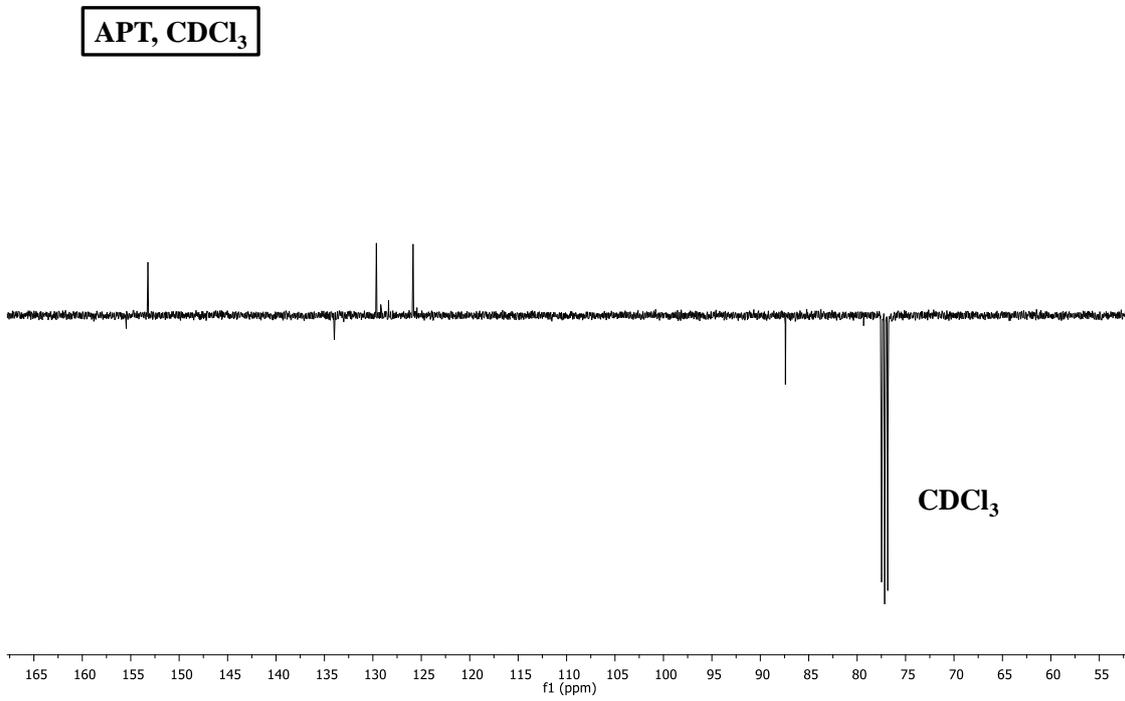
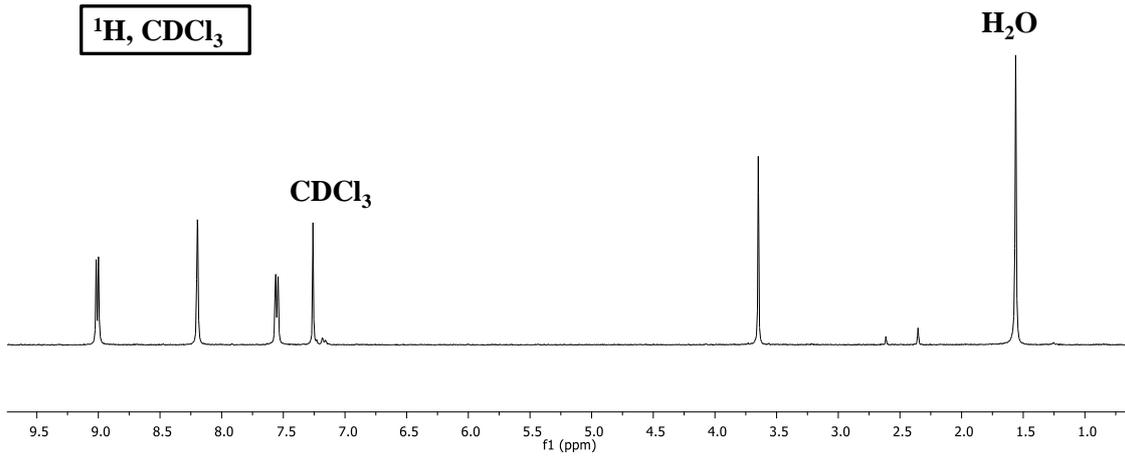


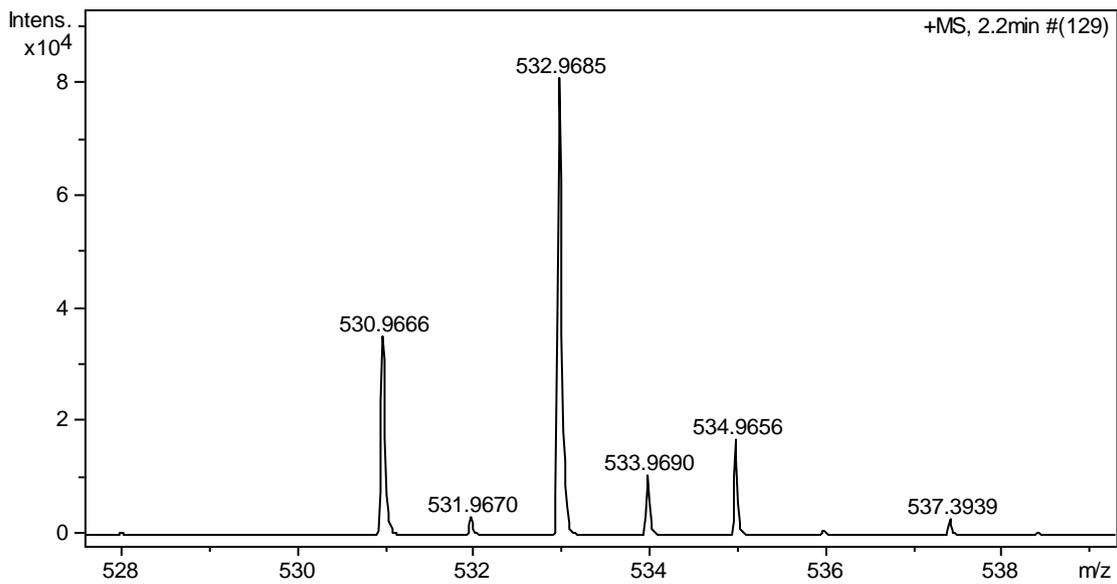
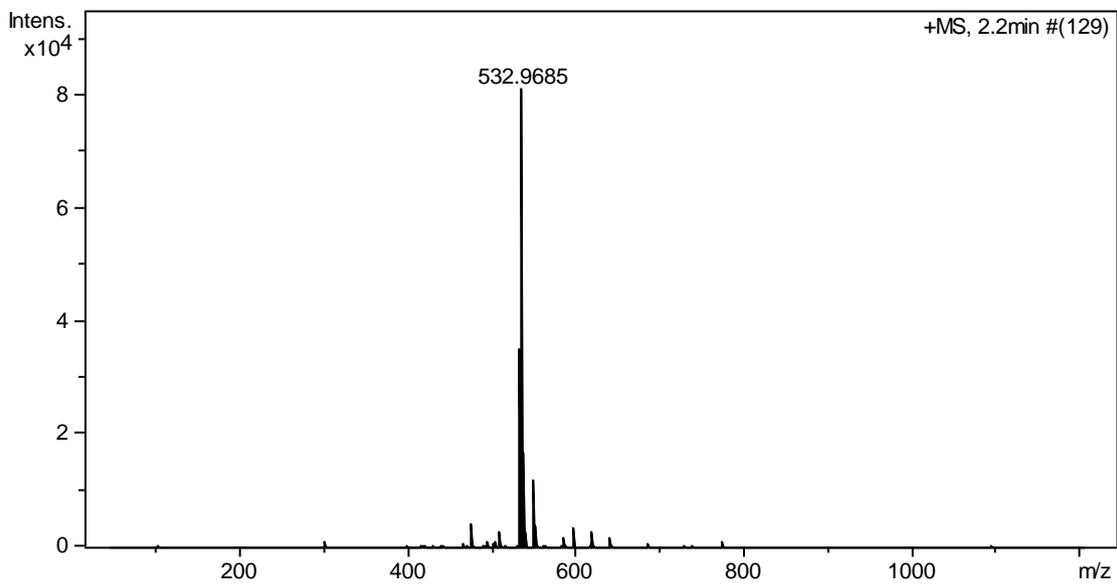
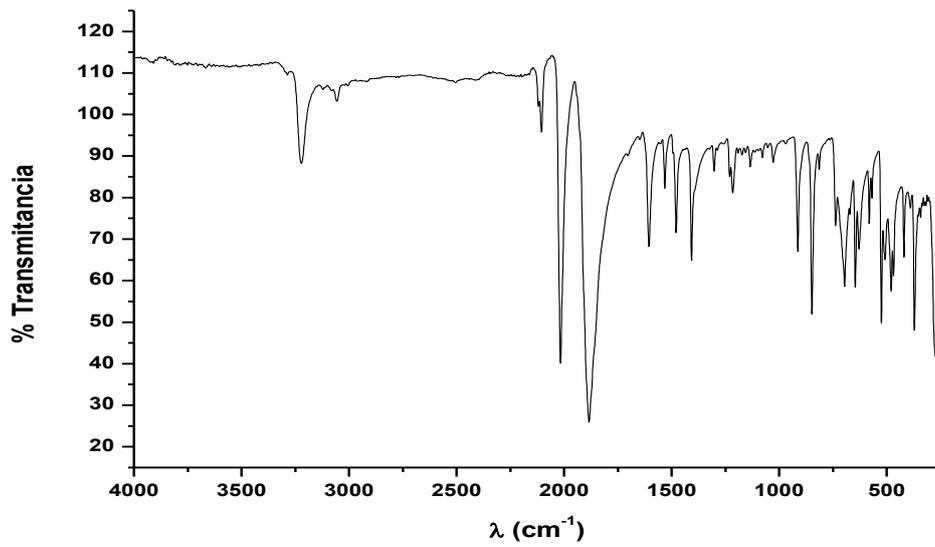
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}, \text{CD}_2\text{Cl}_2$



150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10 -20 -30 -40 -50 -60 -70 -80 -90 -100
f1 (ppm)







Datos cristalográficos para el complejo 26.

Empirical formula	C _{17.5} H _{8.5} Cl _{2.5} N ₂ O ₃ Re	
Formula weight	1738.02	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Monoclinic, C2/c	
Unit cell dimensions	a = 24.659(3) Å b = 8.7831(12) Å c = 18.790(3) Å	alpha = 90° beta = 115.732° gamma = 90°
Volume	3666.02 Å ³	
Z	8	
Calculated density	2.064 Mg/m ³	
Absorption coefficient	7.013 mm ⁻¹	
F(000)	2152	
Crystal size	0.300 x 0.200 x 0.160 mm	
Theta range for data collection	1.834 to 25.24 deg.	
Limiting indices	-29<=h<=29, -10<=k<=10, -22<=l<=22	
Reflections collected / unique	11712 / 3414 [R(int) = 0.0341]	
Completeness to theta = 25.50	99.8 %	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents	
Max. and min. transmission	0.3968 and 0.2250	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3414 / 6 / 240	
Goodness-of-fit on F ²	1.138	
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0222, wR2 = 0.0283	

R indices (all data)

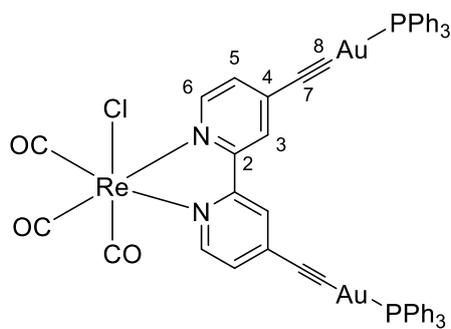
R1 = 0.0451, wR2 = 0.0464

Largest diff. peak and hole

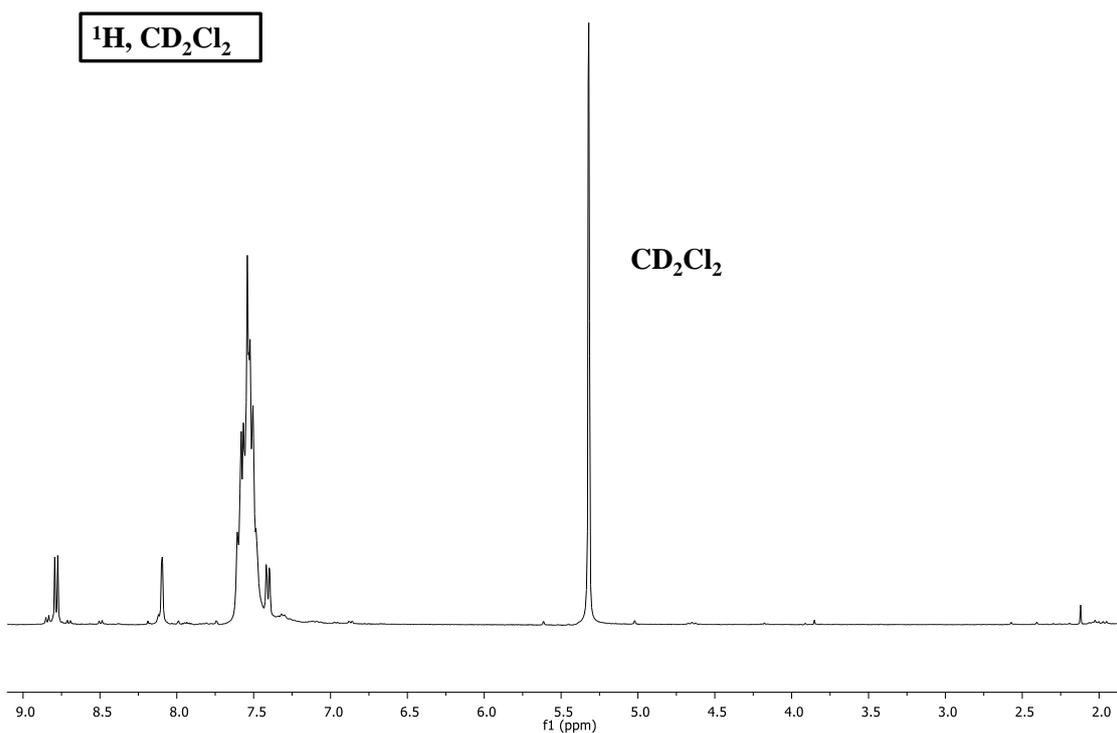
1.539 and -0.821 e. Å⁻³

Longitudes de enlace [Å] y ángulos [°] seleccionados para el complejo 26.

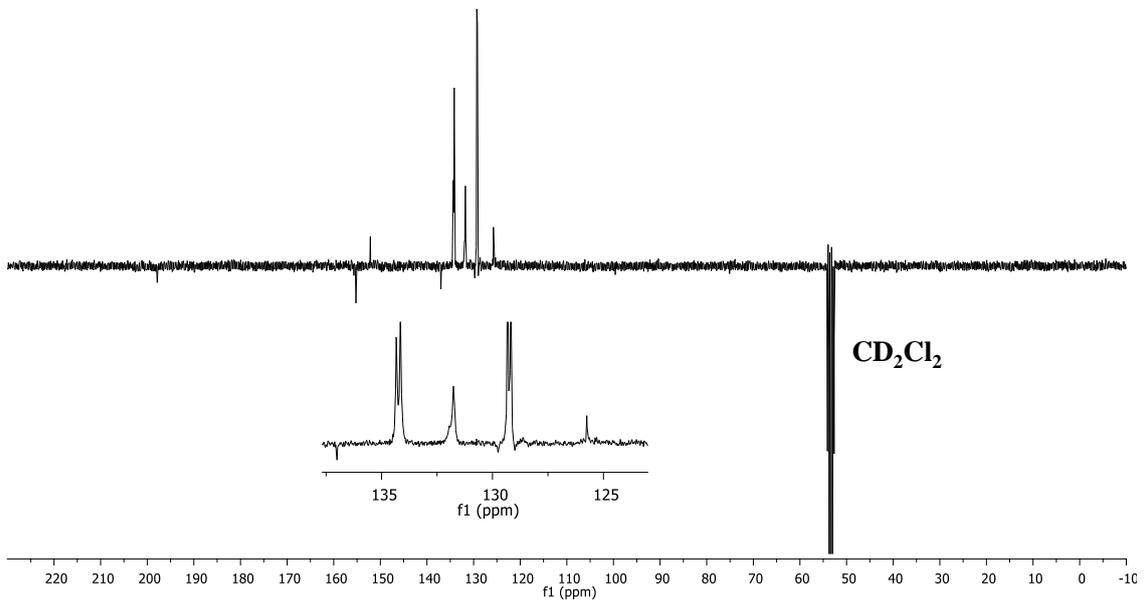
C(16)-C(17)	1.180(7)	N(1)-Re(1)-N(2)	75.0(1)
C(14)-C(15)	1.178(9)	C(3)-Re(1)-Cl(1)	176.4(1)
Re(1)-C(1)	1.928(5)	C(6)-C(14)-C(15)	176.5(5)
Re(1)-C(2)	1.923(6)	C(11)-C(16)-C(17)	178.3(5)
Re(1)-C(3)	1.933(4)	O(1)-C(1)-Re(1)	177.1(4)
Re(1)-N(1)	2.170(4)	O(2)-C(2)-Re(1)	178.6(4)
Re(1)-N(2)	2.165(4)	O(3)-C(3)-Re(1)	173.9(4)
Re(1)-Cl(1)	2.477(1)		
O(1)-C(1)	1.148(6)		
O(2)-C(2)	1.150(7)		
O(3)-C(3)	1.120(5)		



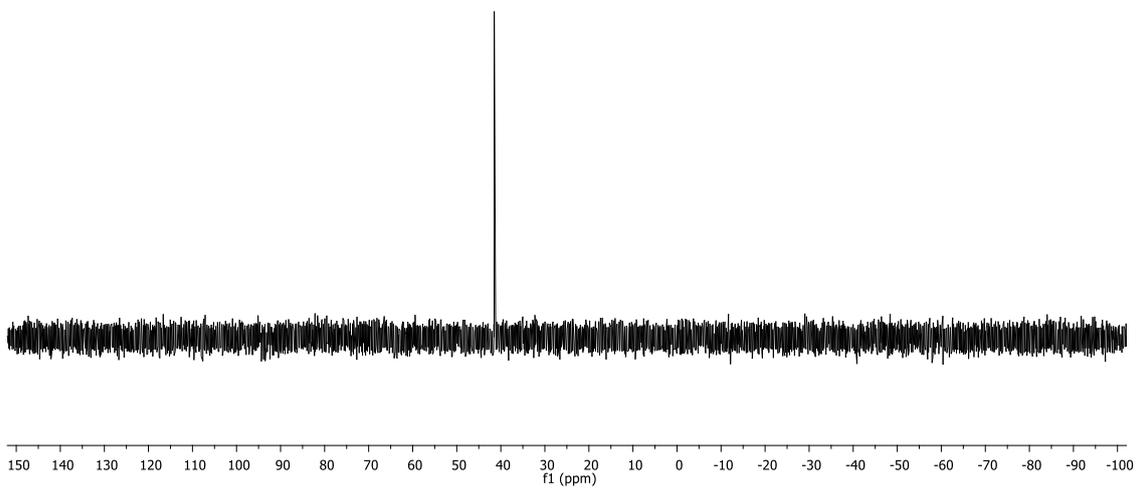
27

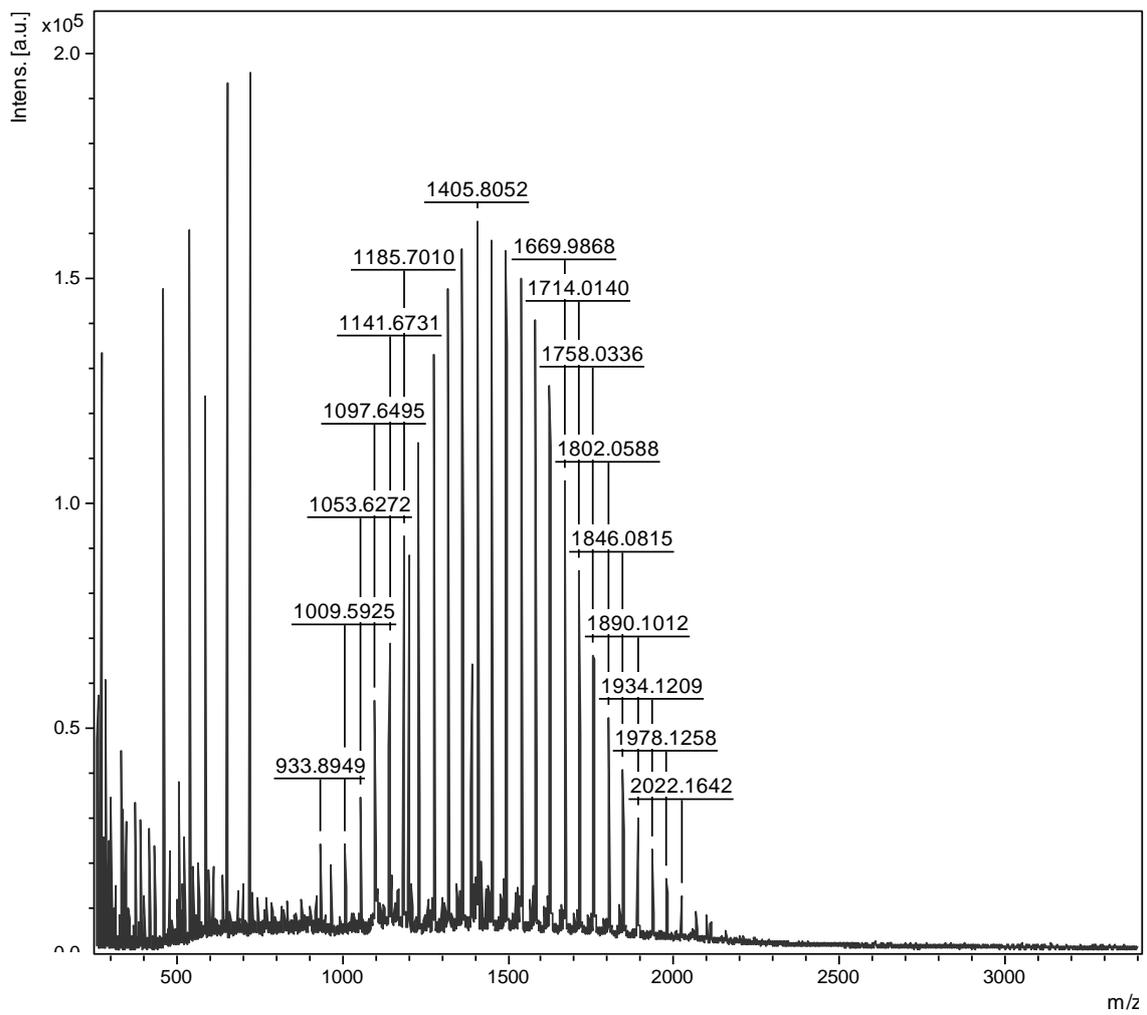
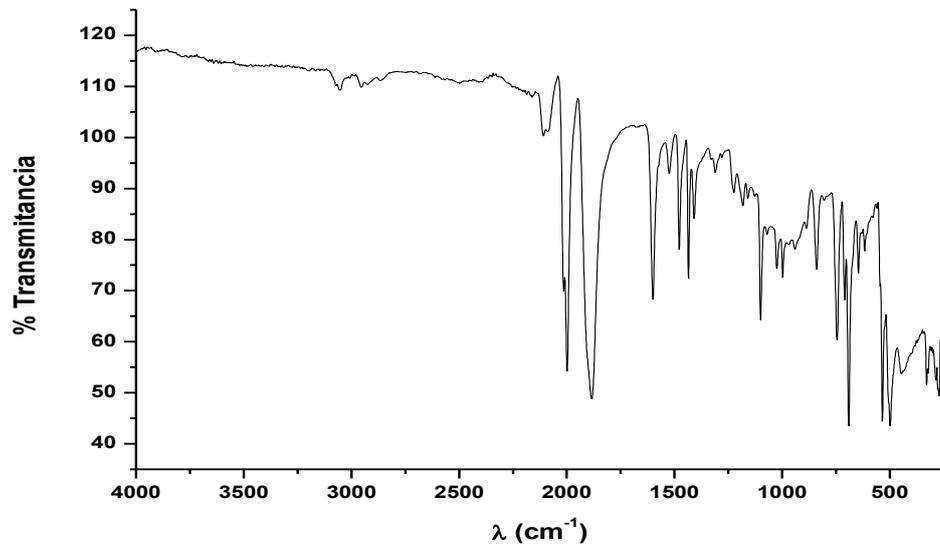


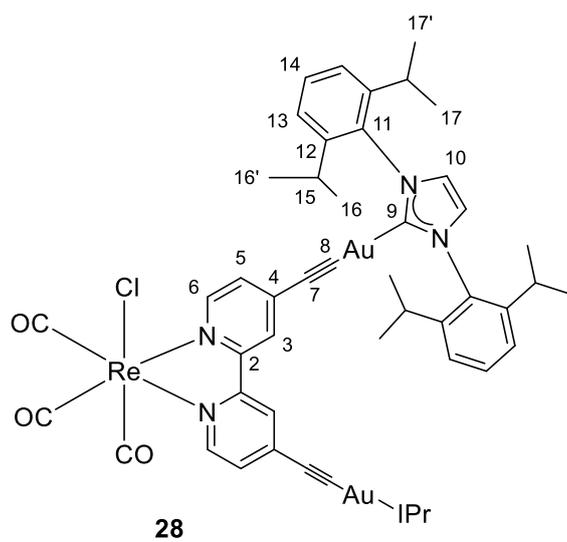
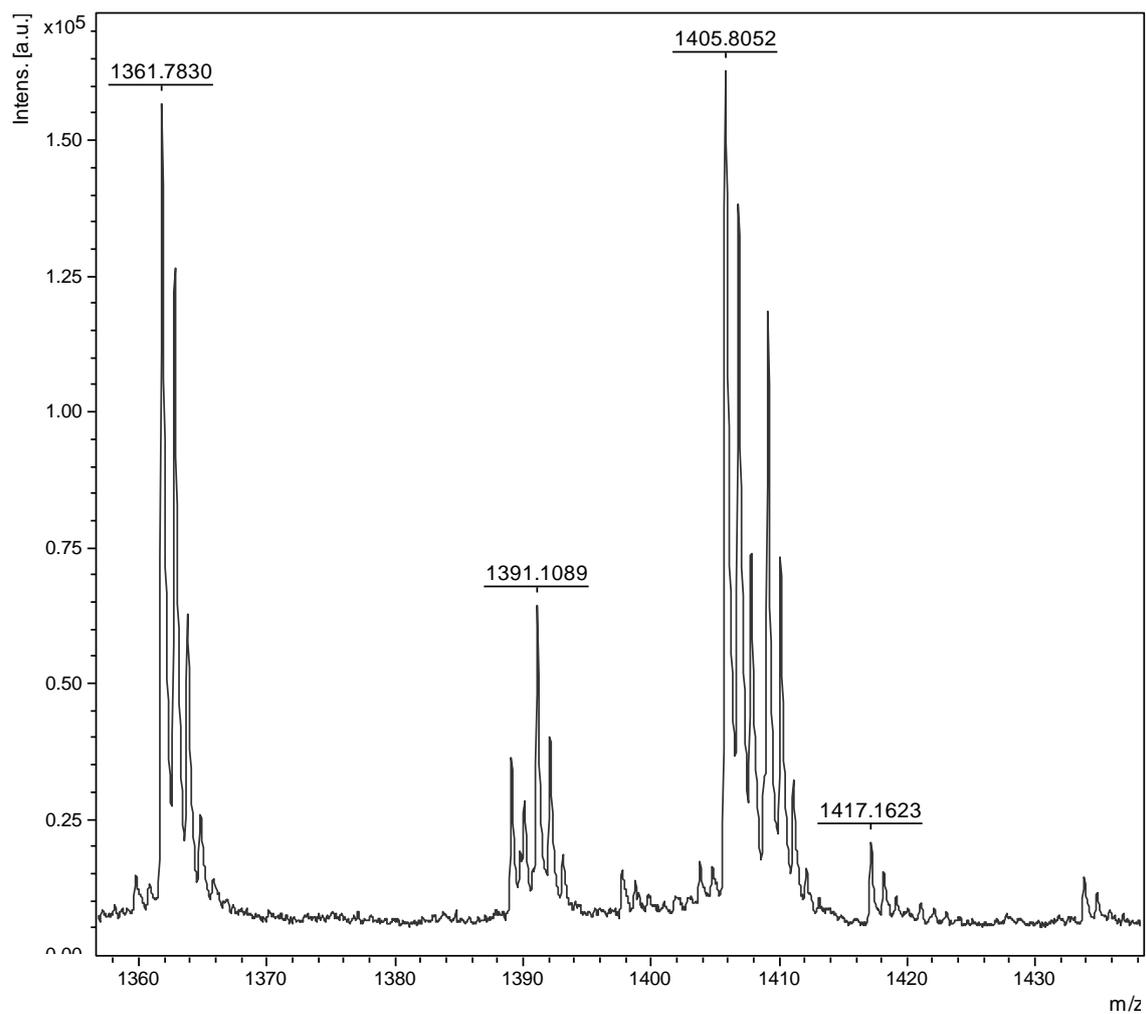
APT, CD₂Cl₂



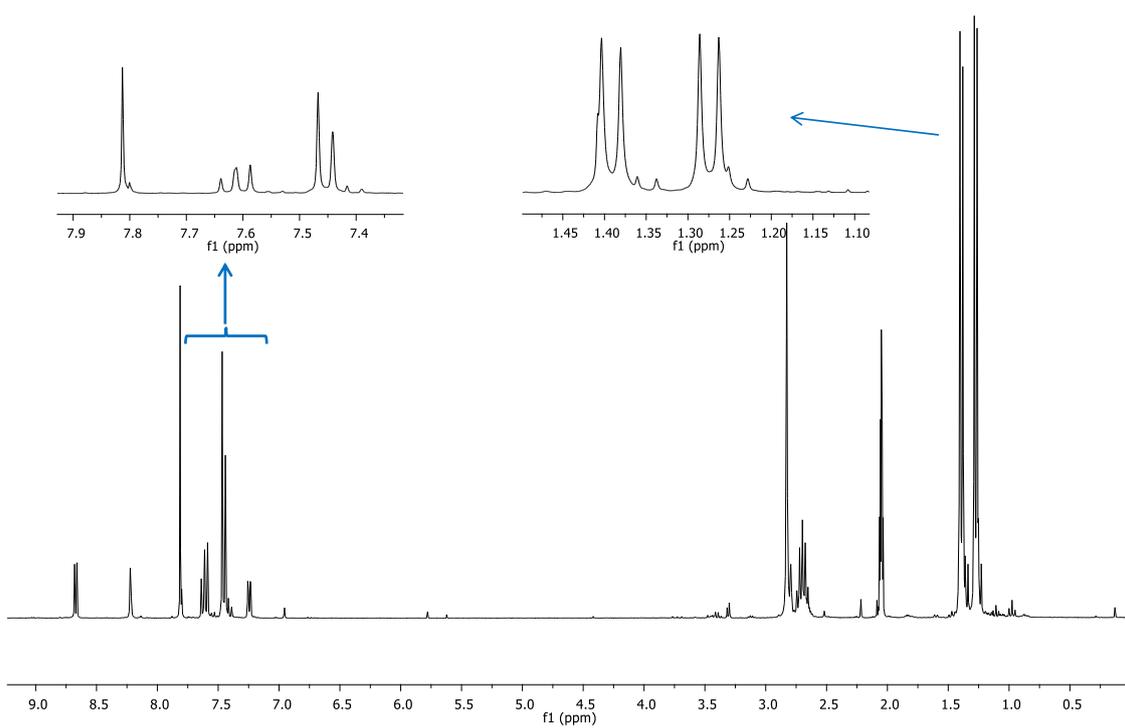
³¹P{¹H}, CD₂Cl₂



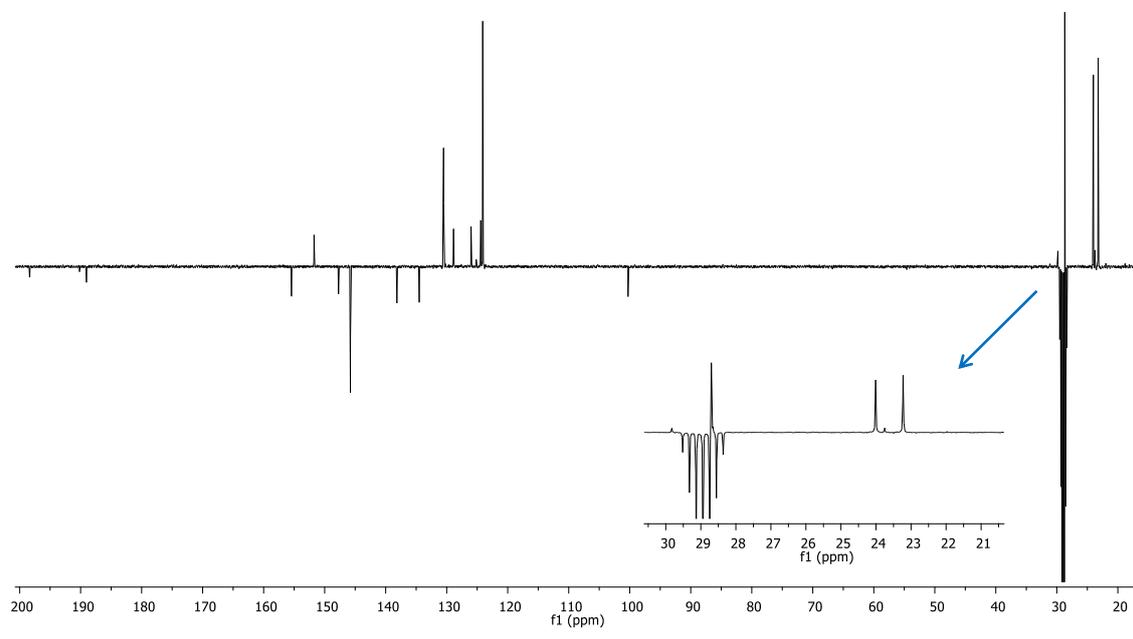


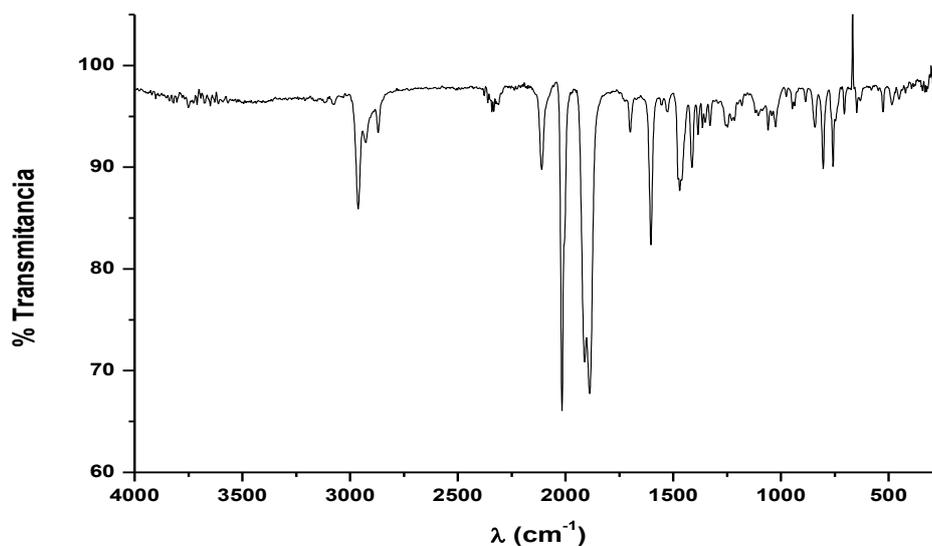


$^1\text{H}, (\text{CD}_3)_2\text{CO}$



APT, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$





Datos cristalográficos para el complejo 28.

Empirical formula	$C_{73}H_{81}Au_2ClN_6O_5Re$	
Formula weight	1738.02	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Orthorhombic, Pnma	
Unit cell dimensions	a = 20.7328(14) Å b = 25.3154(17) Å c = 15.1512(10) Å	alpha = 90° beta = 90° gamma = 90°
Volume	7952.25 Å ³	
Z	4	
Calculated density	1.645 Mg/m ³	
Absorption coefficient	5.292 mm ⁻¹	
F(000)	3920	
Crystal size	0.240 x 0.014 x 0.012 mm	
Theta range for data collection	1.57 to 25.24 deg.	

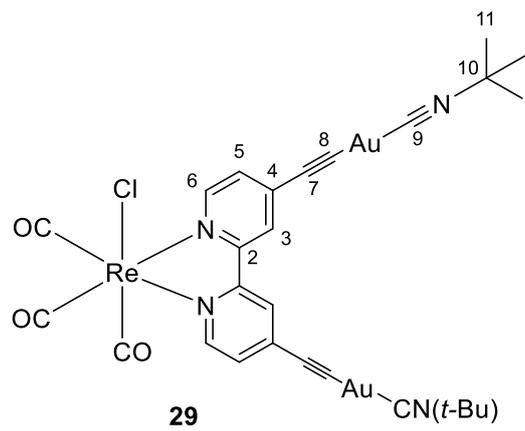
Limiting indices	-24<=h<=25, -30<=k<=30, -18<=l<=18
Reflections collected / unique	60345 / 7580 [R(int) = 0.0767]
Completeness to theta = 25.50	99.9 %
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.7457 and 0.5147
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	7580 / 84 / 395
Goodness-of-fit on F ²	1.065
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0582, wR2 = 0.0780
R indices (all data)	R1 = 0.1274, wR2 = 0.1369
Largest diff. peak and hole	3.620 and -1.620 e. Å ⁻³

Distancias de enlace [Å] y ángulos [°] seleccionados para el complejo 28.

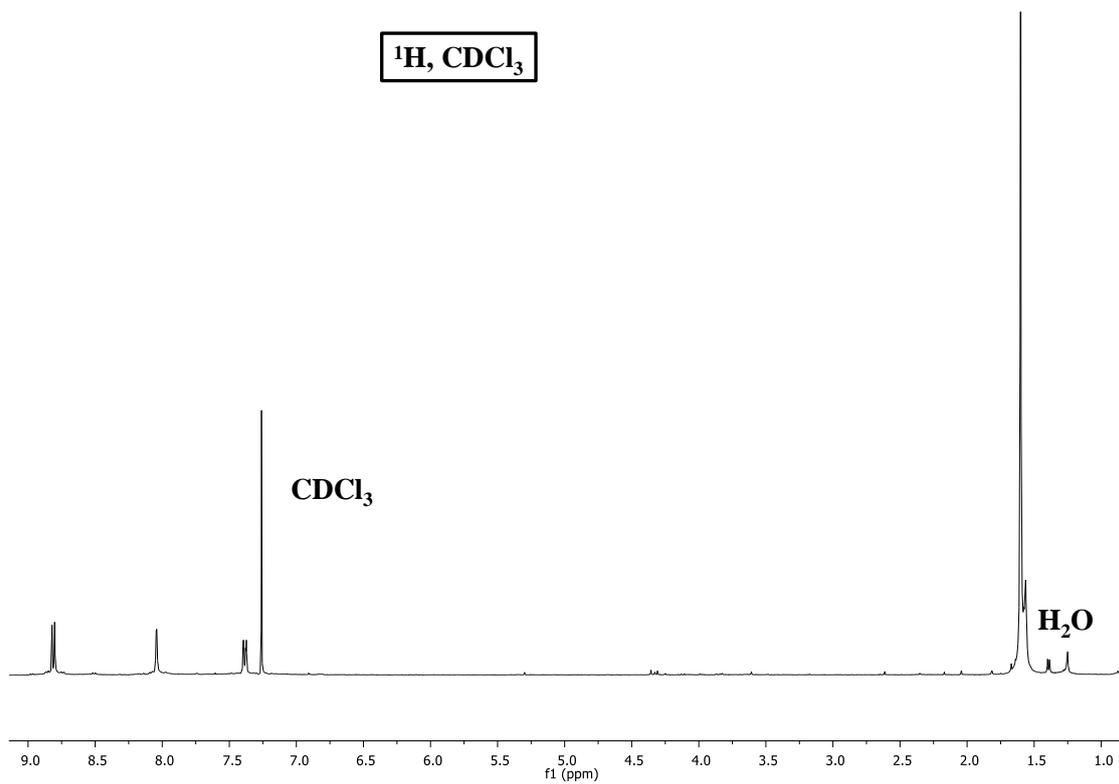
Au(1)-C(1)	1.993(9)	C(1)-Au(1)-C(10)	173.8(4)
Au(1)-C(10)	2.024(9)	N(1)#1-Re(1)-N(1)	75.0
Re(1)-C(8)	1.91	C(9)-Re(1)-Cl(1)	170.0
Re(1)-C(9)	2.08	C(1)-C(2)-C(3)	178(1)
Re(1)-N(1)	2.167	O(1)-C(8)-Re(1)	179
Re(1)-Cl(1)	2.401	O(2)-C(9)-Re(1)	173
O(1)-C(8)	1.13(1)		
C(1)-C(2)	1.20(1)		

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

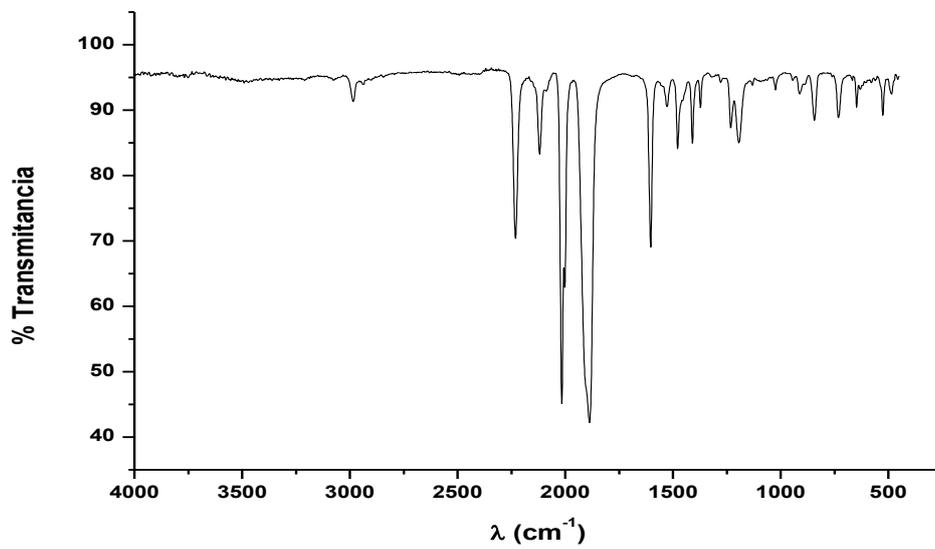
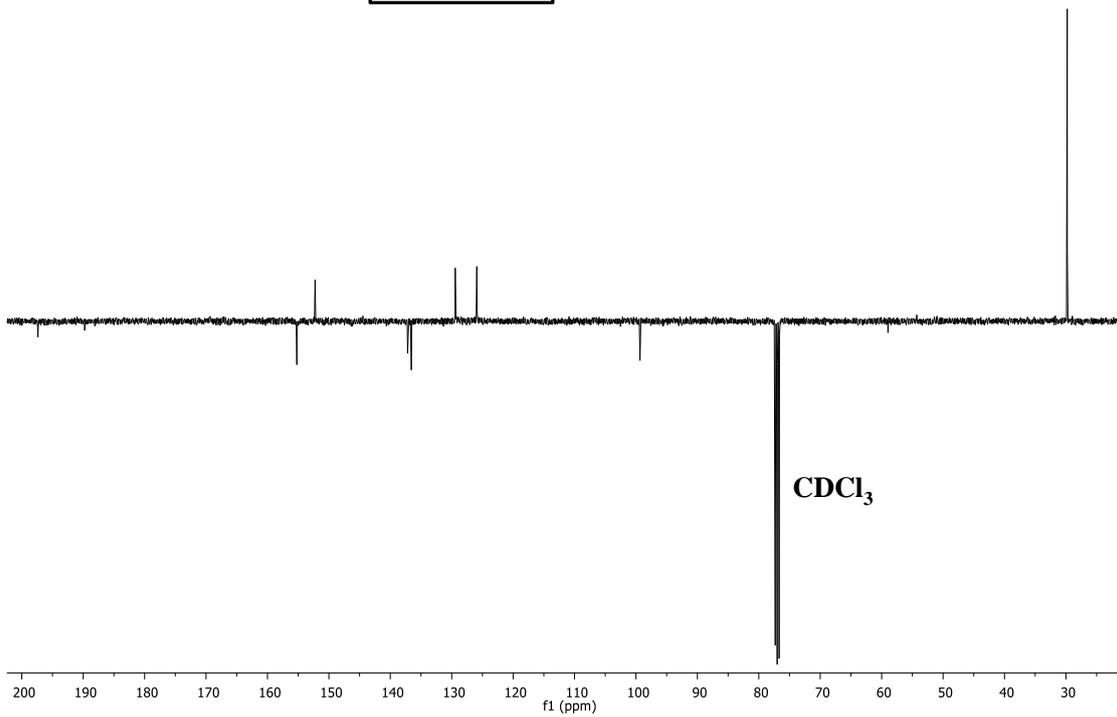
#1 x,-y+3/2,z

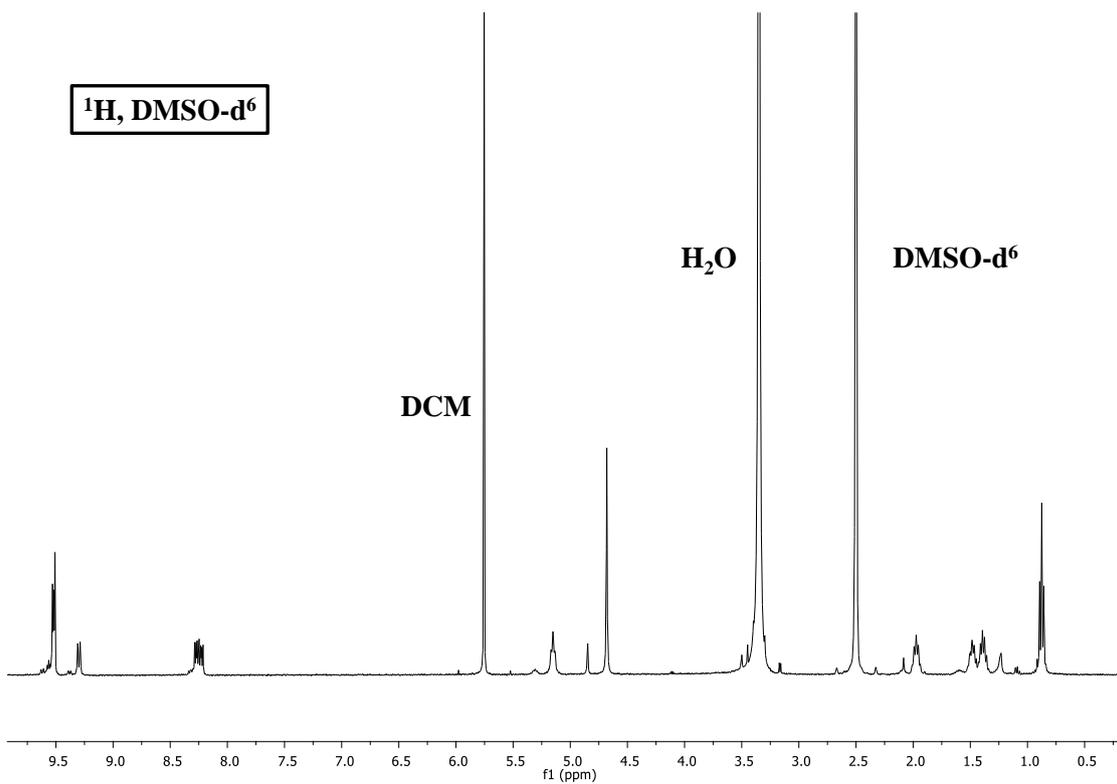
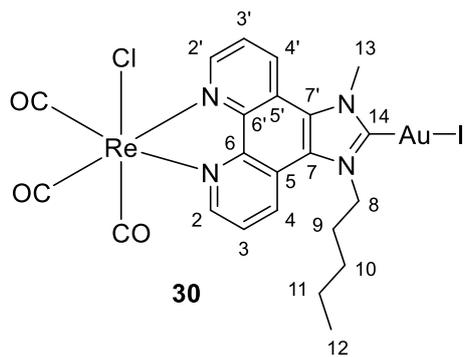


¹H, CDCl₃

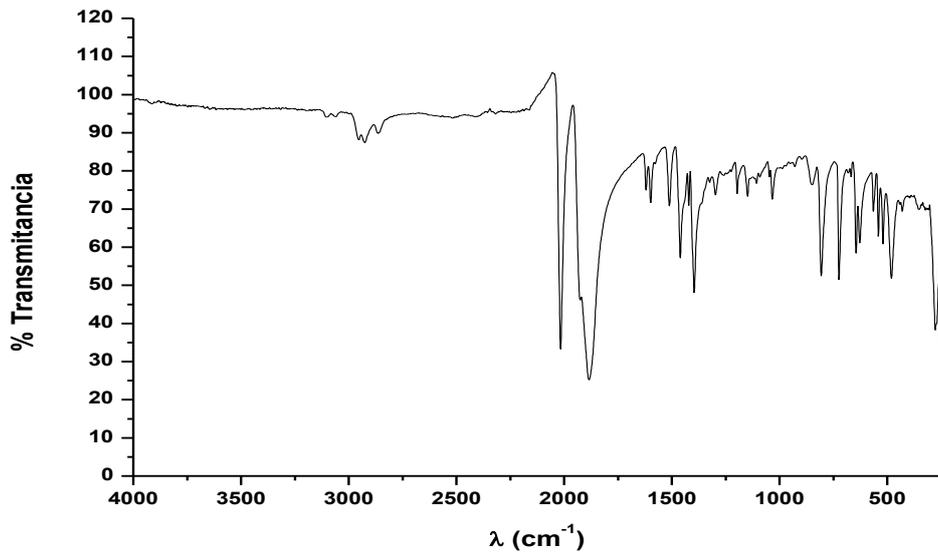
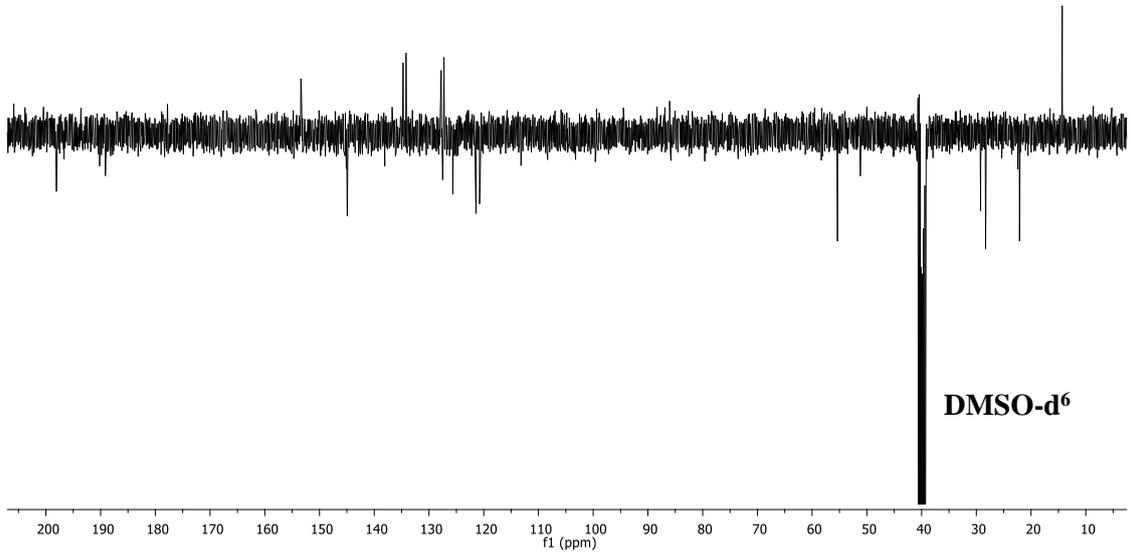


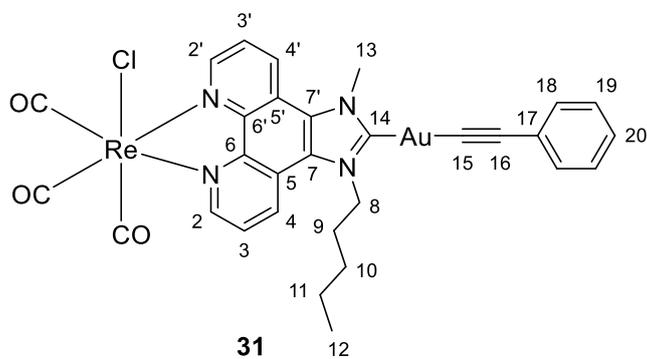
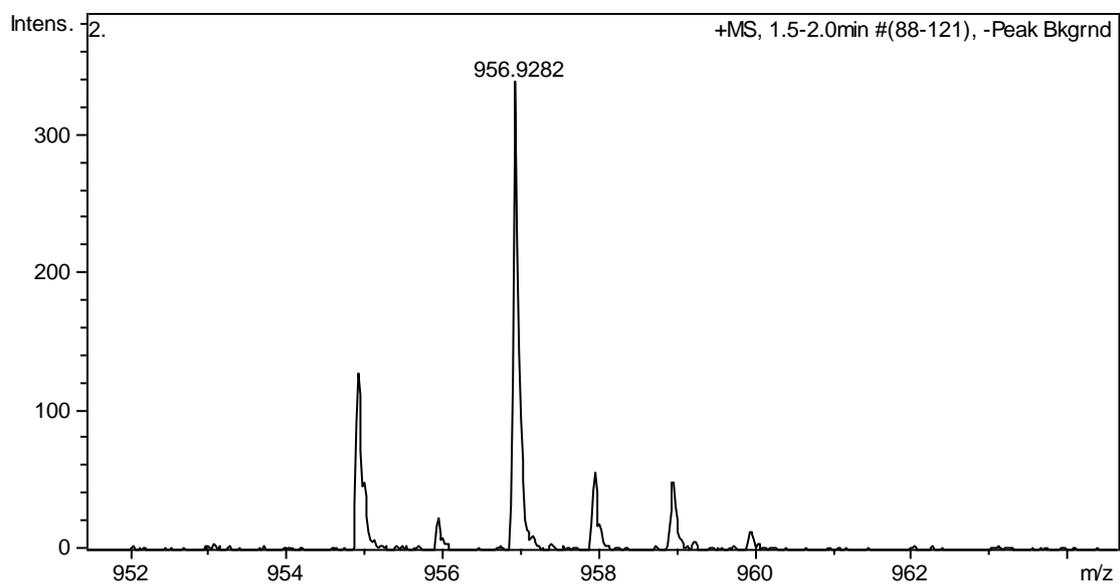
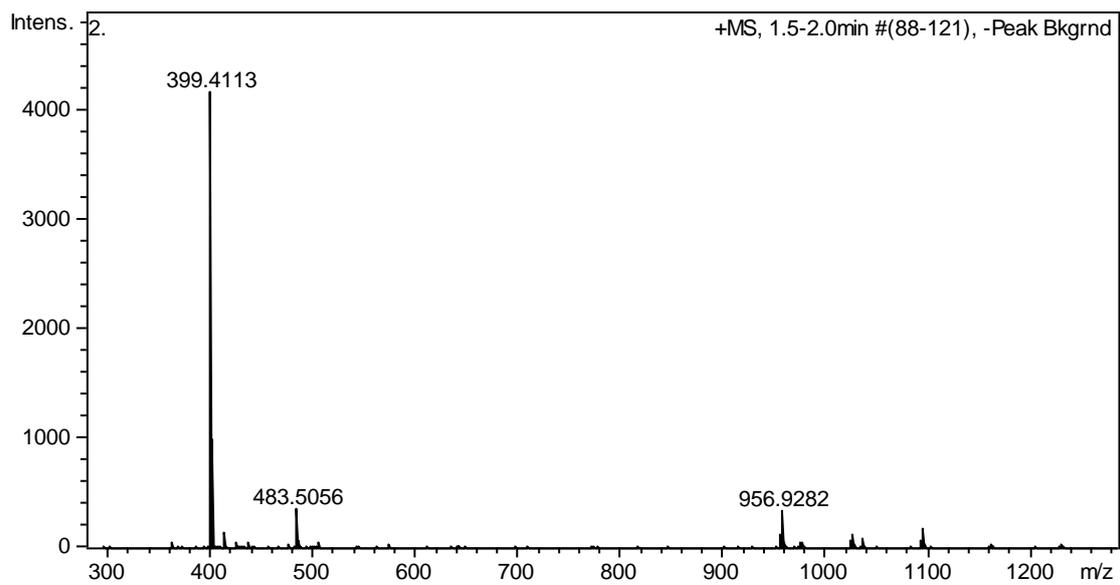
APT, CDCl₃

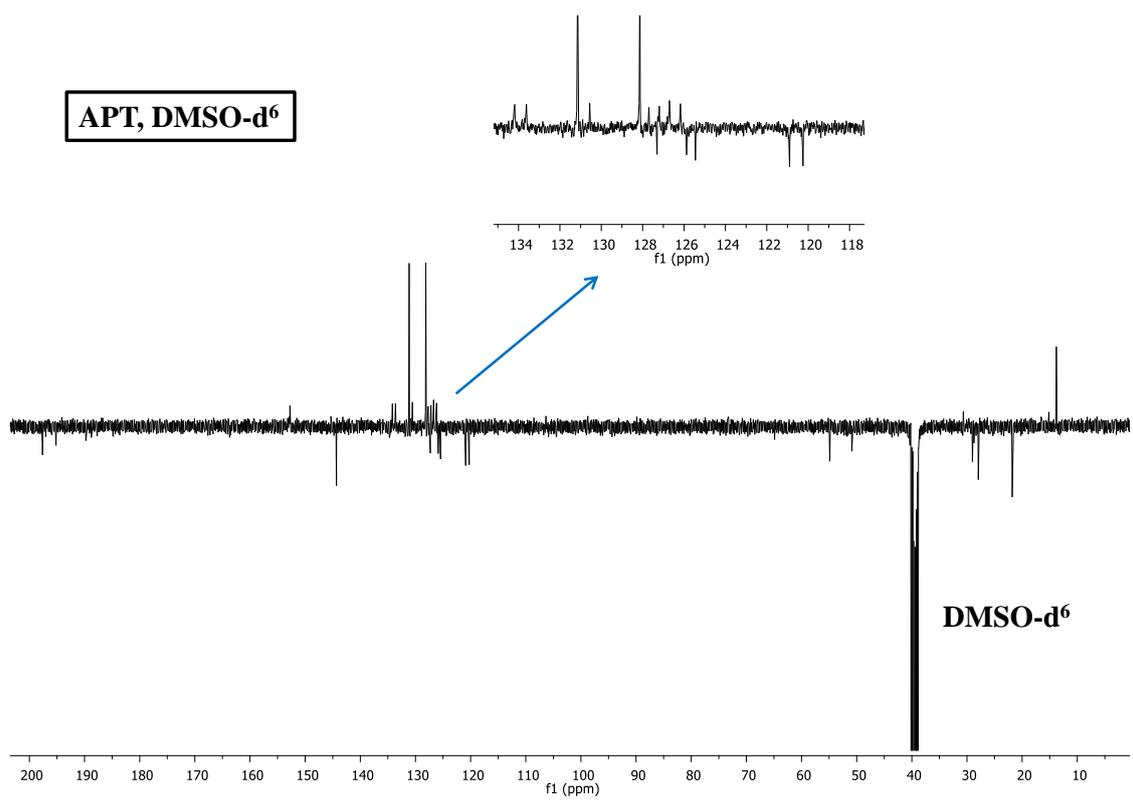
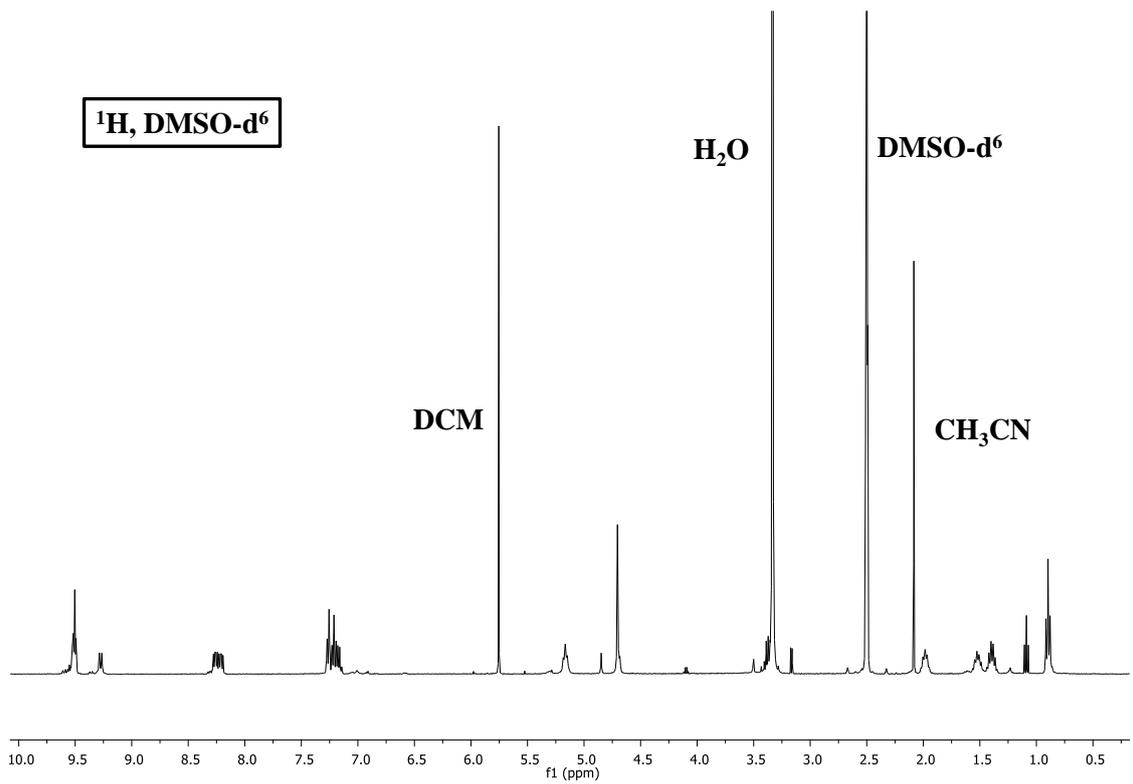


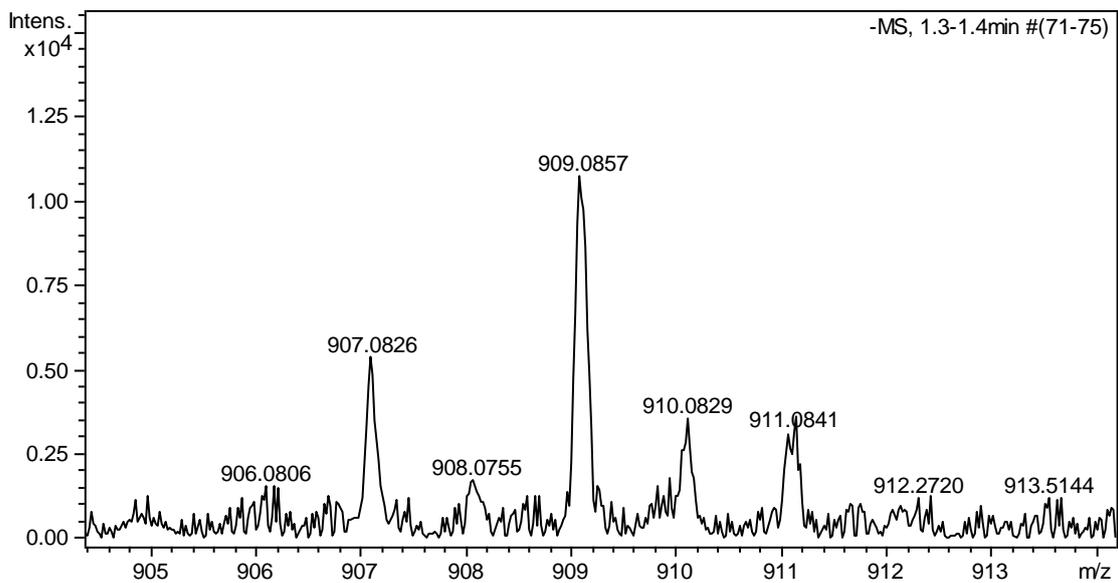
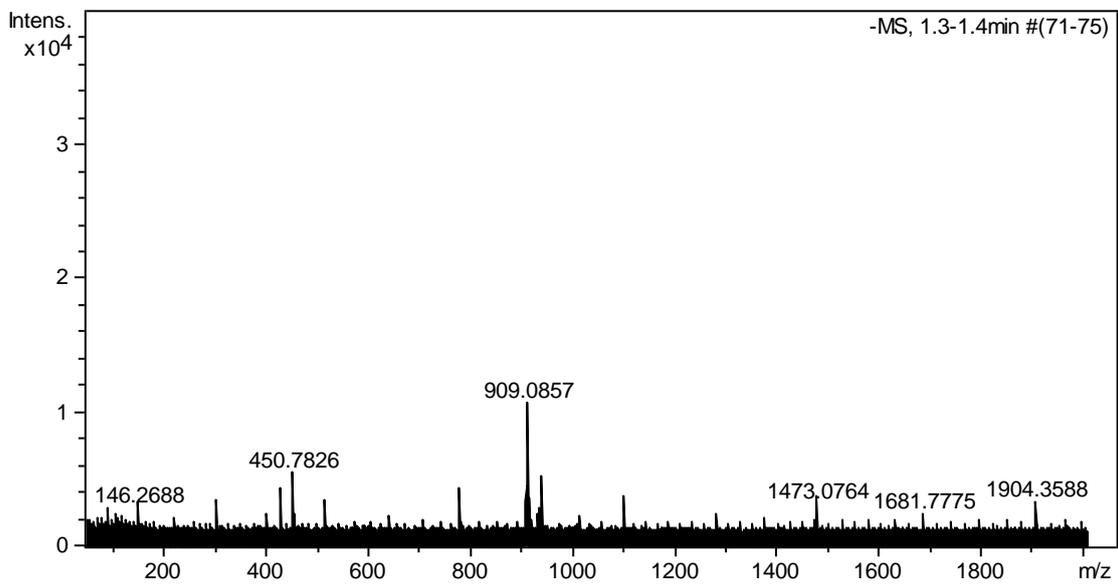
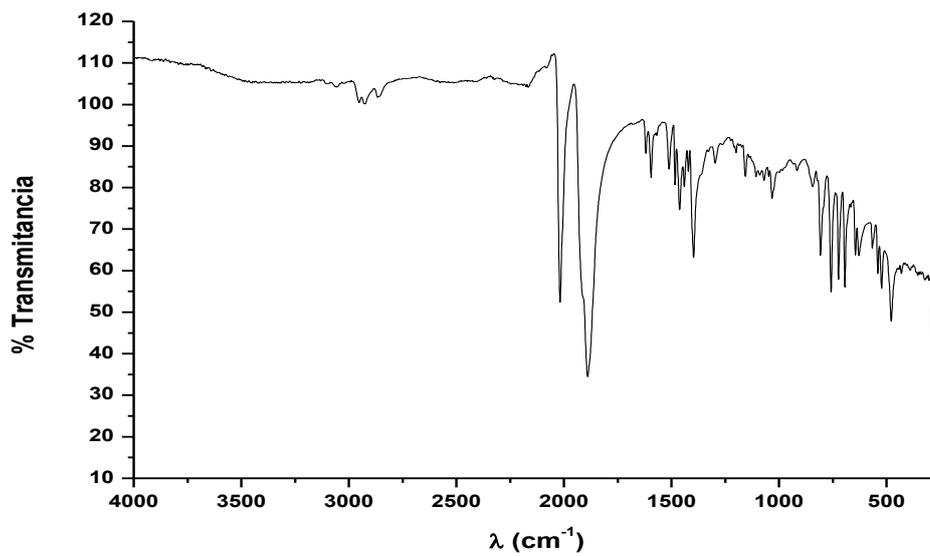


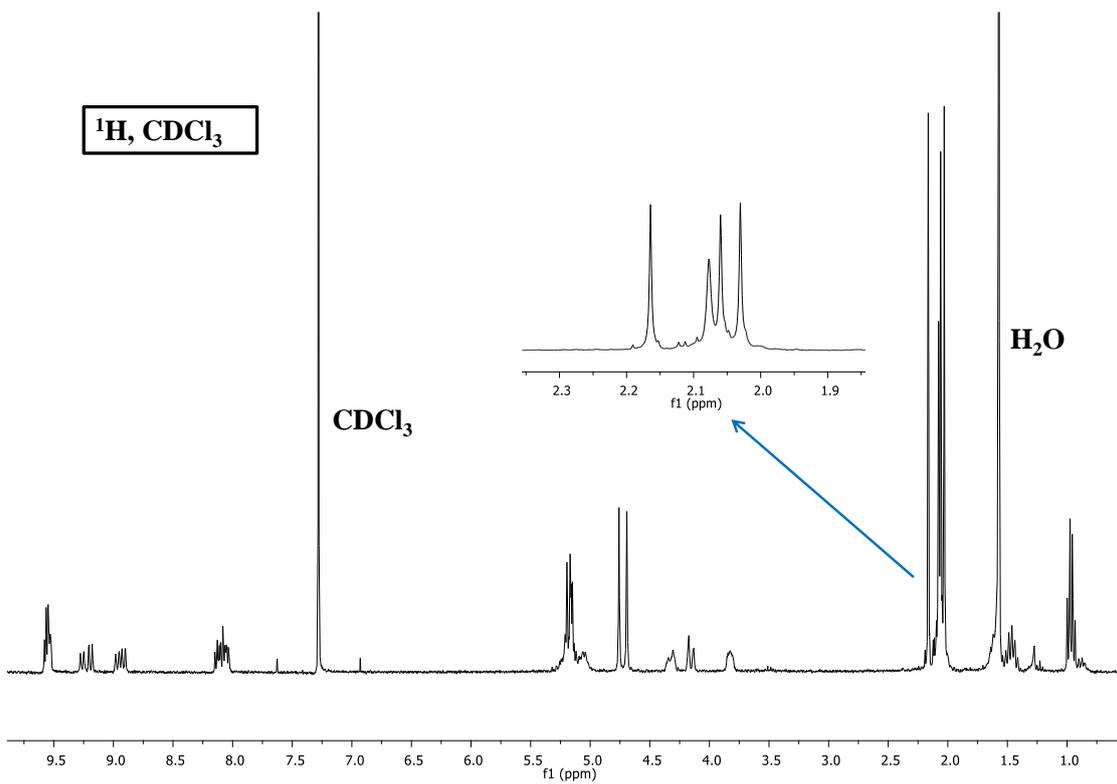
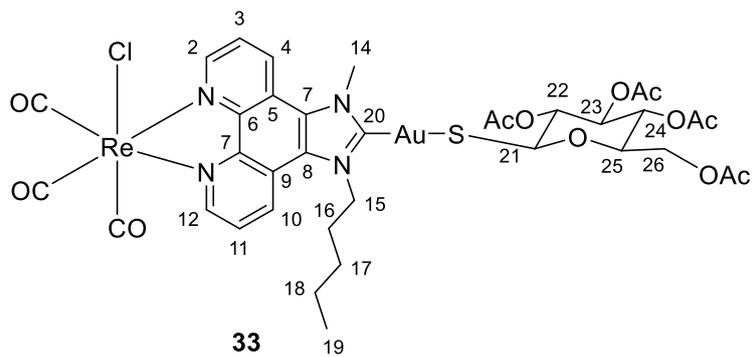
APT, DMSO-d⁶

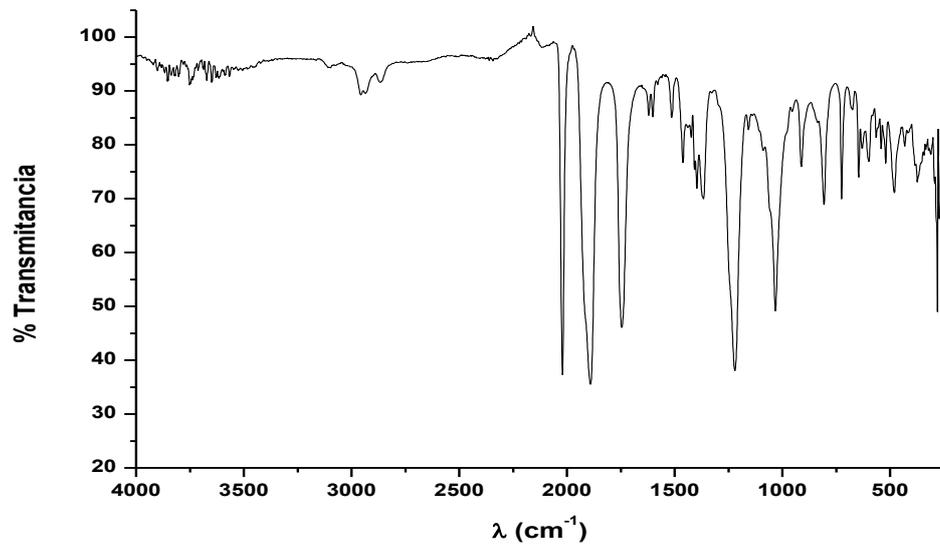
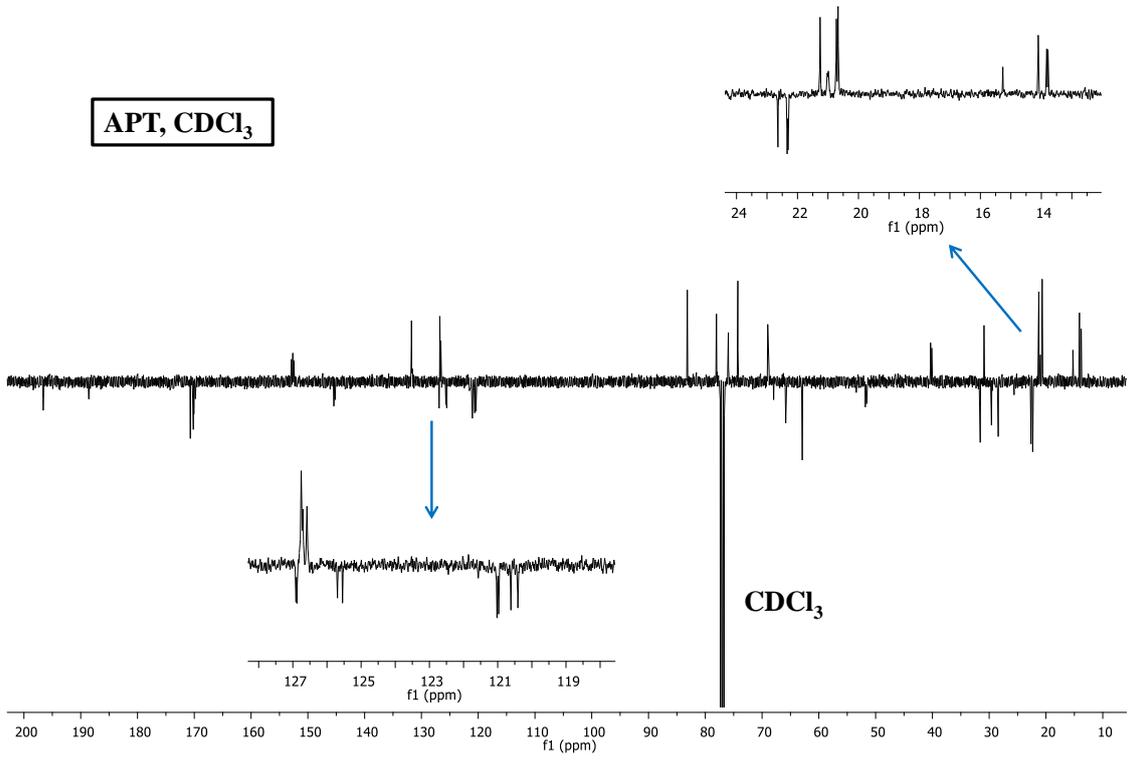


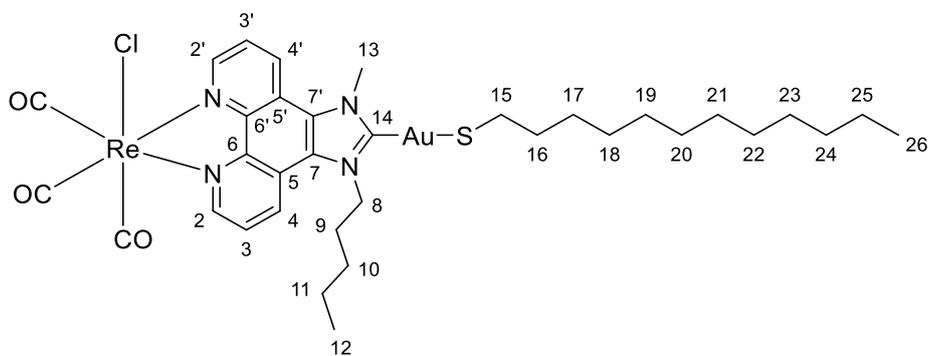
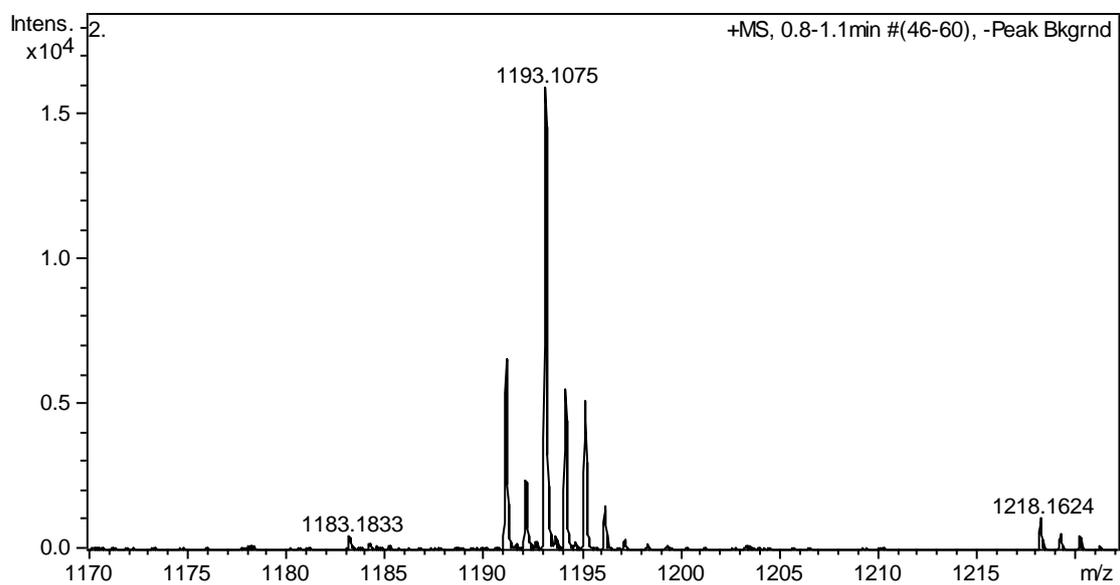
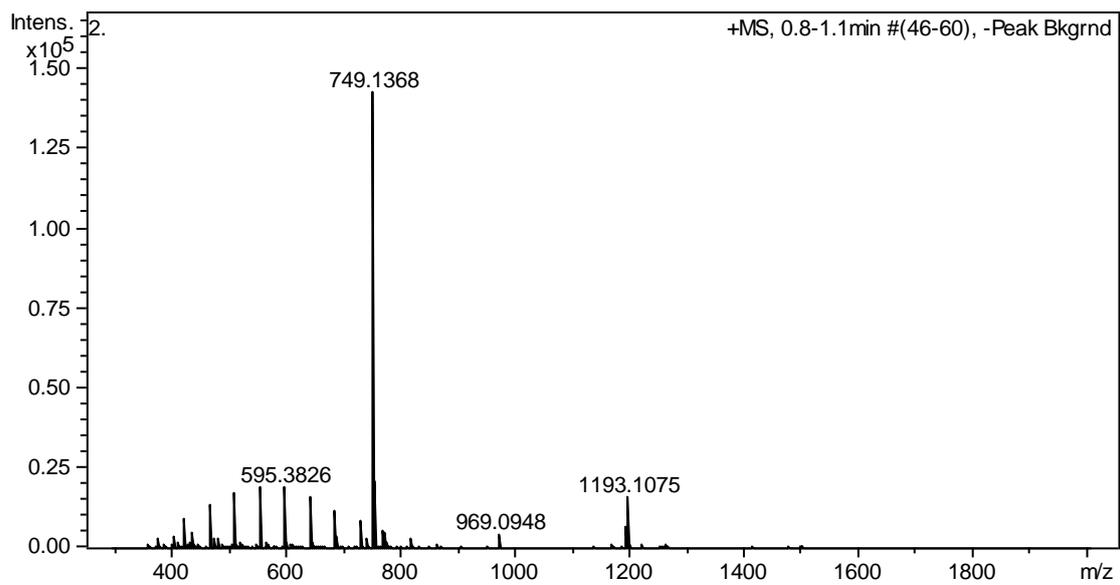


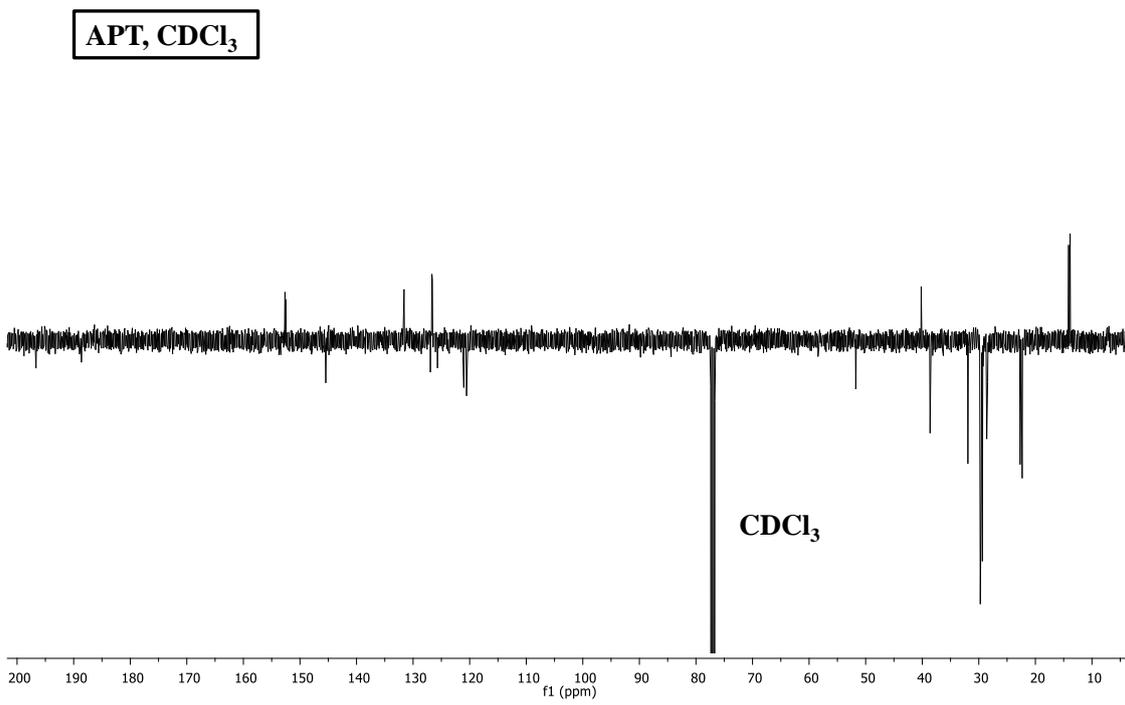
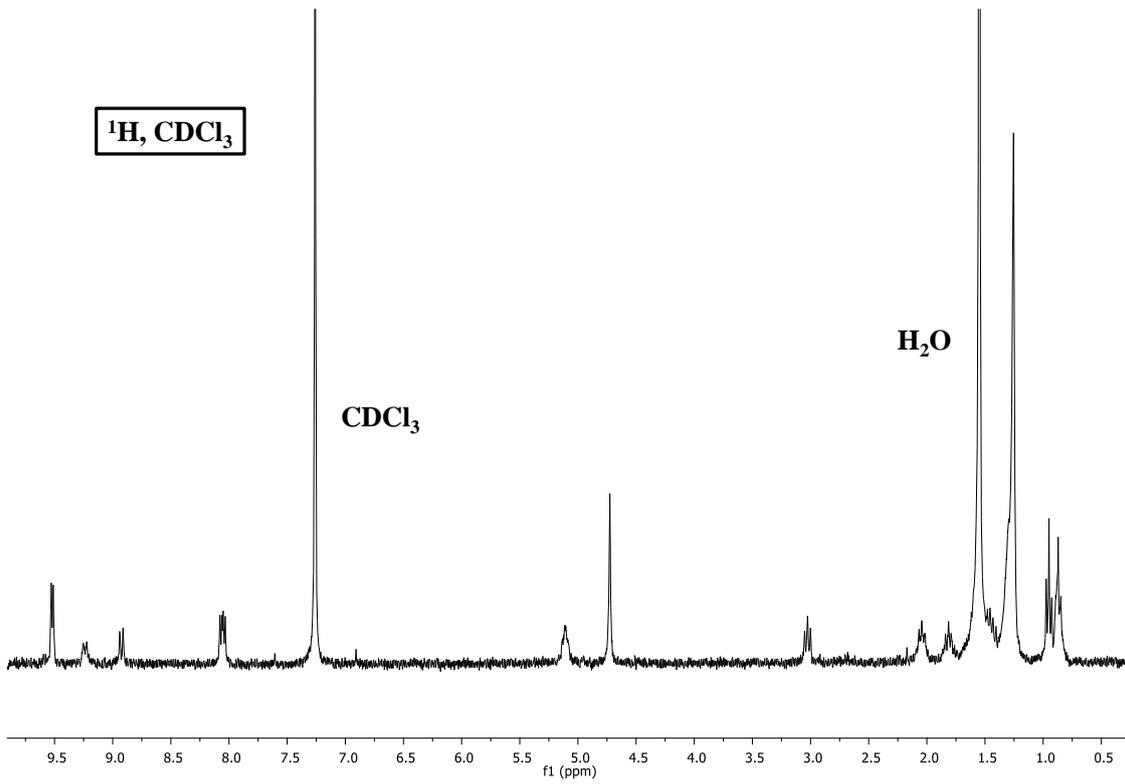


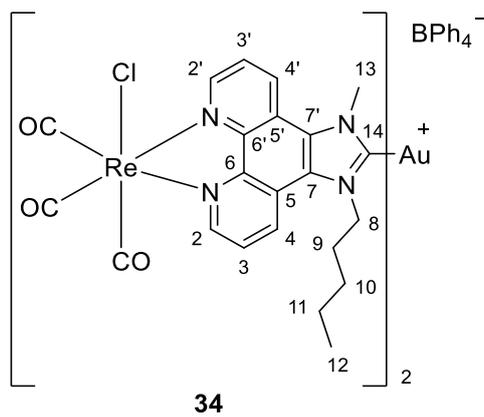
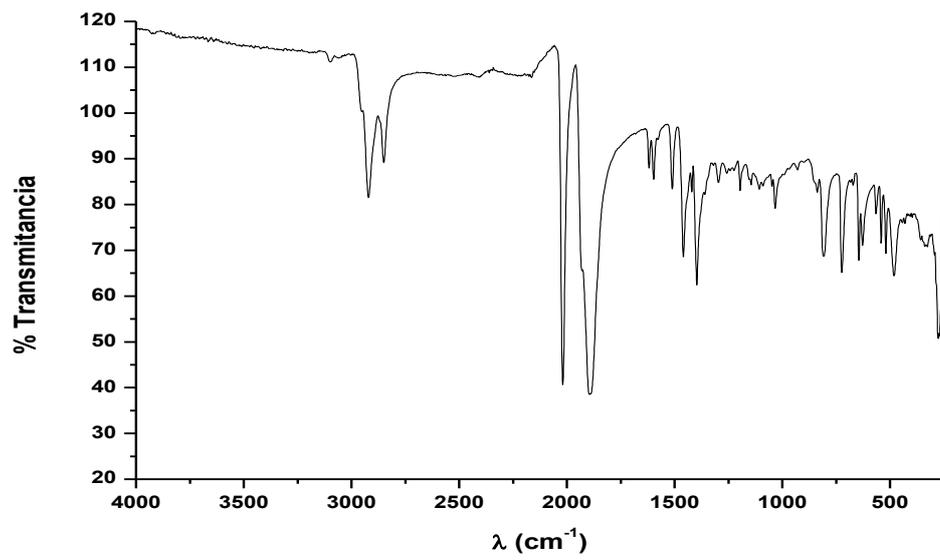


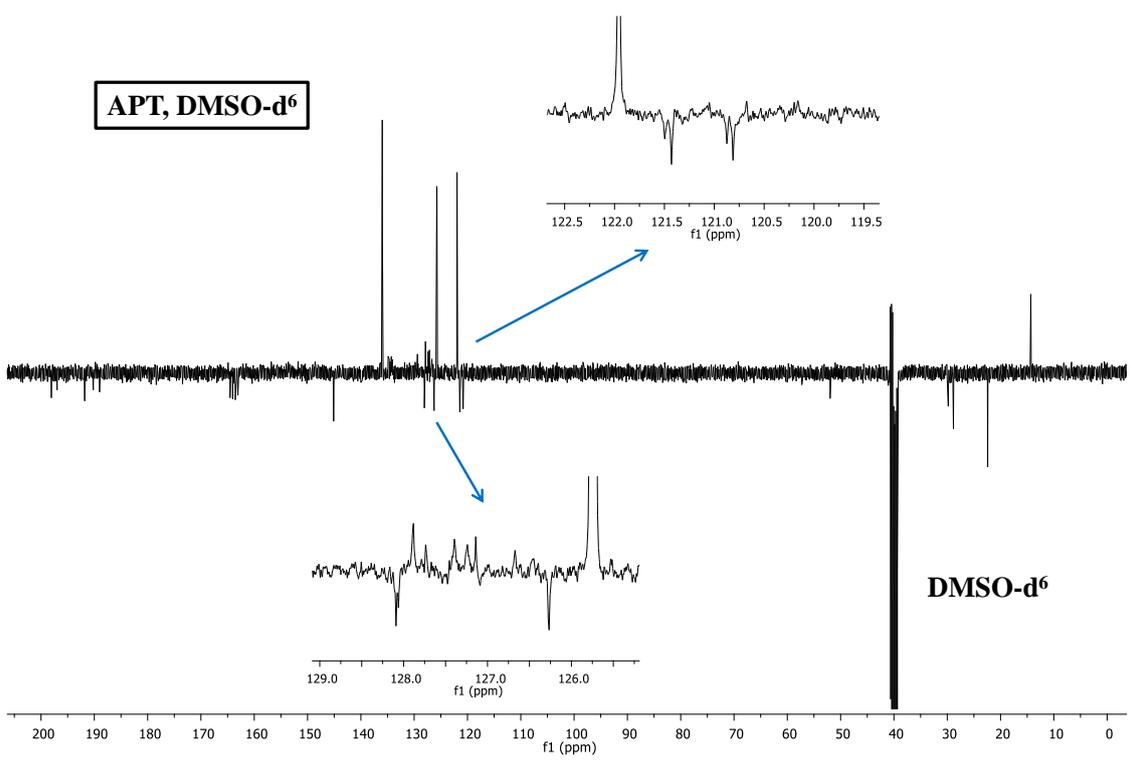
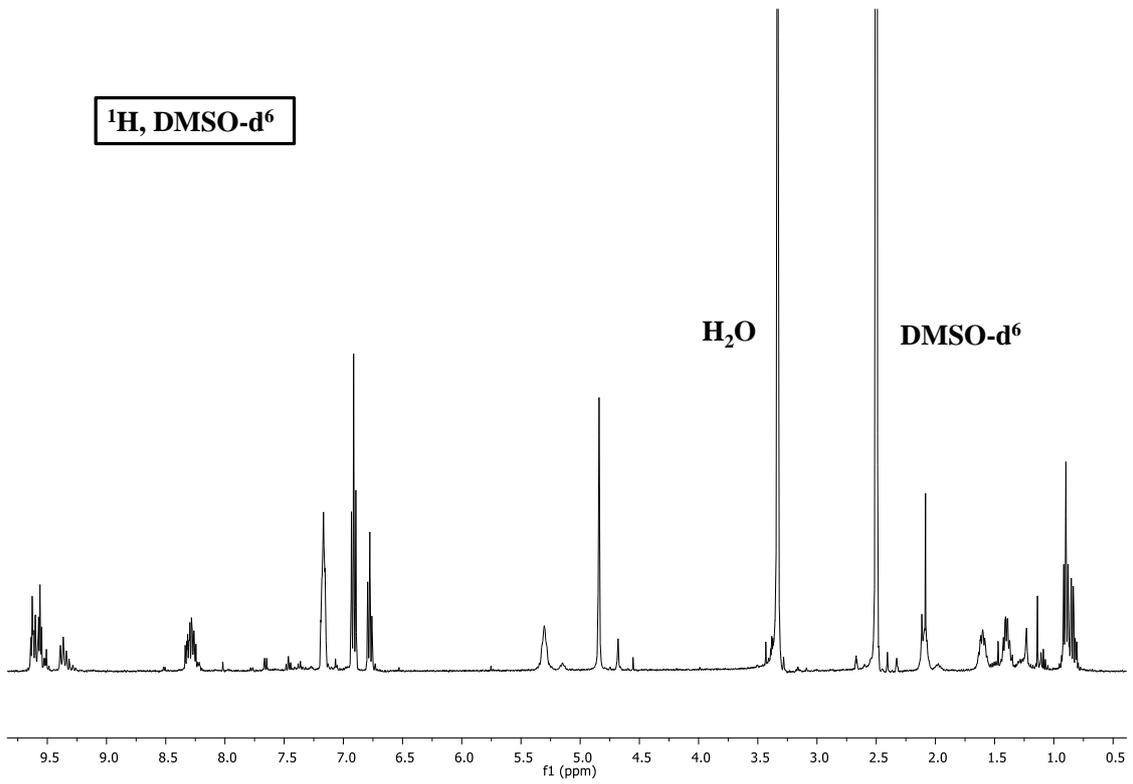


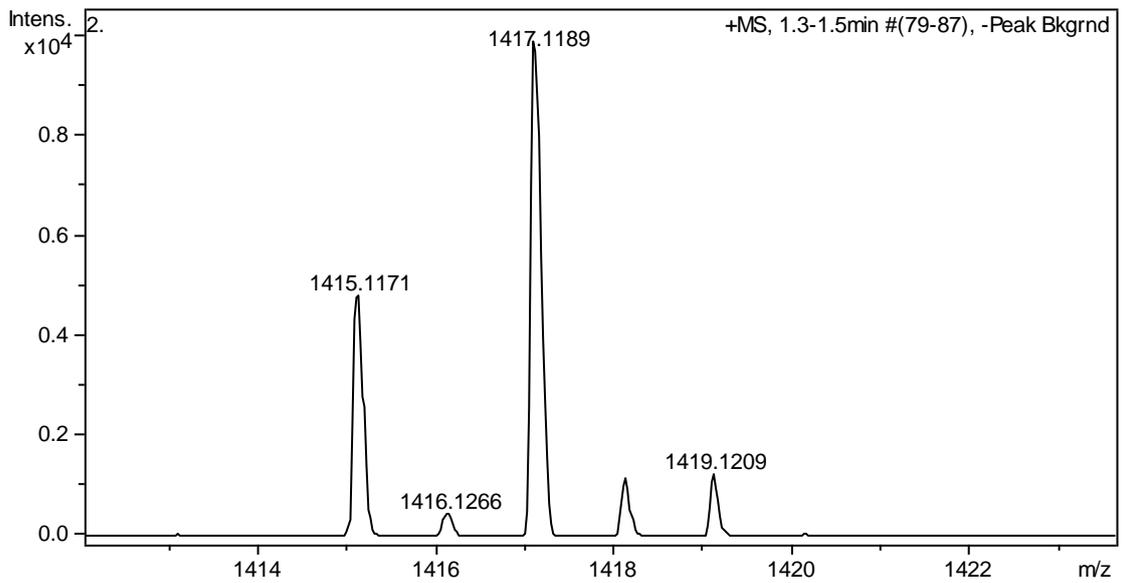
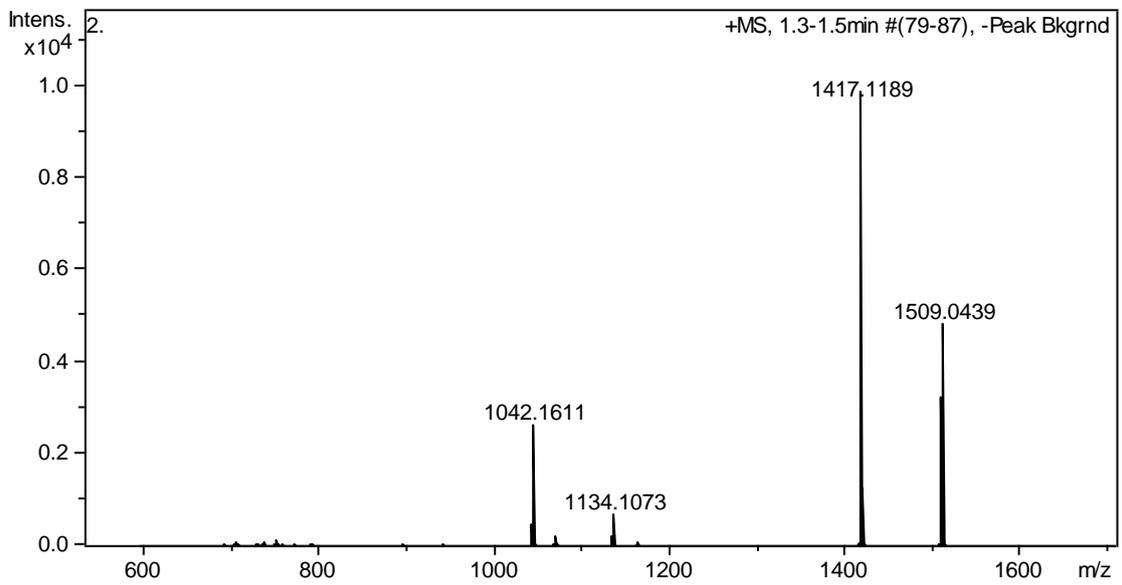
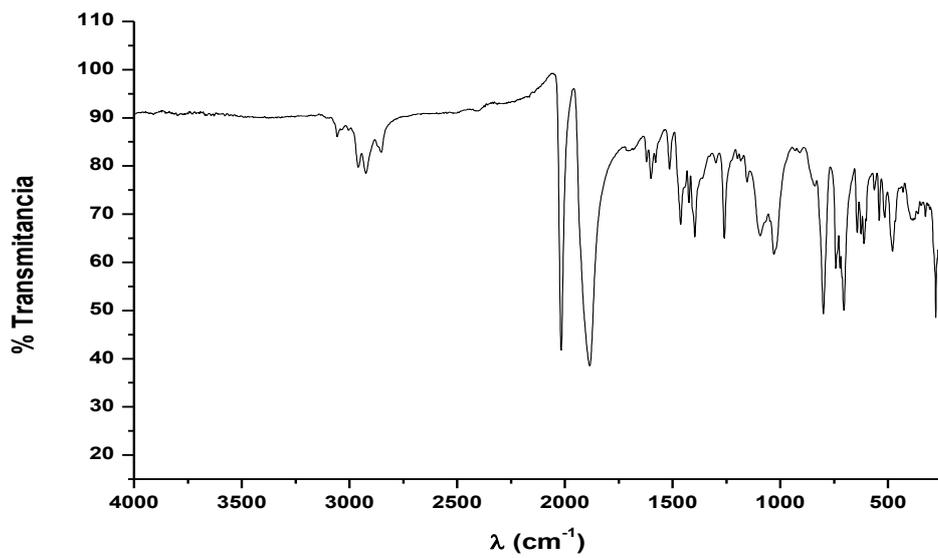


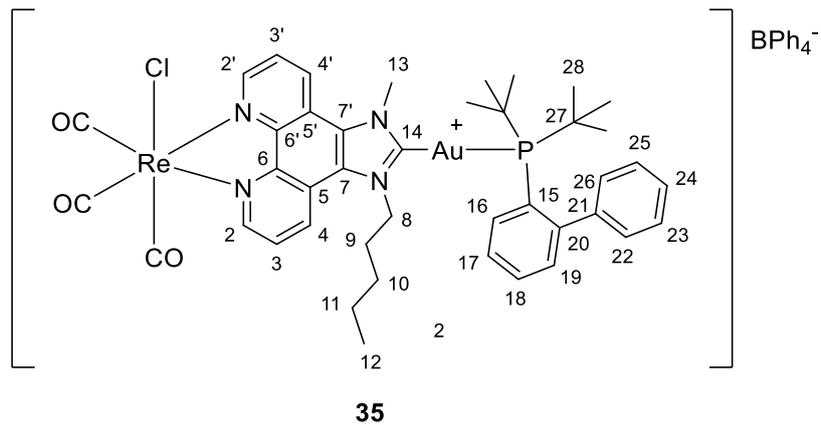




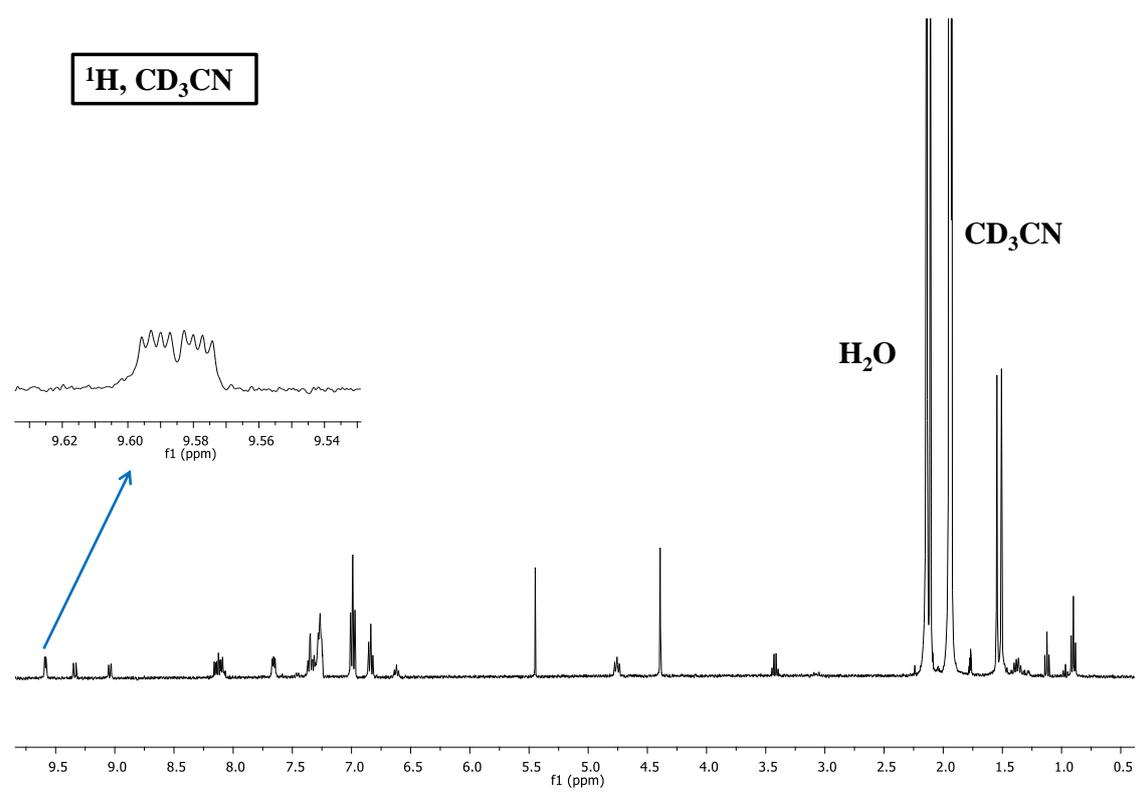


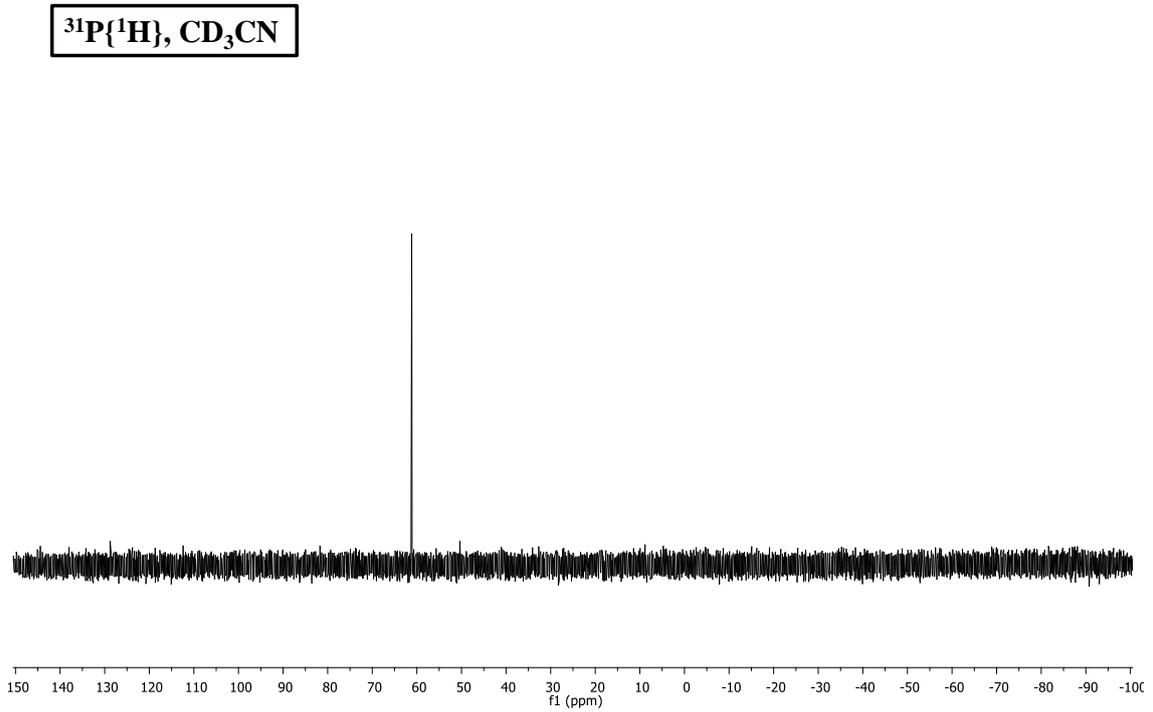
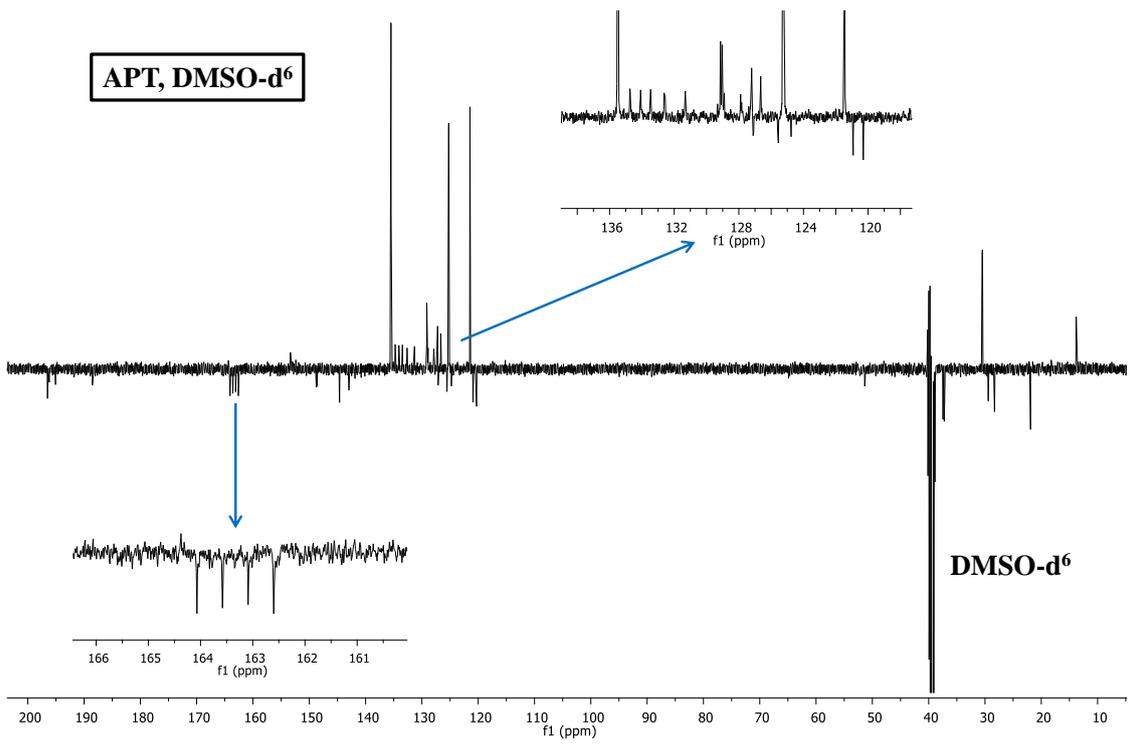


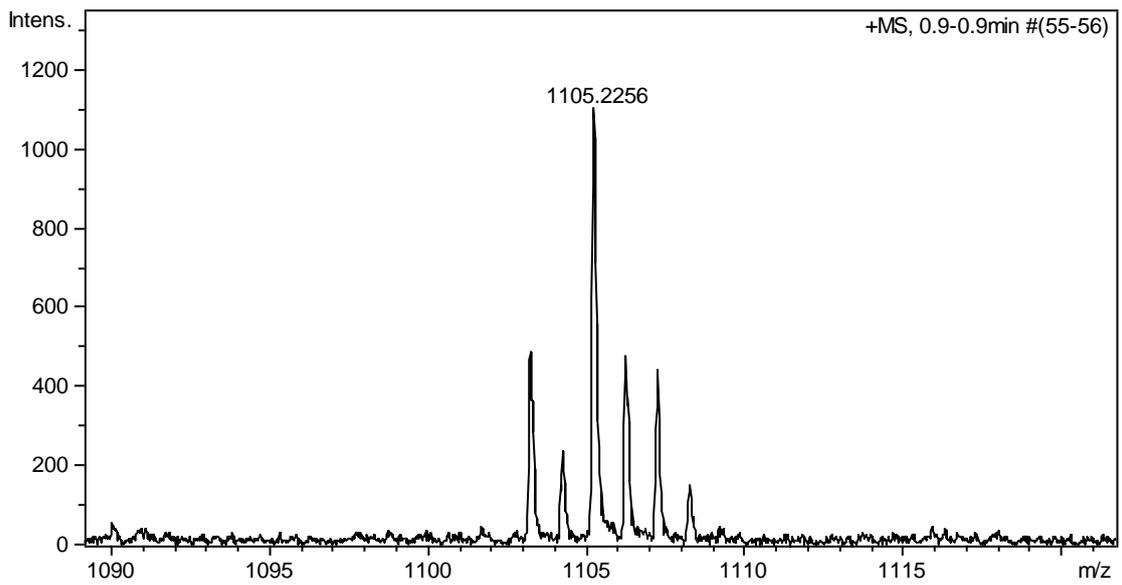
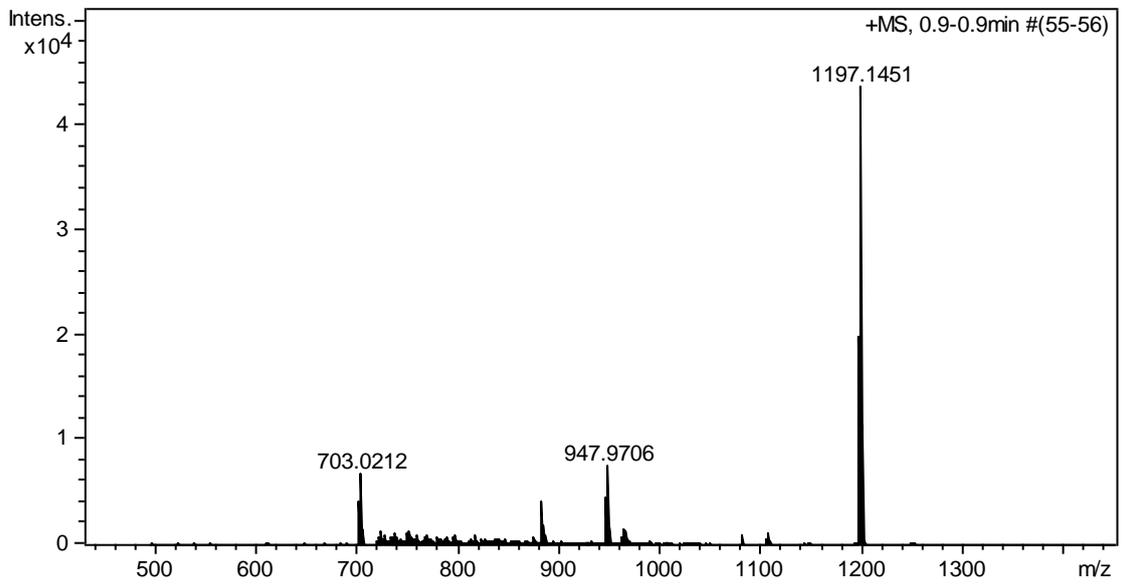
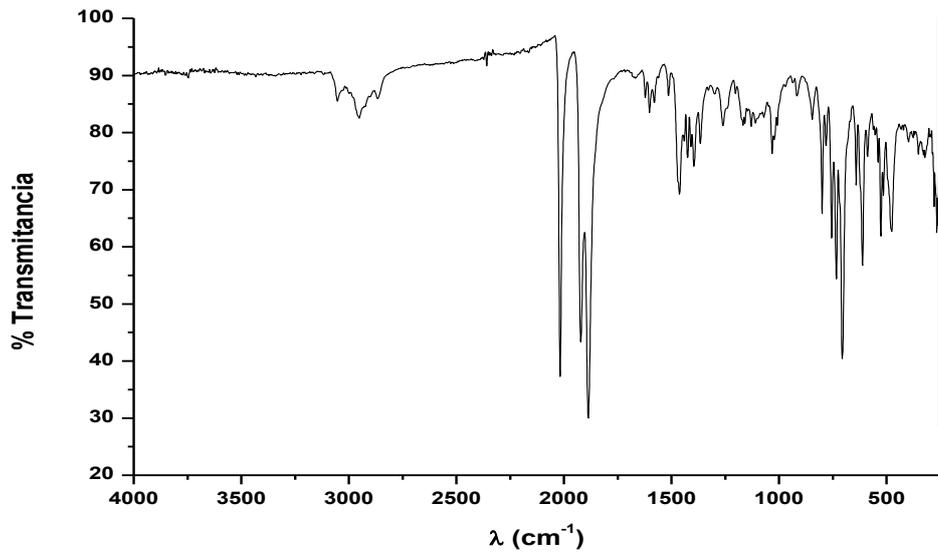


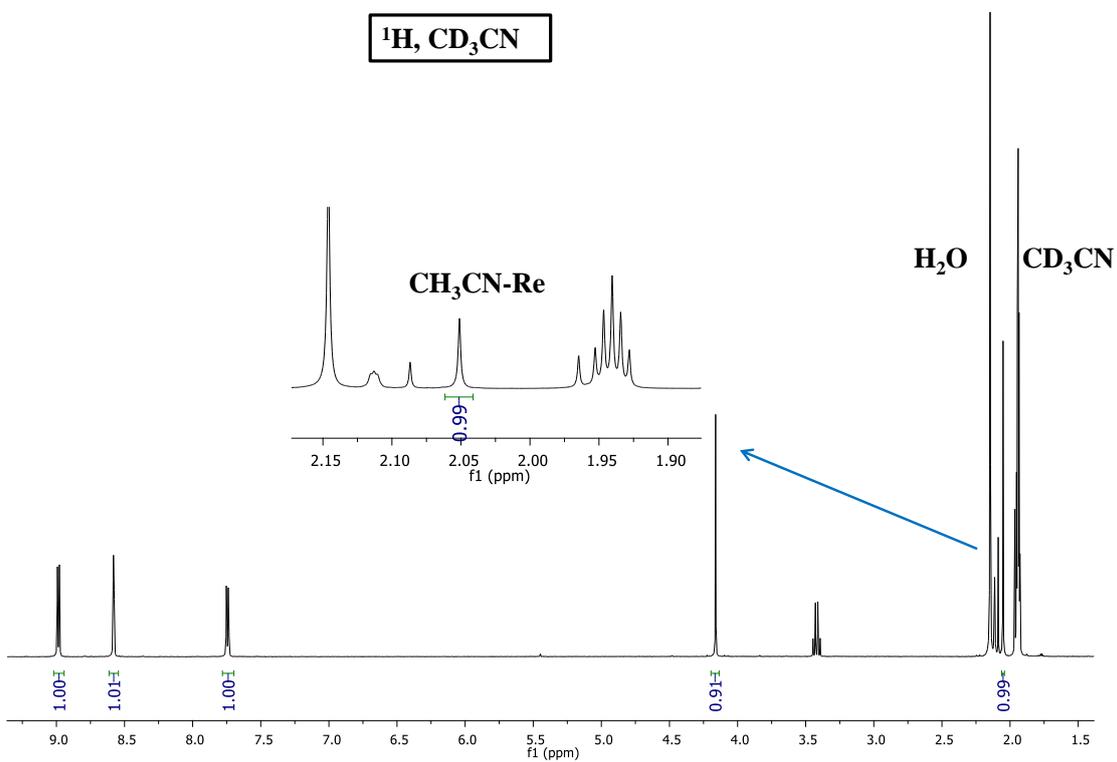
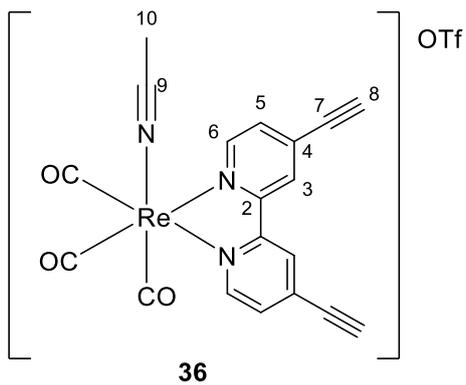


¹H, CD₃CN

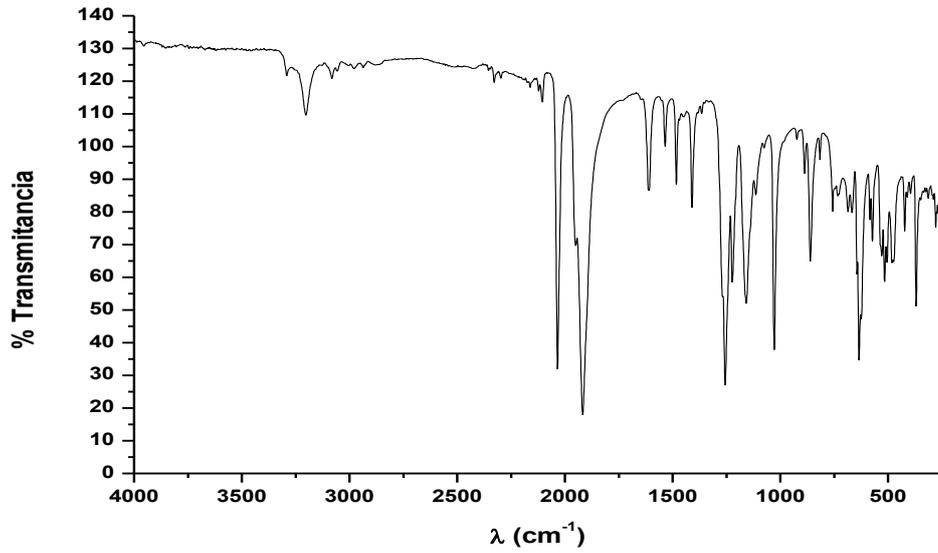
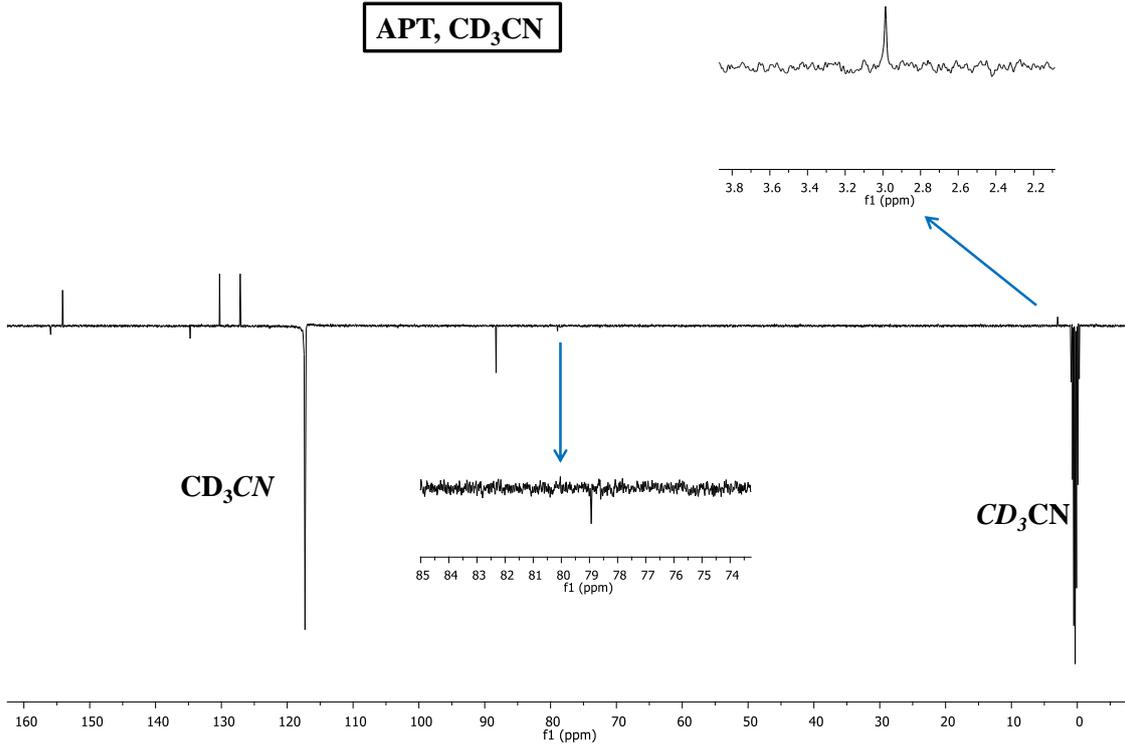


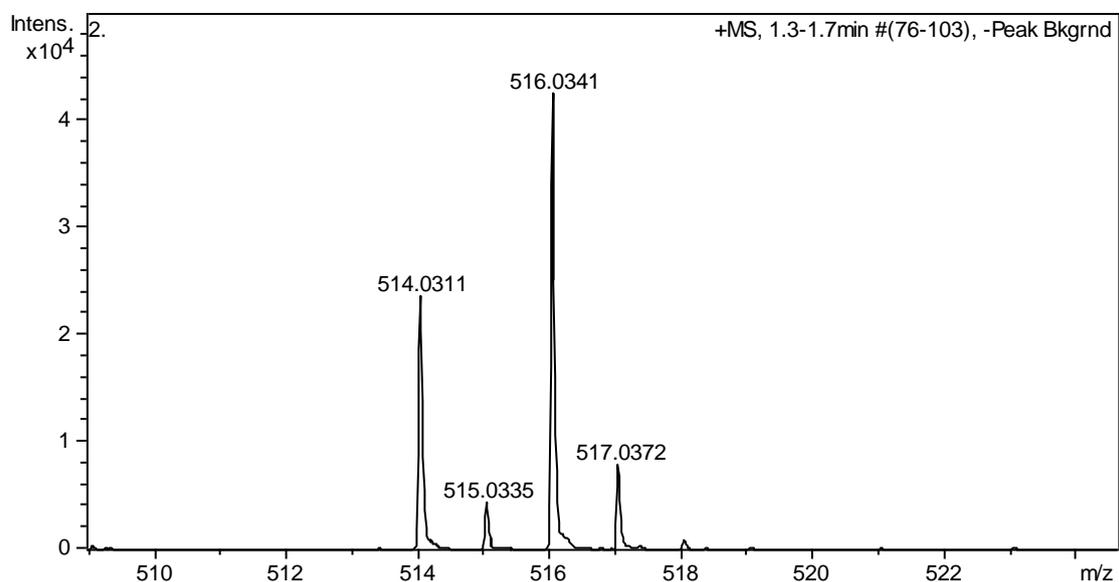
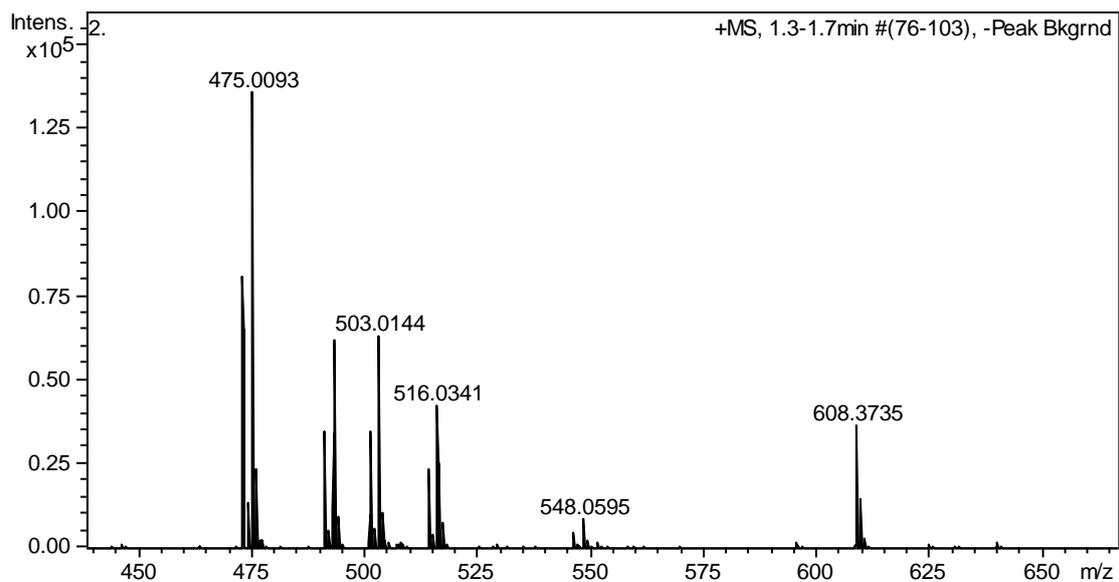






APT, CD₃CN





Datos cristalográficos para el complejo 36.

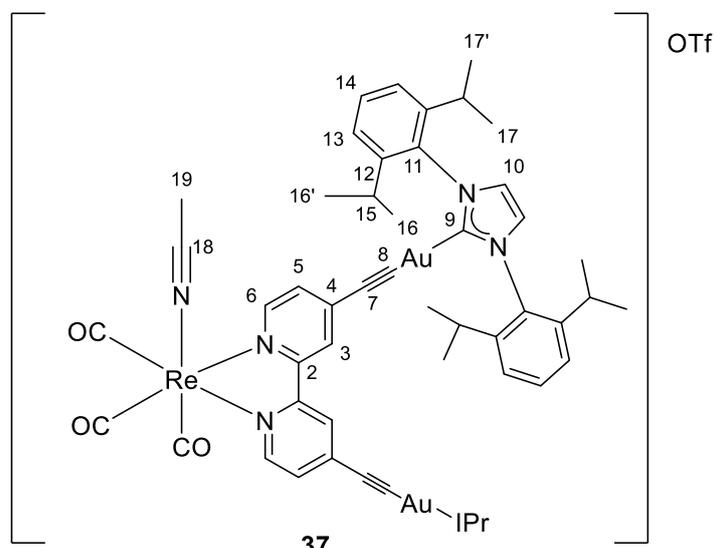
Empirical formula	C _{22.5} H ₁₇ F ₃ N ₃ O ₆ ReS	
Formula weight	1738.02	
Temperature	100(2) K	
Wavelength	0.71073 Å	
Crystal system, space group	Triclinic, P-1	
Unit cell dimensions	a = 11.620(14) Å	alpha = 95.266(2)°
	b = 14.6320(18) Å	beta = 101.316(2)°
	c = 16.484(2) Å	gamma = 110.790(2)°

Volume	2529.53 Å ³
Z	4
Calculated density	1.840 Mg/m ³
Absorption coefficient	4.951 mm ⁻¹
F(000)	1356
Crystal size	0.420 x 0.380 x 0.350 mm
Theta range for data collection	1.280 to 25.24 deg.
Limiting indices	-14<=h<=13, -17<=k<=17, -19<=l<=19
Reflections collected / unique	21803 / 9403 [R(int) = 0.0191]
Completeness to theta = 25.24	99.9 %
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents
Max. and min. transmission	0.2761 and 0.2302
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	9403 / 34 / 662
Goodness-of-fit on F ²	1.049
Final R indices [I>2σ(I)]	R1 = 0.0252, wR2 = 0.0352
R indices (all data)	R1 = 0.0556, wR2 = 0.0608
Largest diff. peak and hole	2.289 and -0.970 e. Å ⁻³

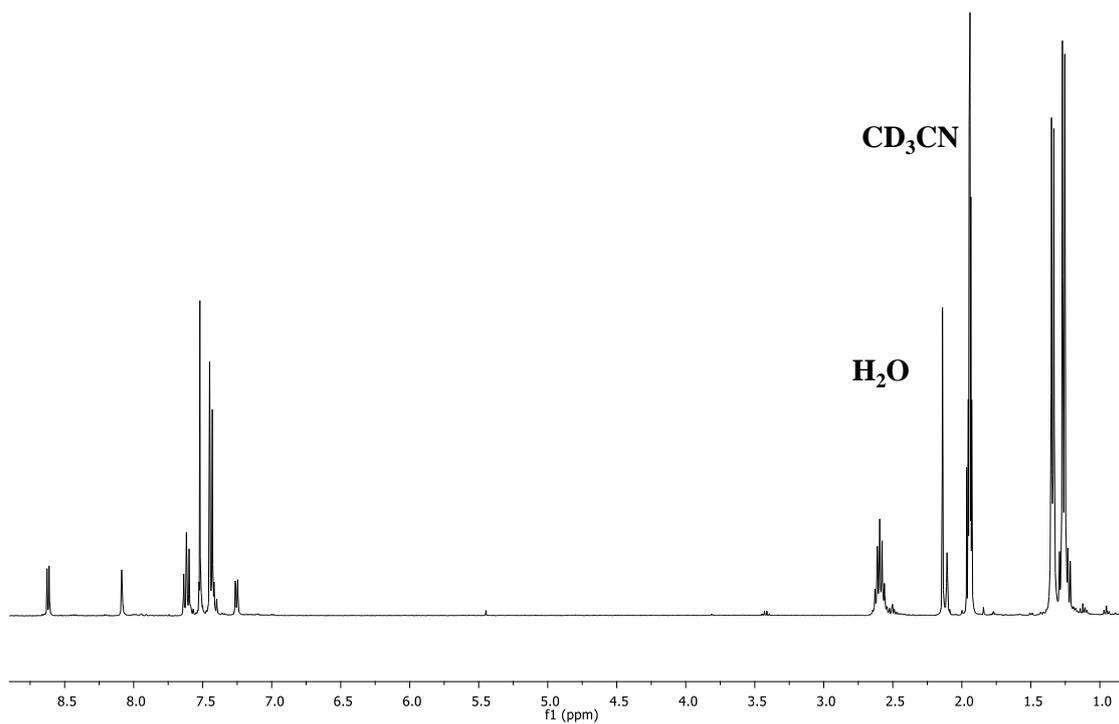
Longitudes de enlace [Å] y ángulos [deg] seleccionados para el complejo 36.

C(16)-C(17)	1.173(7)	N(2)-Re(1)-N(3)	75.3(1)
C(18)-C(19)	1.188(8)	C(4)-N(1)-Re(1)	175.2(3)
Re(1)-C(1)	1.920(4)	C(8)-C(16)-C(17)	177.1(5)
Re(1)-C(2)	1.932(5)	C(13)-C(18)-C(19)	176.9(5)
Re(1)-C(3)	1.926(5)	O(1)-C(1)-Re(1)	179.3(4)
Re(1)-N(1)	2.129(3)	O(2)-C(2)-Re(1)	177.9(4)
Re(1)-N(2)	2.159(3)	O(3)-C(3)-Re(1)	178.8(4)
Re(1)-N(3)	2.174(4)		
O(1)-C(1)	1.150(5)		

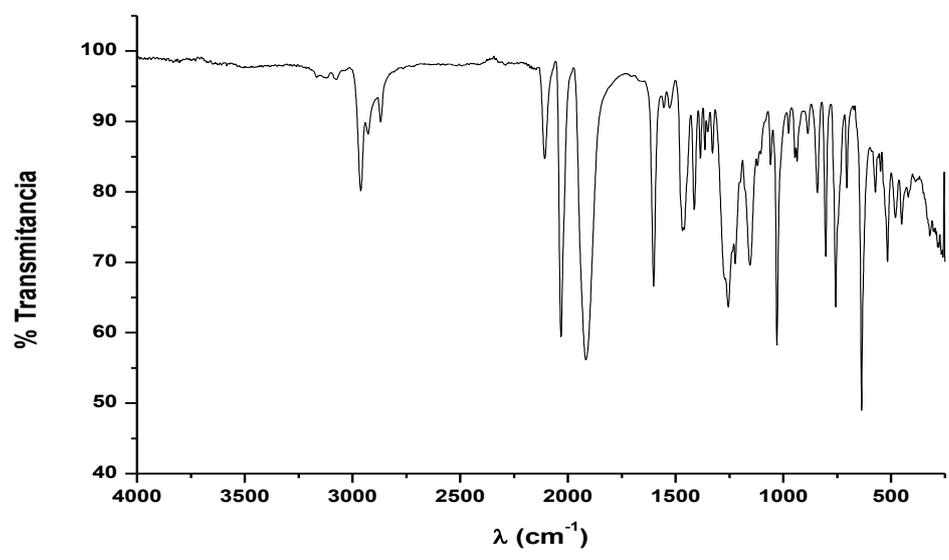
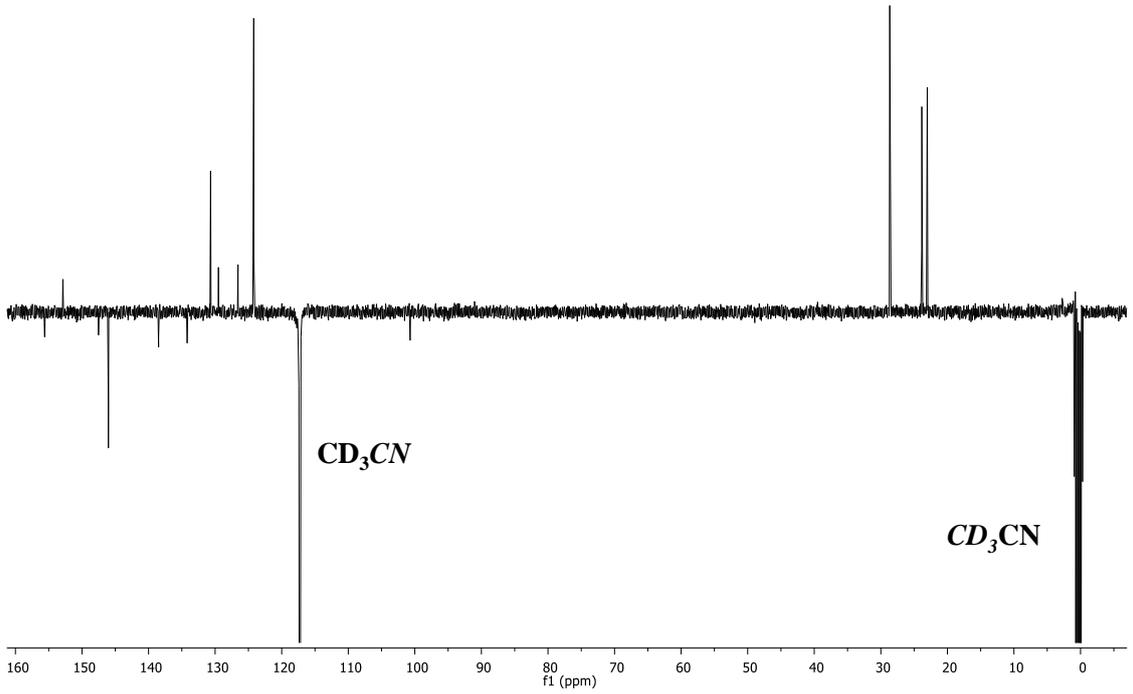
O(2)-C(2) 1.145(7)
O(3)-C(3) 1.146(6)

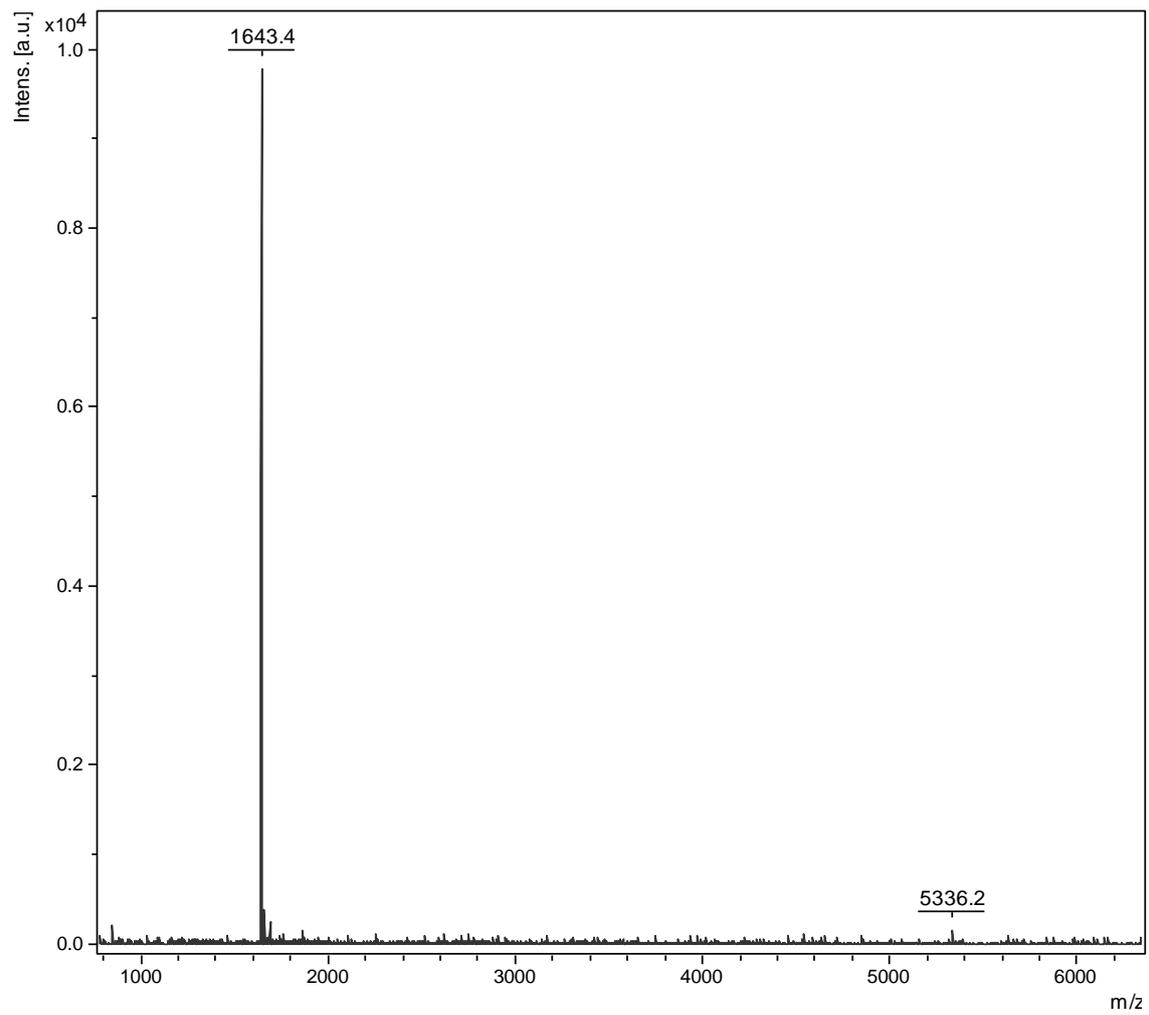


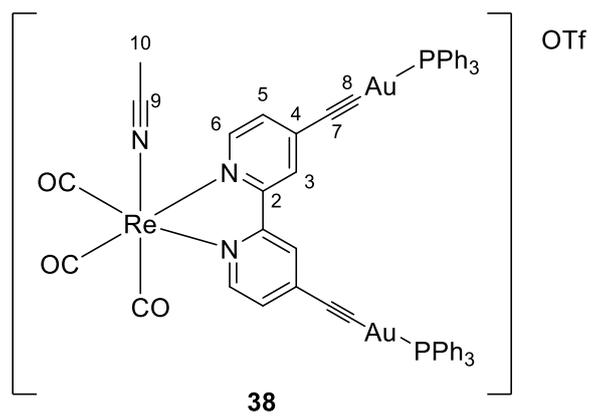
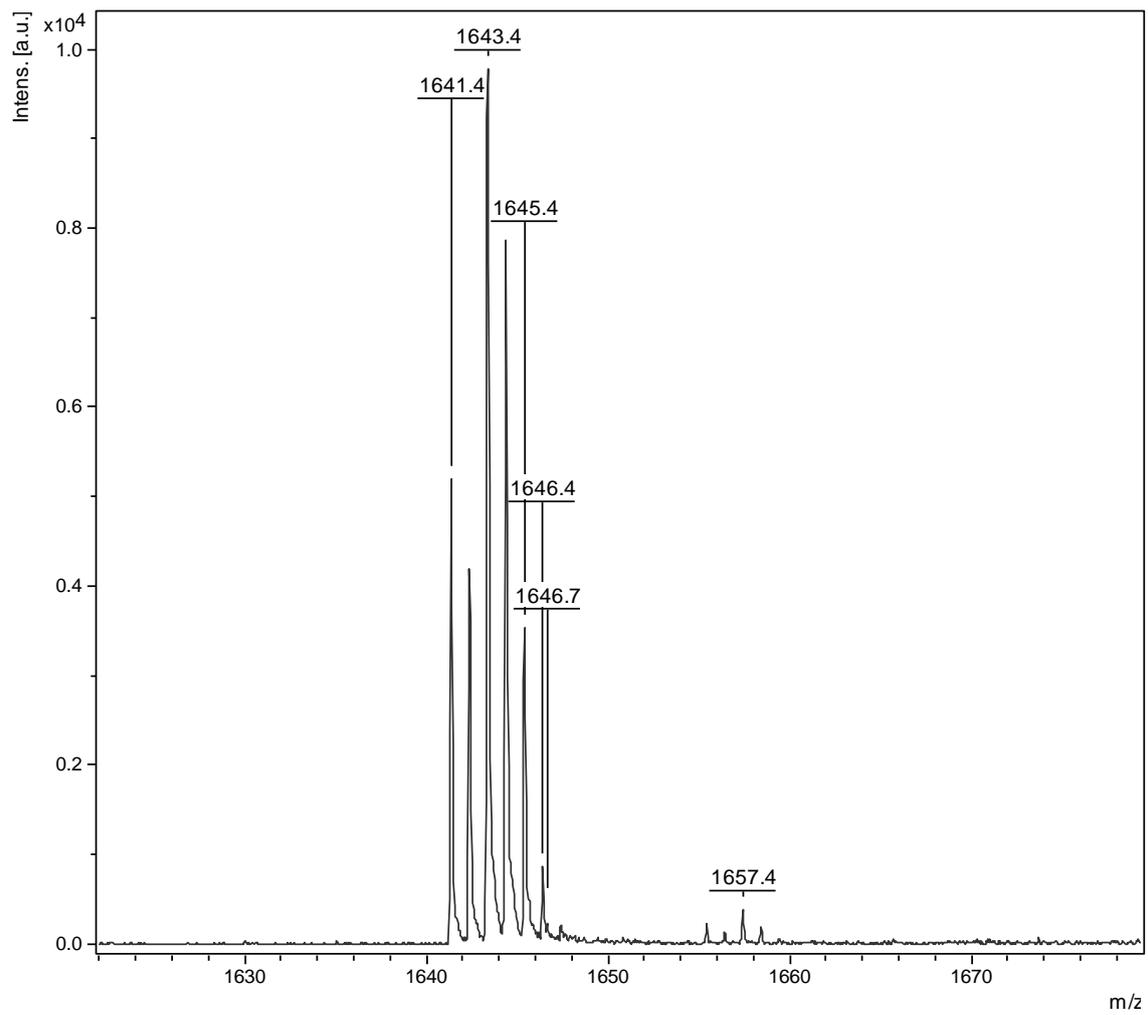
^1H , CD_3CN



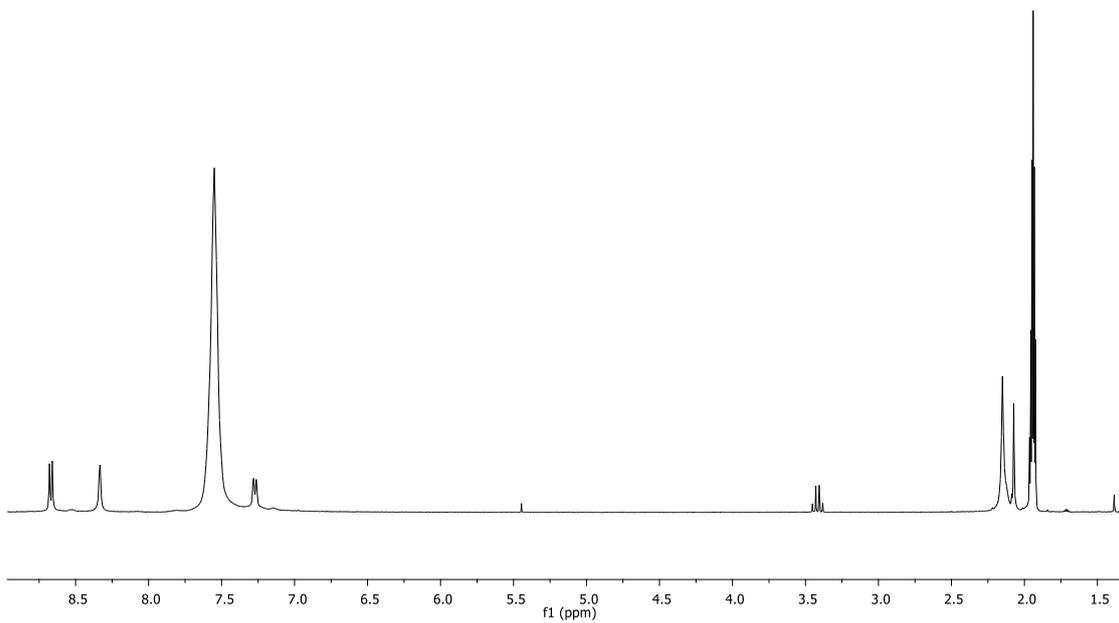
APT, CD₃CN



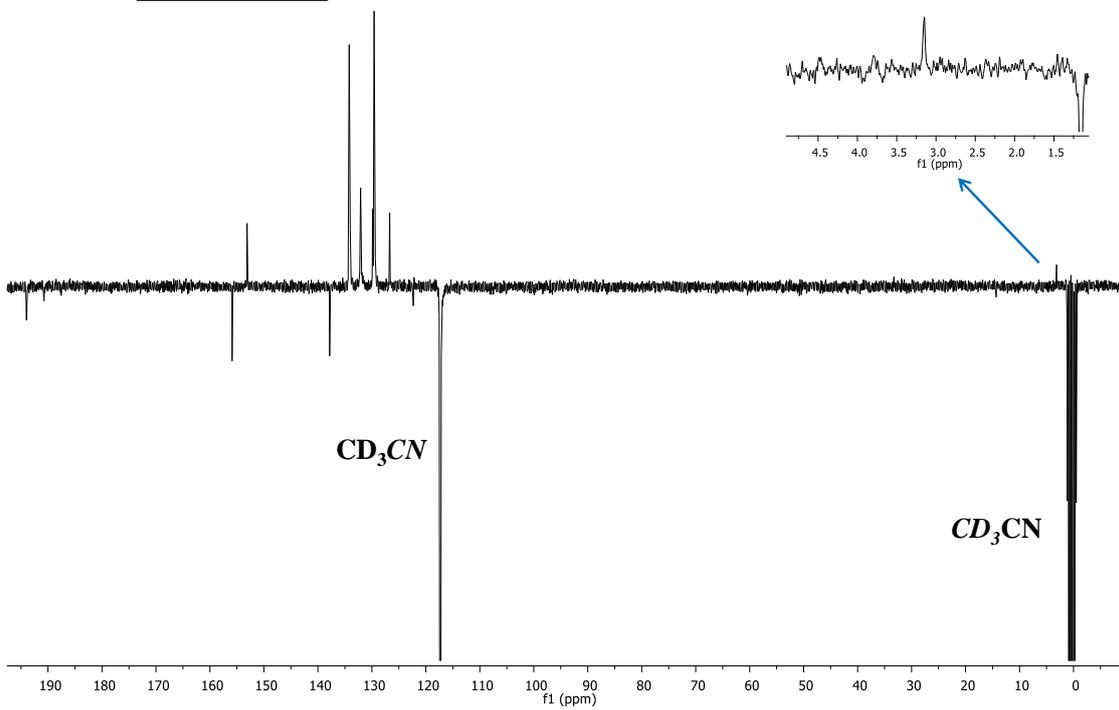




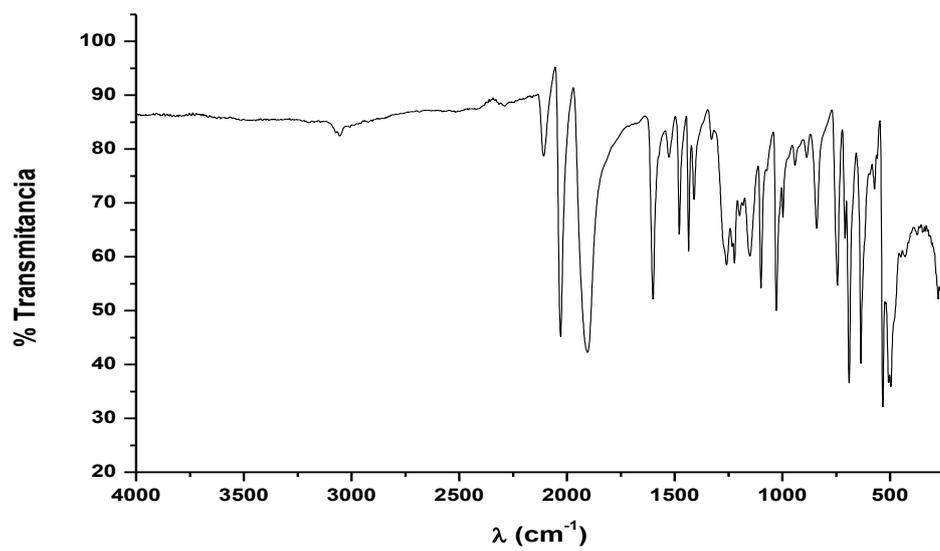
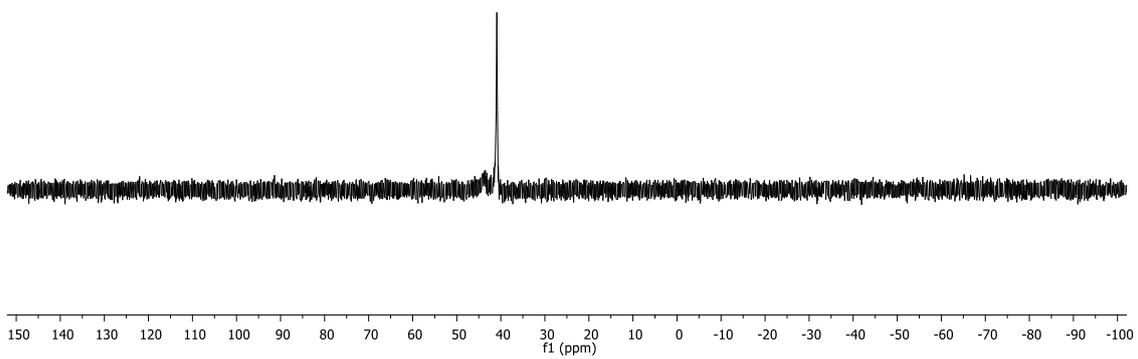
^1H , CD_3CN

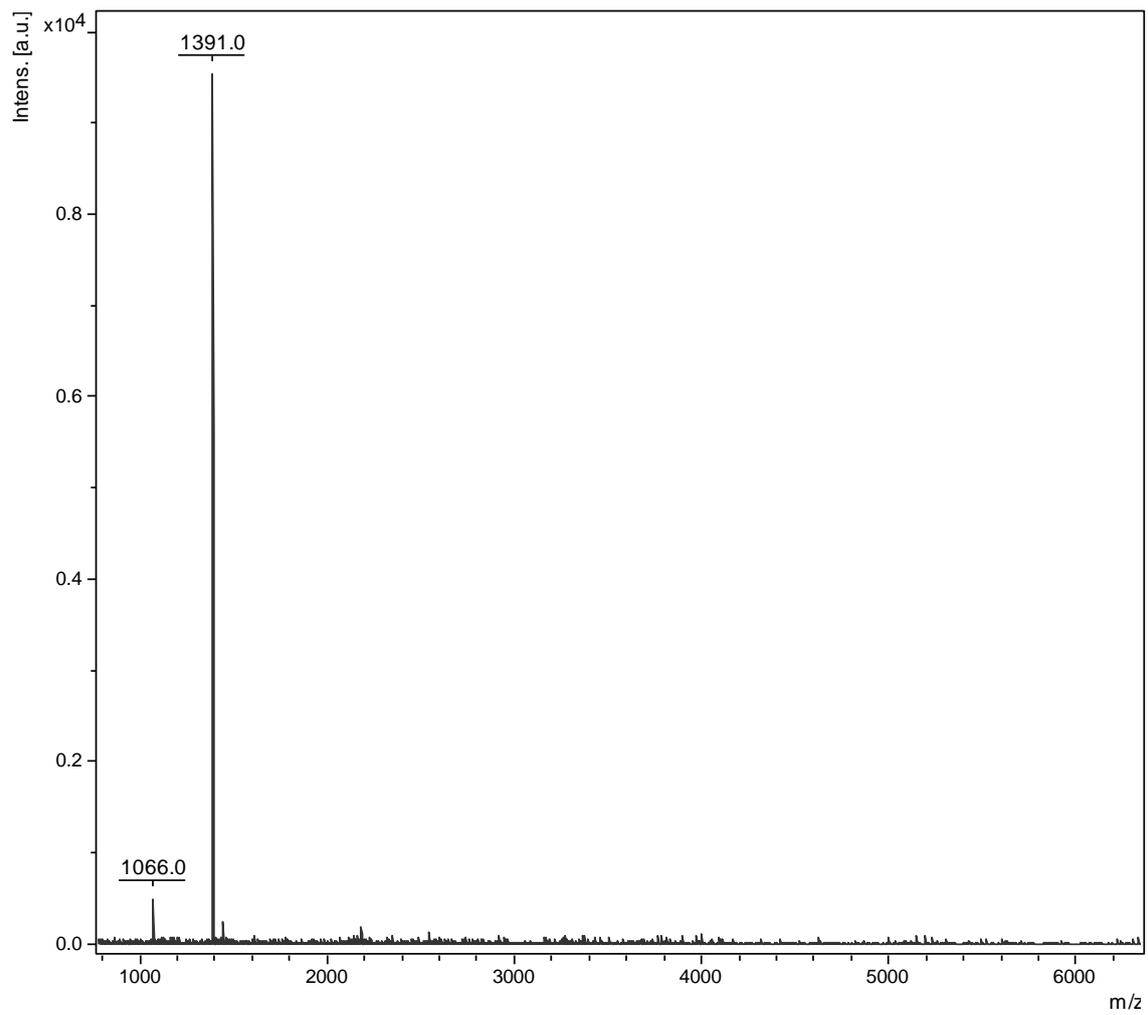


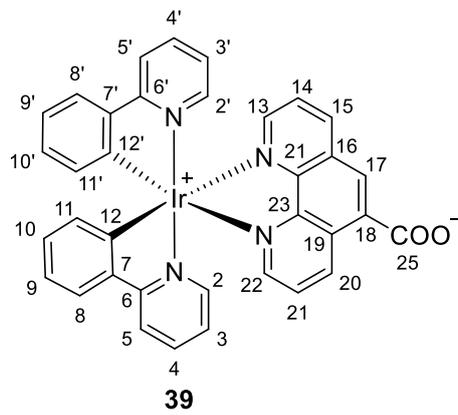
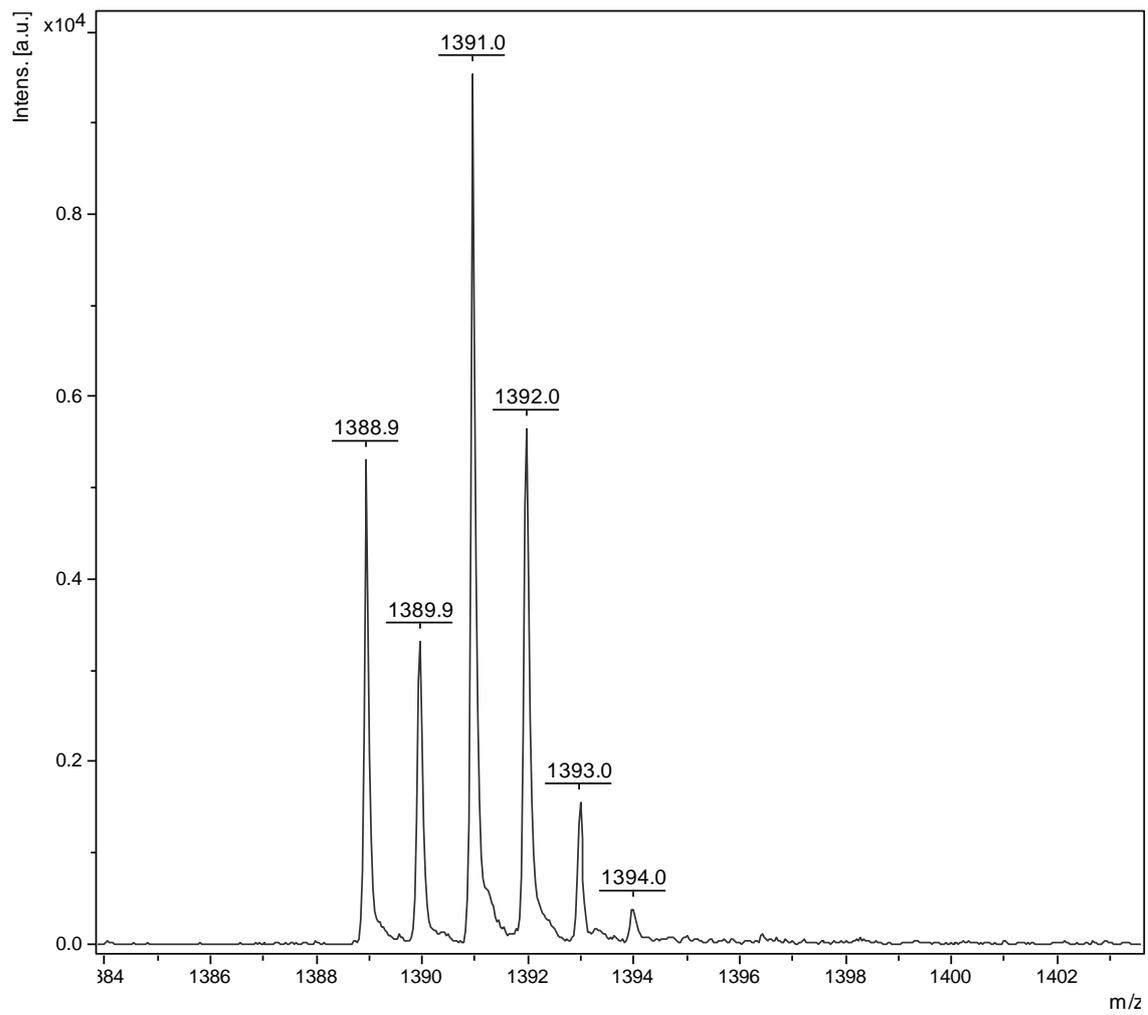
APT, CD_3CN



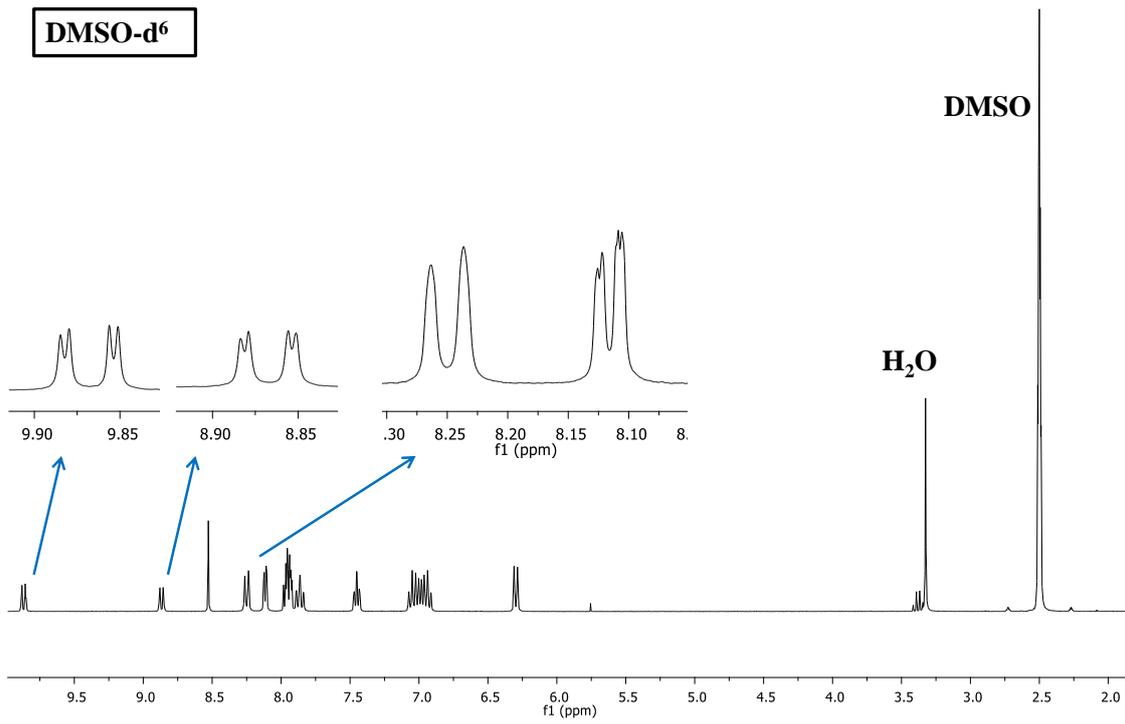
$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}, \text{CD}_3\text{CN}$



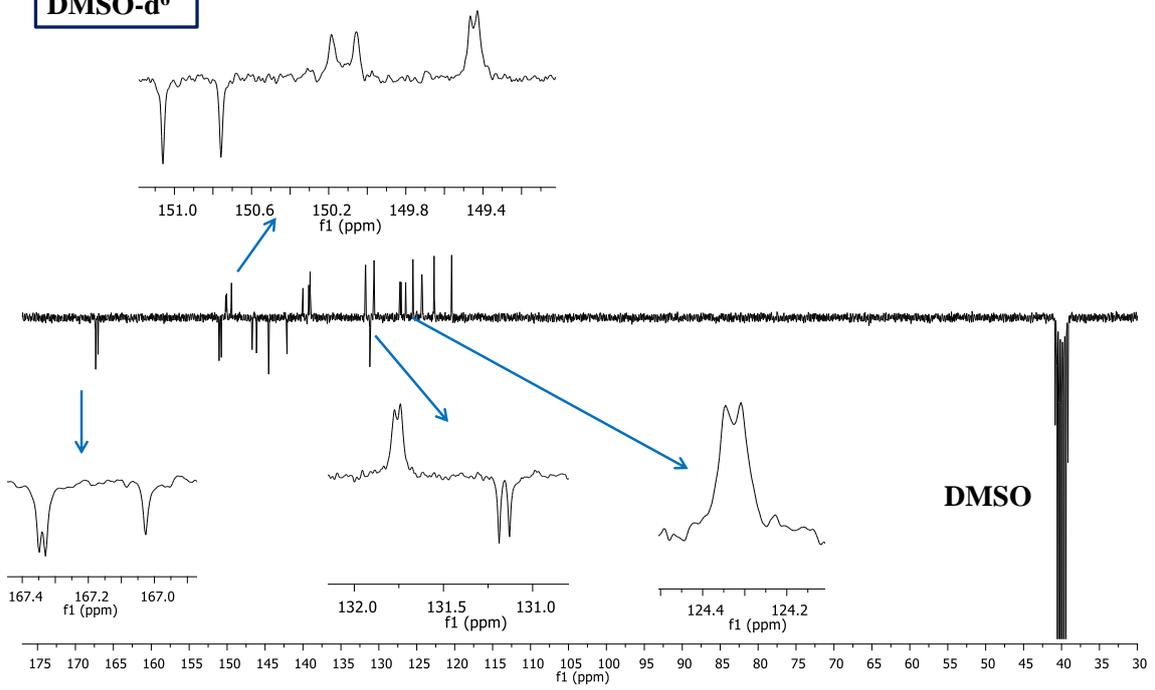


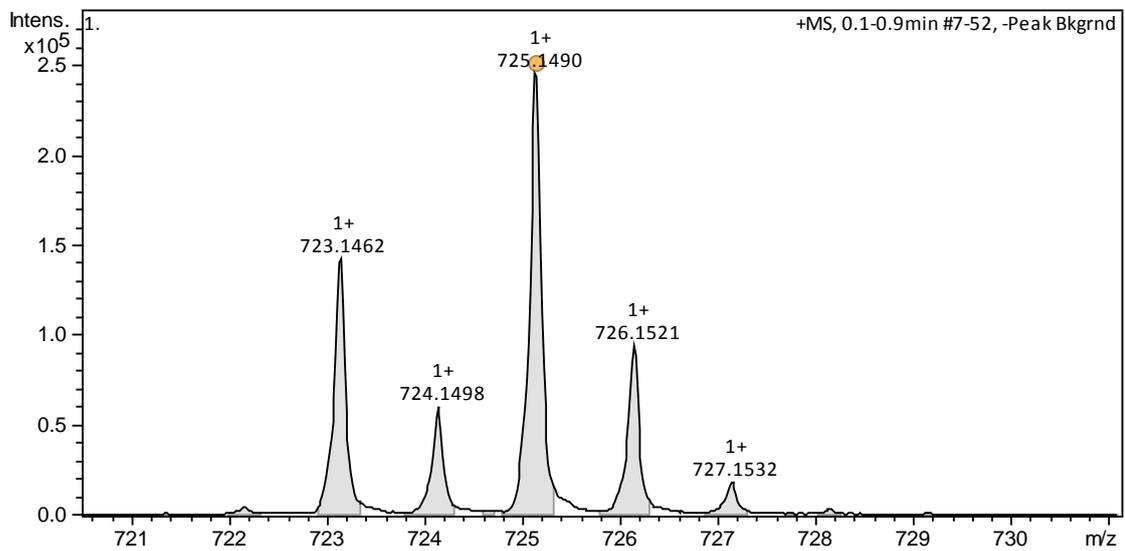
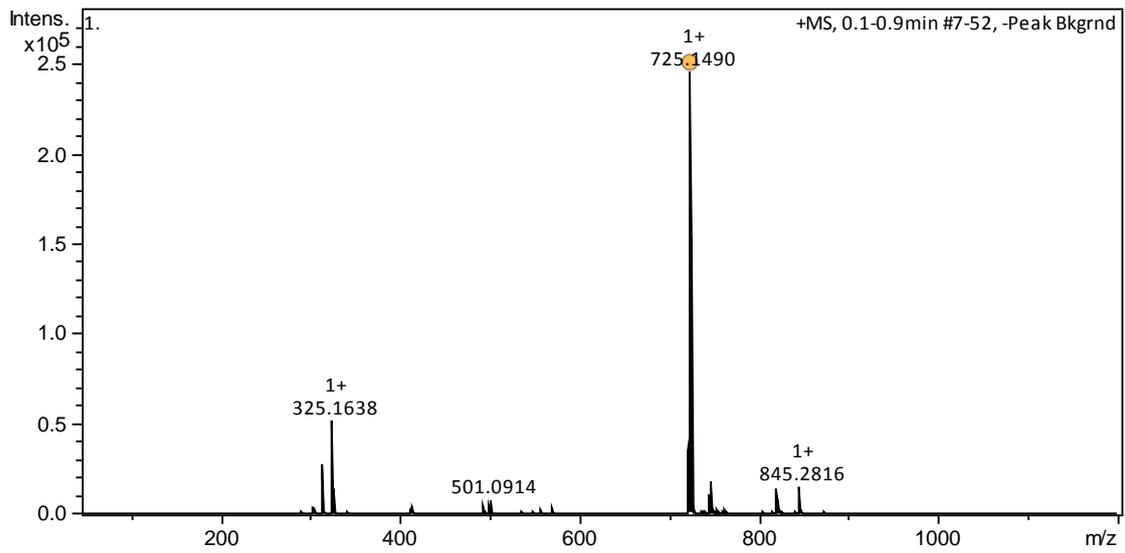
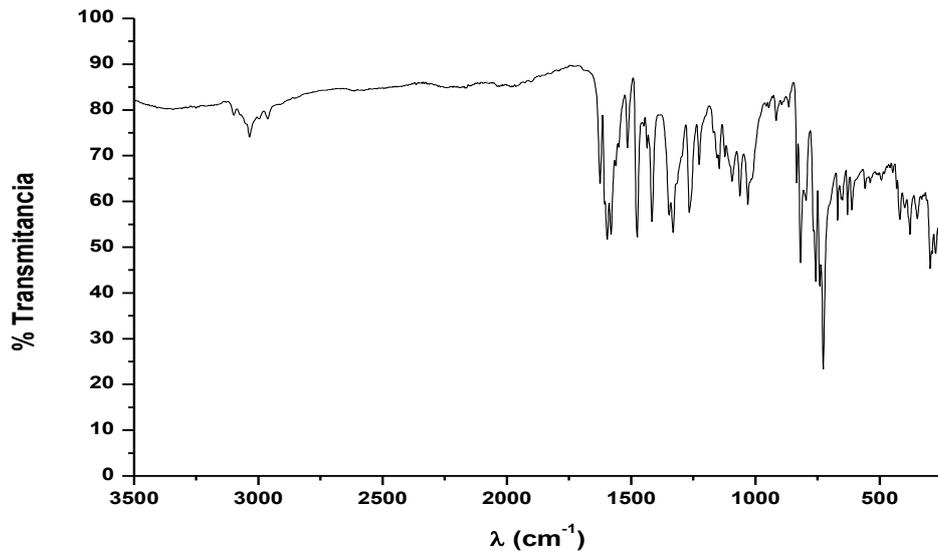


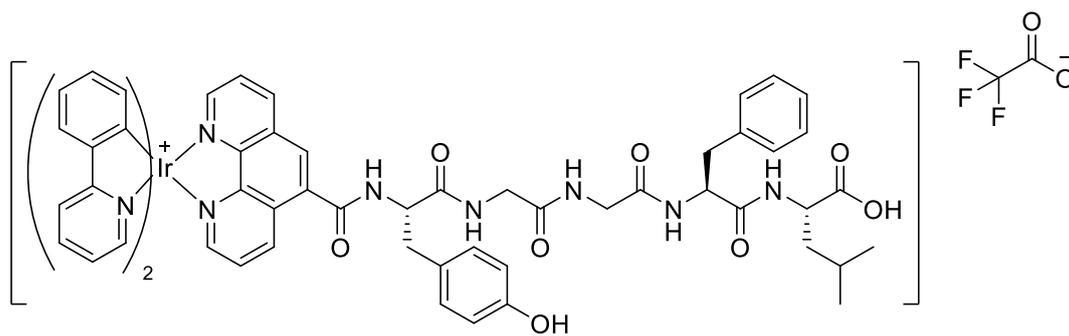
DMSO-d⁶



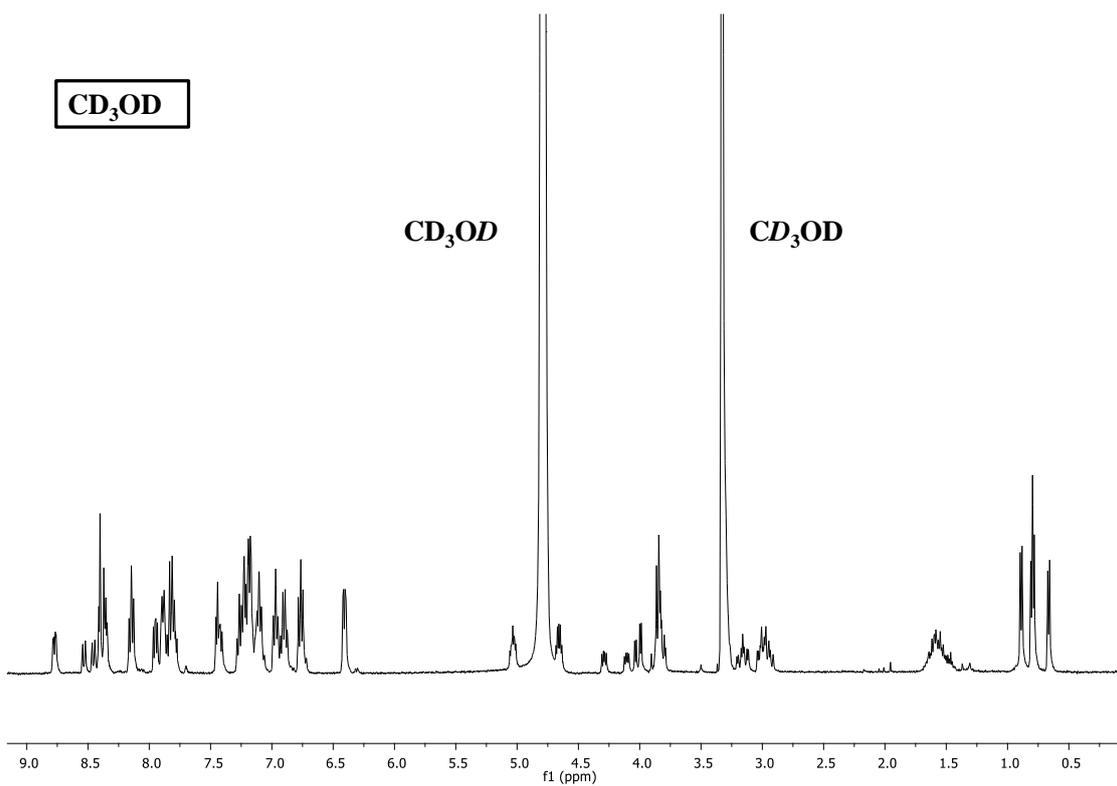
DMSO-d⁶



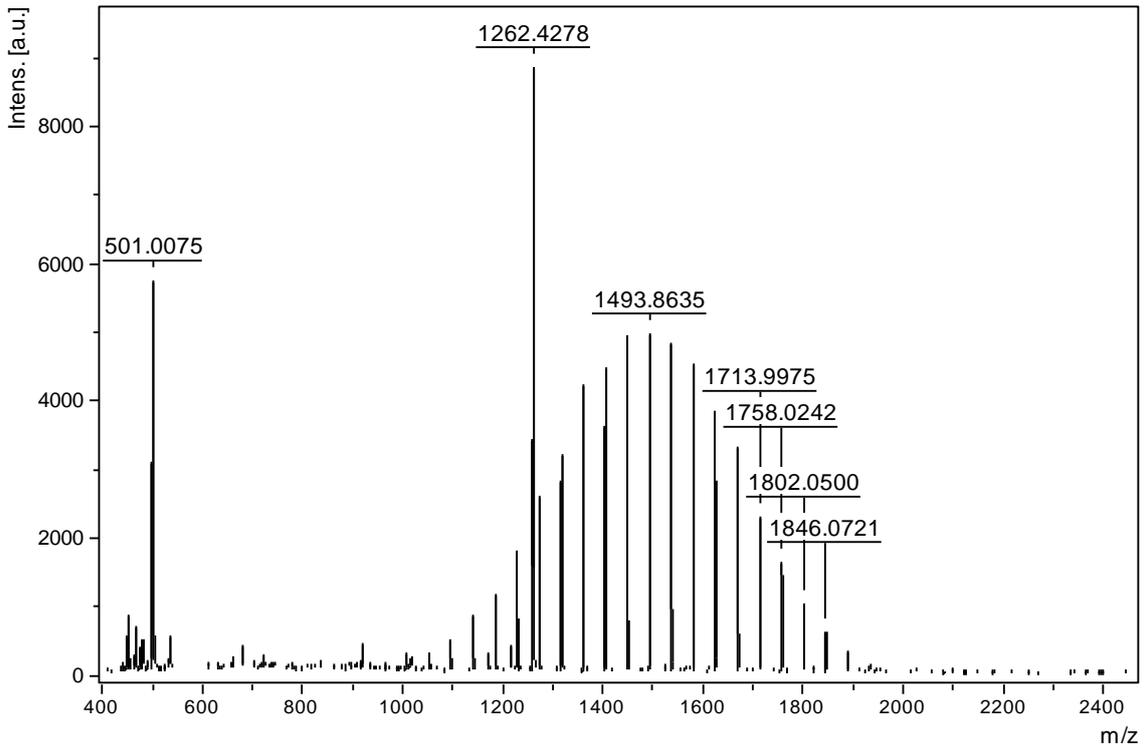
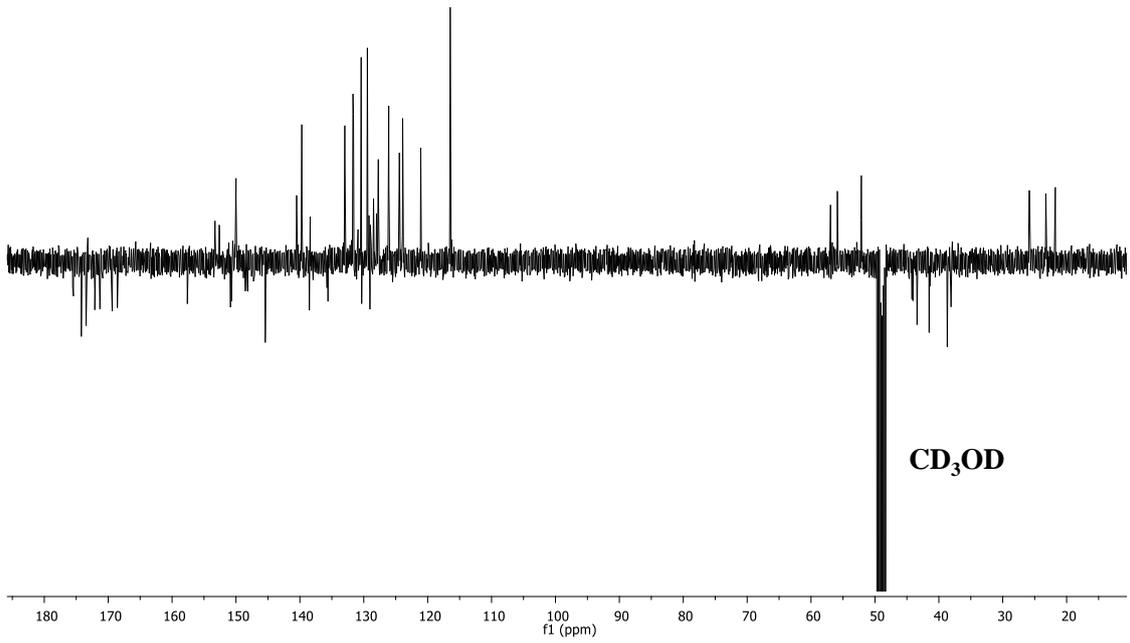


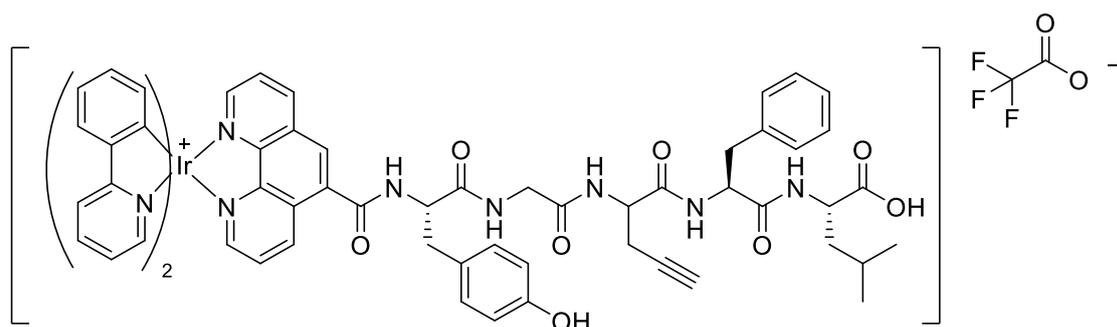
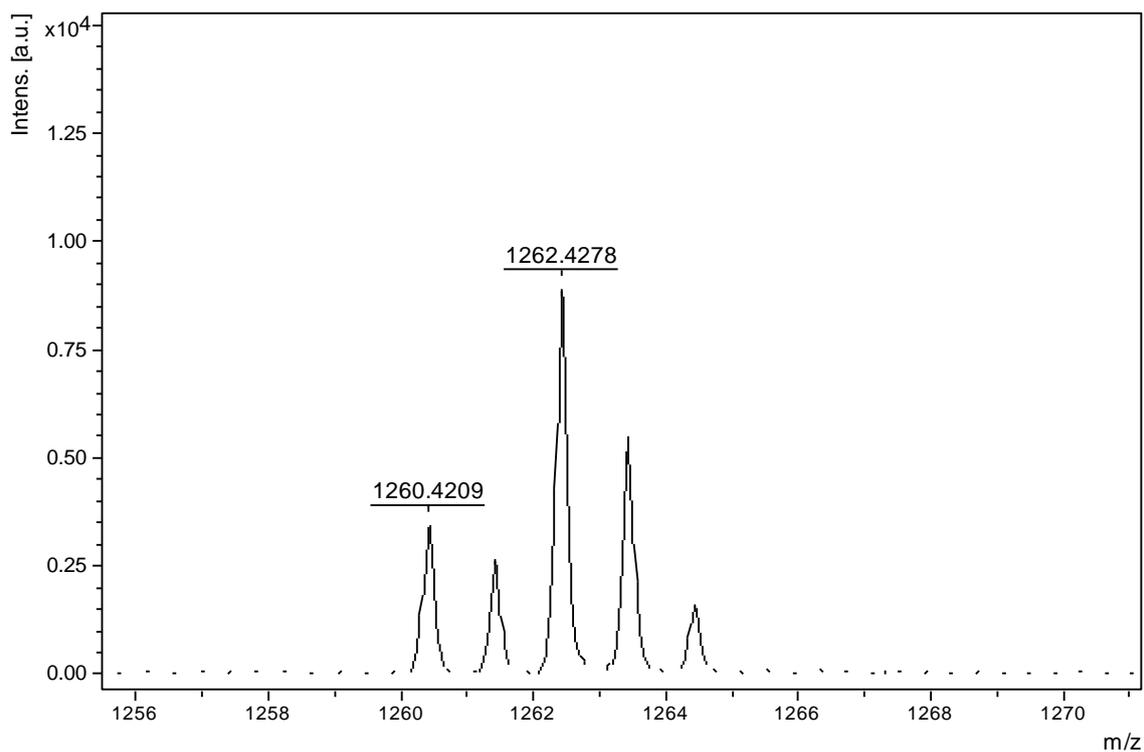


40

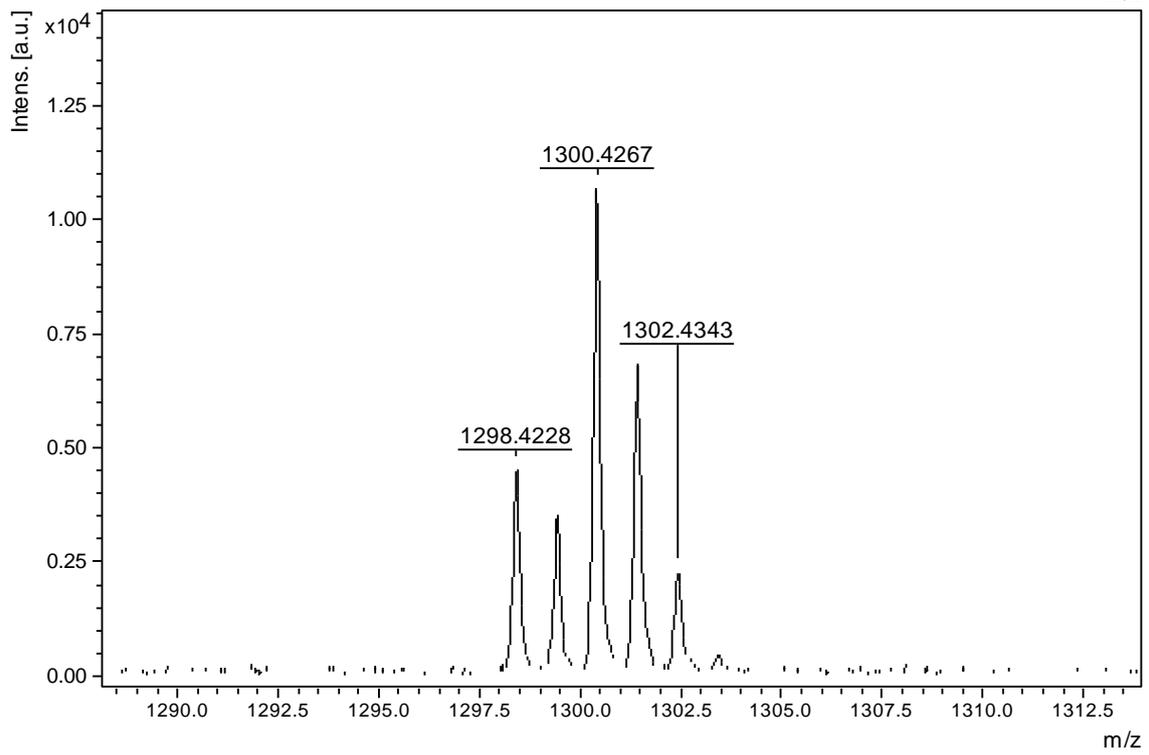
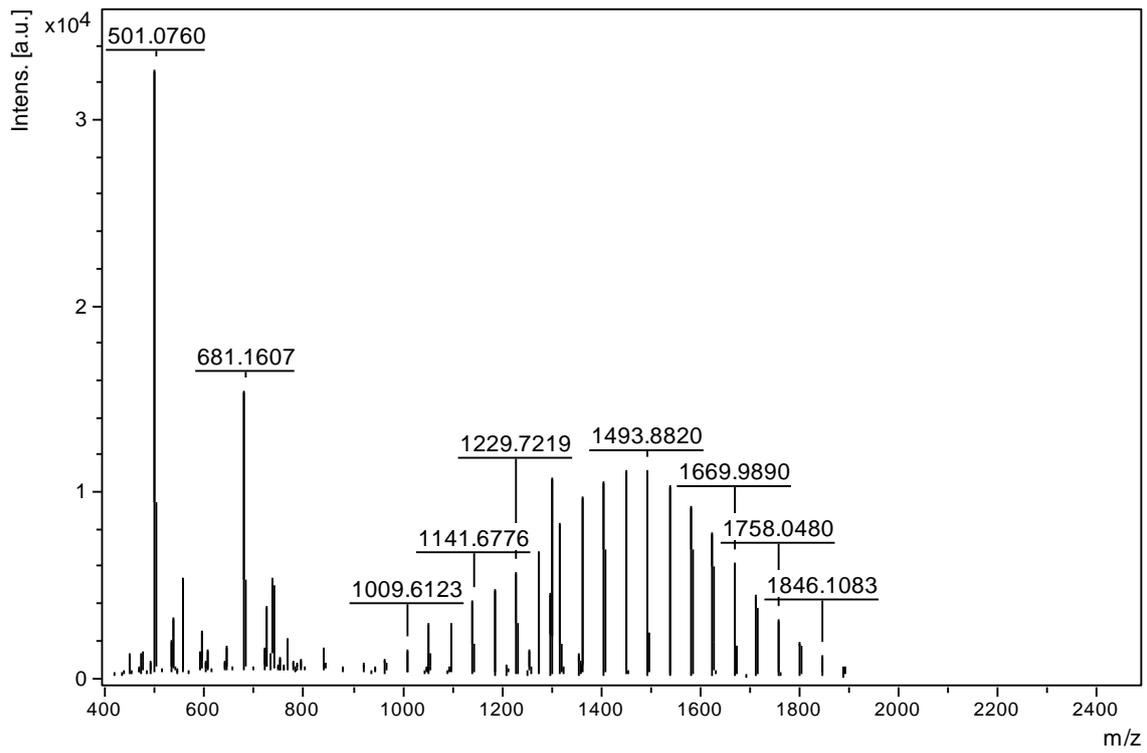


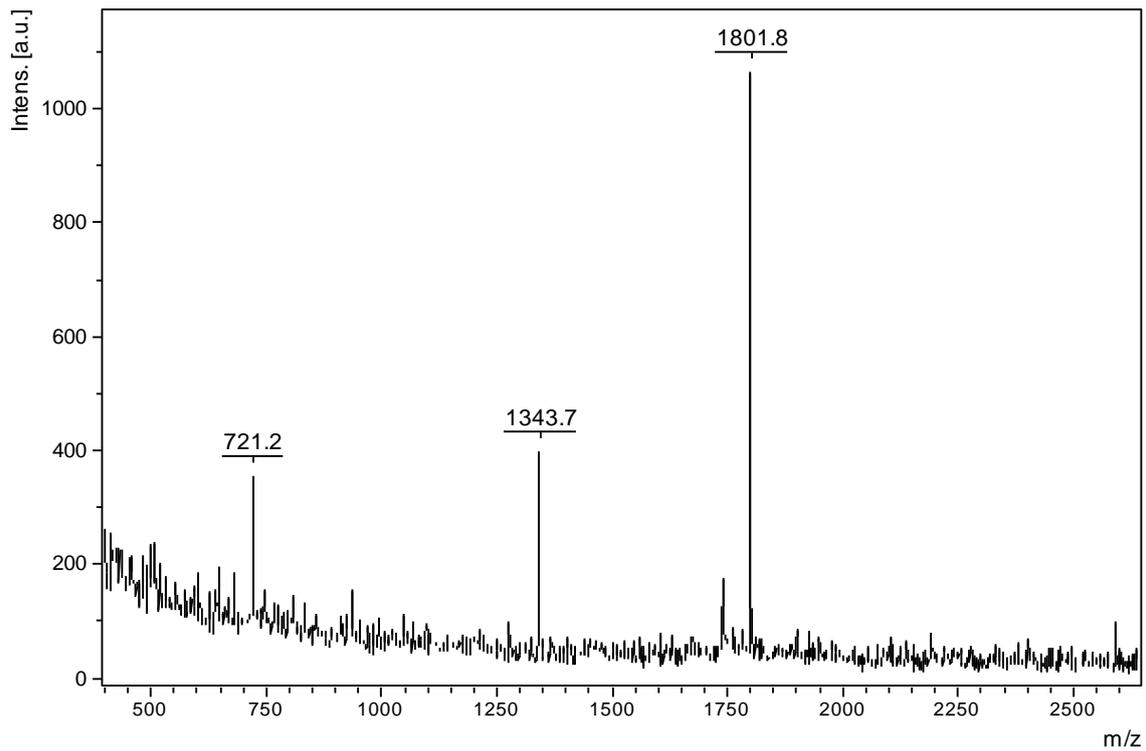
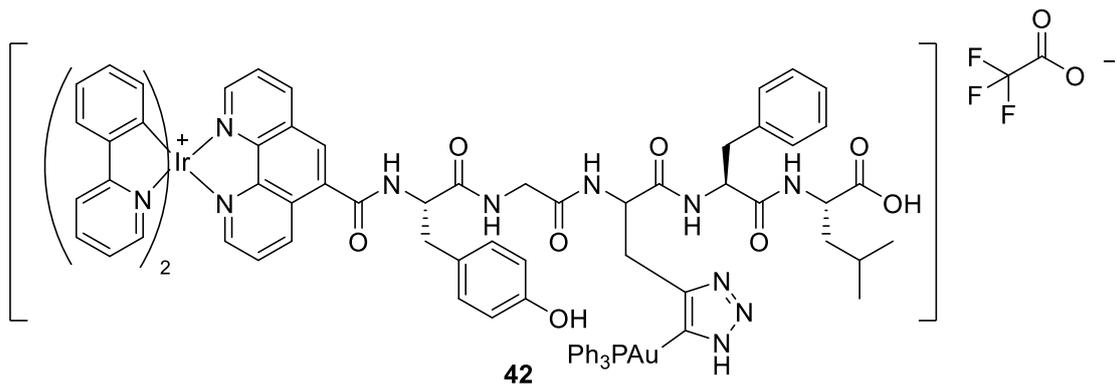
CD₃OD

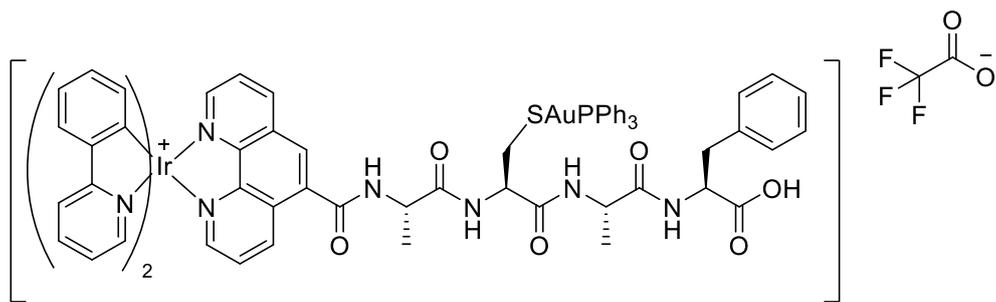
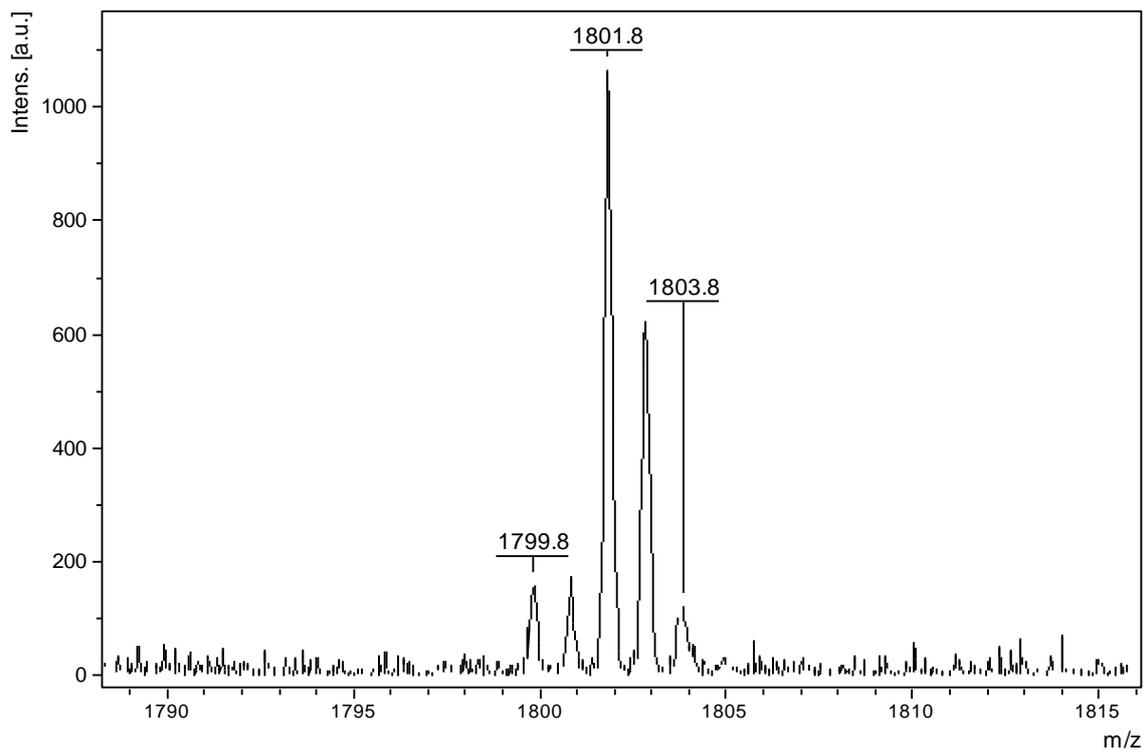




41







43

